

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2021

Mgr. Tomáš Malina

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE



Toxicita nanomateriálů na bázi uhlíku

Toxicity of carbon-based nanomaterials

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. TOMÁŠ MALINA

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Fyzikální chemie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2021

Školitel: prof. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně a že veškerá literatura je řádně citována. Dále prohlašuji, že mám hlavní autorský přínos v publikacích [ii], [iii], [v] a [ix] uvedených v seznamu autorových publikací, které jsou popsány v experimentální části předkládané disertační práce.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

V první řadě bych chtěl velice poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Radku Zbořilovi, za odborné vedení, cenné rady a konzultace, které mi poskytl nejen během psaní disertační práce, ale také během celého doktorského studia. Dále bych rád poděkoval Mgr. Kateřině Polákové, Ph.D. a prof. Ing. Blahoši Maršálkovi, Ph.D. za veškerou pomoc a cenné rady ohledně problematiky humánní a environmentální toxikologie uhlíkových nanomateriálů. Děkuji také kolegům z RCPTM a především Mgr. Martinu Petrovi, Ph.D. a Mgr. Ondřeji Malinovi, Ph.D. za příjemné pracovní prostředí a pohodu v kanceláři.

Obrovské poděkování pak patří mé rodině a především mé milované ženě Lucii za podporu, kterou mi po celou dobu studia poskytovala. Velice Vám děkuji a moc si toho vážím.

Seznam publikací, na nichž se autor této disertační práce podílel jako hlavní autor nebo spoluautor v průběhu doktorského studia (2017 – 2021) (seřazené chronologicky)

- [i] Balzerova, A.; Polakova, K.; **Malina, T.**; Belza, J.; Ranc, V.; Zboril, R. 2019. Cellular uptake of graphene acid by HEL and HELA cells studied by UV raman spectroscopy. NANOCON 2018 - Conference Proceedings, 10th Anniversary International Conference on Nanomaterials - Research and Application, 566-571.
- [ii] **Malina, T.**; Polakova, K.; Skopalik, J.; Milotova, V.; Hola, K.; Havrdova, M.; Tomankova, K.; Cmiel, V.; Sefc, L.; Zboril, R. 2019. Carbon dots for in vivo fluorescence imaging of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. Carbon, 152, 434-443.
- [iii] **Malina, T.**, Marsalkova, E., Hola, K., Tucek, J., Scheibe, M., Zboril, R. and Marsalek, B. 2019. Toxicity of graphene oxide against algae and cyanobacteria: Nanoblade-morphology-induced mechanical injury and self-protection mechanism. Carbon 155, 386-396.
- [iv] Sima, M.; Vrbova, K.; Zavodna, T.; Honkova, K.; Chvojkova, I.; Ambroz, A.; Klema, J.; Rossnerova, A.; Polakova, K.; **Malina, T.**; Belza, J.; Topinka, J.; Rossner, P., Jr. 2020. The differential effect of carbon dots on gene expression and dna methylation of human embryonic lung fibroblasts as a function of surface charge and dose. International Journal of Molecular Sciences, 21, 1-23.
- [v] **Malina, T.**, Marsalkova, E., Hola, K., Zboril, R. and Marsalek, B. 2020. The environmental fate of graphene oxide in aquatic environment-Complete mitigation of its acute toxicity to planktonic and benthic crustaceans by algae. Journal of Hazardous Materials, 399, 123027.

- [vi] Svoboda, L.; Bednar, J.; Dvorsky, R.; Panacek, A.; Hochvaldova, L.; Kvitek, L.; **Malina, T.**; Konvickova, Z.; Henych, J.; Nemeckova, Z.; Vecerova, R.; Kolar, M.; Matysek, D.; Vilamova, Z. 2021. Crucial cytotoxic and antimicrobial activity changes driven by amount of doped silver in biocompatible carbon nitride nanosheets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 202, 111680.
- [vii] Panáček, D.; Hochvaldová, L.; Bakandritsos, A.; **Malina, T.**; Langer, M.; Belza, J.; Martincová, J.; Večeřová, R.; Lazar, P.; Poláková, K.; Kolařík, J.; Válková, L.; Kolář, M.; Otyepka, M.; Panáček, A.; Zbořil, R. 2021. Silver Covalently Bound to Cyanographene Overcomes Bacterial Resistance to Silver Nanoparticles and Antibiotics. *Advanced Science*, 2003090.
- [viii] Vančo, J., Trávníček, Z., Hošek, J., **Malina, T.**, Dvořák, Z. 2021. Copper(II) Complexes Containing Natural Flavonoid Pomiferin Show Considerable in Vitro Cytotoxicity and Anti-Inflammatory Effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 7626.
- [ix] **Malina, T.**; Poláková, K.; Hirsch, C.; Svoboda, L.; Zbořil, R. 2021. Toxicity of Carbon Nanomaterials—Towards Reliable Viability Assessment via New Approach in Flow Cytometry. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 7750.

Prezentace na konferencích

1. Ústní prezentace:

International Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology – ICONAN 2018, Řím, Itálie 26 – 28. srpna 2018: „*Positively charged carbon dots for mesenchymal stem cells imaging*“.

NanoSafe 2018, Grenoble, Francie 5 – 9. listopadu 2018: „*Multimodal toxic mechanism of Graphene Oxide to Algae and Cyanobacteria – The role of surface oxidation*“.

Studentská vědecká soutěž O cenu děkana, Olomouc, Česká Republika 7. července 2020: „*The environmental fate of graphene oxide in aquatic environment—Complete mitigation of its acute toxicity to planktonic and benthic crustaceans by algae*“. 1. místo v doktorské kategorii sekce Biologie a ekologie.

2. Posterová prezentace:

Nanocon 2017, Brno, Česká Republika 18 – 20. říjen 2017: „*Graphene Acid - New Biocompatible Nanocarrier for Bioapplication*“.

Nanocon 2018, Brno, Česká Republika 17 – 19. říjen 2018: „*Comparison of Cytotoxicity of Two Types of Carbon Dots on Lung Normal and Tumor Cells*“.

European Federation of Biotechnology – EFB 2021, Virtual conference, 10 – 14 května 2021: „*Environmental fate of graphene oxide in aquatic environment – complete mitigation of acute toxicity against planktonic and benthic crustaceans by algae*“.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Tomáš Malina
Název práce:	Toxicita nanomateriálů na bázi uhlíku
Typ práce:	Disertační práce
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie, UP v Olomouci
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D.
Rok obhajoby:	2021
Počet stran včetně příloh:	174
Počet příloh:	4
Jazyk:	Čeština

Abstrakt

Předkládaná disertační práce je zaměřena na nové typy uhlíkových nanomateriálů (Carbon nanomaterials – CNMs), které díky svým mimořádným vlastnostem nachází uplatnění v široké škále biomedicínských a environmentálních aplikací. S tím jde však ruku v ruce otázka jejich bezpečného použití v těchto oblastech, a proto se práce zabývá jak humánní, tak environmentální toxicitou CNMs. V části humánní toxicity byla demonstrována klíčová role *in vitro* testů akutní toxicity CNMs pro selekci bezpečné koncentrace, která může být následně využita pro biomedicínskou aplikaci. Současně byla studována interference CNMs s metodami akutní *in vitro* toxicity a především možnost jejího překonání pro získání spolehlivých výsledků, což je klíčové pro budoucí bezpečnou a udržitelnou aplikaci CNMs v biomedicínské oblasti. Ve druhé části práce byla zkoumána environmentální toxicita grafen oxidu (GO) vůči organismům z různých úrovní trofického řetězce vodního ekosystému. Byla pozorována silná závislost povrchové oxidace na toxickém efektu GO. Na druhou stranu, i velmi jednoduché organismy byly schopny se vůči škodlivému účinku GO úspěšně bránit, což naznačuje, že GO nemusí být pro organismy ve vodním prostředí nebezpečný i ve velmi vysokých koncentracích (mg/L).

Bibliographic identification

Author:	Mgr. Tomáš Malina
Type of thesis:	Dissertation thesis
Title of thesis:	Toxicity of carbon-based nanomaterials
Department:	Department of Physical Chemistry, UP in Olomouc
Supervisor:	prof. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D.
The year of presentation:	2021
Number of pages incl.append.:	174
Number of appendices:	4
Language:	Czech

Abstract

The dissertation thesis focuses on new types of carbon nanomaterials (CNMs), which are used in a wide range of biomedical and environmental applications due to their extraordinary properties. However, their usage goes hand in hand with the question of their safety in these fields, therefore the thesis addresses both the human and environmental toxicity of CNMs. In the human toxicity part, the key role of *in vitro* acute toxicity tests of CNMs for the selection of safe concentrations that can be subsequently used for biomedical application was demonstrated. Furthermore, the interference of CNMs with acute *in vitro* toxicity assays was studied and, more importantly, the possibility of overcoming interference was described to obtain reliable results. That is a crucial premise for future safe and sustainable application of CNMs in the biomedical field. In the second part, the environmental toxicity of graphene oxide (GO) towards organisms from different trophic levels of the aquatic ecosystem was investigated. A strong dependence of surface oxidation on the toxic effect of GO was observed. On the other hand, even very simple organisms were able to defend themselves and successfully mitigate harmful effect of GO, suggesting that GO may not be hazardous to organisms in the aquatic environment even at very high concentrations (mg/L).

Seznam obrázků a tabulek

Obrázek č. 1	Hlavní typy uhlíkových nanomateriálů
Obrázek č. 2	Proces syntézy GO
Obrázek č. 3	Proces syntézy GA a GCN a porovnání jejich funkcionalizace s GO
Obrázek č. 4	Nejnovější směry v bioaplikacích uhlíkových teček
Obrázek č. 5	<i>In vitro</i> a <i>In vivo</i> fluorescenční pozorování uhlíkových teček
Obrázek č. 6	Příklad PTT <i>in vivo</i> aplikace uhlíkových teček
Obrázek č. 7	Příklad technologií pro odsolování vody využívající GO
Obrázek č. 8	Komplexní charakterizace vzorku QCDS
Obrázek č. 9	<i>In vitro</i> cytotoxicita MSCs značených 24 h QCDS
Obrázek č. 10	Fluorescenční mikroskopie MSCs značených 100 $\mu\text{g/ml}$ QCDS
Obrázek č. 11	<i>In vivo</i> fluorescenční pozorování QCD-značených MSCs
Obrázek č. 12	Mikroskopie a MTT test BJ buněk značených 24 h CDs, g-C ₃ N ₄ a GA.
Obrázek č. 13	Překonání interference CDs v LIVE/DEAD analýze průtokové cytometrie BJ buněk
Obrázek č. 14	Překonání interference g-C ₃ N ₄ v LIVE/DEAD analýze průtokové cytometrie BJ buněk
Obrázek č. 15	Překonání interference GA v LIVE/DEAD analýze průtokové cytometrie BJ buněk

Obrázek č. 16	Schéma přípravy třech systémů GOs s různým stupněm povrchové oxidace
Obrázek č. 17	Komplexní charakterizace třech systémů GOs
Obrázek č. 18	Test růstové inhibice řas a sinic po značení GOs
Obrázek č. 19	Analýza mechanismu interakce mezi buňkami řas a GOs pomocí průtokové cytometrie
Obrázek č. 20	Analýza adsorpce živin GOs z média a mikroskopická analýza interakce mezi buňkami řas a GOs
Obrázek č. 21	Změny v produkci proteinů a sacharidů řas a sinic po značení GOs
Obrázek č. 22	Viabilita vodních korýšů po značení GOs
Obrázek č. 23	Mikroskopie vodních korýšů a Ramanova spektra jejich střev a výkalů po značení GOs
Obrázek č. 24	Analýza oxidačního stresu <i>Daphnia magna</i> po značení GOs
Obrázek č. 25	Viabilita vodních korýšů po značení GOs s přidaným krokem předinkubace GOs s řasami
Obrázek č. 26	Mikroskopie vodních korýšů a Ramanova spektra jejich střev a výkalů po značení GOs s přidaným krokem předinkubace GOs s řasami
Obrázek č. 27	Analýza oxidačního stresu <i>Daphnia magna</i> po značení GOs s přidaným krokem předinkubace GOs s řasami
Obrázek č. 28	Analýza potenciálu fotosyntézy <i>Lemna minor</i> po značení GOs

Obrázek č. 29	Analýza růstu <i>Lemna minor</i> po značení GOs
Obrázek č. 30	Analýza aktivity antioxidantních enzymů <i>Lemna minor</i> po značení GOs
Obrázek č. 31	Elektronová mikroskopie interakce <i>Lemna minor</i> a GOs
Tabulka č. 1	Vlastnosti materiálů g-C ₃ N ₄ , CDs a GA

Seznam zkratek

CNMs	uhlíkové nanomateriály
CDs	uhlíkové tečky
GO	grafen oxid
GCN	kyanografen
GA	grafenová kyselina
PTT	fototermální terapie
PDT	fotodynamická terapie
IR	infračervená
g-C ₃ N ₄	exfoliovaný grafitický nitrid uhlíku
CA	kyselina chlorogenová
FA	kyselina listová
DOX	doxorubicin
CPT	kamptotecin
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
NEAA	neesenciální aminokyseliny
FBS	fetální hovězí sérum
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
AFM	mikroskopie atomárních sil
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie
FTIR	infračervená spektroskopie s Furierovou transformací
TGA	termogravimetrická analýza
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

PI	propidium jodid
CAT	kataláza
SOD	superoxid dismutáza
QCDs	kvartérní uhlíkové tečky
MSCs	mezenchymální kmenové buňky
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
H&E	barvení hematoxylinem a eosinem
NMs	nanomateriály
PBS	fosfátový pufr
NM PC	nanomateriálová pozitivní kontrola
RFU	relativní fluorescenční hodnota
HO-GO	Hoffmanův grafen oxid
HU-GO	Hummersův grafen oxid
TO-GO	Tourův grafen oxid
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
EPC	extracelulární proteiny a sacharidy

Obsah

1.	Úvod.....	14
2.	Teoretická část	17
2.1.	Typy a vlastnosti uhlíkových materiálů.....	17
2.1.1.	2D uhlíkové materiály.....	17
2.1.2.	Uhlíkové tečky (CDs)	21
2.2.	Biomedicínské aplikace uhlíkových nanomateriálů.....	22
2.2.1.	Zobrazování biologických systémů, nádorová terapie a detekce biochemických jevů.....	23
2.2.2.	Cílené doručování léčiv.....	26
2.3.	Aplikace uhlíkových nanomateriálů v životním prostředí	27
2.3.1.	Čištění odpadních vod.....	28
2.3.2.	Odsolování mořské vody.....	28
3.	Cíle disertační práce.....	31
4.	Experimentální část – Materiály a metody	32
4.1.	Materiály.....	32
4.1.1.	Uhlíkové nanomateriály	32
4.1.2.	Buněčné linie.....	32
4.1.3.	Vodní organismy.....	33
4.2.	Metody.....	33
4.2.1.	Metody charakterizace nanomateriálů	34
4.2.2.	<i>In vitro</i> cytotoxické metody	35
4.2.3.	<i>In vivo</i> pozorovací metody	37
4.2.4.	Standardy pro testy akutní toxicity vodních organismů.....	37
5.	Výsledky a diskuze	38

5.1. Interakce uhlíkových nanomateriálů s buněčnými liniemi – humánní toxicita	38
5.1.1. Uhlíkové tečky pro <i>in vivo</i> fluorescenční pozorování mezenchymálních kmenových buněk	39
5.1.2. Toxicita uhlíkových materiálů – spolehlivá metoda pro sledování viability pomocí nového přístupu v průtokové cytometrii.....	51
5.2. Interakce uhlíkových nanomateriálů s organismy ve vodním prostředí – environmentální toxicita	68
5.2.1. Grafen oxidy s rozdílným stupněm povrchové oxidace	69
5.2.2. Interakce GOs s řasami a sinicemi.....	74
5.2.3. Interakce GOs s vodními korýši	86
5.2.4. Interakce GOs s vodními rostlinami	99
6. Závěr.....	109
7. Reference	112
8. Seznam příloh.....	125

1. Úvod

Nanotechnologie je dynamický a velmi rychle se vyvíjející obor. V současnosti dochází v celosvětovém měřítku k vývoji nejrůznějších nových materiálů se specifickými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Uhlíkové nanomateriály (Carbon nanomaterials – CNMs) představují třídu nízkodimenzionálních materiálů, která od objevu prvního alotropu, fullerenů v roce 1985, vyvolala ve vědecké komunitě značný rozruch.¹ Uvedení dvou dalších alotropů CNMs, uhlíkových nanotrubiček a grafenu v roce 1991 a 2004, mělo podobný impakt.^{2,3} Za objev a studium dvou ze tří alotropů byla dokonce udělena Nobelova cena (fullereny – 1996 (Chemie) a grafen – 2010 (Fyzika)), což názorně ilustruje význam a důležitost těchto materiálů pro celou společnost. Díky velikostem v nanometrickém měřítku tyto alotropy vykazují mimořádné optické, elektronické, magnetické a chemické vlastnosti, které se dají využít v širokém portfoliu aplikací např. v elektronice, katalýze, fotonice, energetice a medicíně.^{4,5}

V poslední době se pozornost vědců zaměřuje na stále novější typy CNMs nacházející uplatnění především v aplikacích spojených s biomedicínou a životním prostředím.⁶⁻¹³ Patří zde například uhlíkové tečky (carbon dots – CDs), čili velice malé fluorescenční nanomateriály (< 10 nm) s grafitovým jádrem a různými povrchovými skupinami.¹⁴ Velice atraktivní jsou také materiály, vycházející ze struktury grafenu, které jsou tvořeny jednou nebo několika uhlíkovými vrstvami, souhrnně nazvané 2D uhlíkové materiály.¹⁵ Struktura těchto materiálů může být navíc dále chemicky modifikována pro usnadnění disperze ve vodných roztocích, která je pro mnoho biomedicínských a environmentálních aplikací klíčová.^{16, 17} Se stále rostoucí aplikací těchto materiálů jde však ruku v ruce také otázka jejich bezpečného použití. Pochopení následků in vitro interakce CNMs s buněčnými liniemi je důležitým prvním krokem a klíčovým

předpokladem k jejich následnému využití v jakékoliv biomedicínské aplikaci.¹⁸ Podobně je tomu také v případě životního prostředí, kde jsou však buněčné linie nahrazeny organismy vyskytující se ve vodním prostředí, do kterého se mohou materiály v důsledku aplikace uvolňovat.¹⁹

Předkládaná disertační práce se zabývá právě studiem interakce uhlíkových nanomateriálů jak s buněčnými liniemi, tak s organismy z různých trofických úrovní vodního ekosystému. Teoretická část práce stručně přibližuje typy CNMs se zaměřením na nové, vycházející materiály a popisem jejich mimořádných vlastností. Dále je v literárním přehledu představeno několik aplikací z oblasti biomedicíny a životního prostředí, ve kterých se zmíněné materiály využívají. Experimentální část je rozdělena na dvě části, ve kterých hlavní kapitoly představují vědecké články, na nichž se autor podílel jako první autor.

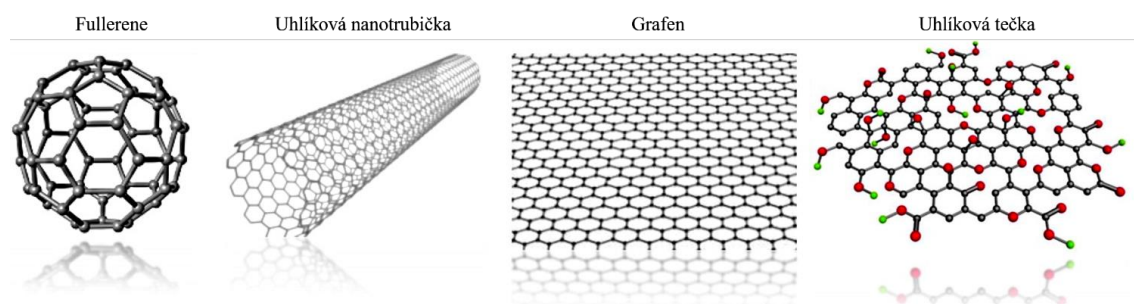
První část se zabývá humánní toxicitou CNMs, čili interakcí s buněčnými liniemi a obsahuje dvě kapitoly. První kapitola detailně popisuje sérii *in vitro* toxikologických testů uhlíkových teček na mezenchymálních kmenových buňkách, které vedly k selekci bezpečné koncentrace. Tato byla následně použita pro první *in vivo* monitoring kmenových buněk značených uhlíkovými tečkami (Malina et al. 2019, Carbon).²⁰ Druhá kapitola přibližuje téma interference CNMs s klasickými testy pro vyhodnocení základního parametru *in vitro* toxicity, kterým je životnost buněk. Ignorance interference může vést v literatuře k velkým problémům, jelikož díky ní dochází k publikování nesprávných toxikologických *in vitro* dat. Na třech typech moderních CNMs bylo díky novému protokolu s dodatečnými kontrolami ukázáno, jak lze interferenci překonat a získat tak správné výsledky *in vitro* testů viability buněk (Malina et al. 2021, Int. J. Mol. Sci.).²¹

Druhá hlavní sekce experimentální části se soustředí na environmentální toxicitu CNMs skrze pozorování interakce s organismy ve vodním prostředí. Celá část se věnuje studiu vlivu povrchové oxidace grafen oxidu (GO), nejrozšířenějšího derivátu grafenu, na jeho potenciální škodlivý účinek vůči organismům ze třech různých trofických úrovní vodního ekosystému. Sekce je rozdělena na tři kapitoly od nejjednodušších po nejsložitější organismy (řasy a sinice, vodní korýši a vodní rostliny) a jejich interakci s grafen oxidy (Malina et al. 2020, Carbon; Malina et al. 2020, J. Hazard. Mater.).^{22, 23}

2. Teoretická část

2.1. Typy a vlastnosti uhlíkových materiálů

Jak již bylo zmíněno v úvodu, mezi hlavní tři třídy uhlíkových nanomateriálů se řadí fullereny, uhlíkové nanotrubičky a materiály na bázi grafenu (Obrázek č. 1). Poněkud mladší, nově představenou třídou jsou uhlíkové tečky, diskrétní nanočástice téměř sférické geometrie s velikostí pod 10 nm, které přidávají nové možnosti do už tak všestranných vlastností CNMs (Obrázek č. 1).^{24, 25} Jelikož se v předkládané disertační práci pracovalo pouze s uhlíkovými tečkami a 2D uhlíkovými materiály na bázi grafenu, věnují se následující kapitoly pouze těmto typům CNMs.



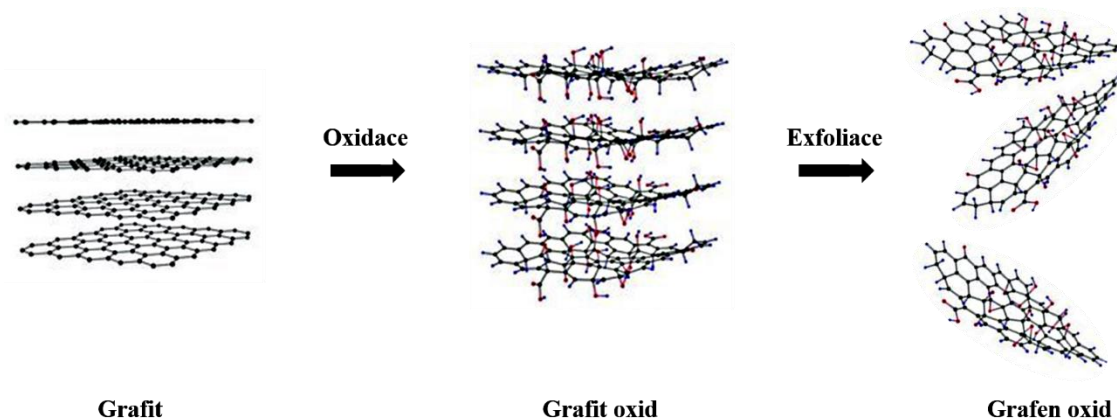
Obrázek č. 1. Uhlíkové nanomateriály, zahrnující fullereny, uhlíkové nanotrubičky, materiály na bázi grafenu a uhlíkové tečky. Převzato z ⁴ a upraveno.

2.1.1. 2D uhlíkové materiály

Jako nově vznikající třída materiálů, dvou dimenzionální (2D) uhlíkové materiály se od objevu grafenu v roce 2004 staly terčem intenzivního výzkumu.²⁶ Grafen se skládá z uhlíkových atomů s sp^2 hybridizací, které jsou uspořádány do hexagonální 2D struktury poskytující grafenu obrovskou plochu povrchu na obou stranách jeho planární struktury.³ Díky svým mimořádným vlastnostem, které zahrnují vynikající mechanickou pevnost,

vodivost a elektro-katalytický výkon, nachází grafen uplatnění v mnoha energetických, elektronických, a také biomedicínských aplikacích.²⁷ I grafen však vykazuje několik znaků, které mohou být v určitém kontextu různých aplikací nežádoucí. Jedná se například o hydrofobní chování, nulovou magnetickou odezvu a náchylnost k oxidačnímu prostředí. Proto se vědci neustále snaží najít nové cesty k chemické modifikaci grafenu, díky které vznikají nové technologicky zajímavé deriváty.²⁸

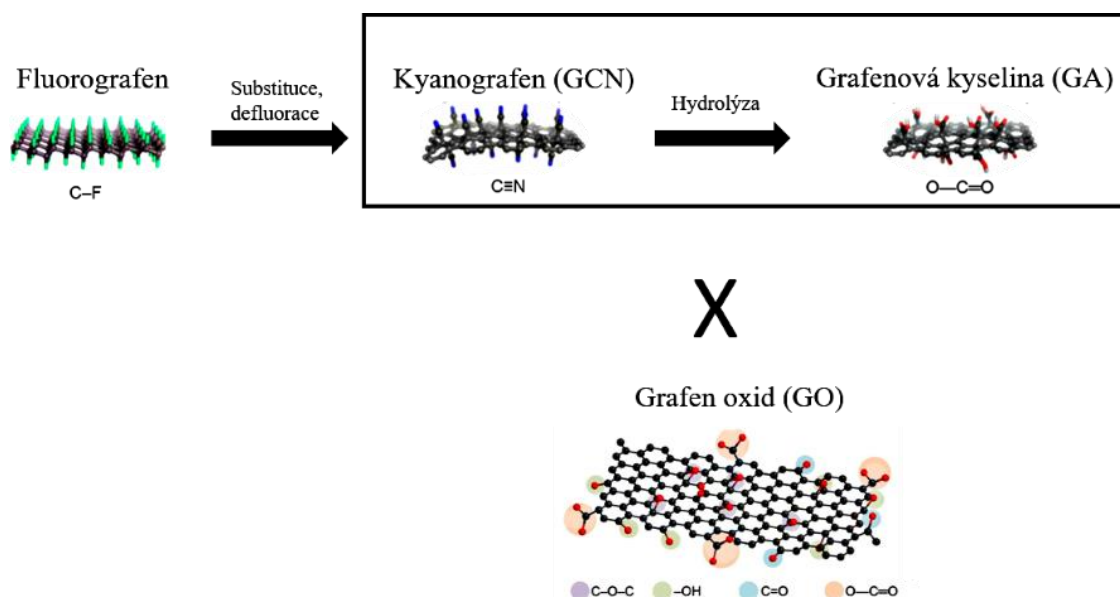
Grafen oxid (GO) představuje nejrozšířenější grafenový derivát, který je připraven silnou oxidací povrchu grafitu a následnou exfoliací vzniklého grafit oxidu (Obrázek č. 2). Vzniká tak vysoce oxidovaný 2D materiál s negativním nábojem a početnými oxidačními skupinami připojenými k povrchu grafenové matrice.²⁹ V porovnání s grafenem vykazuje GO lepší koloidní chování ve vodných roztocích, vyšší reaktivitu povrchu, a současně jeho výroba a produkce nepředstavuje velkou finanční zátěž.^{30, 31} Proto má GO značný potenciál pro uplatnění v širokém portfoliu aplikací, zahrnující bioinženýrství, biomedicínu a životní prostředí.³²⁻³⁴



Obrázek č. 2. Ukázka procesu syntézy grafen oxidu (GO).

Přímá selektivní kovalentní funkcionalizace grafenu je komplikovaný proces, jelikož je z velké části omezen velice nízkou chemickou reaktivitou jeho povrchu.^{35, 36} Dokonce i široce využívaný GO je připraven v drsných oxidačních podmínkách, které

vedou ke změnám v jeho stechiometrii, defektům ve struktuře a především k neselektivnímu simultánnímu navázání několika typů funkčních skupin (Obrázek č. 3).³⁷ Na druhou stranu, rozsáhlé portfolio potenciálních aplikací spojených s vlastnostmi nových derivátů získaných kovalentní úpravou povrchu, stále zvyšuje potřebu nových strategií, které by selektivní funkcionalizaci grafenu za více kontrolovatelných podmínek usnadnily. Jednou z takových možností je využití fluorografenu jako výchozího materiálu. Fluorografen je stabilní, stechiometrický a dobře definovaný derivát grafenu, který je připraven jeho fluorací s následnou exfoliací.^{38, 39} Skrze jeho kontrolovanou substituci a defluorinaci lze připravit kyanografen (GCN), čili grafenový derivát s vysokým stupněm funkcionalizace a -CN skupinami na svém povrchu (Obrázek č. 3).¹⁷ Následná hydrolyza GCN vede k syntéze grafenové kyseliny (GA), což je 2D karboxylová kyselina, tedy derivát s karboxylovými skupinami na svém povrchu (Obrázek č. 3).¹⁷ Takto připravené nové deriváty vykazují silně hydrofilní charakter a s tím spojené vynikající koloidní chování ve vodných roztocích. Navíc mají na svém povrchu specifické funkční skupiny (kyanidové pro GCN a karboxylové pro GA), díky kterým představují excelentní kandidáty pro potenciální využití v biomedicínských oblastech namísto neselektivně funkcionalizovaného GO (Obrázek č. 3).



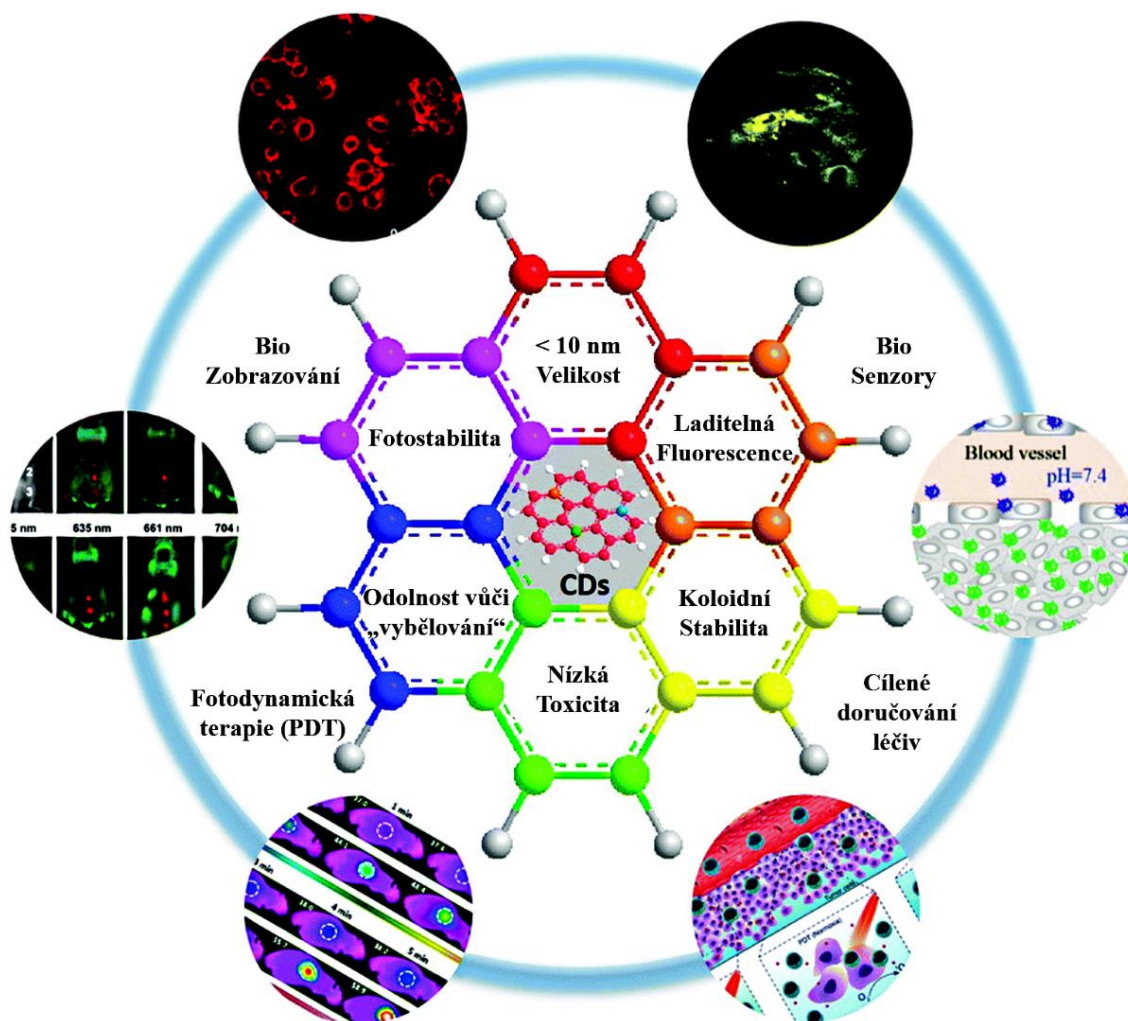
Obrázek č. 3. Syntéza GCN a GA s využitím fluorografenu jako výchozího materiálu. Ukázka selektivní funkcionalizace povrchu GCN a GA v porovnání s neselektivním povrchem GO.

Rostoucí počet studií zabývající se grafenem a jeho deriváty vyvolal velký zájem také o další, grafenu-podobné 2D uhlíkové materiály, jako jsou například karbidy přechodných kovů (MXenes) nebo grafitické nitridy uhlíku ($g\text{-C}_3\text{N}_4$).^{26, 40} U těchto materiálů vykazujících podobnou strukturu jako grafen, který je však složen pouze z uhlíku, byla snaha o využití větší flexibility a rozmanitosti ve fyzikálně-chemických vlastnostech, složení materiálů a jejich povrchové chemie.⁷ O to důležitější byl nedávný úspěch v syntéze a funkcionalizaci těchto 2D „nanolistů“, jelikož nabízí příležitosti k vytvoření složitějších nanostruktur.⁷ Nové atraktivní vlastnosti a současně grafenu-podobná velká plocha povrchu tak přináší grafenu-podobným 2D materiálům široké potenciální využití v biomedicínských a katalytických aplikacích.^{41, 42}

2.1.2. Uhlíkové tečky (CDs)

Uhlíkové tečky byly objeveny náhodně při elektroforetické purifikaci uhlíkových nanotrubiček v roce 2004.⁴³ Z pohledu struktury je pojem „uhlíková tečka“ obecně používán pro fluorescenční uhlíkaté materiály s grafitovým jádrem obaleným slupkou s různými chemickými skupinami.¹⁴ Ačkoliv uhlíkové tečky obsahují dominantně prvky uhlíku, vodíku, kyslíku, dusíku či síry, jejich procentuální zastoupení silně závisí na typu syntézy a použitého prekurzoru.⁴⁴ V mnoha ohledech tak CDs připomínají grafen oxid, který se také vyazuje přítomností funkčních skupin na svém povrchu (Obrázek č. 1 a Obrázek č. 3).⁴⁵ Hlavní rozdíl je však ve velikosti, která je u CDs ve většině případů pod 10 nm ve všech 3 dimenzích, díky čemuž jsou CDs považovány za tzv. 0D uhlíkový nanomateriál.⁴⁶

Největší předností uhlíkových teček jsou jejich mimořádné fluorescenční vlastnosti, a to v širokém rozsahu spektra od ultrafialové,⁴⁷ přes viditelné,⁴⁸ až po blízké infračervené oblasti.^{49, 50} Jejich fluorescence může nebo nemusí být přímo závislá na excitaci, a to podle druhu syntézy a výsledného složení a struktury teček.⁵¹ Vrchol jejich emisního spektra navíc může být dále laděn v rozsahu celého viditelného spektra (400 – 750 nm) s postupným posouváním vlnové délky excitace.^{48, 50} CDs je také možné snadno funkcionalizovat pro vytvoření stabilních koloidních roztoků ve vodě, dále vykazují silnou chemickou inertnost, včetně vysoké odolnosti proti „vybělování“ a mají mnohem nižší toxicitu ve srovnání s tradičními kvantovými tečkami na bázi polovodičů.^{14, 52} Vzhledem k všestranným optickým vlastnostem s velkou plochou povrchu, společnou pro všechny CNMs, nachází CDs rozsáhlé uplatnění v biomedicínských aplikacích zahrnující *in vitro* a *in vivo* zobrazování, cílené doručování léčiv, biosenzory a fotodynamickou terapii (Obrázek č. 4).^{53, 54}



Obrázek č. 4. Schéma znázorňující vlastnosti a nejnovější směry v bioaplikacích uhlíkových teček. Převzato z⁵³ a upraveno.

2.2. Biomedicínské aplikace uhlíkových nanomateriálů

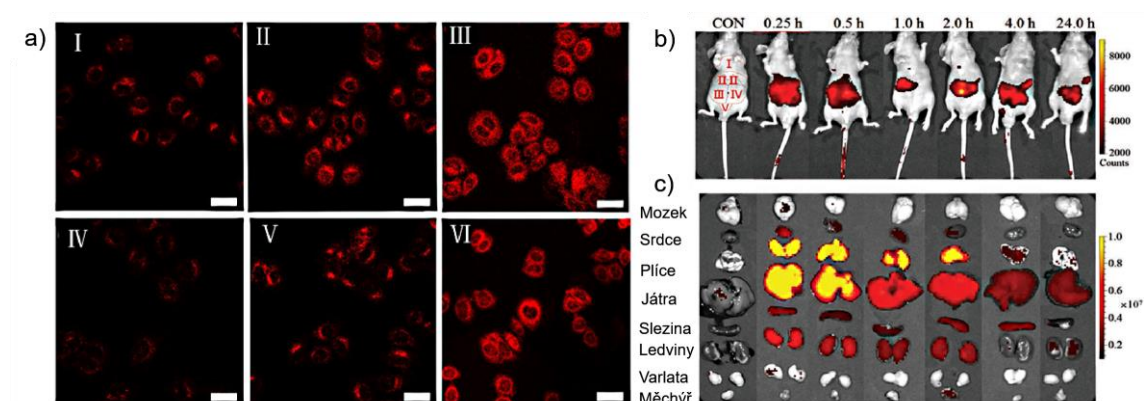
Portfolio biomedicínských aplikací, kde nachází CNMs využití je velice rozsáhlé a zahrnuje několik oblastí. Proto jsou v následující kapitole popsány příklady aplikací pouze těch CNMs, se kterými se pracovalo v disertační práci v části popisující humánní toxicitu CNMs, a to uhlíkových teček, grafenových derivátů a grafitických nitrídech uhlíku.

2.2.1. Zobrazování biologických systémů, nádorová terapie a detekce biochemických jevů

Zobrazování a detekce biologických procesů v živých systémech patří mezi jedny z nejrozšířenějších aplikací CNMs, především pak uhlíkových teček.⁵⁵ Nízká toxicita a mimořádné fluorescenční vlastnosti z nich totiž dělají ideální kandidáty pro pozorování at' buněrných linií na úrovni *in vitro*, nebo *in vivo* na úrovni orgánů a organismů.⁵⁶ *In vitro* pozorování bylo provedeno na mnoha typech linií, zahrnujících například rakovinné buňky⁵⁷⁻⁵⁹ pro velmi důležitý výzkum rakoviny nebo také kmenové buňky^{60, 61} v rámci studia regenerační medicíny. Na rakovinných HeLa buňkách byl například objasněn mechanismus internalizace CDs do buněk, který se skládá ze dvou typů membránových transportů: i) na energii závislé endocytózy a ii) pasivní difúze.⁶² Z obrázku č. 5a lze vidět, že s rostoucí teplotou a časem dochází v buňkách k vyšší akumulaci CDs v cytoplasmě, což se projevuje silnější intenzitou fluorescence. Bylo tak prokázáno, že hlavní mechanismus internalizace CDs byla na energii závislá endocytóza.

In vivo optické zobrazování je v současnosti velmi perspektivní z pohledu moderní diagnostiky, proto i zde mohou nalézt uhlíkové tečky své jedinečné uplatnění. Liu et al například sledovali *in vivo* biodistribuci CDs v těle myši po intravenózním podání v několika časových bodech.⁶³ Ze silného fluorescentního signálu na obrázku č. 5b je patrné, že po 0,25 a 0,5 h byly CDs distribuovány v celém těle myši, ale po 24 h od podání částic fluorescenční signál výrazně zeslábl. Následně byl proveden experiment, kdy byly ve stejných časových bodech odebrány orgány myši a fluorescence byla analyzována *ex vivo* (Obrázek č. 5c). Intenzity orgánů potvrdili závěr real-time pozorování, jelikož nejvyšší hodnota byla naměřena po 0,5 h a následně došlo k poklesu fluorescence (Obrázek č. 5c). Bylo tak prokázáno, že CDs dokáží velmi rychle skrze krevní řečiště

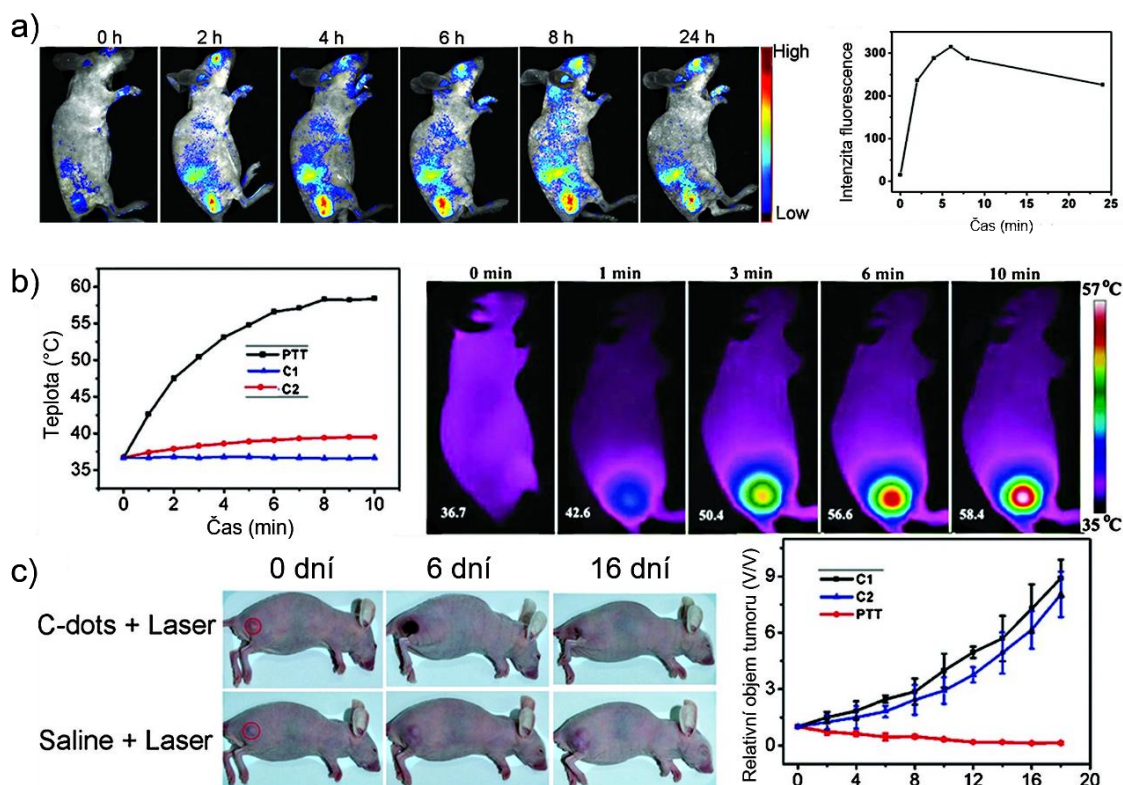
vstoupit do celého těla myši, ale následně dochází k jejich rychlému vyloučení a neakumulaci v jednotlivých orgánech.⁶³



Obrázek č. 5. a) Fluorescenční obrázky HeLa buněk inkubovaných s 50 µg/ml CDs po 0,5 (I), 1 (II) a 2 h (III). Fluorescenční obrázky HeLa buněk inkubovaných s 50 µg/ml CDs po 2 h v 4 (IV), 25 (V) a 37 °C (VI). Excitační vlnová délka byla 514 nm a měřítko je 50 µm. b) *In vivo* a c) *ex vivo* real-time pozorování myši v různých časových bodech s intravenózně aplikovanými CDs. Převzato z ⁵⁴ a upraveno.

In vivo distribuce CDs se však může výrazně změnit v přítomnosti nádoru, jelikož byla u CDs popsána schopnost akumulace v nádoru skrze efekt zvýšené permeability a retence (EPR effect).^{64, 65} Současně se zobrazováním tak mohou být CDs využity jako nanoplatformy pro klinické biomedicínské aplikace, zahrnující hlavně fototermální (PTT) a fotodynamickou terapii (PDT) nádorů.⁶⁶⁻⁷⁰ Ge et al například pozorovali výraznou fluorescenci nádorové oblasti způsobenou akumulací CDs právě skrze zmiňovaný EPR efekt (Obrázek č. 6a).⁷¹ Po potvrzení specifické distribuce dále studovali terapeutický efekt CDs pomocí ozařování 671 nm laserem s výkonem 2 W/cm² po dobu 10 minut. Byl potvrzen fototermální efekt CDs, jelikož došlo ke zvýšení teploty v oblasti nádoru v přítomnosti teček na 50,4 °C už během prvních 3 minut terapie. Po 10ti minutách teplota stoupla dokonce až na 60 °C, zatímco teplota v kontrolní skupině dosáhla pouze 39,5 °C při stejných podmínkách ozařování, což prokázalo klíčovou roli CDs při tvorbě tepla

(Obrázek č. 6b). Pro finální ověření PTT účinnosti CDs autoři ještě sledovali míru přežití myši a rychlost růstu nádoru po 16 dní (Obrázek č. 6c). Pouze u myši, které podstoupily současné ošetření CDs s ozářením bylo prokázáno významné potlačení růstu nádoru, a po odstranění tmavého strupu z kůže po 16 dnech došlo k jejich úplnému zotavení (Obrázek č. 6c).



Obrázek č. 6. a) Real-time *in vivo* fluorescenční pozorování po intravenózní aplikaci CDs v myši a graf zobrazující průměr fluorescenční intenzity oblastí nádoru v různých časových bodech; b) Graf změny teploty v nádorové oblasti a IR termální zobrazování nádorových míst v časech 0, 1, 3, 6 a 10 minut po ozáření 671 nm laserem s výkonem 2 W/cm²; c) Fotografie myši nesoucích nádor v různé dny po různých ošetřeních a relativní změna v objemu nádoru myši nesoucích nádor z různých skupin po aplikované léčbě. Převzato z ⁷¹ a upraveno.

Exfoliovaný grafitický nitrid uhlíku (g-C₃N₄), nový grafenu-podobný 2D uhlíkový materiál, představuje další materiál z rodiny CNMs, který díky svým optickým

vlastnostem nachází uplatnění ve fluorescenčním zobrazování biologických systémů.¹⁵ Zhang et al například představili novou syntézu g-C₃N₄, díky které získali ultratenké 2D materiály, které následně využili k fluorescenčnímu sledování HeLa buněk.⁷² Biokompatibilní chování materiálu bylo potvrzeno testy viability buněk a vysoký kvantový výtěžek g-C₃N₄ (19,6 %) byl prokázán *in vitro* fluorescenční mikroskopií buněk.⁷²

S fluorescenčním zobrazováním biologických systémů je úzce spojena také další aplikace CNMs, a to využití materiálů jako biosenzorů pro detekci biochemických jevů. Proto není překvapivé, že CDs a g-C₃N₄ materiály patří mezi nejrozšířenější CNMs také v této oblasti, jelikož se vyznačují výbornou biokompatibilitou, chemickou stabilitou a především laditelnými optickými vlastnostmi.⁷³⁻⁷⁵ Dochází tak k vývoji stále většího množství senzorů na bázi těchto materiálů, které fungují na základě analytem vyvolaném zhasnutí nebo zvýšení fluorescence. Takto připravené senzory se pak využívají například k detekci kovových iontů, malých organických molekul jako markerů nemoci, vnitrobuněčných změn pH nebo environmentálních polutantů.^{15, 54}

2.2.2. Cílené doručování léčiv

Doručování léčiv a biomolekul (např. proteinů, peptidů nebo genů) do konkrétních buněk nebo specifických tkání organismu stále představuje primární oblast zájmů medicínského výzkumu.⁷⁶ Právě grafenové materiály mohou přispět svými jedinečnými vlastnostmi jako ideální platformy pro navázání různých léčiv. Od první zprávy o využití grafen oxidu (GO) jako účinného „nanonosiče“ pro doručení analogu Kamptotecinu (CPT) v roce 2008,⁷⁷ došlo k rychlému vzrůstu zájmu o GO a jiné deriváty grafenu pro jejich využití k doručování léčiv, včetně antibiotik, peptidů, protilátek nebo genů.⁷⁸ Rakovina stále představuje jeden z největších problémů moderní medicíny, jelikož

dosáhnout efektivní protinádorové léčby je komplikované kvůli faktorům zahrnujícím jak nízkou biologickou dostupnost, tak také slabé specifické cílení chemoterapeutik.⁷⁹ Je proto logické, že deriváty grafenu jsou důkladně testovány také jako platformy pro různá léčiva v protinádorových terapiích.⁸⁰

V jednom případě došlo k vytvoření pH senzitivního nanokompozitu GO a kyseliny chlorogenové (CA), který sloužil pro pomalé uvolňování CA z platformy GO.⁸¹ Zatímco pro rakovinné buňky byl pozorován vysoce toxický účinek kompozitu, vůči zdravé buněčné linii byla jeho toxicita zanedbatelná.⁸¹ V dalším případě byl GO chemicky funkcionalizován aminovými skupinami v kombinaci s karboxymethyl celulórou pro vytvoření systému, který byl následně využit pro kontrolované a cílené uvolňování protinádorového léku Doxorubicinu (DOX).⁸² Zhang et al zase připravili GO, který byl funkcionalizován skupinami kyseliny sulfonové (-SO₃H) pro zvýšení jeho koloidní stability ve fyziologických podmínkách.⁸³ Následně byla ke kompozitu kovalentně připojena kyselina listová (FA) pro specifické zaměření rakovinných buněk. Navíc na GO kompozit navázali současně dvě protinádorové léčiva (DOX a CPT) a prokázali výrazně lepší terapeutickou účinnost tohoto duálního kompozitu ve srovnání s účinností pouze jednoho léčiva.⁸³

2.3. Aplikace uhlíkových nanomateriálů v životním prostředí

Jednu z největších výzev dnešního světa představuje otázka čisté a pitné vody, jelikož se jedná o téma, které má přímý vztah jak ke zdraví lidstva, tak volně žijících živočichů. Vzhledem k rychlému rozvoji průmyslu se do životního prostředí uvolňuje stále více znečišťujících látek, zatímco prudký růst populace zase neustále zvyšuje

poptávku po pitné vodě.⁸⁴ Proto je následující kapitola zaměřena na aplikace CNMs související s čištěním odpadních vod a technologiemi zajišťující odsolování mořské vody. Podobně jako u kapitoly biomedicinských aplikací CNMs, je tato kapitola zaměřena pouze na využití grafen oxidu, jelikož se s GO pracovalo v části disertační práce popisující environmentální toxicitu CNMs.

2.3.1. Čištění odpadních vod

Jak již bylo zmíněno dříve, GO vykazuje dvoudimenzionální vrstevnatou strukturu s velkou plochou povrchu a funkčními skupinami ukotvenými ke svému povrchu (Obrázek č. 2 a č. 3). Proto si GO získal výraznou pozornost vědecké komunity, jelikož jako nano-adsorbent může pozitivně interagovat s různými polutanty v molekulární nebo iontové formě skrze mechanismy zahrnující elektrostatické, hydrofobní nebo patrové (π - π) interakce.⁸⁵ Efektivní strategie pro čištění odpadních vod využívající GO jsou tak rozděleny do dvou hlavních kategorií: adsorpce a konverze polutantů.

Právě díky funkčním skupinám obsahujícím kyslík na povrchu GO sloužící jako aktivní místa byl již GO využit pro adsorpci iontů těžkých kovů,⁸⁶⁻⁸⁸ polycyklických aromatických uhlovodíků⁸⁹ nebo organických barviv^{90, 91} z vody. Kromě přímého adsorpčního efektu hraje GO roli také jako další, avšak neméně významný článek kompozitů umožňující chemickou nebo fotokatalytickou konverzi polutantů.³² Existuje celá řada prací, kde vytvořené kompozity obsahující GO našly uplatnění například k redukci vysoce toxického iontu Cr^{6+} na Cr^{3+} ,^{92, 93} při degradaci organických barviv,^{94, 95} fenolů,⁹⁶ nebo herbicidů⁹⁷ ve vodním prostředí.

2.3.2. Odsolování mořské vody

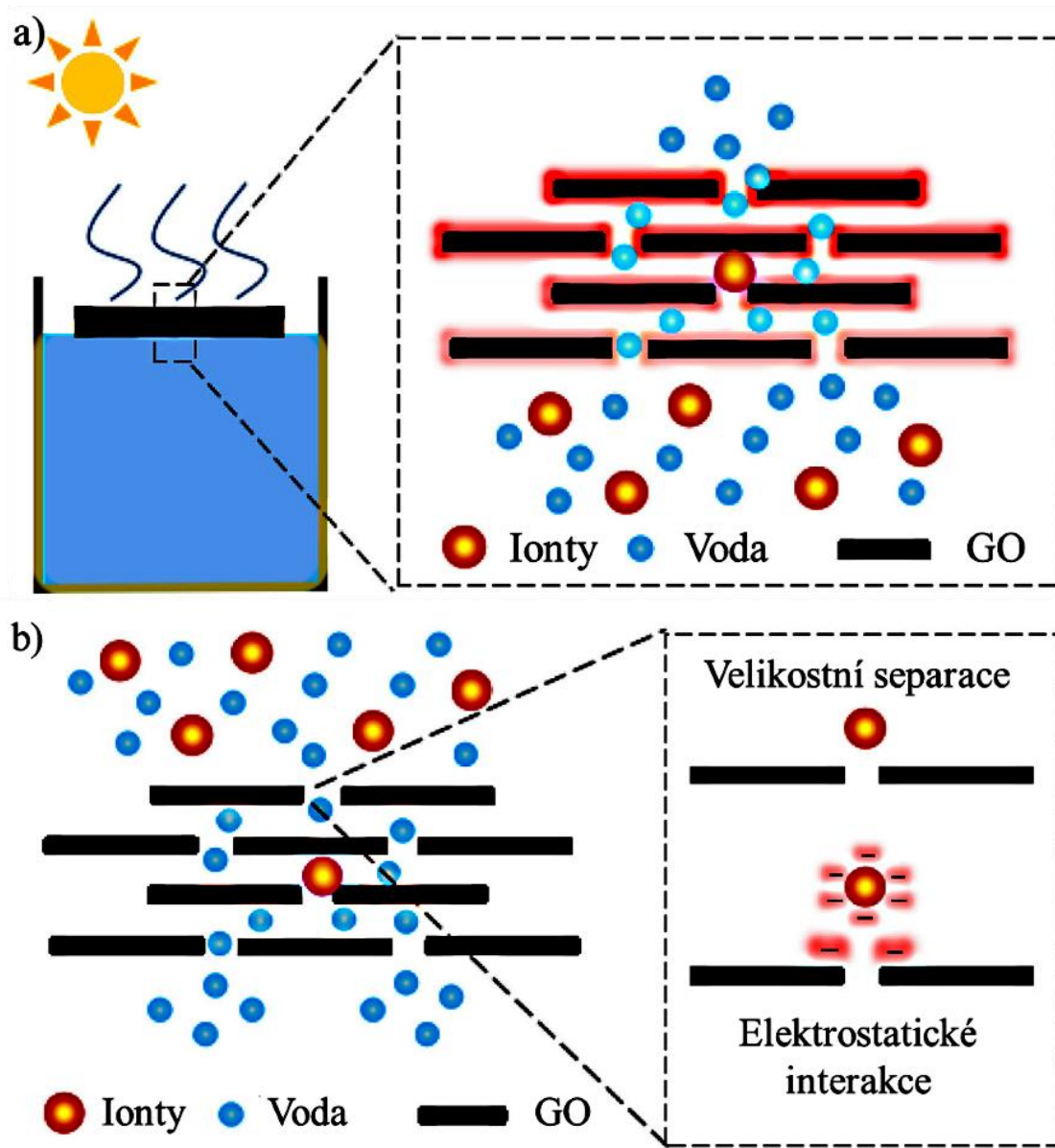
V souvislosti s objevem a výrobou nových materiálů zaznamenaly technologie zabývající se odsolováním mořské vody v poslední době výrazný pokrok. Jedná se

především o solární odpařování vody a filtraci přes membránu.⁹⁸ Schopnost výrazné absorpce, porózní struktura, vysoká chemická stabilita, hydrofilní chování a výborné antivegetativní vlastnosti dělají z grafen oxidu velice atraktivní materiál právě pro využití v těchto technologiích.^{99,100}

Na obrázku č. 7a je demonstrováno, jak důležitou roli může hrát GO během mezifázového slunečního odpařování. GO zde slouží jako vynikající absorbér,¹⁰¹⁻¹⁰⁵ který přijímá sluneční světlo a zajišťuje jeho přeměnu na tepelnou energii prostřednictvím opticky excitovaného rozptylu elektronů, čímž se sám zahřívá a způsobuje odpaření vody (Obrázek č. 7a). Navíc, vrstva GO obsahující „nanokanály“ poskytuje cestu pro přívod vody a únik par. Odsolování je tak dosaženo procesem fázové změny, zatímco netěkavé ionty zůstávají netknuty a čerstvá voda je následně získána kondenzací. Technologie solárního odpařování vody tak zahrnuje tři hlavní rysy: 1) je poháněna výhradně sluneční energií; 2) vykazuje extrémně vysokou účinnost odstraňování iontů a 3) vyžaduje nízké kapitálové investice. Právě díky těmto benefitům má tato technologie velký potenciál pro využití v rozvojových zemích a obecně v oblastech s nízkou úrovní infrastruktury.¹⁰⁰

Obrázek č. 7b popisuje, jak lze poskládat GO materiály pro vytvoření „nanokanálu“ mezi sousedními GO „nanolisty“, skrz které lze provádět odsolování pomocí filtrace.¹⁰
¹⁰⁶⁻¹¹¹ Vzdálenost mezi dvěma sousedními GO listy je přibližně 0,76 nm (hodnota může být dále modifikována),¹⁰⁰ takže umožňuje pronikání vody, jelikož její molekuly mají velikost pouze 0,275 nm. Na druhou stranu, ionty, jejichž molekuly jsou větší (Li^+ (0,764 nm), Na^+ (0,716 nm), K^+ (0,662 nm), Mg^{2+} (0,856 nm), Ca^{2+} (0,824 nm), F^- (0,704 nm), Cl^- (0,664 nm), Br^- (0,660 nm)),¹¹² mohou být z mořské vody odstraněny skrze velikostní separaci a elektrostatické interakce, čímž je dosaženo odsolování pomocí filtračního filmu GO (Obrázek č. 7b). I když filtrační technologie vyžaduje poměrně vysoké kapitálové investice a je založena na elektrické energii, lze tímto způsobem

odsolovat obrovské množství mořské vody, a proto je tato technologie zvláště vhodná pro centralizované řešení ve vyspělých oblastech.¹⁰⁰



Obrázek č. 7. Ilustrační schéma znázorňující a) solární odpařování mořské vody založenou na GO a b) filtraci mořské vody přes GO filtrační membránu. Převzato z¹⁰⁰ a upraveno.

3. Cíle disertační práce

Hlavním cílem předkládané disertační práce bylo studium interakce nových uhlíkových nanomateriálů, zahrnujících uhlíkové tečky, grafenové deriváty a příbuzné materiály na bázi grafenu s různými buněčnými liniemi a organismy z různých vrstev trofického řetězce vodního ekosystému.

Jednotlivé specifické cíle práce pak lze shrnout do těchto bodů:

- Stanovení bezpečné koncentrace uhlíkových teček, která neovlivňuje viabilitu, buněčné procesy a charakter mezenchymálních kmenových buněk a následné použití této koncentrace uhlíkových teček pro *in vivo* pozorování mezenchymálních kmenových buněk.
- Analýza interference nových uhlíkových nanomateriálů s klasickými *in vitro* testy viability a optimalizace nové metody pro překonání této interference.
- Studium environmentálního osudu grafen oxidu ve vodním prostředí a jeho mechanismu potenciálního toxického účinku vůči různým vodním organismům v závislosti na: i) úrovni povrchové oxidace grafen oxidu, ii) komplexnosti a morfologii vodních organismů a iii) životní strategii vodních organismů.

4. Experimentální část – Materiály a metody

4.1. Materiály

4.1.1. Uhlíkové nanomateriály

V předkládané disertační práci se pracovalo celkem se šesti uhlíkovými nanomateriály. Jednalo se o uhlíkové tečky,¹¹³ grafenovou kyselinu,¹⁷ grafitický nitrid uhlíku (materiál označený jako NS500)¹¹⁴ a tři typy grafen oxidu lišící se v míře povrchové oxidace.¹¹⁵ Za syntézu materiálů děkuji kolegům a kolegyním Mgr. Kateřině Holé, Ph.D. (uhlíkové tečky), Mgr. Davidu Panáčkovi (grafenová kyselina), Ing. Ladislavu Svobodovi, Ph.D. (grafitický nitrid uhlíku) a Mgr. Šárce Adámkové (tři systémy grafen oxidu). Detaily ohledně syntézy všech zmíněných materiálů mohou být nalezeny v příslušných publikacích.

4.1.2. Buněčné linie

V disertační práci byly ve dvou různých studiích využity dvě buněčné linie: lidské mezenchymální kmenové buňky (MSCs – mesenchymal stem cells) a lidské kožní fibroblasty (BJ). MSCs byly izolovány z tukové tkáně tří zdravých dárců, kteří podstoupili kosmetickou liposukci (jeden muž, dvě ženy). Izolace byla založená na inkubaci lipoaspirátů s kolagenázou. MSCs byly následně kultivovány v kompletním modifikovaném Dulbecco Eagle médiu (DMEM), doplněném 5% lyzátem trombocytů a 1% penicilínem.²⁰ Lidské kožní fibroblasty BJ byly pořízeny z ATCC databáze buněk (ATCC, CRL-2522) a byly kultivovány v EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) médiu doplněném o (v závorce jsou uvedeny finální koncentrace látek v médiu): L-

Glutamin (2 mM), neesenciální aminokyseliny (NEAA, 1x), fetální hovězí sérum (FBS, 10%), PenStrep (5 U penicilín, 50 µg streptomycin/ml) a hydrogenuhličitan sodný (2 g/l).

4.1.3. Vodní organismy

V rámci třech různých studií bylo celkem studováno šest zástupců pěti typů vodních organismů: řas, sinic, planktonních a bentických korýšů a vodních rostlin. Jako zástupci řas a sinic byly použity zelené řasy *Raphidocelis subcapitata* (Korshikov) a *Chlorella kessleri* (Fott & Nováková) a sinice *Synechococcus elongatus* (Nägeli), které byly pořízeny z kolekce CCALA (Třeboň, Czech Republic). Jejich kultivace probíhala v ZBB médiu - 1:1 kombinace Z-média (Zehnder and Staub médium) a BB-média (Bristol and Bold médium).²² Pro testování vodních korýšů byla vybrána lasturnatka (ostracoda) *Heterocypris incongruens* jako zástupce bentických korýšů a *Thamnocephalus platyurus* a *Daphnia magna* jako zástupci planktonních korýšů. Korýši byli vylíhnuti z cyst dodaných součástí kitů: Ostracodtoxkit F, Thamnotoxkit F a Daphtoxkit F, vše od firmy Microbiotests, Belgie a jejich kultivace probíhala v M4 médiu.²³ Pro studium vodních rostlin byla vybrána modelová rostlina okřehek *Lemna minor*, která byla kultivována ve Steinbergově médiu.

4.2. Metody

V předkládané disertační práci bylo využito velké množství laboratorních metod. Já jsem byl osobně zodpovědný za všechny *in vitro* cytotoxické metody. Za měření a vyhodnocování ostatních metody bych chtěl v této části poděkovat mým kolegům a kolegyním. Přesně se jedná o Mgr. Kláru Čépe, Ph.D. (TEM a SEM), Mgr. Arianu Opletalovou, Ph.D. a Magdalenu Scheibe, Ph.D. (AFM), Mgr. Kateřinu Holou, Ph.D. (Zetasizer Nano Zs a FTIR), Mgr. Kateřinu Štymplovou (Raman), Ing. Vojtěcha Kupku,

Ph.D. (TGA), Mgr. Martina Petra, Ph.D. (XPS), RNDr. Radku Pechancovou, Ph.D. (ICP-MS), Mgr. Věru Milotovou (Bruker BioSpin Xtreme *In Vivo*), Martinu Sadílkovou a Mgr. Adélu Lamaczovou (standardy akutní toxicity vodních organismů).

4.2.1. Metody charakterizace nanomateriálů

Nanomateriály použité v předkládané disertační práci byly podrobeny rozsáhlé charakterizaci pomocí velkého množství charakterizačních technik. Informace ohledně velikosti, tvaru a morfologie nanomateriálů byla zjišťována pomocí mikroskopických technik zahrnujících transmisní elektronovou mikroskopii (TEM), skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) a mikroskopii atomárních sil (AFM). Elektronové mikroskopie byly provedeny za pomoci HITACHI SU 6600 skenovacího elektronového mikroskopu a TEM JEOL 2010 transmisního elektronového mikroskopu s LaB₆ typem emisního děla, operujícího při 160 kV. Povrchová morfologie byla zkoumána pomocí AFM kombinovaného systému NTEGRA (NT-MDT), s využitím semikontaktního módu a konzoly NSG_30 (NT-MDT) se silovou konstantou 22-100 N/m a rezonanční frekvencí 240-440 kHz. Chování nanomateriálů a jejich velikost v různých roztocích byla studována také pomocí měření dynamického rozptylu světla za pomoci instrumentu Zetasizer Nano Zs.

Přítomnost funkčních skupin a chemické složení nanomateriálů bylo studováno za pomoci třech spektroskopických technik: i) rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS); ii) infračervené spektroskopie s Furierovou transformací (FTIR) a iii) Ramanovy spektroskopie. XPS s vysokým rozlišením byla provedena pomocí spektrometru PHI VersaProbe II se zdrojem Al K α (15 kV, 50 W). FTIR spektra a spektra z Ramanovy spektroskopie byla získána pomocí spektrometru iS5 Thermo Nicolet (s technikou Smart Orbit ZnSe ATR) a DXR Ramanova mikroskopu. Chemické složení materiálů a

přítomnost organických zbytků po syntéze materiálů byla analyzována také pomocí termogravimetrické analýzy (TGA) s využitím Netzsch STA 449 C Jupiter analyzátoru a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) pomocí ICP-MS Agilent 7700x. TGA experimenty byly prováděny v otevřeném α -Al₂O₃ kelímku v dynamické atmosféře syntetického vzduchu (100 cm³/min) a v teplotním rozsahu 45 – 1000 °C, při rychlosti ohřevu 5 °C/min. Zeta potenciál materiálů byl měřen s využitím instrumentu Zetasizer Nano Zs. Fluorescenční spektrum uhlíkových teček bylo získáno pomocí laserového skenovacího konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8 X.

4.2.2. *In vitro* cytotoxické metody

V předkládané disertační práci byly pro analýzu *in vitro* cytotoxicity CNMs využity metody zahrnující především tři hlavní instrumenty: i) průtokový cytometr; ii) multifunkční reader pro měření destiček buněčných kultur a iii) mikroskopické techniky.

Průtokový cytometr BD FACSVerse™ byl využit pro studium buněk po interakci s různými CNMs. Analýzy, které byly prováděny, zahrnovaly viabilitu (LIVE/DEAD® viability/cytotoxicity kit (Thermo Fisher Scientific), značení propidium jodidem (PI) a calceinem), buněčný cyklus (BD Cycletest™ Plus DNA kit (Becton Dickinson)), měření markerů kmenových buněk (CD73, CD90, CD105) a studiu internalizace CNMs, endocytózy a exocytózy. Průtokový cytometr Sysmex Partec GmbH byl zase použit pro analýzu řas po interakci s CNMs. Byla sledována membránová integrita řasových buněk (značení (PI) (Sigma)), autofluorescence chlorofylových barviv a oxidační stres za pomocí sondy H₂-DCFDA (Thermo Fisher Scientific).

Pomocí multifunkčního readeru Tecan Infinite PRO M200 byl také měřen oxidační stres sondami H₂-DCFDA (Thermo Fisher Scientific) a CM-H₂DCFDA (Thermo Fisher Scientific). Oxidační stres byl analyzován také pomocí kitů pro stanovení aktivity

antioxidačních enzymů Kataláza (CAT) a Superoxid Dismutázy (SOD) (oba od Thermo Fisher Scientific). Dále byla na tomto readeru stanovována koncentrace proteinů ve vzorcích pomocí Bradfordovi metody, ¹¹⁶ studována viabilita pomocí MTT testu, a také měřena míra hemolýzy červených krvinek po interakci s uhlíkovými tečkami. Multifunkční reader Tecan GENios byl zase použit pro měření koncentrace živin v médiu (Mg, N a P) a pro stanovení množství extracelulárních proteinů a sacharidů.

Mikroskopické techniky byly využity pro detailní přiblížení interakce CNMs s buněčnými liniemi nebo organismy. Mikroskopie zahrnovala jak jednoduchý optický mikroskop (Olympus IX 70), tak laserový skenovací konfokální mikroskop (Leica TCS SP8 X). Konfokální mikroskopie byla dále použita také pro fluorescenční pozorování mikroskopických řezů nádoru, studium diferenciačních vlastností kmenových buněk (kit pro Osteogenezi, Adipogenezi, Chondrogenezi (vše Invitrogen)), migračního potenciálu kmenových buněk, vnitrobuněčné distribuce uhlíkových teček a jejich fotostability. Absolutní detaily ohledně interakce CNMs s živými systémy byly opatřeny pomocí skenovací elektronové mikroskopie (HITACHI SU 6600 SEM) a mikroskopie atomárních sil (AFM kombinovaný systému NTEGRA (NT-MDT)) po fixaci a dehydrataci vzorků. V neposlední řadě, informace ohledně přítomnosti CNMs uvnitř vodních korýšů byla získána měřením Ramanových spekter střev a výkalů s využitím DRX Ramanova mikroskopu. Metoda analýzy komet (Comet assay) byla použita pro studium genotoxicity CNMs a Bruker BioSpin Xtreme *In Vivo* pozorovací systém byl využit k zjištění fluorescence kmenových buněk značených uhlíkovými tečkami ve zkumavkách.

4.2.3. *In vivo* pozorovací metody

Zobrazovací systém Bruker BioSpin Xtreme *In Vivo* byl současně využit také pro *in vivo* fluorescenční pozorování athymické imunodeficientní nahé (Nu/Nu) myši (CD-1-Foxn1nu), které byly subkutánně aplikovány kmenové buňky značeny uhlíkovými tečkami. Pomocí stejného systému byl následně zkoumán také *in vivo* migrační potenciál uhlíkovými tečkami značených kmenových buněk, které byly tentokrát aplikovány intravenózně.

4.2.4. Standardy pro testy akutní toxicity vodních organismů

Hodnocení interakce CNMs s vodními organismy bylo prováděna podle příslušných standardů akutní toxicity. Inhibice růstu řas a sinic byla studována podle modifikované verze ISO 8692 procedury,¹¹⁷ kdy byl z důvodu interference CNMs test vyhodnocen přímou metodou počítání buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu, namísto měření pomocí readeru Tecan GENios. Akutní toxicita CNMs vůči vodním korýšům byla stanovena pomocí těchto standardů: i) ISO 6341 pro *Daphnia magna*,¹¹⁸ ii) ISO 14380 pro *Thamnocephalus platyurus*,¹¹⁹ a iii) ISO 14371 pro *Heterocypris incongruens*.¹²⁰ Fytotoxicita CNMs vůči vodní rostlině *Lemna minor* byla provedena dle příslušných standardů^{121, 122} pomocí třech parametrů: i) počet lístků rostliny, ii) hmotnosti vysušených rostlin a iii) fotosyntetické aktivity skrze kvantový výtěžek Fotosystému II.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Interakce uhlíkových nanomateriálů s buněčnými liniemi – humánní toxicita

Jak již bylo zmíněno v literární části práce, CNMs představují mimořádné materiály nacházející uplatnění v mnoha odvětvích biomedicínské oblasti. Současně se však dostává do povědomí otázka potenciálních nepříznivých účinků těchto materiálů na lidské zdraví, což může v souvislosti s využitím těchto materiálů vyvolávat značné obavy. Pochopení důsledků CNMs po přímém kontaktu s buněčnými liniemi *in vitro* je proto klíčovým prvním krokem a zcela zásadním předpokladem pro jejich následné bezpečné a úspěšné využití především v biomedicínských aplikacích.¹⁸ Mimoto, paradigma toxikologie 21. století se zaměřuje na spolehlivé a rychlé testování at' už nanomateriálů či jiných látek na buněčných *in vitro* kulturách, aby docházelo k co nejvyšší redukci *in vivo* testů využívající zvířata.^{123, 124} *In vitro* toxikologické metody tak představují velice důležitou část výzkumu spojeného prakticky s jakýmkoliv aplikačním odvětvím.

5.1.1. Uhlíkové tečky pro *in vivo* fluorescenční pozorování mezenchymálních kmenových buněk^A

Regenerační terapie založené na cíleném doručování mezenchymálních kmenových buněk (MSCs – mesenchymal stem cells) patří mezi jedny z nejslibnějších technik v současné medicíně. Kmenové buňky totiž dokáží interagovat s mikroprostředím poškozeného místa, diferenciovat se na požadované typy buněk a tím přispívat k hojení a tvorbě nové tkáně.^{125, 126} Jedná se však o poměrně složitý proces, a proto se o něm vědci neustále snaží získávat co nejvíce detailních informací zaváděním nových strategií pro jeho sledování. Jednu takovou představuje i optické fluorescenční zobrazování, které umožňuje neinvazivní *in vivo* pozorování kmenových buněk dokonce až na buněčné úrovni.¹²⁷ I tato strategie má však své nedostatky zahrnující autofluorescenci tkání a vybělování tradičních organických fluoroforů. Proto byly vybrány uhlíkové tečky jako ideální kandidáti pro studium jejich uplatnění v této oblasti. CDs totiž vykazují výrazně lepší fluorescenční vlastnosti než klasické fluorescenční sondy, výbornou fotostabilitu a rezistenci proti vybělování, a současně také vynikající biokompatibilitu v porovnání s toxickými polovodičovými kvantovými tečkami.^{14, 128, 129}

5.1.1.1. Uhlíkové tečky s kvartérní amoniou skupinou na povrchu

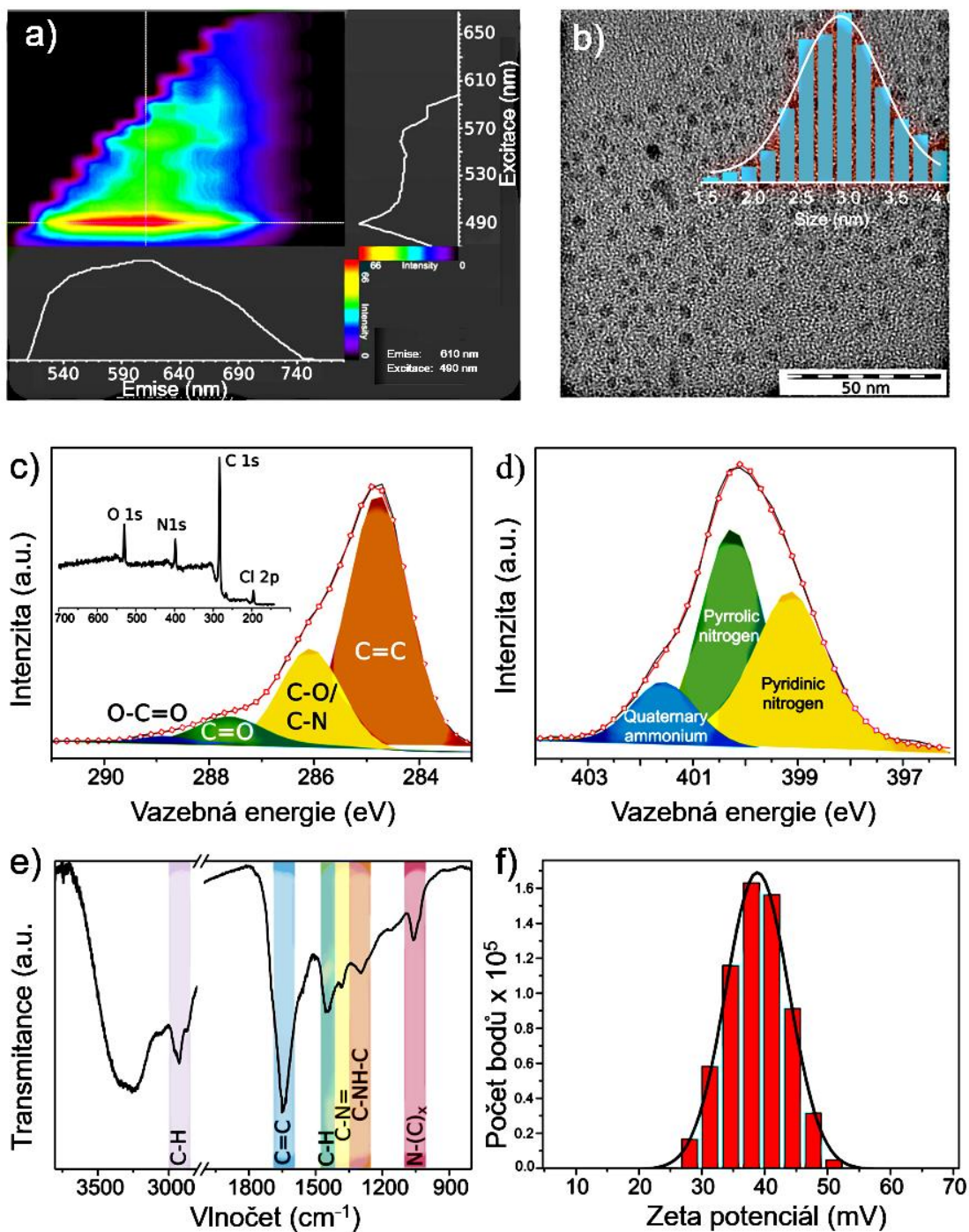
V naší studii byly použity uhlíkové tečky připraveny tepelným rozkladem nízkonákladových prekurzorů tris(hydroxymethyl)aminomethanu (Tris) a betain hydrochloridu. Podrobnosti o syntéze mohou být nalezeny v příslušné studii.¹¹³ Uhlíkové

^A Publikováno jako: **Malina, T.**; Polakova, K.; Skopalik, J.; Milotova, V.; Hola, K.; Havrdova, M.; Tomankova, K.; Cmiel, V.; Sefc, L.; Zboril, R. 2019. Carbon dots for *in vivo* fluorescence imaging of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Carbon*, 152, 434-443. Příloha A.

tečky na svém povrchu obsahovaly kvartérní amoniové skupiny, a proto dostaly název kvartérní uhlíkové tečky (QCDs – quaternary carbon dots).

Nanočástice vykazovaly typickou na excitaci závislou emisi,¹¹³ avšak pro jejich *in vitro* a *in vivo* využití byla použita pouze červená oblast jejich fluorescenčního spektra (Obrázek č. 8a). Podle elektronové mikroskopie měly QCDs velice úzkou velikostní distribuci (2 – 4 nm, Obrázek č. 8b), což bylo potvrzeno také měřením jejich hydrodynamického průměru, který byl 5 nm.²⁰ Díky přítomnosti kvartérního amonia měly navíc QCDs velmi dobrou koloidní stabilitu, jelikož jejich velikost ve fyziologickém roztoku vzrostla pouze na 8 nm podle měření DLS.²⁰

Charakterizace pomocí XPS odhalila přítomnost uhlíku (78,2 %), kyslíku (9,7 %), dusíku (9,2 %) a reziduální zbytek iontového chlóru (2,9 %), pocházejícího z prekurzorů syntézy.²⁰ Současně pak XPS spektrum uhlíku a dusíku ve vysokém rozlišení ukázalo silné zastoupení jak C=C uhlíkové vazby, tak výskyt kvartérní amoniové skupiny (Obrázek č. 8c, d). Stejný výsledek byl potvrzen také infračervenou spektroskopií (Obrázek č. 8e). Vysoké zastoupení kvartérního amonia bylo navíc zodpovědné za silně pozitivní náboj výsledných QCDs (+ 40 mV)(Obrázek č. 8f). Komplexní charakterizace vzorku QCDs tedy potvrdila, že syntéza vedla k vytvoření velmi malých, uniformních, velmi dobře karbonizovaných uhlíkových teček se silně pozitivním nábojem díky přítomnosti kvartérního amonia.



Obrázek č. 8. Komplexní charakterizace vzorku QCDs: a) Excitačně-emisní spektrum získané konfokálním mikroskopem; b) TEM obrázek s vloženým detailem o velikostní distribuci, měřítko je 50 nm; c) XPS spektrum uhlíku ve vysokém rozlišení s vloženým detailem o přehledovém spektru XPS; d) XPS spektrum dusíku ve vysokém rozlišení; e) FT-IR spektrum a f) Zeta potenciál materiálu. Převzato z ²⁰ a upraveno.

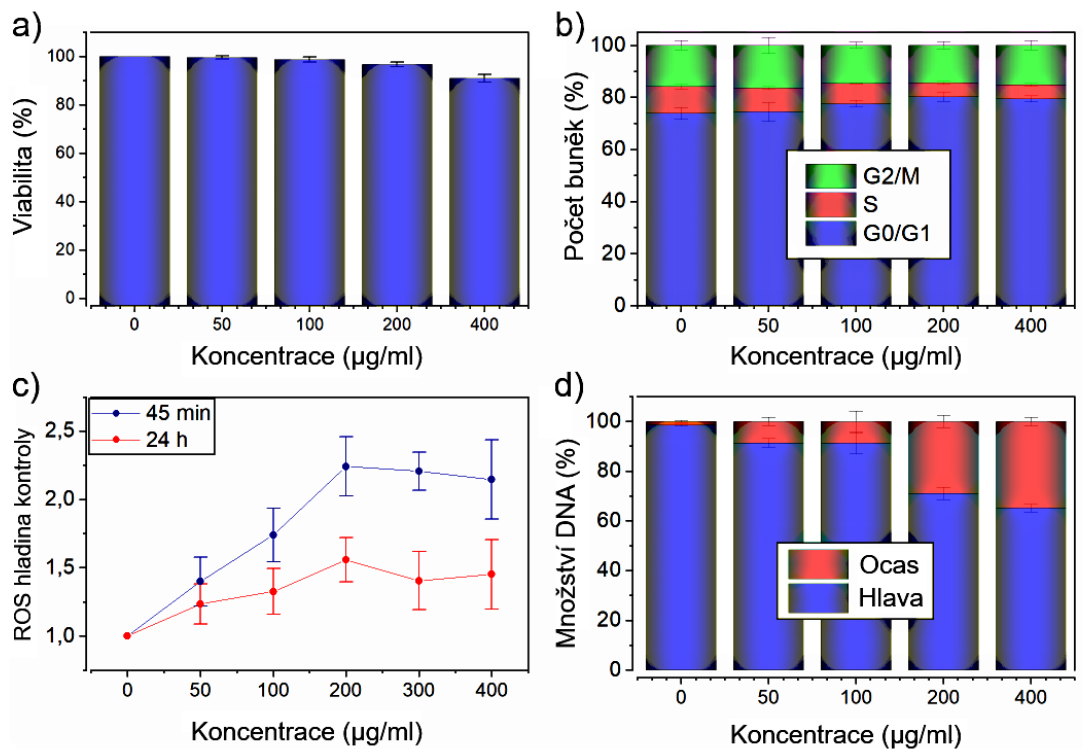
5.1.1.2. QCDs *in vitro* toxicita vůči mezenchymálním kmenovým buňkám

Je dobře známo, že míra přežití transplantovaných kmenových buněk je obvykle velmi nízká.¹³⁰ Proto první krok pro potenciální využití QCDs v regenerativní medicíně pro *in vivo* sledování mezenchymálních kmenových buněk představoval selekci vhodné a bezpečné koncentrace QCDs, která neovlivňuje viabilitu, ale ani charakter MSCs. Provedli jsme tak komplexní baterii *in vitro* testů MSCs, které byly po 24 h inkubovány s různými koncentracemi QCDs (50, 100, 200 a 400 µg/ml).

V literatuře bývá silně pozitivní náboj nanomateriálů často spojován s vyšší cytotoxicitou.¹³¹ V případě QCDs však testy viability MSCs prokázaly jejich silně biokompatibilní charakter, jelikož i MSCs značené po 24 h s nejvyšší testovanou koncentrací QCDs (400 µg/ml) měly viabilitu přes 90 % (Obrázek č. 9a). Pouze 10% pokles v životnosti buněk značených maximální testovanou koncentrací QCDs navíc představuje lepší výsledek, než byl dosažen v dalších studiích, které testovali *in vitro* toxicitu jiných CDs vůči kmenovým buňkám.¹³²⁻¹³⁵ Ačkoliv viabilita buněk nebyla významně poznamenána ani maximální testovanou koncentrací, koncentrace 200 a 400 µg/ml negativně ovlivnily další testované buněčné procesy MSCs. Tyto koncentrace způsobily jak výrazné změny v buněčném cyklu MSCs, tak poškození DNA buněk (Obrázek č. 9b a d). Především potenciální genotoxicita QCDs v těchto koncentracích může být riziková, jelikož i když poškození DNA nebylo natolik závažné, aby ovlivnilo viabilitu buněk, mohlo by eventuálně vést k mutagenезi a rakovinnému růstu buněk.¹³⁶ Od koncentrace 200 µg/ml byl také detekován největší nárůst reaktivních kyslíkových radikálů (ROS – reactive oxygen species), který mohl indikovat oxidační stres (Obrázek č. 9c). Proto byla pro pokračování studie vybrána koncentrace 100 µg/ml, která

nezpůsobila žádné významné změny ani v jednom testovaném buněčném procesu (Obrázek č. 9).

Následně byla tato koncentrace použita pro testování charakteru MSCs podle standardních kritérií stanovených Mezinárodní společností buněčné terapie.¹³⁷ Kritéria zahrnovala: i) schopnost MSCs adherence k plastu při kultivaci za standardních podmínek, ii) schopnost migrace, iii) schopnost diferenciaci do adipocytů, chondroblastů a osteoblastů *in vitro* a iv) schopnost exprese specifických povrchových markerů (CD105, CD73 a CD90). MSCs vykazovaly všechny schopnosti ze zmíněných kritérií i po 24 h značení koncentrací 100 µg/ml, což potvrdilo správnou selekci bezpečné koncentrace QCDs.²⁰

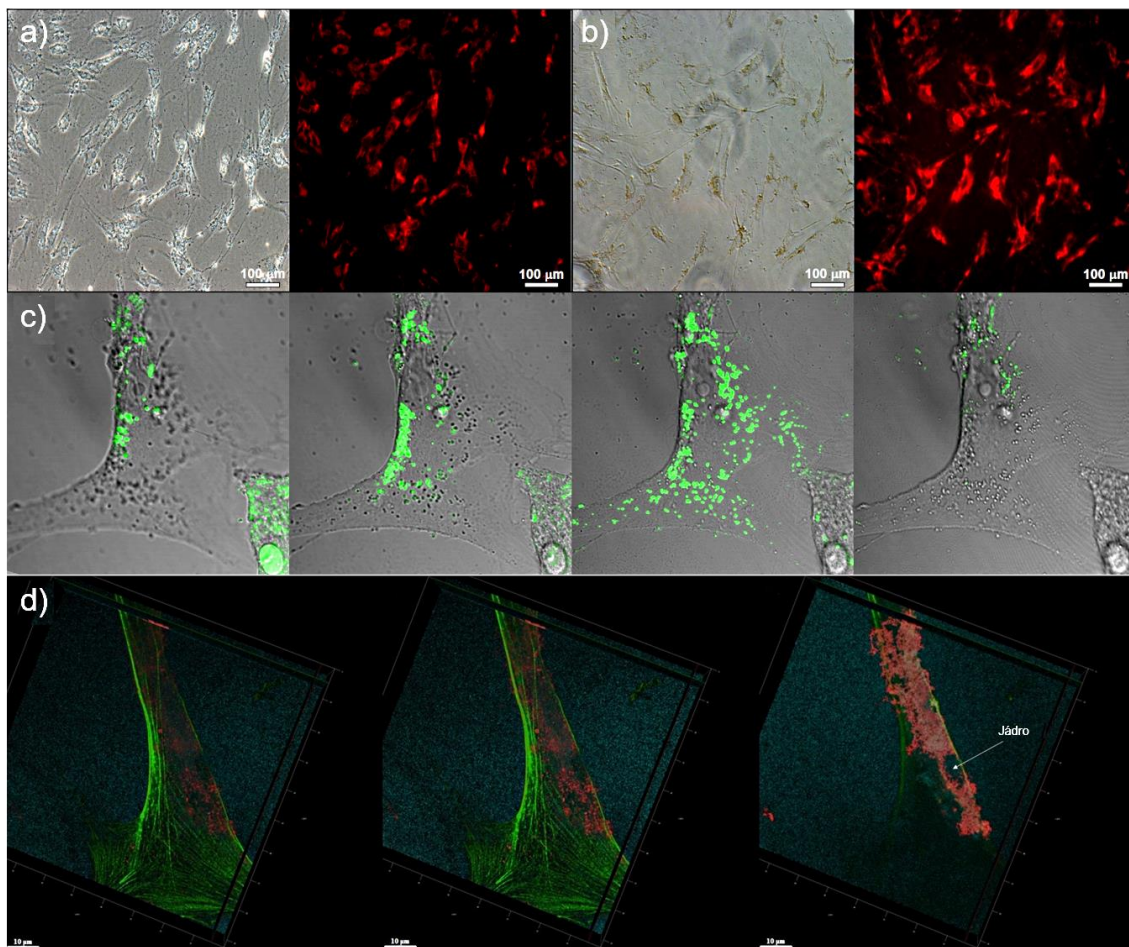


Obrázek č. 9. *In vitro* cytotoxicita MSCs značených po 24 h různými koncentracemi QCDs: a) buněčná viabilita MSCs; b) analýza buněčného cyklu MSCs; c) oxidační stres skrze generaci ROS a d) detekce poškození DNA. V panelu b) představují popisky G2/M, S a G0/G1 fáze buněčného cyklu a v panelu d) popis Ocas a Hlava množství DNA v ocasu nebo hlavě komety buňky, podle které se určuje poškození její DNA. Převzato z ²⁰ a upraveno.

5.1.1.3. Internalizace a distribuce QCDs v kmenových buňkách

Vnitrobuněčná distribuce 100 µg/ml QCDs v kmenových buňkách byla analyzována pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie. Fluorescenční mikroskopie prokázala přítomnost QCDs v buňkách už po 4 h inkubace (Obrázek č. 10a). Obrázky po 24 h inkubace následně ukázaly větší množství internalizovaných QCDs, jelikož došlo k výraznému zvýšení v intenzitě fluorescence (Obrázek č. 10b). Doplňující měření časové závislosti internalizace QCDs tyto výsledky potvrdila, jelikož nejvyšší fluorescenční signál byl detekován právě po 24 h, kdy byly buňky plně saturovány QCDs.²⁰ Distribuce QCDs v MSCs byla zkoumána také pomocí několika fluorescenčních

horizontálních skenů kmenové buňky, které jednoznačně vyloučily penetraci QCDs do jádra a opět naznačily jejich přítomnost v buněčných vezikulách uvnitř buňky (Obrázek č. 10c, d). Doplnující analýzy následně ukázaly, že QCDs do kmenových buněk opravdu vstupovaly pomocí procesu endocytózy a následně došlo k jejich akumulaci v lyzozomech.²⁰



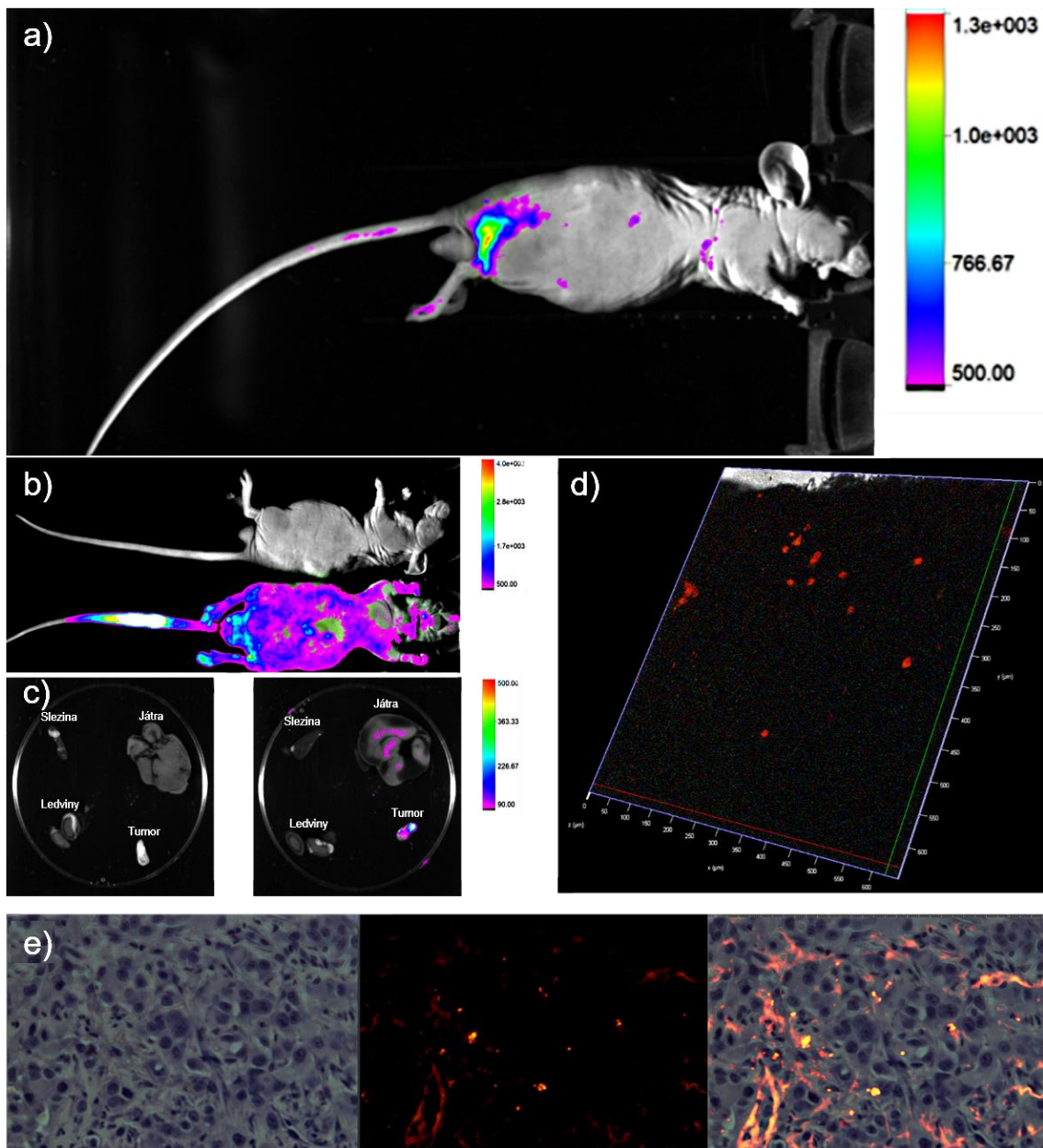
Obrázek č. 10. Obrázky MSCs z fluorescenční mikroskopie značené 100 $\mu\text{g/ml}$ QCDs po dobu a) 4 h a b) 24 h. Vlevo – obrázky v režimu světlého pole. Vpravo – obrázky ve fluorescenčním režimu s použitím filtru U-MWG2 (ex. 510-550 nm/em. >590 nm) pořízené mikroskopem Olympus IX70. Obrázky reprezentativní mezenchymální kmenové buňky pořízené konfokálním mikroskopem: c) Obrázky čtyř horizontálních vrstev získané překryvem režimů světlého pole a fluorescence (Setup ex. 488/em. 590 nm); d) Obrázky třech horizontálních vrstev získané překryvem dvou režimů fluorescence (Setup ex. 490/em. 600-650 nm pro QCDs a ex. 490/em. 500-525 nm pro ActinGreenTM 488). Převzato z ²⁰ a upraveno.

5.1.1.4. *Ex vivo* a *in vivo* sledování a migrační vlastnosti QCD- značených MSCs

Pomocí komplexní baterie *in vitro* testů jsme tedy byli schopni selektovat koncentraci QCDs, která dávala výrazný fluorescenční signál uvnitř MSCs a zároveň žádným způsobem neovlivňovala jak viabilitu a další buněčné procesy MSCs, tak jejich charakter. Současně byla ověřena *in vivo* kompatibilita QCDs pomocí testu hemolýzy a také otestován správný počet QCD-značených MSCs, který dával maximální fluorescenční signál *ex vivo*.²⁰ Pro posouzení, zda je signál QCD-značených MSCs dostatečný i uvnitř organismu *in vivo* a lze takto označené buňky sledovat, byla následně provedena jejich subkutánní aplikace do zadní končetiny myši. Aplikované buňky označené QCDs byly jasně detekovány pomocí *in vivo* fluorescenčního pozorování (Obrázek č. 11a). Tento výsledek tak potvrdil premisu, že QCDs mohou být využity pro sledování kmenových buněk v různých terapiích regenerační medicíny, zahrnující např. procesy hojení kožních ran.

Potvrdili jsme tedy, že QCD-značené MSCs dávají dostatečný signál pro jejich *in vivo* fluorescenční detekci. Současně byly pomocí *in vitro* testů potvrzeny jejich migrační vlastnosti, které zůstaly i po označení QCDs neměnné.²⁰ Živý organismus však představuje kompletně odlišné prostředí od *in vitro* testů, a proto je pro potenciální využití v regeneračních terapiích nezbytné, aby schopnost navádění do zánětlivého místa organismu MSCs, byla po značení QCDs ověřena také *in vivo*. Proto byly QCD-značené MSCs intravenózně aplikovány do myši nesoucí tumor, který zastupoval místo vykazující zánětlivou reakci (Obrázek č. 11b). Po 24 h od aplikace byly odebrány vybrané orgány myši (játra, ledviny, slinivka a tumor) a byla provedena jejich fluorescenční detekce *ex vivo*. V porovnání s kontrolní myší, které byly aplikovány neznačené MSCs, byl fluorescenční signál detekován hlavně v tumoru a částečně také v játrech myši, které byly

aplikovány QCD-značené MSCs (Obrázek č. 11c). Současně byla provedena konfokální mikroskopie tenkých řezů nejprve samotné tumorové tkáně a následně také tumorové tkáně po barvení hematoxylinem a eosinem (H&E). U obou pozorování byla potvrzena přítomnost QCD-značených MSCs v tumorové tkáni ve formě červených fluorescenčních klastrů (Obrázek č. 11d a 11e). Bylo tedy potvrzeno, že značení pomocí QCDs nemění schopnost navádění MSCs do zánětlivého místa organismu ani při *in vivo* aplikaci, což je klíčové zjištění pro jejich potenciální aplikaci v buněčné a regenerační terapii.



Obrázek č. 11. a) *In vivo* fluorescenční sledování MSCs značených QCDs po subkutánní aplikaci do zadní končetiny myši. b) *In vivo* fluorescenční sledování myši nesoucí tumor po intravenózní aplikaci neznačených MSCs (horní myš) a po aplikaci MSCs značených QCDs (spodní myš). c) *Ex vivo* fluorescenční sledování vybraných orgánů (slezina, játra, ledviny, tumor) z myši po 24 h intravenózní aplikace neznačených MSCs (vlevo) a MSCs značených QCDs (vpravo). d) Obrázek tenkého řezu tumoru pořízený konfokálním mikroskopem. e) Tumorová tkáň po H&E barvení: obrázek v režimu světlého pole (vlevo), obrázek ve fluorescenčním režimu (uprostřed) a obrázek zobrazující překryv obou režimů (vpravo). Pro všechna fluorescenční měření byl použit setup ex. 520 nm/em. 600 nm. Převzato z ²⁰ a upraveno.

5.1.1.5. Shrnutí studie

V této práci jsme poprvé představili použití uhlíkových teček pro bezpečnou *in vivo* aplikaci mezenchymálních kmenových buněk. Po komplexních testech *in vitro* toxicity byla selektována koncentrace, která byla využita jako fluorescenční sonda pro kmenové buňky bez potřeby dalších podpůrných sloučenin, jako jsou transfekční činidla nebo do buněk pronikající fluorescenční proteiny. QCDs tedy představují velice slibný materiál pro nové strategie v regeneračních terapiích využívající kmenové buňky.

5.1.2. Toxicita uhlíkových materiálů – spolehlivá metoda pro sledování viability pomocí nového přístupu v průtokové cytometrii^B

Hodnocení viability buněk představuje jeden z nejdůležitějších testů *in vitro* akutní toxicity nanomateriálů (nanomaterials – NMs) pro jejich jakoukoliv další aplikaci. Na základě tohoto výsledku je totiž možné stanovit křivku závislosti odezvy na dávce (dose-response) a dále se zaměřit na pochopení mechanismů interakce mezi NMs a buněčnými liniemi.¹³⁸ Již bylo několikrát popsáno, že NMs mohou interferovat se standardními testy viability.^{139, 140} O to více alarmující je zjištění, že stále existuje velké množství studií, které tuto informaci neberou v potaz. Důsledkem toho dochází v literatuře k publikování falešných výsledků akutní toxicity NMs, které jsou způsobeny interferencí a ne účinkem NMs, což může představovat obrovský problém pro budoucí bezpečnou a udržitelnou aplikaci specifických nanomateriálů.¹⁴⁰ Uhlíkové nanomateriály nejsou výjimkou a v literatuře už byly publikovány zprávy o jejich interferenci s běžnými testy viability jako je např. barvení alamarovou modří a neutrální červení nebo MTT a WST-1 test.¹⁴¹⁻¹⁴⁶ Proto se použití těchto metod pro studium viability CNMs doporučuje pouze s velkou opatrností.

Průtoková cytometrie je rychlá a vysoce přesná technika poskytující informaci o jednotlivých buňkách v celé populaci,¹⁴⁷ takže představuje vhodnou alternativu pro *in vitro* testování viability buněk. Na druhou stranu, již bylo zjištěno, že NMs mohou interferovat dokonce i s vyhodnocením pomocí této metody.¹⁴⁸ Proto se nabízí otázka, zda CNMs mohou také interferovat s metodou průtokové cytometrie, a co je důležitější,

^B Publikováno jako: **Malina, T.**; Poláková, K.; Hirsch, C.; Svoboda, L.; Zbořil, R. 2021. Toxicity of Carbon Nanomaterials—Towards Reliable Viability Assessment via New Approach in Flow Cytometry. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 7750. Příloha B.

jestli existuje způsob, jak interferenci překonat a získat tak spolehlivé výsledky akutní toxicity CNMs.

Pro demonstraci, jak rozdílné vlastnosti materiálů mohou ovlivnit jejich interferenci s *in vitro* testy, byli vybráni tři zástupci nových CNMs: grafenová kyselina (GA), exfoliovaný grafitický nitrid uhlíku (g-C₃N₄) a uhlíkové tečky (CDs). Detaily o syntéze jsou uvedeny v příslušných publikacích: GA,¹⁷ g-C₃N₄ (materiál označen jako NS500¹⁴ a NS¹⁴⁹) a CDs.²⁰ Jelikož je interference materiálů úzce spojena s použitou koncentrací, byly vybrány dvě koncentrace (50 a 300 µg/ml), kterými byly po 24 h značeny lidské kožní fibroblasty (BJ) a následně studována interference jak s klasickým testem viability MTT, tak s metodou LIVE/DEAD průtokové cytometrie.

5.1.2.1. Vlastnosti vybraných CNMs

Hlavní vlastnosti nanomateriálů, které hrají hlavní roli nejen při *in vitro* testování, jsou velikost, náboj a tvar materiálů, proto jsou tyto vlastnosti pro tři CNMs přehledně popsány v Tabulce č. 1. GA vykazovala záporný náboj (- 32 mV) a obsahovala mono nebo několikvrstevné listy o velikosti kolem 200 nm (Tabulka č. 1). Navíc u ní nebyly popsány fluorescenční vlastnosti.¹⁷ Na druhou stranu, CDs a g-C₃N₄ mají schopnost fluorescence, a především uhlíkové tečky jsou známy pro jejich široké emisní spektrum a silný fluorescenční signál.¹⁴ U obou materiálů byl prokázán pozitivní náboj (+ 40 mV pro CDs a +24 mV pro g-C₃N₄) (Tabulka č. 1), ale měly kompletně odlišnou velikost i tvar. Zatímco CDs byly složeny z velmi malých nanokuliček (5 nm), g-C₃N₄ obsahovaly volné aglomeráty s nepravidelným tvarem, které měly podle DLS velikost 880 nm (Tabulka č. 1).

Tabulka č. 1. Charakterizace uhlíkových nanomateriálů g-C₃N₄, CDs a GA. Převzato z ²¹ a upraveno.

	g-C ₃ N ₄ ^{114, 149}	CDs ²⁰	GA ¹⁷
Velikost (DLS, nm)	880	5	200
Zeta potenciál (mV)	+ 24	+ 40	- 32
Tvar	Volné aglomeráty s nepravidelným tvarem	kuličky	Mono/několikavrstevné listy
Fluorescenční vlastnosti	Ano	Ano	Ne

5.1.2.2. Světelná mikroskopie a interference CNMs se standardním testem MTT

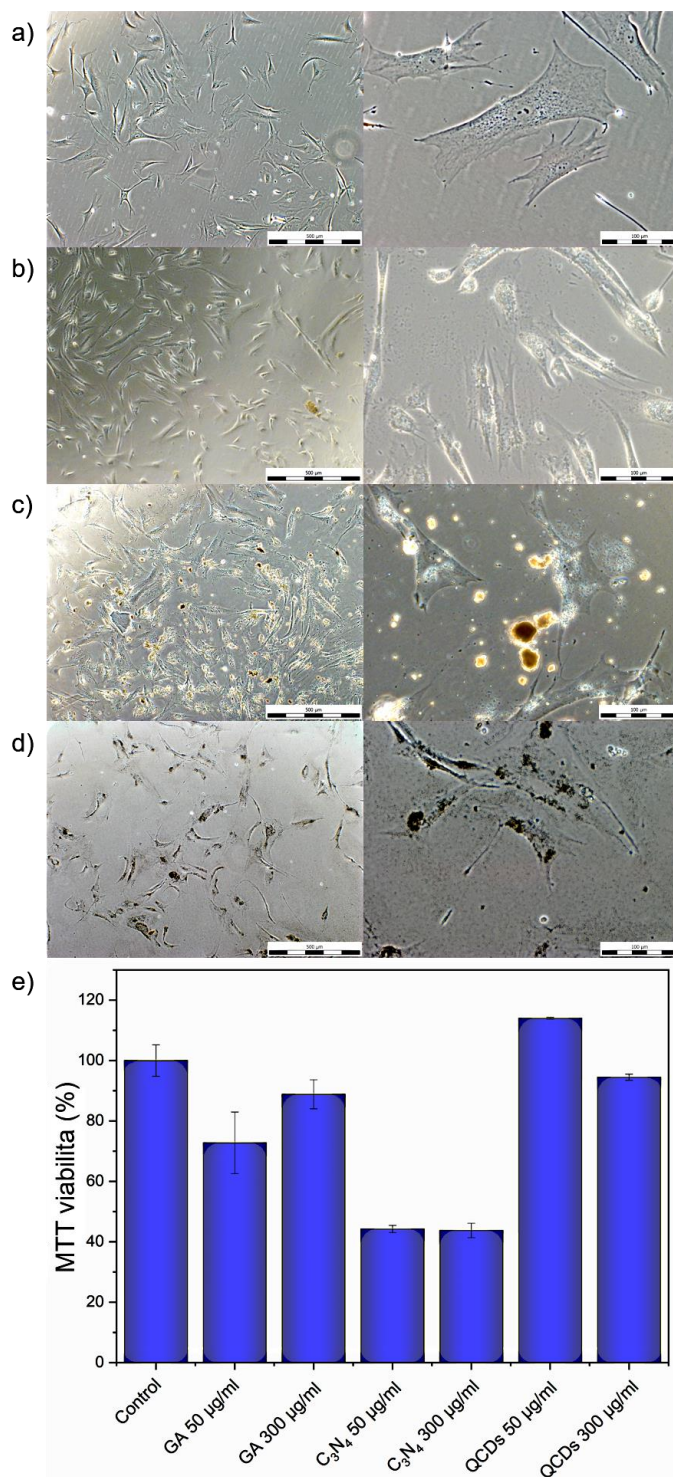
Prvním důležitým faktorem, který může ovlivňovat možnou interferenci CNMs je jejich chování a stabilita v kultivačním médiu. Ačkoliv jsme již měli informace o nejdůležitějších vlastnostech studovaných CNMs (Tabulka č. 1), tyto se mohou velice rychle změnit kvůli interakci s proteiny přítomných v kultivačním médiu (přesněji ve fetálním hovězím séru - FBS).¹⁵⁰ Z obrázků světelné mikroskopie na obrázku č. 12 je patrné, že chování CNMs v médiu se velice lišilo především v závislosti na jejich povrchovém náboji (zobrazeny jsou pouze vzorky značené koncentrací 300 µg/ml). Je třeba také poznamenat, že vzorky byly před pozorováním světelnou mikroskopií promyty fosfátovým pufrům (PBS – Phosphate Buffered Saline), ve kterém byly také následně

zobrazovány. Ve vzorcích značených pozitivně nabitými CDs a g-C₃N₄ byla pozorována přítomnost velkých aglomerátů nanomateriálů (Obrázek č. 12b a c), i když bylo velké množství volných aglomerátů již odebráno společně se supernatantem. Přestože byly určité aglomeráty detekovány také u vzorků značených GA s negativním nábojem, jejich velikost byla mnohem menší než v případě vzorků CDs a především g-C₃N₄ (Obrázek č. 12d). Důvodem vzniku aglomerátů je především náboj CNMs, jelikož pozitivně nabitě NMs vykazují mnohem vyšší interakcí s proteiny v FBS (především s abundantními albuminy a globuliny),¹⁵¹ které nesou za fyziologického pH negativní náboj.¹⁵² Důvodem pro větší velikost a vyšší množství aglomerátů u vzorku značeného g-C₃N₄ než CDs byl výrazný rozdíl ve velikosti CNMs (Tabulka č. 1), jelikož je pochopitelné, že větší materiály budou po interakci s proteiny vytvářet větší aglomeráty. Z pozorování světelnou mikroskopií jsme tak vyvodili dva závěry. Zaprvé, absence mrtvých buněk a nezměněná morfologie buněk značených CNMs naznačovala, že by vybrané materiály v použité koncentraci neměly mít výrazný cytotoxický účinek vůči BJ buňkám. Za druhé, mimo různého množství a velikosti aglomerátů, všechny vybrané materiály interagovaly s buňkami, jelikož byly detekovány ať už uvnitř buněk nebo v kontaktu s jejich membránami. Existoval tedy předpoklad, že CNMs budou interferovat s vyhodnocením viability.

Pro ukázkou, jak výrazně může interference CNMs ovlivnit vyhodnocení běžného testu toxicity, jsme provedli klasicky používaný test MTT pro naše vybrané CNMs (Obrázek č. 12e). Test byl proveden podle standardního protokolu, kdy bylo odečteno pozadí vzorků, které by mělo sloužit právě k překonání interference materiálů. Bohužel, náš pokus dokázal, že tento postup není dostatečný, jelikož došlo k silné interferenci zejména materiálů GA a g-C₃N₄ (Obrázek č. 12e). Především vzorek g-C₃N₄ způsobil výrazný pokles MTT viability pod 50 %, což by indikovalo obrovský cytotoxický efekt

(Obrázek č. 12e). Důvodem však byla právě interference materiálu, jelikož obrázky ze světelného mikroskopu neukázaly skoro žádné mrtvé nebo poškozené buňky (Obrázek č. 12c). Současně zásobní roztok g-C₃N₄ měl bílou barvu, což způsobilo, že jamky značené tímto vzorkem měly mnohem jasnější barvu než jamky s kontrolními buňkami.²¹ U vzorku GA nedošlo k tak výraznému poklesu MTT viability, jako v případě g-C₃N₄, ale i tak byly hodnoty pro obě koncentrace pod 90 % (73 % a 89 % pro koncentraci 50 a 300 µg/ml, resp.). Mikroskopická analýza opět neukázala skoro žádné poškozené buňky, za to však bylo detekováno velké množství GA částic uvnitř buněk nebo pokrývajících jejich povrch (Obrázek č. 12d). Právě tyto materiály tak mohou být zodpovědné za pokles v MTT signálu skrze interakci s krystaly formazanu podobně, jako bylo prokázáno u jiných uhlíkových nanomateriálů.^{144, 146} Z výsledků našeho pokusu jsme nebyli schopni určit, zda i poslední vzorek CDs způsobil interferenci, jelikož MTT hodnoty viability byly srovnatelné s kontrolním vzorkem, a navíc nebyla pozorována žádná změna barvy MTT roztoku (Obrázek č. 12e).²¹

Bylo tedy prokázáno, že použití klasického MTT testu viability není pro vybrané CNMs vhodné, jelikož i přes využití postupu určeného k překonání interference vedlo k falešným výsledkům viability BJ buněk.



Obrázek č. 12. Obrázky BJ buněk pořízené světelnou mikroskopií v PBS po odebrání supernatantu pod menším (vlevo – objektiv 10x) a větším (vpravo – objektiv 40x) zvětšením. a) Neznačené kontrolní BJ buňky. BJ buňky značené po 24 h 300 µg/ml b) CDs, c) g-C₃N₄ a d) GA. Měřítka jsou 500 µm (obrázky vlevo) a 100 µm (obrázky vpravo). Výsledky viability BJ buněk značených 24 h koncentracemi 50 a 300 µg/ml CNMs podle standardního MTT testu. Převzato z ²¹ a upraveno.

5.1.2.3. **Dodatečné kontroly pro LIVE/DEAD analýzu pomocí průtokové cytometrie**

V LIVE/DEAD analýze průtokové cytometrie se standardně využívá negativní (neznačené buňky) a pozitivní (buňky umrtvené teplem 15 min v 60 °C) kontrola. Pro překonání potenciální interference jsme však v našem testu zavedli také dvě dodatečné kontroly.

První typ se jmenoval spike-in kontrola a byl založen na typu kontroly představené v článku Bohmer et al.¹⁴⁸ Jelikož při přípravě vzorku k analýze pomocí průtokové cytometrie dochází ke kolekci veškerého objemu do jedné zkumavky, abychom při měření měli informaci o všech buňkách ve vzorku (sbírá se supernatant, PBS pro promytí a následně buňky), byly nanomateriály přítomny při značení fluorescenčními barvivy (PI/Calcein). Proto jsme ve spike-in kontrole těsně před měřením přidali stejný objem ze zásobních roztoků CNMs, který odpovídal nejvyšší koncentraci v celém sesbíraném objemu zkumavky (300 µg/ml). Takto jsme napodobili situaci, kdy by žádné nanomateriály nebyly internalizovány do buněk a skončily volně ve vzorku, kde mohly potenciálně interferovat s fluorescenčními barvivy. Spike-in kontroly představují vynikající nástroj a měly by být využívány v jakémkoliv měření průtokové cytometrie, kde by mohla být očekávána interference nanomateriálů. Umožňují totiž získat profil volných nanomateriálů v roztoku, a proto je díky ní proveden správně proces výběru populace buněk tzv. gatování. Při vyhodnocení je totiž klíčové, aby byla provedena analýza pouze populace buněk ve vzorku a ne volných materiálů.

Přestože použití spike-in kontrol pomohlo s výběrem správných gatů pro výběr populace buněk, neposkytly nám bohužel žádnou informaci o chování a možné interferenci CNMs uvnitř nebo na membránách buněk. Při spike-in kontrolách jsou totiž NMs přidávány do vzorku těsně před měřením a nestihnou tak přímo s buňkami

interagovat. Proto bylo důležité zavést další dodatečnou kontrolu, kterou jsme pojmenovali nanomateriálová pozitivní kontrola (NM PC – nanomaterial positive control). V této kontrole byly buňky značeny CNMs po 24 h stejně jako testované vzorky, ale před měřením byly buňky umrtveny teplem (60 °C, 20 min). Byla tak vytvořena kontrola, která představovala situaci, kdy by CNMs zabily veškeré buňky ve vzorku a my tak získali profil mrtvých buněk, které měly CNMs uvnitř nebo na svých membránách.

V následujících kapitolách budou představeny dot ploty LIVE/DEAD analýzy průtokové cytometrie, které popisují intenzitu dvou fluorescenčních barviv: propidium jodidu (PI – červený detektor, FL-1 A setup: ex. 488/em. 586 nm), který proniká pouze do mrtvých buněk s poškozenou membránou a calceinu (zelený detektor, FL – 2 – A setup: ex. 488/em. 527 nm), který je fluorescenční pouze poté, co je metabolizován aktivními esterázami uvnitř živých buněk.

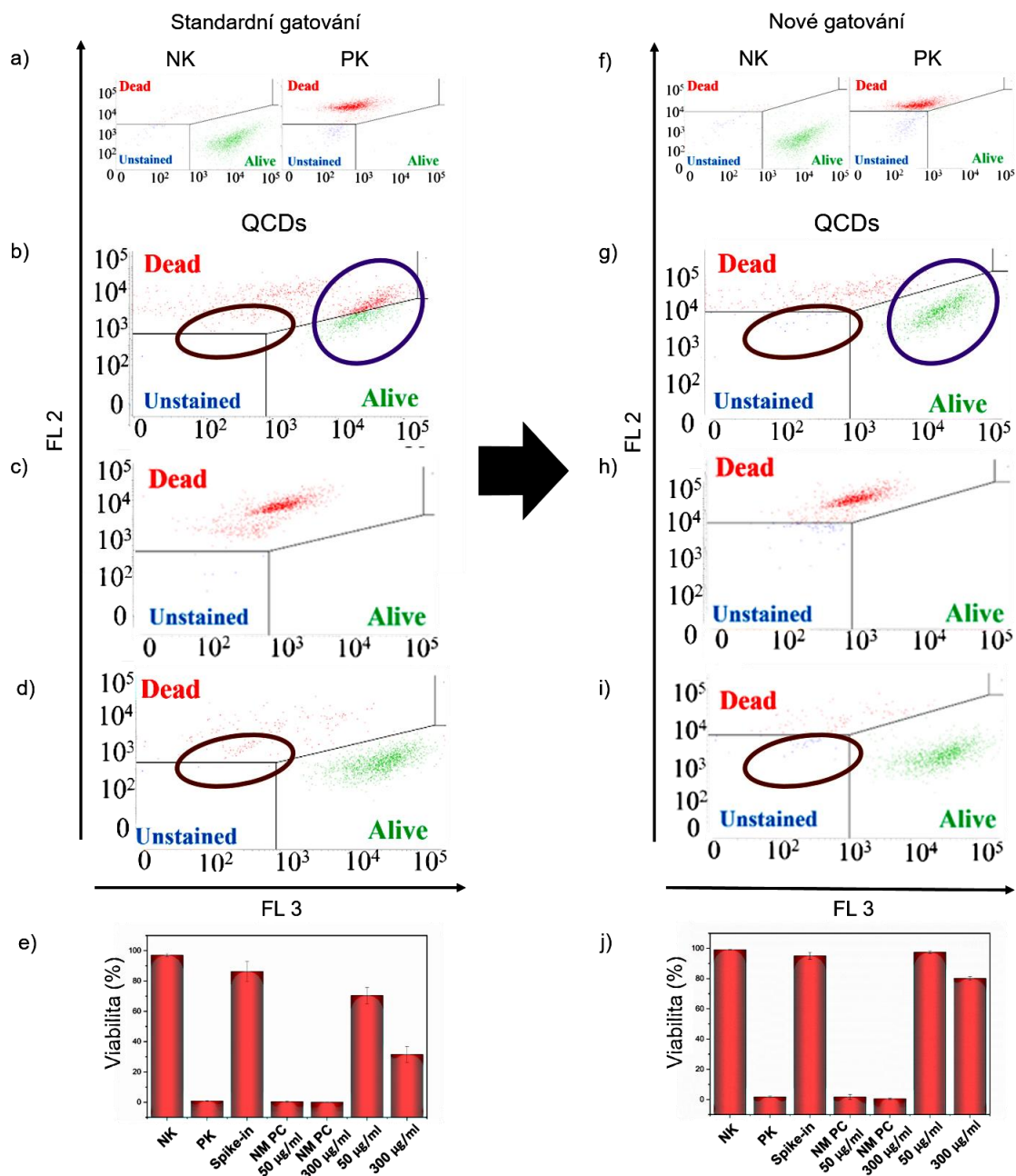
Budou uvedeny podrobné informace nejprve o tom, jak mohou rozdílné typy interference vybraných CNMs negativně ovlivnit výsledky LIVE/DEAD analýzy provedené podle standardního postupu zahrnujícího pouze negativní a pozitivní kontrolu. Následně bude popsáno, jak lze pomocí nového protokolu zahrnujícího dodatečné kontroly vybrat správné gatování, díky kterému je možné překonat interferenci CNMs a získat spolehlivé výsledky v LIVE/DEAD analýze průtokové cytometrie. Standardní postup zahrnoval dobře známý protokol výběru gatů pouze podle negativní (viabilita přes 90 %) a pozitivní (viabilita pod 10 %) kontroly. V našem novém postupu podle dodatečných kontrol byly gaty vybrány následovně: viabilita negativní a spike-in kontroly přes 90 % a viabilita pozitivní a NM PC kontroly pod 10 %. Jelikož všechny typy interference byly výraznější pro vyšší koncentraci, jsou ukázány reprezentativní dot ploty z průtokové cytometrie pouze pro vzorky značené koncentrací 300 µg/ml CNMs.²¹

5.1.2.4. CDs a LIVE/DEAD analýza BJ buněk – překonání interference fluorescenčních vlastností

V metodě využívající standardní gatování byly detekovány dva typy interference CDs s LIVE/DEAD analýzou (Obrázek č. 13a-e). První a mnohem výraznější typ představovala interference skrze fluorescenční vlastnosti CDs.²⁰ Body interferující tímto typem interference jsou na obrázku č. 13b zvýrazněny fialovým oválem a můžeme vidět, že interakce CDs s buňkami způsobila posun fluorescenční intenzity bodů reprezentující buňky značené CDs v červeném detektoru (FL – 2 – A) (Obrázek č. 13b). Nárůst intenzity byl natolik výrazný, že způsobil posun určitého procenta bodů reprezentujících buňky z gatu pro živé buňky (*alive*) do gatu pro mrtvé buňky (*dead*) (Obrázek č. 13b). Druhým typem interference byla přítomnost volných aglomerátů CDs. Ačkoliv byl tento typ interference méně výrazný, jelikož jsme se snažili pro vyhodnocení LIVE/DEAD analýzy gatovat pouze populaci buněk,²¹ způsobil pokles viability spike-in kontroly na 86 % (Obrázek č. 13d a 13e). Body představující volné aglomeráty jsou na obrázku č. 13 zvýrazněné hnědým oválem (Obrázek č. 13d). I když byl pokles viability zaznamenán u spike-in kontroly mírný, indikoval, že vzorek CDs může způsobovat další typ interference, jelikož spike-in kontrola by měla mít porovnatelnou viabilitu s negativní kontrolou, tedy přes 90 %. Bylo tedy prokázáno, že výsledná viabilita vzorků značených 50 a 300 µg/ml CDs (70 a 32 %, resp.) vyhodnocená podle standardního postupu nebyla spolehlivá, jelikož byla ovlivněna dvěma typy interference CDs.

Abychom ukázali, jak překonat interferenci CDs v LIVE/DEAD analýze průtokové cytometrie, vyhodnotili jsme stejnou datovou sadu podle nového protokolu gatování využívajícího dodatečné kontroly (Obrázek č. 13f-j). S využitím těchto gatů zůstala nejprve celá populace živých buněk obsahujících CDs v gatu pro živé buňky (*alive*) i přes zvýšenou intenzitu fluorescence (fialový ovál v Obrázku č. 13g). Současně se také body

reprezentující volné aglomeráty CDs přesunuly do gatu pro neoznačené buňky (*unstained*) a nebyly tak zahrnuty do vyhodnocení viability, díky čemuž měla spike-in kontrola viabilitu přes 90 % (hnědý ovál v Obrázku č. 13i a Obrázek č. 13j). Podle nového protokolu tak značení BJ buněk po 24 h koncentracemi 50 a 300 µg/ml CDs vyústilo ve výslednou viabilitu 98 a 80 %, resp. (Obrázek č. 13j).



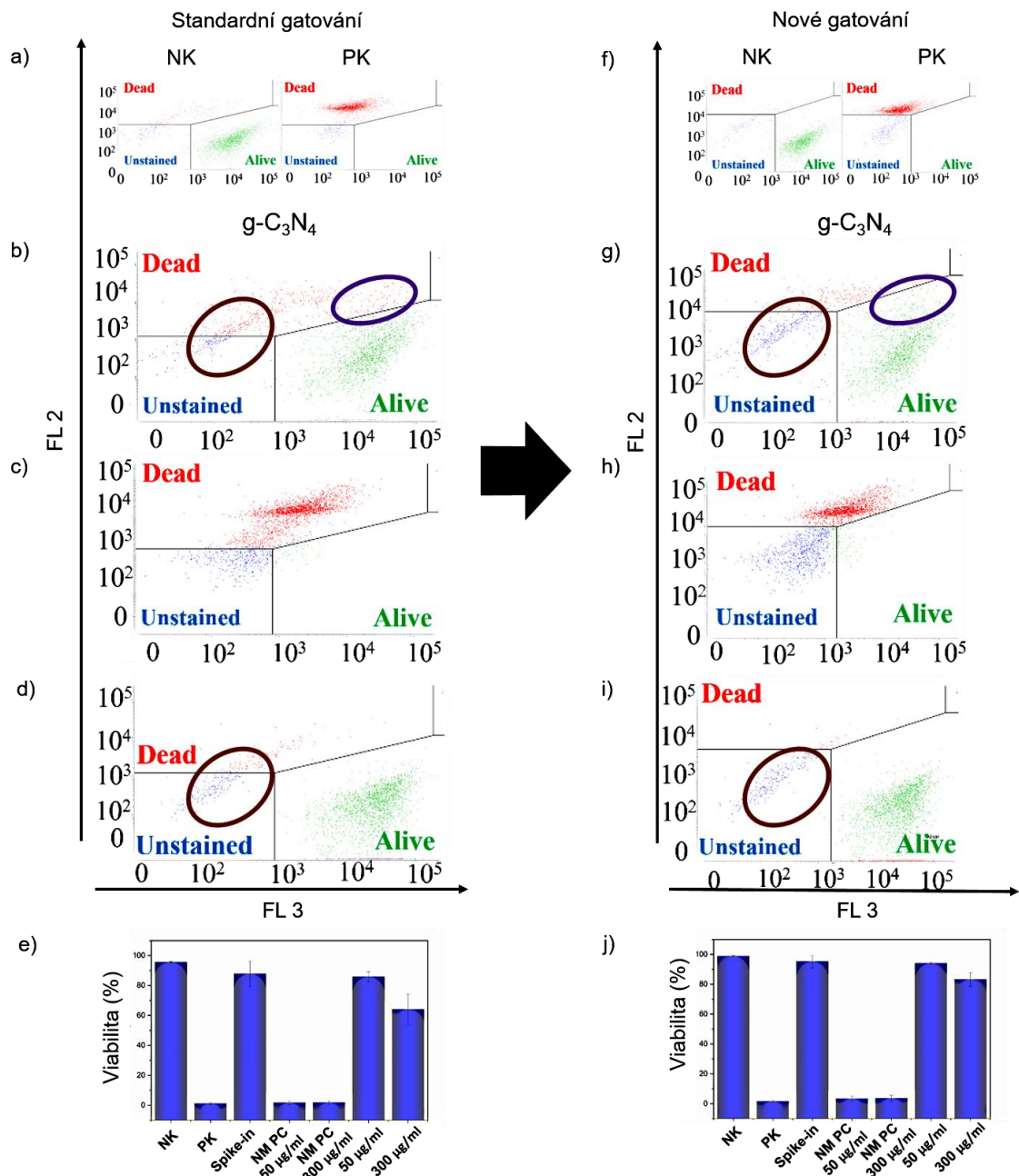
Obrázek č. 13. Dot ploty LIVE/DEAD analýzy: (a, f) negativní a pozitivní kontroly BJ buněk a (b - d, g - i) BJ buněk značených vzorkem CDs a vyhodnoceny podle (a - d) standardního gatování a (f - i) nového protokolu gatování. b, g) vzorky značené 300 µg/ml CDs po 24 h. c, h) NM PC 300 µg/ml pro vzorek CDs. d, i) Spike-in kontroly pro vzorek CDs. e, j) Vyhodnocení viability BJ buněk značených po 24 h CDs a dodatečných kontrol (n = 3). Body v gatru *alive* (živé) jsou označeny zeleně, body v gatru *dead* (mrtvé) červeně a body v gatru *unstained* (neoznačené) jsou uvedeny modře. Body interferujících volných aglomerátů jsou zvýrazněny hnědým oválem a body interferujících buněk s fluorescenčními CDs uvnitř nebo na membráně fialovým oválem. Převzato z²¹ a upraveno.

5.1.2.5. g-C₃N₄ a LIVE/DEAD analýza BJ buněk – překonání

interference volných aglomerátů

Pro vzorek g-C₃N₄ byly podle standardního postupu detekovány stejné typy interference jako u vzorku CDs, avšak jejich vliv na vyhodnocení se výrazně lišil. Posun ve fluorescenční intenzitě bodů buněk obsahující g-C₃N₄ nebyl ani zdaleka natolik výrazný jako v případě CDs, jelikož způsobil posun pouze zlomku bodů (fialový ovál v Obrázku č. 14b). Intenzivnější interferenci představovala přítomnost volných aglomerátů ve vzorcích, které se překrývaly s body reprezentující populaci buněk, a proto je při prvotním gatování nešlo odlišit a musely být do vyhodnocení zahrnuty, aby nedošlo ke ztrátě informace o populaci buněk.²¹ Tyto body se při použití standardního gatování nacházely v gatě pro mrtvé buňky (dead) jak ve vzorku značeném 300 µg/ml g-C₃N₄ (hnědý ovál v Obrázku č.14b), tak ve spike-in kontrole, kde byly zodpovědné za její pokles na 88 % živých buněk (hnědý ovál v Obrázku č. 14d a Obrázek č. 14e). Pokles viability u vzorku značených 24 h 50 a 300 µg/ml g-C₃N₄ na 86 a 63 %, resp. tak nebyl způsoben působením materiálu, ale interferencí jeho volných aglomerátů (Obrázek č. 14e).

Využitím nového protokolu s dodatečnými kontrolami jsme byli schopni překonat tuto interferenci, jelikož výběrem specifických gatů byla vyhodnocována pouze populace buněk a body reprezentující volné aglomeráty byly přesunuty do gatě pro neoznačené buňky (*unstained*) (hnědé ovály v Obrázku č. 14g a 14i). Současně také body buněk obsahujících g-C₃N₄ se zvýšenou intenzitou se nyní nacházely v gatě pro živé buňky (*alive*) (modrý ovál v Obrázku č. 14g). Výsledná viabilita BJ buněk značených 24 h 50 a 300 µg/ml g-C₃N₄ tak byla 94 a 83 %, resp. (Obrázek č. 14j).



Obrázek č. 14. Dot plots LIVE/DEAD analýzy: (a, f) negativní a pozitivní kontroly BJ buněk a (b - d, g - i) BJ buněk značených vzorkem g-C₃N₄ a vyhodnoceny podle (a - d) standardního gatování a (f - i) nového protokolu gatování. b, g) vzorky značené 300 µg/ml g-C₃N₄ po 24 h. c, h) NM PC 300 µg/ml pro vzorek g-C₃N₄. d, i) Spike-in kontroly pro vzorek g-C₃N₄. e, j) Vyhodnocení viability BJ buněk značených po 24 h g-C₃N₄ a dodatečných kontrol (n = 3). Body v gatú *alive* (živé) jsou označeny zeleně, body v gatú *dead* (mrtvé) červeně a body v gatú *unstained* (neoznačené) jsou uvedeny modře. Body interferujících volných aglomerátů jsou zvýrazněny hnědým oválem a body interferujících buněk s fluorescenčními g-C₃N₄ uvnitř nebo na membráně fialovým oválem. Převzato z ²¹ a upraveno.

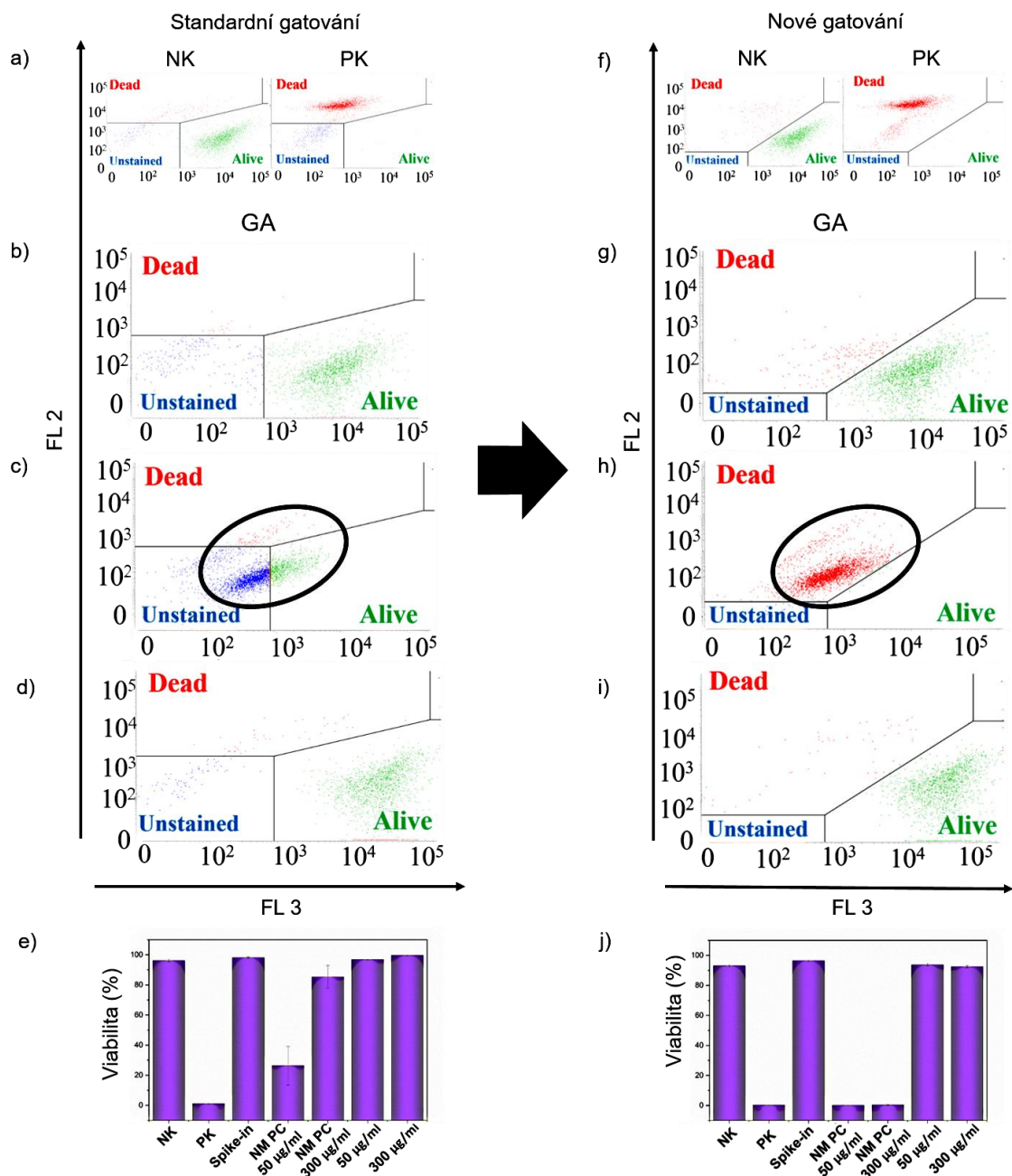
5.1.2.6. GA a LIVE/DEAD analýza BJ buněk – překonání

interference zhášení fluorescence PI

Pro vzorky CDs a g-C₃N₄ nebyla ovlivněna kontrola NM PC (Obrázek č. 13 a č. 14) a k detekci interference byla využita především spike-in kontrola, jelikož CDs a g-C₃N₄ způsobovaly vznik volných aglomerátů (Obrázek č. 12b a 12c). Vzorek GA nevytvářel tak velké aglomeráty, na druhou stranu však mikroskopie ukázala, že buňky značené GA měly velké množství materiálů buď v intracelulárním prostoru, nebo na své membráně (Obrázek č. 12d). LIVE/DEAD analýza provedena podle standardního gatování odhalila, že GA způsobuje kompletně jiný typ interference než zbylé dva CNMs (Obrázek č. 15a-e). Ačkoliv spike-in kontrola nebyla ovlivněna (viabilita přes 90 %), vzorek GA způsoboval zhášecí efekt, který měl za následek výrazný pokles intenzity fluorescence PI a tedy bodů představující mrtvé buňky. Zatímco v pozitivní kontrole měly body reprezentující mrtvé buňky intenzitu fluorescence okolo 10⁴ RFU v červeném detektoru (FL – 2, Obrázek č. 15a), v kontrole NM PC 300 µg/ml byla intenzita bodů silně redukována na hodnoty kolem 10² RFU v červeném detektoru (černý ovál v Obrázku č. 15c). Jelikož v obou kontrolách (PK a NM PC 300 µg/ml) byly teplem umrtvené buňky a jediný rozdíl byla přítomnost GA ve vzorku NM PC 300 µg/ml, je jasné, že interference byla způsobena právě interakcí GA s fluorescenční značkou PI. Zhášecí efekt GA měl za následek posun bodů reprezentující buňky z gatů pro mrtvé (*dead*) buňky do gatů pro živé (*alive*) nebo neoznačené (*unstained*) buňky (černý ovál v Obrázku č. 15c). Tato interference tak vedla k falešnému zvýšení viability vzorků NM PC 50 µg/ml a NM PC 300 µg/ml na 26 % a 85 %, resp., i když v obou vzorcích byly pouze umrtvené buňky (Obrázek č. 15e). Proto ačkoliv vzorky značené 50 a 300 µg/ml

GA měly viabilitu přes 96 %, vyhodnocení nebylo kvůli interferenci GA spolehlivé, jelikož by mrtvé buňky mohly být chybně zahrnuty v gatu pro živé buňky (*alive*).

Prostřednictvím nového protokolu podle dodatečných kontrol byla interference překonána selekcí vhodných gatů, které vedly k viabilitě v NM PCs vzorcích menší než 10 % (černý ovál v Obrázku č. 15h a Obrázek č. 15j). Měli jsme tak jistotu, že i přes zhášecí efekt GA budou případné mrtvé buňky ve vzorcích značených 50 a 300 $\mu\text{g/ml}$ GA ve správném gatu pro mrtvé buňky (*dead*). Výsledná viabilita BJ buněk značených 24 h 50 a 300 $\mu\text{g/ml}$ GA tak byla 94 a 92 %, resp. (Obrázek č. 15j).



Obrázek č. 15. Dot ploty LIVE/DEAD analýzy: (a, f) negativní a pozitivní kontroly BJ buněk a (b - d, g - i) BJ buněk značených vzorkem GA a vyhodnoceny podle (a - d) standardního gatování a (f - i) nového protokolu gatování. b, g) vzorky značené 300 µg/ml GA po 24 h. c, h) NM PC 300 µg/ml pro vzorek GA. d, i) Spike-in kontroly pro vzorek GA. e, j) Vyhodnocení viability BJ buněk značených po 24 h GA a dodatečných kontrol (n = 3). Body v gatě *alive* (živé) jsou označeny zeleně, body v gatě *dead* (mrtvé) červeně a body v gatě *unstained* (neoznačené) jsou uvedeny modře. Body interferujících buněk s GA uvnitř nebo na membráně, který zhasí fluorescenci PI, jsou zvýrazněny černým oválem. Převzato z²¹ a upraveno.

5.1.2.7. Shrnutí studie

V této studii bylo cílem upozornit na důležitost spolehlivé techniky pro vyhodnocení viability CNMs, jednoho z nejdůležitějších parametrů k posouzení jejich akutní *in vitro* toxicity. U vybraných CNMs jsme poukázali, že použití klasických testů viability jako je např. MTT u těchto materiálů není vhodné, jelikož kvůli interferenci může vést k falešným výsledkům. Proto byla navržena metoda průtokové cytometrie jako alternativa s využitím LIVE/DEAD analýzy. I když vybrané CNMs interferovaly i s touto metodou, dokázali jsme díky našemu novému protokolu s využitím dodatečných kontrol tuto interferenci identifikovat a následně překonat. Podařilo se nám tak získat spolehlivé výsledky viability BJ buněk po značení vybranými CNMs. Proto doporučujeme použití našeho protokolu s dodatečnými kontrolami pro jakékoliv testování *in vitro* toxicity uhlíkových nanomateriálů využívající průtokovou cytometrii.

5.2. Interakce uhlíkových nanomateriálů s organismy ve vodním prostředí – environmentální toxicita

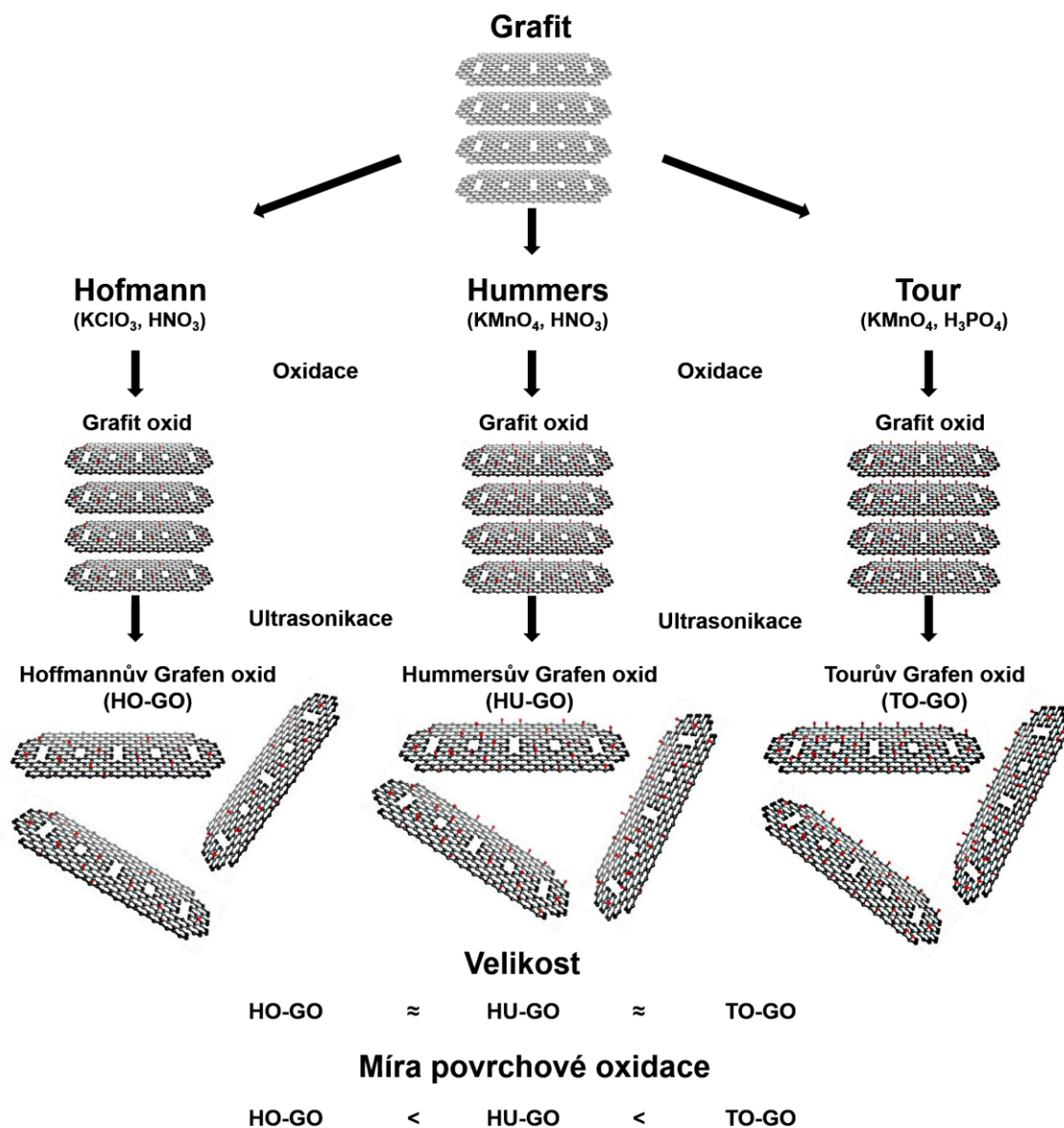
Jak již bylo zmíněno v literárním přehledu práce, díky svým vlastnostem je grafen oxid (GO) jedním z nejvyužívanějších CNMs v aplikacích v životním prostředí. Uplatnění nachází především v technologiích zabývajících se sanací vody. Vzhledem k zájmu o výzkum GO v této specifické oblasti a rozmachu jeho výroby, který zaznamenal v posledních letech, je vysoce pravděpodobné, že nakonec dojde k částečnému úniku nebo jeho uvolnění do životního prostředí, zejména vodních ekosystémů.¹⁵³ V takovém případě tak mimořádné vlastnosti jako hydrofilní chování, mobilita ve vodě a vysoká reaktivita povrchu, které z GO dělají žádaný materiál v mnoha aplikacích, mohou GO rychle proměnit v ekologický problém pro organismy v životním prostředí. Z dlouhodobého hlediska by také mohla představovat problém stabilita GO, jelikož by uvolňující GO mohl být distribuován na velmi širokém území a přetrvávat po značnou dobu.¹⁵⁴

Již dříve bylo popsáno, že materiály na bázi grafenu mají silnou tendenci akumulovat se v tělech organismů a ovlivňovat tak potravní řetězec vodního ekosystému.^{155, 156} Podobné chování lze očekávat také u GO, jelikož by díky zmíněným vlastnostem intenzivně interagoval s vodními organismy. Existují tak opodstatněné obavy o bezpečnost použití GO v environmentálních aplikacích, které jsou spojeny s jeho potenciální environmentální toxicitou a osudem ve vodním prostředí. Proto je naprosto nezbytné pochopit interakci GO s vodními organismy a identifikovat potenciální toxický mechanismus, kterým by je mohl poškozovat. Ačkoliv studií zabývajících se GO a jeho ekotoxicitou v poslední době stále přibývá, stále není objasněn přesný mechanismus,

kterým GO interaguje s organismy z různých úrovní potravního řetězce vodních ekosystémů.¹⁹

5.2.1. Grafen oxidy s rozdílným stupněm povrchové oxidace

V předložené disertační práci jsme pracovali se třemi GO systémy, které byly připraveny podle třech rozdílných syntéz. Syntéza podle Hoffmanova protokolu vedla k vytvoření Hoffmanova grafen oxidu (HO-GO), příprava sledující Hummersův postup k Hummersově grafen oxidu (HU-GO) a poslední syntéza podle Tourova procesu vyústila v Tourův grafen oxid (TO-GO). Detaily ohledně jednotlivých syntéz jsou uvedeny v publikaci Chng et al.¹¹⁵ Hlavní rozdíl mezi třemi různými syntézami spočívá v použití rozdílných oxidačních činidel: i) Hoffmanova metoda využívá chlorečnan draselný a kyselinu dusičnou,¹⁵⁷ ii) Hummersův postup používá manganistan draselný a kyselinu dusičnou¹⁵⁸ a iii) v protokolu podle Toura se využívá manganistan draselný a kyselina fosforečná generovaná in situ.¹⁵⁹ Tyto tři různé procedury tedy měly poskytnout listy GO s podobnou velikostí a tloušťkou, ale s kompletně různou povrchovou oxidací a distribucí kyslík-obsahujících funkčních skupin (Obrázek č. 16).



Obrázek č. 16. Ilustrační schéma přípravy grafen oxidu z grafitu podle Hoffmanova, Hummersova a Tourova protokolu. Použití různých oxidantů vedlo k přípravě třech různých grafen oxidových systémů s podobnou velikostí, ale rozdílnou mírou povrchové oxidace. Převzato z ²³ a upraveno.

Pro ověření výsledků syntéz byla provedena rozsáhlá charakterizace materiálů, jejíž výsledky jsou uvedeny na obrázku č. 17. Analýza reprezentativních SEM a AFM obrázků materiálů odhalila, že všechny tři GO systémy měly opravdu podobnou velikost (až do 5 μm) (Obrázek č. 17a), a také jednovrstevnou strukturu, jelikož výška listů GO byla kolem

1 nm (Obrázek č. 17b). Současně jsme provedli také velikostní distribuci a rozdělení výškových profilů, které tyto výsledky potvrdilo (velikost listů byla průměrně $2 \times 4 \mu\text{m}$ a výška listů fluktovala mezi 0,8 a 1,2 nm).²²

Povrchová chemie GOs byla studována pomocí tří spektroskopických technik, které potvrdily rozdílnou povrchovou oxidaci GO v závislosti na syntéze a použitých oxidačních činidlech. Získaná spektra materiálů z XPS, FTIR a Ramanovy spektrometrie jsou uvedena na obrázku č. 17c-g. XPS měření ukázalo, že C/O poměr, který je indikátorem míry oxidace, byl 2,60 pro HO-GO, 1,95 pro HU-GO a 1,72 pro TO-GO materiál.²² TO-GO tedy obsahoval nejvyšší procento kyslíku, zatímco HO-GO nejnižší. Různá množství funkčních skupin obsahujících kyslík ve vzorcích GOs se odrazila v XPS uhlíkových (C 1s) spektrech s vysokým rozlišením (Obrázek č. 17c-e)²² Epoxidové skupiny, které jsou reprezentovány píky detekovány při 286,8 eV (Obrázek č. 17c), a byly nejvýraznější funkční skupiny u HO-GO vzorku, jsou často pozorovány ve vzorcích GO připravených oxidací chlorečnanem, což odpovídá postupu přípravy HO-GO.¹⁶⁰ Naopak vzorky HU-GO a TO-GO, které byly oxidovány manganistanem, vykazovaly výrazné zastoupení hydroxylové (285,9 eV), karbonylové (287,5 eV) a karboxylové skupiny (288,8 eV) (Obrázek č. 17d a 17e). I když byly tyto skupiny přítomné u obou vzorků HU-GO a TO-GO, míra jejich zastoupení se lišila.²²

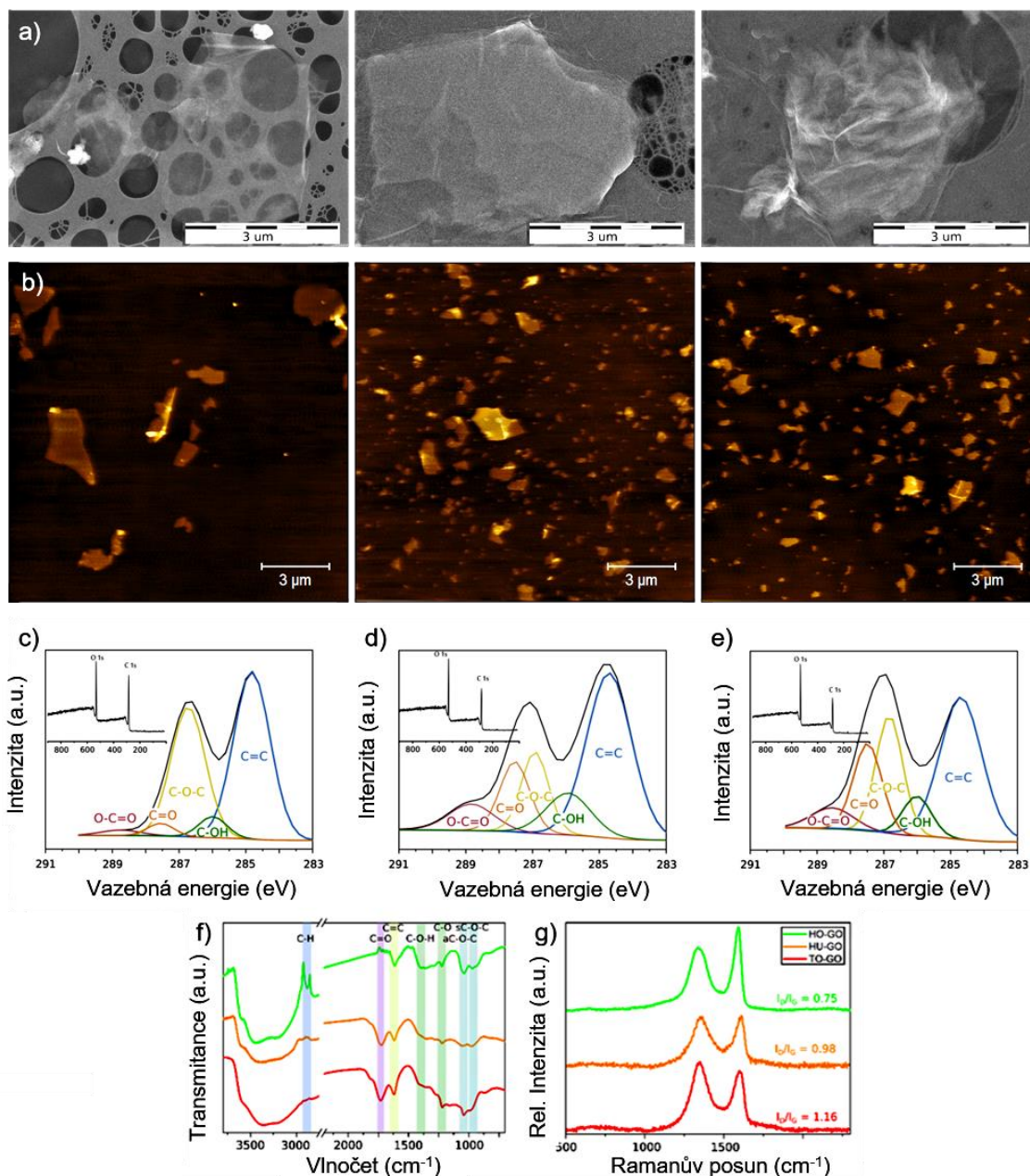
Různé stupně oxidace GO vzorků byly patrné také v jejich FTIR spektrech (Obrázek č. 17f). Charakteristický pás na 1615 cm^{-1} odpovídající aromatickým systémům s vazbou C=C byl viditelný u všech tří vzorků. Spektru HO-GO však chyběl pás na 1735 cm^{-1} , který je charakteristický pro karbonylové a karboxylové skupiny, byly však detekovány silné symetrické a asymetrické C-O-C deformační pásy na 1041 a 956 cm^{-1} charakteristické pro epoxidové skupiny,¹⁶¹ což dobře odpovídalo výsledkům z XPS. Pozorovány byly také dva pásy hydroxylových skupin: široký pás C-O-H na 1392 cm^{-1} a

pás C–C–O na 1223 cm^{-1} . Spektra HU-GO a TO-GO vzorků obsahovala dominantní pásy odpovídající C=O při 1735 cm^{-1} , stejně jako pásy charakteristické pro epoxidové a hydroxylové skupiny (Obrázek č. 17f). Pozorovaná intenzita těchto pásů však byla vyšší pro vzorek TO-GO.

V Ramanových spektrech všech materiálů byly detekovány dva píky při 1330 cm^{-1} a 1596 cm^{-1} , které odpovídají grafenovým D a G pásům (Obrázek č. 17g). G pás je spojen s uhlíkovými atomy v sp^2 hybridizaci v grafenové mřížce, zatímco D pás je způsoben sp^3 defekty v sp^2 hybridizaci uhlíkových atomů.¹⁶² Poměr mezi intenzitou D a G pásu (I_D/I_G) proto indikuje míru defektů a neuspořádání v grafenové mřížce vlivem množství navázaných funkčních skupin, čili stupeň oxidace systému GO. Získané I_D/I_G poměry pro vzorky HO-GO, HU-GO a TO-GO byly 0,75, 0,98 a 1,16, resp. (Obrázek č. 17g), což je v souladu s výsledky z FTIR a XPS.

Doplňující analýzy zahrnující TGA a ICP-MS měření dále potvrdily, že ve vzorcích GO nezůstávají žádná anorganická rezidua ze syntézy a jakýkoliv pozorovaný efekt je tedy definitivně způsoben vlivem materiálů.²² Z výsledků charakterizace bylo tedy jasné, že TO-GO byl nejvíce oxidován GO ze třech vzorků, zatímco HO-GO nejméně. Jelikož měl HO-GO nejnižší stupeň oxidace, obsahoval také nejméně karboxylových skupin, které se obvykle nacházejí na hranách GO. Tento jev se vzhledem k ekotoxicitě GO ukázal jako klíčový a bude detailněji popsán dále.

V následujících kapitolách bude popsána interakce třech zmíněných GO s organismy z různých úrovní potravinového řetězce vodního prostředí, kdy byl studován potenciální toxický účinek GO vůči vodním organismům právě v závislosti na chemickém složení jeho povrchu. Současně jsme se také snažili přinést nové informace ohledně otázky osudu GO ve vodním prostředí, která je klíčová pro jeho využití v aplikacích životního prostředí.



Obrázek č. 17. Reprezentativní obrázky ze a) SEM a b) AFM analýzy materiálů (zleva doprava) HO-GO, HU-GO a TO-GO. XPS spektra uhlíku (C 1s) s vysokým rozlišením materiálu a) HO-GO, b) HU-GO a c) TO-GO. Detaily v panelech c), d) a e) ukazují přehledová XPS spektra příslušných GO. f) FTIR spektra a g) Ramanova spektra vzorku HO-GO (zelená linie), HU-GO (oranžová linie) a TO-GO (červená linie). Nejdůležitější vibrační pásy ve FTIR spektru jsou zvýrazněna různými barvami (sC-O-C: symetrická epoxidová vibrace; aC-O-C: asymetrická epoxidová vibrace). V Ramanových spektrech jsou uvedeny I_D/I_G poměry, které jsou uvedeny vedle linií příslušných GOs. Převzato z ²² a upraveno.

5.2.2. Interakce GOs s řasami a sinicemi^C

První studie se zabývala interakcí GOs se zástupci jednobuněčných organismů: zelených řas (*Raphidocelis subcapitata*) a sinic (*Synechococcus elongatus*). Řasy a sinice jsou fotoautotrofní organismy, které hrají ve vodním prostředí podobnou roli s tím rozdílem, že sinice jsou prokaryota, zatímco zelené řasy eukaryota. Jako primární producenti organických sloučenin reprezentují klíčovou složku vodních ekosystémů a budou vystaveny jakémukoliv materiálu nebo částicím uvolněným do vodního prostředí (včetně GO). Jelikož jsou navíc v ekosystému zdrojem základních procesů zahrnující produkci kyslíku a biomasy, fixaci CO₂ a N₂ a samočištění znečištěné vody,^{163, 164} je nezbytné, aby byla analyzována jejich citlivost vůči potenciální ekotoxicitě GO. Pro studium mechanismu interakce třech GO s různou mírou povrchové oxidace s řasami a sinicemi byla vybrána koncentrační řada 0,39, 6,25, 25, 100 a 200 mg/L.

5.2.2.1. Inhibice růstu řas a sinic po značení GO materiály

Inhibiční efekt tří vzorků GO na růst řasy *Raphidocelis subcapitata* a sinice *Synechococcus elongatus* byl pozorován po dobu 24, 48 a 72 h a výsledky jsou uvedeny na obrázku č. 18. Současně jsme provedli test inhibice růstů filtrátů vzorků GO, který prokázal, že rezidua ze syntézy neměly žádný vliv a jakýkoliv účinek byl tak definitivně způsoben efektem GOs.²² Test inhibice růstu GOs ukázal tři velice zajímavé jevy.

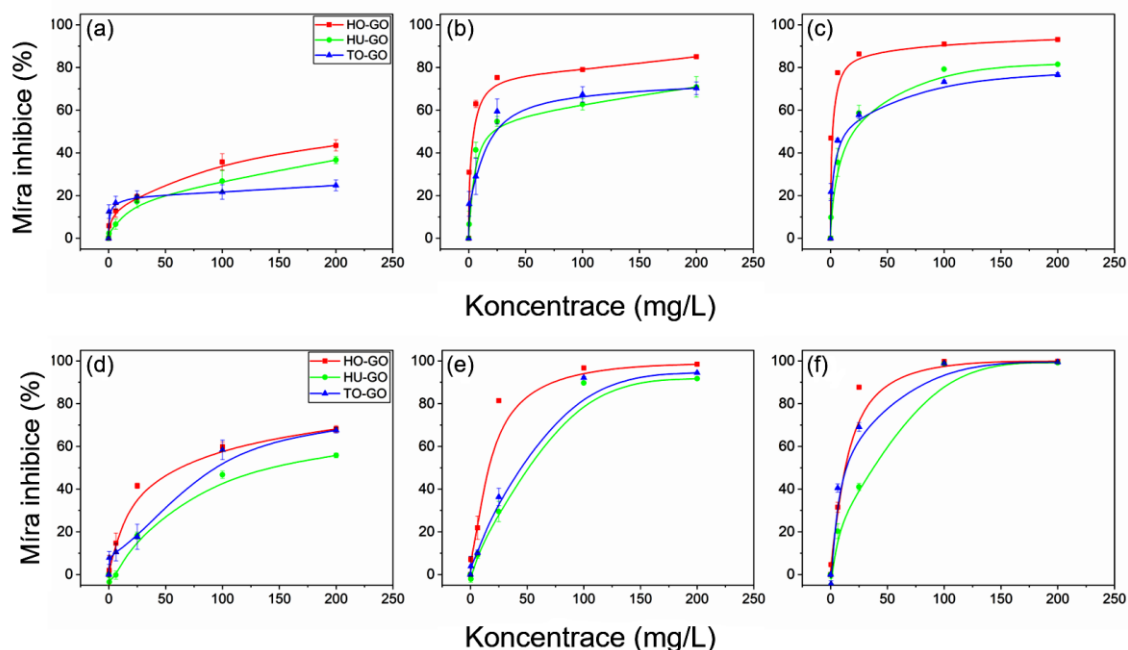
Za prvé, buňky sinice *Synechococcus* byly mnohem citlivější vůči vzorkům GOs než buňky zelené řasy *Raphidocelis*. Bylo to patrné především z míry inhibice po 24 h, kdy všechny GOs inhibovaly růst sinic o 50 % nebo výše u vyšších koncentrací, zatímco

^C Publikováno jako: **Malina, T.**, Marsalkova, E., Hola, K., Tucek, J., Scheibe, M., Zboril, R. and Marsalek, B. 2019. Toxicity of graphene oxide against algae and cyanobacteria: Nanoblade-morphology-induced mechanical injury and self-protection mechanism. *Carbon* 155, 386-396. Příloha C.

u řas nedosáhl žádný GO inhibičního efektu 50 % ani u nejvyšší použité koncentrace 200 mg/L (Obrázek č. 18a a 18d, EC 50 hodnoty jsou uvedeny v ²²). Vyšší citlivost sinice byla pravděpodobně způsobena jednodušší prokaryotickou buněčnou strukturou (v porovnání s eukaryotickou buňkou řasy), a také dobře známými antibakteriálními vlastnostmi GO.¹⁶⁵ Výsledky po 48 a 72 h přinesly podobný výsledek citlivosti organismů především u vyšších koncentrací, i když všechny systémy GO již měly vysoký toxický účinek, jelikož způsobily inhibici růstu 50 % a výše pro výrazně nižší koncentrace než v případě 24 h (Obrázek č. 18).²² Tyto výsledky jsou v souladu s již publikovanými studiemi o toxických účincích materiálů na bázi grafenu, včetně GO, na řasy.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹

Za druhé, byla pozorována silnější inhibice v případě nejméně oxidovaného vzorku HO-GO, než více oxidovaných HU-GO a TO-GO. To by naznačovalo, že interakce mezi GO a řasami a sinicemi jsou citlivé na fyzikálně-chemické vlastnosti GO. U *S. elongatus* byl pozorován rozdíl mezi materiály jen u nižších koncentrací, zatímco u *R. subcapitata* se rozdílná povrchová oxidace projevila ve všech testovaných koncentracích (Obrázek č. 18). Z toho vyplývá, že GO ovlivňuje oba organismy určitým mechanismem, který silně závisí na jeho povrchovém složení. U vyšších koncentrací GO však u sinic došlo k tak silnému inhibičnímu účinku, že se zmíněný mechanismus GO nestačil projevit.

Poslední pozorovaným jevem byla rozdílná velikost účinků růstové inhibice během časových bodů pro nižší koncentrace GOs (pod 100 mg/L). Zatímco u výsledků po 24 a 48 h došlo k výraznému nárůstu míry inhibice růstu, rozdíl nárůstu mezi 48 a 72 h již nebyl tolik významný (Obrázek č. 18). Tento rozdíl byl navíc mnohem více markantní pro buňky řas než buňky sinic. Takové chování naznačovalo aktivaci určitých obranných mechanismů, které by organismům umožnily přítomnost GO v kultivačním médiu tolerovat.



Obrázek č. 18. Test růstové inhibice (a-c) zelené řasy *Raphidocelis subcapitata* a (d-f) sinice *Synechococcus elongatus* po značení různými koncentracemi třech systémů GO po (a,d) 24 h, (b, e) 48 h a (c, f) 72 h. Data byla normalizována definováním 100 % růstu pro kontrolní neznačené buňky a rozdíl od 100 % byl stanoven jako míra inhibice (např. vzorek s 60% růstem ve srovnání s kontrolním vzorkem měl míru inhibice 40 %). Převzato z ²² a upraveno.

5.2.2.2. Analýza mechanismu interakce mezi GOs a buňky řas pomocí průtokové cytometrie

Pro objasnění mechanismu interakce mezi GOs a buňkami řas v závislosti na povrchové oxidaci GO byla studována integrita membrány buněk, generace ROS a obsah pigmentových barviv Chlorofylu a a b zelené řasy *R. subcapitata* po inkubaci s různými koncentracemi GOs po 2, 24 a 48 h. Výsledky jsou představeny na obrázku č. 19.

Nejzávažnější ztráta integrity membrány buněk řas byla pozorována po prvních 2 h inkubace se vzorky GOs (Obrázek č. 19a). HO-GO způsobil nejvýraznější poškození, jelikož byla pozorována ztráta až 50 % integrity membrány již při koncentraci 50 mg/L.

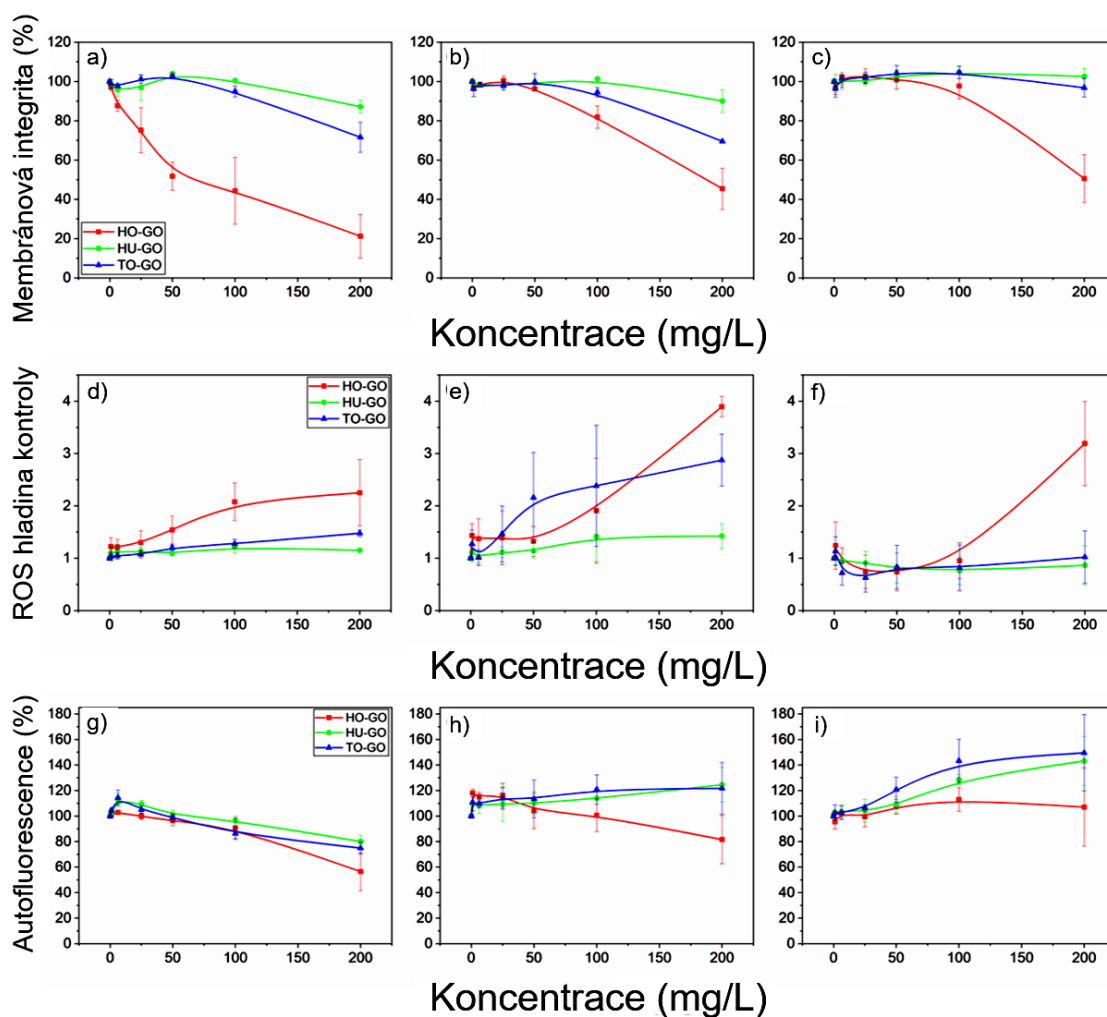
HU-GO a TO-GO systémy byly výrazně méně škodlivé, jelikož byla detekována ztráta integrity pouze u nejvyšší testované koncentrace 200 mg/L (13 a 29 % pro HU-GO a TO-GO, resp.). Vzorek HO-GO byl také zodpovědný za nejvyšší nárůst ROS po 2 h (Obrázek č. 19d), což bylo pochopitelně způsobeno reakcí buněk na poškození membrány. Naproti tomu hodnoty ROS ve vzorcích značených materiály HU-GO a TO-GO byly na podobné úrovni jako neznačený kontrolní vzorek (Obrázek č. 19d). Výsledky analýzy integrity membrány řasových buněk po 24 a 48 h silně naznačují určitou formu regenerace membrány a aktivaci obranného mechanismu proti působení GOs (Obrázek č. 19b a 19c). Jediné výrazné poškození membrány bylo totiž pozorováno pro nejvyšší koncentraci HO-GO po 24 a 48 h (55 a 50% ztráta integrity, resp.) a TO-GO vzorku po 24 h (30% ztráta integrity). Tuto skutečnost podporují také výsledky tvorby ROS v příslušných časových bodech, jelikož významné hladiny ROS byly detekovány pouze u nejvyšších koncentrací HO-GO a TO-GO vzorků (Obrázek č. 19e a 19f).

Tyto výsledky naznačují, že mechanismus interakce GO s řasami vysoce závisí na počtu oxidovaných funkčních skupin na jeho povrchu. Nejméně oxidovaný systém HO-GO totiž způsobil nejvýraznější poškození řasové membrány spolu s nejvyšším nárůstem ROS, což indikuje přímou interakci s buňkami řas, která vede k mechanickému poškození membrány a následnému oxidačnímu stresu. Na druhou stranu, nejvíce oxidovaný materiál TO-GO způsobil oxidační stres, aniž by výrazně narušil integritu řasové membrány. Tyto výsledky tedy naznačují, že TO-GO neinteragoval s buňkami řas přímo, ale skrze své hojně zastoupené funkční skupiny na povrchu, čímž způsobil nárůst ROS, ale nepoškodil přitom membránu buněk. HU-GO jako středně oxidovaný systém GO měl pravděpodobně dostatek povrchových funkčních skupin k interakci bez přímého poškození membrány, ale ne tolik, aby způsobil oxidační stres. Poprvé jsme tak komplexně popsali interakci GO s buňkami řas v závislosti na jeho povrchové oxidaci.

Předchozí studie v této oblasti navíc přinesly pouze takové výsledky, kdy byl toxický účinek GO nejvýraznější při nejdelsí inkubační době a neposkytly žádnou zmínku o potenciální obranné reakci organismů.^{166, 167, 170}

Měření obsahu pigmentových barviv je u řas obvykle využívána pro doplnění testů toxicity, jelikož přináší informace o metabolickém a fyziologickém stavu buněk.¹⁷¹ Z výsledků na obrázku 19g-i lze vidět, že změny v obsahu chlorofylu a a b buněk značených GOs dobře korelují s pozorovanými změnami membránové integrity a oxidačního stresu. Hodnoty totiž prudce poklesly po prvních dvou hodinách expozice, především pro nejvyšší koncentrace GOs (pokles o 44, 20 a 25 % pro HO-GO, HU-GO a TO-GO 200 mg/L, resp.), což opět indikuje, poškození buněk během prvních několika hodin (Obrázek č. 19g). Po 24 h však došlo k nárůstu hladiny chlorofylu u všech vzorků v souladu s regeneračními procesy a aktivací obranného mechanismu, které vedou ke zvýšené metabolické aktivitě (Obrázek č. 19h). Bylo již prokázáno, že řasy mohou za stresových podmínek zvýšit jejich hladiny chlorofylu.¹⁷² Toto tvrzení navíc podpořil také výsledek po 48 h inkubaci, kdy byl obsah chlorofylu v buňkách řas vystavených nejvyšším koncentracím GOs vyšší než hladiny na začátku experimentu (Obrázek č. 19i).

Analýza mechanismu interakce mezi GOs a buňkami řas pomocí průtokové cytometrie tak odhalila, že nepříznivé účinky GO silně závisí na stupni povrchové oxidace GO, jelikož mohou být způsobeny jak přímou mechanickou interakcí, tak oxidačními procesy. Naměřené výsledky také dokládají, že nejvyšší toxický účinek GOs byl pozorován po krátkodobé expozici, zatímco po delší inkubaci došlo ke zmírnění toxicity GO. Za zmírnění jsou pravděpodobně zodpovědné regenerační procesy a aktivace obranných mechanismů po expozici GO, které buňkám odebírají energii, což způsobuje jejich pomalejší růst v porovnání s neznačenými kontrolními buňkami (Obrázek č. 18).



Obrázek č. 19. Analýza řasových buněk po inkubaci s různými koncentracemi GOs pomocí průtokové cytometrie. a-c) Analýza ztráty membránové integrity po a) 2 h, b) 24 h a c) 48 h. d-f) Nárůst ROS po d) 2 h, e) 24 h a f) 48 h. g-i) Hladiny chlorofylu a a b po g) 2 h, h) 24 h a i) 48 h. Data byla normalizována definováním 100 % membránové integrity, hladinou ROS 1 a obsahu chlorofylu 100 % jako odpovídající hodnoty pozorované v neznačených kontrolních vzorcích. Převzato z²² a upraveno.

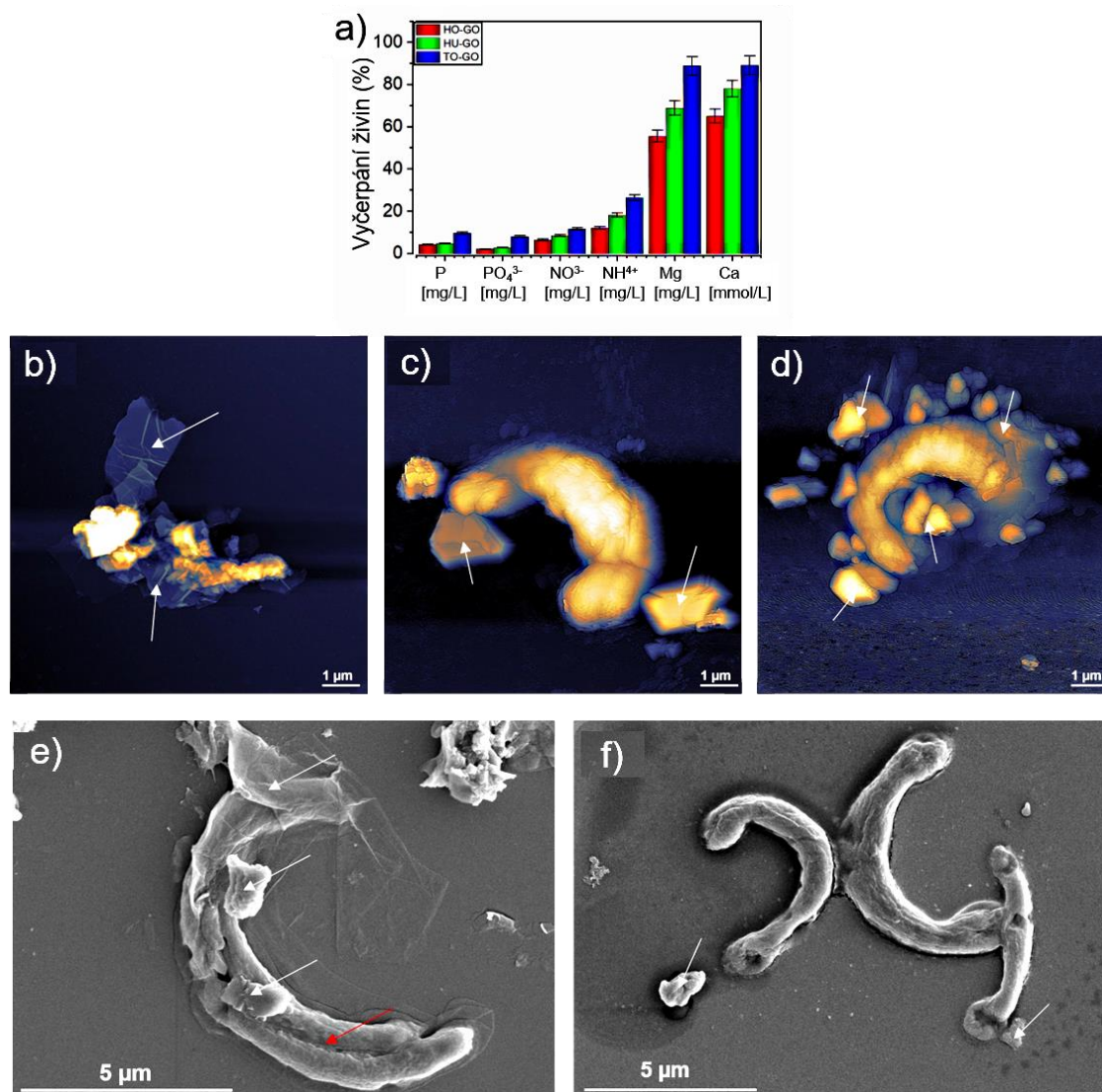
5.2.2.3. Vyčerpání živin z kultivačního média vlivem GOs a detailní mikroskopické hodnocení interakce řas s GOs

Jelikož bylo v literatuře popsáno, že za nepřímou toxicitu GO může být zodpovědný efekt adsorpce živin na GO a tím jejich vyčerpání z kultivačního média,¹⁶⁷ provedli jsme podobný test, abychom zjistili, zda může povrchová oxidace hrát roli i v tomto efektu.

Koncentrace 100 mg/L třech systémů GOs tak byla kultivována v kultivačním médiu 24 h, následně byla získána suspenze pomocí centrifugace v kombinaci s filtrací a měřena koncentrace živin: vápník (jako Ca^{2+}), hořčík (jako Mg^{2+}), dusík (jako NO_3^- a NH_4^+) a fosfor (jako celková koncentrace P a PO_4^{3-}). Výsledky jsou uvedeny na obrázku č. 20a. Nejvyšší adsorpce byla pozorována pro živiny Ca a Mg a v obou případech míra odstranění závisela na stupni oxidace GO, jelikož nejvyšší vyčerpání těchto živin způsobil vzorek TO-GO (88 a 89 % pro Ca a Mg, resp). Jelikož vápník a hořčík hrají klíčovou fyziologickou roli v buněčné signalizaci, fotosyntetické asimilaci a biosyntéze chlorofylu, jejich vyčerpání vlivem GO mohlo výrazně přispět k celkové ekotoxicitě GO vůči řasám a sinicím. Pozoruhodným zjištěním bylo to, že sorpční kapacita systémů GO silně korelovala s obsahem jejich kyslík-obsahujících funkčních skupin a tedy s jejich hydrofilními vlastnostmi.¹⁷³

Pro detailní informace o interakci mezi GOs a buňkami řas byly využity různé druhy mikroskopie. Už první pozorování pomocí optické mikroskopie s malým zvětšením jasně ukázaly, že všechny tři systémy GO vykazovaly určitou interakci s buňkami řas, jelikož byly buňky obklopeny velkým množstvím částic.²² Přítomnost GOs v blízkosti buněk řas mohla omezit přístup buněk ke světlu a vést tak k jevu, který je v literatuře známý jako efekt stínění uhlíkových nanomateriálů.¹⁷⁴ Tyto experimenty tedy definovaly další nepřímý efekt, který mohl ovlivnit potenciálně toxicitu GOs vůči řasám, ale který nebyl závislý na povrchové oxidaci GO. Obrázky fixovaných buněk získané optickou mikroskopií následně odhalily, že buňky řas byly v mnohem intenzivnější interakci či kontaktu se vzorkem HO-GO, než se zbylými GOs.²² Toto chování tak bylo další indikací naší hypotézy, že HO-GO je schopen s buňkami řas interagovat přímo a může tak způsobovat mechanické poškození.

Pro detailní pozorování interakce mezi GOs a řasovými buňkami byly využity techniky AFM a SEM. Obrázky z AFM potvrdily přímý kontakt mezi buňkou řasy a HO-GO, jelikož byla buňka obklopena listy HO-GO a navíc vykazovala známky výrazného poškození (Obrázek č. 20b). Naopak buňky inkubované s HU-GO a TO-GO sice byly také obklopeny listy GO, ale jejich morfologie zůstala nezměněna (Obrázek č. 20c a 20d). Zejména však u vzorku TO-GO bylo pozorováno velké množství materiálů okolo buňky řasy, které pravděpodobně interagovaly skrze funkční skupiny, což by vysvětlovalo nárůst oxidačního stresu pozorovaný u tohoto vzorku (Obrázek č. 19e). Obrázky z elektronové mikroskopie (SEM) tyto závěry potvrdily. I když oba materiály (HO-GO a TO-GO) opět viditelně interagovaly s buňkou řasy, na buňce značené materiálem HO-GO byla pozorována výrazná poškození ve formě řezné rány a také HO-GO listy pronikající do buňky (Obrázek č. 20e). Na druhou stranu, u vzorku TO-GO byly listy GO pozorovány pouze v těsné blízkosti buňky a především buňky řasy nevykazovaly jakékoliv známky poškození (Obrázek č. 20f). Bylo tak prokázáno, že listy GO mohou působit jako „nano-žiletky“ a způsobovat mechanické poškození buněk řas. Tento jev je však vysoce citlivý na povrchovou funkcionalizaci GO, jelikož byl pozorován pouze u nejméně oxidovaného vzorku HO-GO. Relativní nedostatek karboxylových skupin na hranách HO-GO se tak jeví jako klíčový pro jeho schopnost mechanicky „řezat“ řasové membrány.



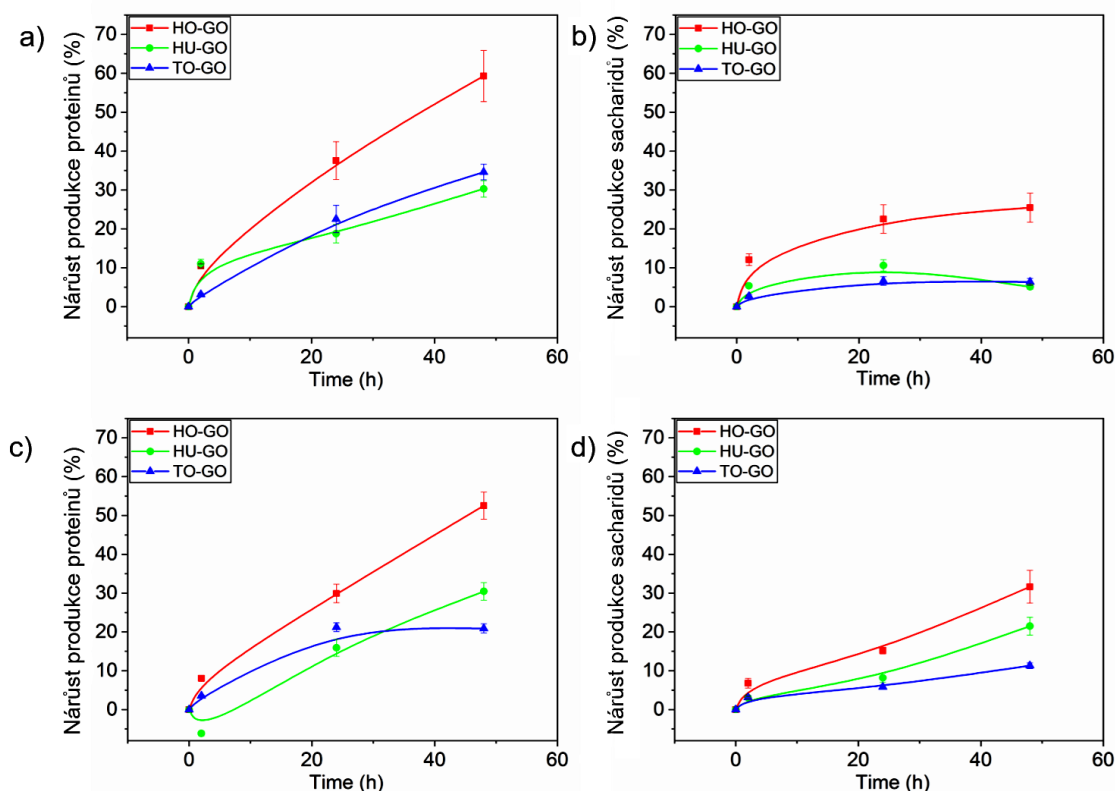
Obrázek č. 20. a) Množství vyčerpaných živin z 50% růstového média ZBB po 24 h inkubace 100 mg/L GOs. Míra vyčerpání každé živiny je vyjádřena v procentech a udává se jako poměr koncentrace živin v médiu obsahujícím GO ku koncentraci v kontrolním médiu. b- d) Obrázky z AFM buněk řasy po 24 hodinách inkubace s 200 mg/L b) HO-GO, c) HU-GO a d) TO-GO. e, f) Obrázky ze SEMu buněk řasy po 24 hodinách inkubace s 200 mg/L e) HO-GO a f) TO-GO. Bílé šipky v panelech označují jednotlivé listy GO a červená šipka v panelu e) znázorňuje řeznou ránu na povrchu řasové buňky. Převzato z ²² a upraveno.

5.2.2.4. Obranná reakce organismů na přítomnost GOs – stanovení extracelulárních proteinů a sacharidů

Jelikož dosavadní výsledky indikovaly určitý obranný mechanismus organismů vůči přítomnosti GOs, provedli jsme experiment na stanovení extracelulárních proteinů a sacharidů (EPCs – extracellular proteins and carbohydrates) po 2, 24 a 48 h inkubace s GOs. Naše výsledky ukázaly, že oba studované organismy začaly produkovat EPCs již po nejkratší 2 h inkubaci s GOs (Obrázek č. 21). Produkce EPCs navíc prudce vzrostla s délkou inkubace: zatímco po 2 h inkubace byla míra produkce EPCs pouze mírně vyšší než v kontrolním vzorku, inkubace po 24 a 48 h vedla k výraznému nárůstu v produkci EPCs (Obrázek č. 21). Nejvyšší nárůst v produkci proteinů u řas byl pozorován pro vzorek HO-GO (59 %), ale více oxidované vzorky HU-GO a TO-GO taktéž indukovaly významné zvýšení (30 a 35 % pro HU-GO a TO-GO, resp. Obrázek č. 21a). Produkce sacharidů byla u řas méně výrazná, avšak trend byl stejný jako u proteinů, tedy více oxidované systémy vyvolaly nižší nárůst než nejméně oxidovaný HO-GO (Obrázek č. 21b). Tyto výsledky potvrzují zjištění získané z analýzy průtokovou cytometrií, jelikož vzorek HO-GO, který mechanicky poškozoval buňky řas, vyvolal nejsilnější obrannou reakci a regenerační aktivitu, zatímco méně toxické vzorky HU-GO a TO-GO indukovaly slabší odezvu. U buněk sinic inkubovaných s GOs byly pozorovány podobné výsledky, jelikož intenzita nárůstu produkce EPCs byla závislá na stupni oxidace GO. Současně byla opět výraznější odpověď detekována u proteinů (53%, 30% a 21% pro HO-GO, HU-GO a TO-GO, resp.; Obrázek č. 21c), než u sacharidů (32%, 21% a 11% pro HO-GO, HU-GO a TO-GO, resp.; Obrázek č. 21d).

Navzdory obavám ohledně potenciální ecotoxicity GO, které byly vyjádřeny v literatuře, naše výsledky naznačují, že GO opravdu dokáže způsobit poškození populací řas a sinic, ale pouze v krátkodobém měřítku. 24 h po expozici GOs již totiž začnou tyto

mikroorganismy produkovat EPCs , kterými jsou schopni se chránit proti dlouhodobým nepříznivým účinkům systémů GO, mezi které patří především schopnost mechanicky poškozovat membránu („nano-žiletky“) systémů GO s nízkým stupněm povrchové oxidace.



Obrázek č. 21. Změny v produkci (a, c) proteinů a (b, d) sacharidů ve srovnání s produkcí v kontrolních neznačených buňkách organismu (a, b) *R. subcapitata* a (c, d) *S. elongatus* po 2, 24 a 48 h inkubace s materiály HO-GO, HU-GO a TO-HO vyjádřené v proteinech. Převzato z ²² a upraveno.

5.2.2.5. Shrnutí studie

V této studii byla provedena podrobná analýza interakce sinice *Synechococcus elongatus* a zelené řasy *Raphidocelis subcapitata* se třemi systémy GO vykazujícími různý stupeň povrchové oxidace. Výsledky ukazují, že GO může inhibovat růst těchto organismů několika způsoby. Mimo známé nepřímé efekty, mezi které patří schopnost

vyčerpat živiny z média a efekt stínění, byl popsán zcela nový mechanismus pozorovaný u *R. subcapitata*, kdy listy GO s nízkým stupněm oxidace působily jako „nano-žiletky“ a mechanicky poškozovaly membránu řasových buněk. Současně byl předložen také první důkaz o dynamické obranné reakci těchto mikroorganismů proti toxickým účinkům GOs skrze produkci extracelulárních proteinů a sacharidů. Tyto výsledky tedy naznačují, že stupeň oxidace GO hraje klíčovou roli v jeho potenciální ekotoxicitě vůči mikroorganismům ve vodním prostředí. Pozorované obranné mechanismy však také naznačují, že dlouhodobá environmentální rizika GO mohou být významně nižší, než je v současnosti prezentováno v literatuře.

5.2.3. Interakce GOs s vodními korýši^D

Ve studiu environmentálního osudu GO ve vodním prostředí a jeho potenciální toxicity v závislosti na povrchové oxidaci jsme pokračovali sledováním interakce mezi třemi GOs a zástupci planktonních a bentických korýšů.²³ Vodní korýši byli vybráni ze dvou hlavních důvodů: za prvé hrají důležitou roli jako primární konzumenti v potravinovém řetězci sladkovodních rybníků a jezer; a za druhé se v poslední době staly také modelovými druhy pro studium potenciálních škodlivých účinků nově vyvinutých materiálů.¹⁷⁵ Celková délka těl korýšů bývá v rozmezí od 1 do 5 mm a je uzavřena krunýřem, který je tvořen buď z velké části z polysacharidového chitinu (planktonní korýši) nebo z kalcifikovaného karapaxu, který obklopuje celé jejich tělo (bentičtí korýši).¹⁷⁶ Z důvodu jejich velikosti může GO interagovat jak s vnějšími částmi těla, tak s vnitřním prostředím po pohlcení GO organismy. Důležitou roli v případné ekotoxicitě GO tak může hrát také rozdílná strategie získávání potravy zmíněných organismů. Planktonní korýši ke krmení využívají filtraci prakticky čehokoliv, co se ve vodním sloupci nachází (proto se označují za tzv. filter-feeders), přičemž řasy představují nejběžnější typ jejich potravy.¹⁷⁵ Naproti tomu bentičtí korýši se živí různými druhy potravy v sedimentech¹⁷⁶ a existují dokonce práce prokazující schopnost těchto organismů vybrat si svůj preferovaný typ potravy.¹⁷⁷ Jako zástupci planktonních korýšů byli vybráni *Daphnia magna* (nejčastěji používaný korýš při testování ekotoxicity látek)^{178, 179} a *Thamnocephalus platyurus* (korýš vysoce citlivý vůči environmentálním toxikantům),^{180, 181} zatímco *Heterocypris incongruens* (hojně rozšířený sladkovodní korýš používaný při monitorování půdy a sedimentů)^{182, 183} zastupoval bentické korýše.

^D Publikováno jako: **Malina, T.**, Marsalkova, E., Hola, K., Zboril, R. and Marsalek, B. 2020. The environmental fate of graphene oxide in aquatic environment-Complete mitigation of its acute toxicity to planktonic and benthic crustaceans by algae. *Journal of Hazardous Materials*, 399, 123027. Příloha D.

Interakce tří systémů GO vůči zmíněným organismům byla pozorována pro koncentrace 0,39, 1,56, 6,25 a 25 mg/L.

5.2.3.1. Akutní toxicita GOs vůči vodním korýšům dle příslušných standardů

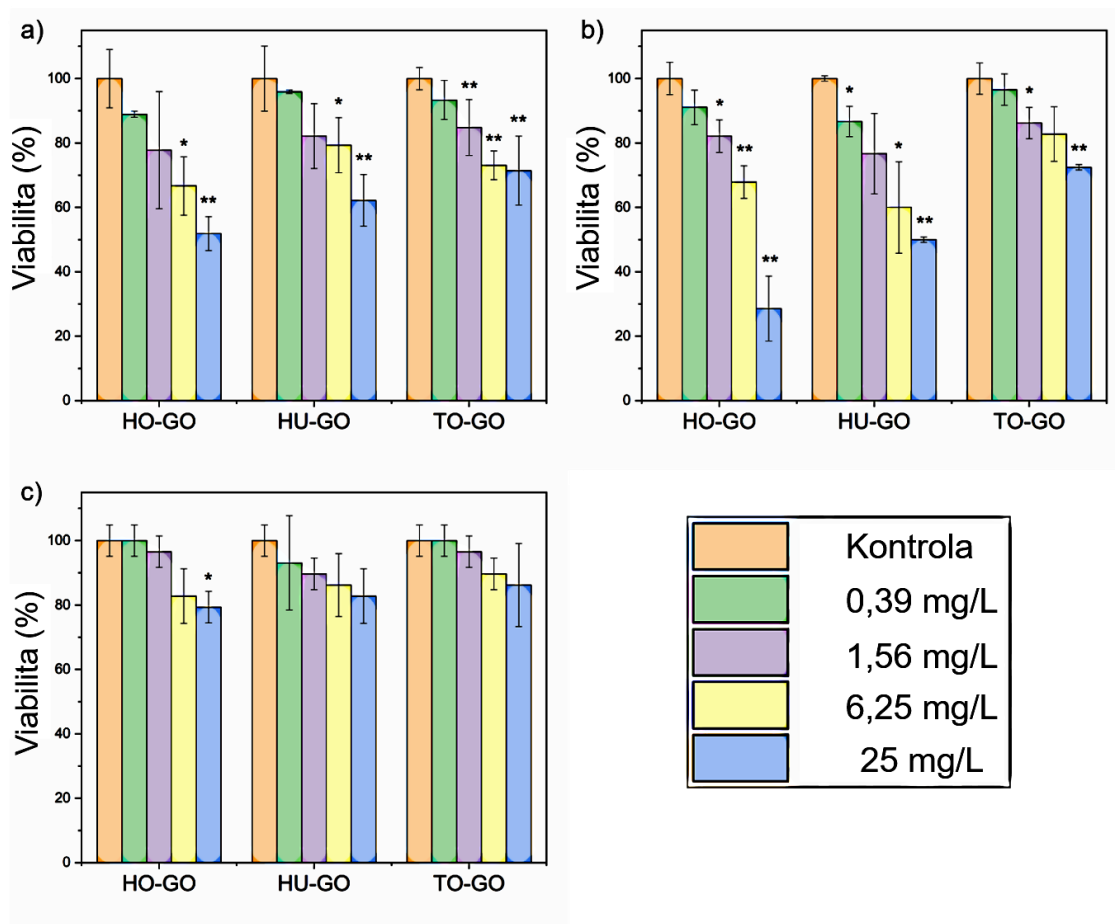
První experimenty jsme provedli dle standardů pro akutní toxicitu příslušných organismů. Viabilita *D. magna* a *T. platyurus* byla vyhodnocena po 48 h, zatímco *H. incongruens* po 6 dnech inkubace s různými koncentracemi GOs. Před samotným testováním byl proveden test stability třech systémů GOs v kultivačním médiu pomocí UV-VIS měření. Ten ukázal vysokou agregaci všech tří GO již po 4 hodinách.²³ Pro tak velké materiály se jednalo o docela očekávaný jev, kdy však i velmi jemné protřepání disperzí GO vedlo k posunutí agregace asi o 30 min. Vzhledem k tomu, že inkubace GOs s organismy byla doprovázena neustálým provzdušňováním ze dna zkumavek, sedimentace materiálů tak nebyla při testování tak dramatická. Je vhodné zmínit, že i když už byla určitá sedimentace pozorována, planktonní organismy následně plavaly ke dnu testovací zkumavky, aby mohly materiál pozřít. Sedimentace materiálů tak na expozici vodních korýšů vůči GOs neměla žádný vliv.²³ Výsledky akutní toxicity GOs uvedené na obrázku č. 22 ukázaly, že *H. incongruens* byl nejodolnějším organismem, jelikož vykazoval životnost přes 79 % i pro nejvyšší koncentrace GOs (Obrázek č. 22c). Na druhou stranu oba planktonní organismy měly viabilitu pod 73 % pro nejvyšší koncentraci (25 mg/L) všech tří GOs (Obrázek č. 22a a 22b, EC 50 hodnoty jsou uvedeny v²³). Hlavním důvodem byla určitě rozdílná potravní strategie korýšů, jelikož planktonní korýši filtrující vše ve vodním sloupci se dostali do kontaktu s GO mnohem více než při přijímání potravy mnohem více selektivní bentičtí korýši.²³ Projevit se mohlo také odlišné složení krunýře organismů, jelikož chitinový obal planktonních organismů může být

citlivější na vnější poškození než kalcifikovaný karapax bentických korýšů. Rozdílné složení vnějšího krunýře je také jasně ukázáno na obrázcích z optické mikroskopie vyobrazených na obrázku č. 23, kde byly GOs zřetelně viditelné uvnitř střeva Dafnie, zatímco u *Heterocypris* nebylo možné rozpoznat ani vnitřní strukturu těla (Obrázek č. 23a). Ramanova měření vzorků značených GOs však prokázala přítomnost všech tří GOs uvnitř obou organismů, jelikož ve střevech a výkalech obou organismů byly detekovány typické 1330 cm^{-1} a 1596 cm^{-1} pásy odpovídající D a G pásům GO (Obrázek č. 23b). Spektra neznačených kontrolních vzorků žádné typické pásy GO neobsahovala.²³ Bylo tak potvrzeno, že všechny tři systémy GO interagovaly jak s vnějšími částmi těla, tak s trávicím systémem planktonních a bentických korýšů.

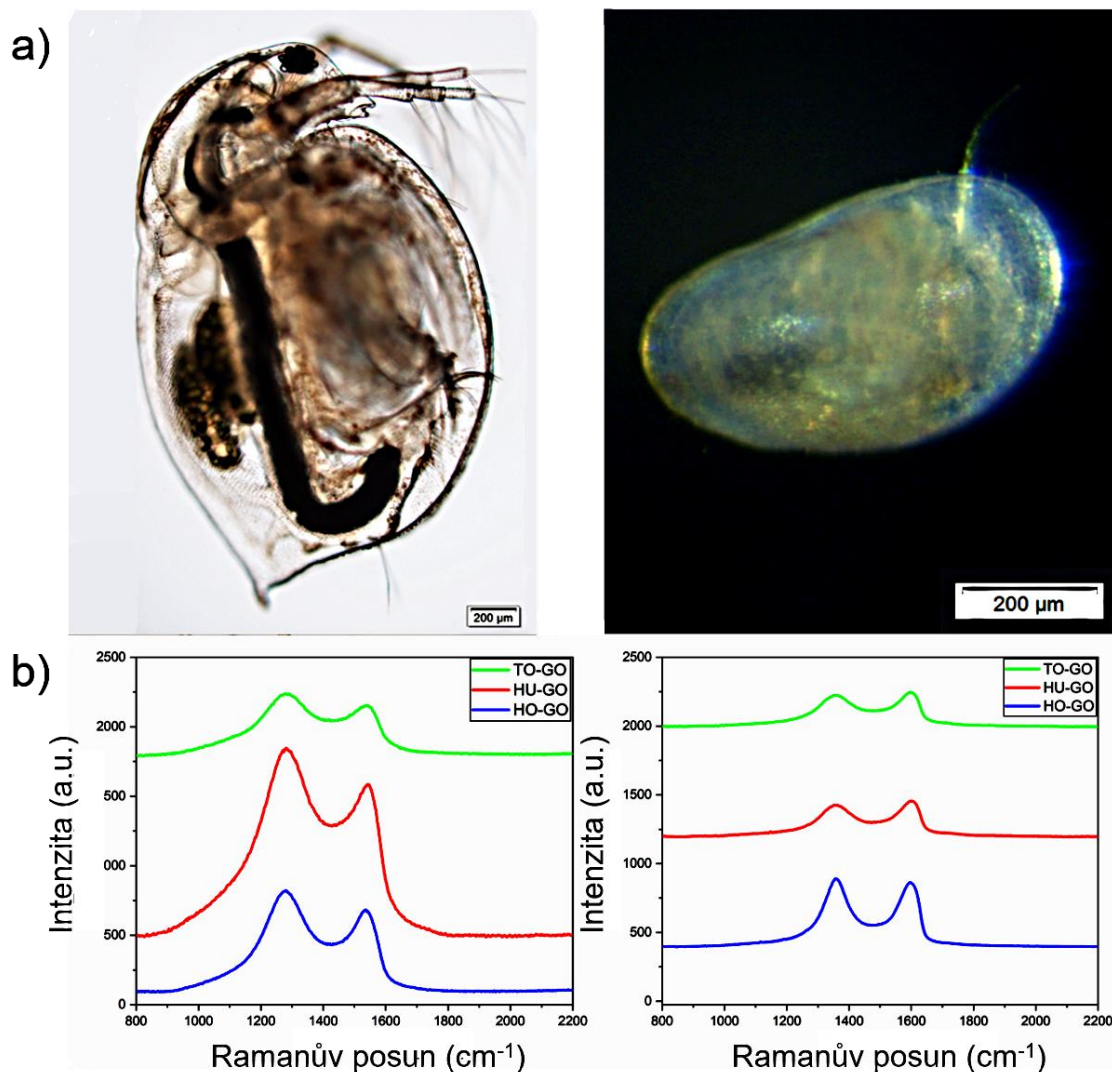
Ze zástupců planktonních korýšů způsoboval GO vyšší toxický účinek vůči *Thamnocephalus platyurus* než *Daphnia magna*, ale pouze u níže oxidovaných HO-GO a HU-GO vzorků. Tyto materiály totiž způsobily pokles viability na 50 % nebo níže pro nejvyšší použitou koncentraci (29 % a 50 % pro HO-GO a HU-GO, resp.), zatímco dafnie značené těmito materiály vykazovaly životnost vyšší než 50 % (52 % pro HO-GO a 62 % pro HU-GO) (Obrázek č. 22a a 22b). Vysoce oxidovaný TO-GO měl téměř totožný účinek na oba planktonní organismy a současně byl nejméně toxický ze tří GOs (71 % u *Daphnia* a 72 % u *Thamnocephalus* pro 25 mg/L) (Obrázek č. 22a a 22b). Vyšší citlivost thamnů v porovnání s dafniemi však není žádnou novinkou a byla už v literatuře popsána u jiných nanomateriálů.¹⁸⁴

Výsledky akutní toxicity vodních korýšů dle příslušných standardů tak odhalily, že GO je více toxický vůči organismům, kteří získávají potravu filtrací, než vůči těm, kteří si potravu selektivně vybírají ze sedimentu. Současně byl pozorován také výrazný efekt povrchové oxidace GO, jelikož nejvyšší úmrtnost všech organismů způsobil nejméně oxidovaný vzorek HO-GO. S malým počtem funkčních skupin na hranách listů GO a

nejvyšší hydrofobicitou HO-GO mohl interagovat přímo s organismy, zejména s filtračním aparátem planktonních korýšů, a způsobovat mechanické poškození, které ve výsledku vedlo k vyššímu úhynu organismů.²²



Obrázek č. 22. Viabilita planktonních korýšů a) *Daphnia magna* a b) *Thamnocephalus platyurus* po 48 h inkubace s různými koncentracemi HO-GO, HU-GO a TO-GO. Viabilita bentického korýše c) *Heterocypris incongruens* po 6 denní inkubaci s různými koncentracemi HO-GO, HU-GO a TO-GO. Výsledky byly normalizovány definováním 100% viability pro kontrolní nezačený vzorek. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Převzato z²³ a upraveno.



Obrázek č. 23. a) Reprezentativní obrázky z optické mikroskopie *Daphnia magna* (vlevo) a *Heterocypris incongruens* (vpravo) inkubované s 25 mg/L HO-GO po 24 h (*Daphnia*) a 96 h (*Heterocypris*). Měřítko je 200 μm. b) Ramanova spektra *Daphnia magna* (vlevo) a *Heterocypris incongruens* (vpravo) po 24 h a 96 h inkubaci s 25 mg/L HO-GO (modrá linie), HU-GO (červená linie) a TO-GO (zelená linie). Převzato z ²³ a upraveno.

5.2.3.2. Analýza oxidačního stresu *Daphnia magna* po inkubaci s GOs dle standardního protokolu

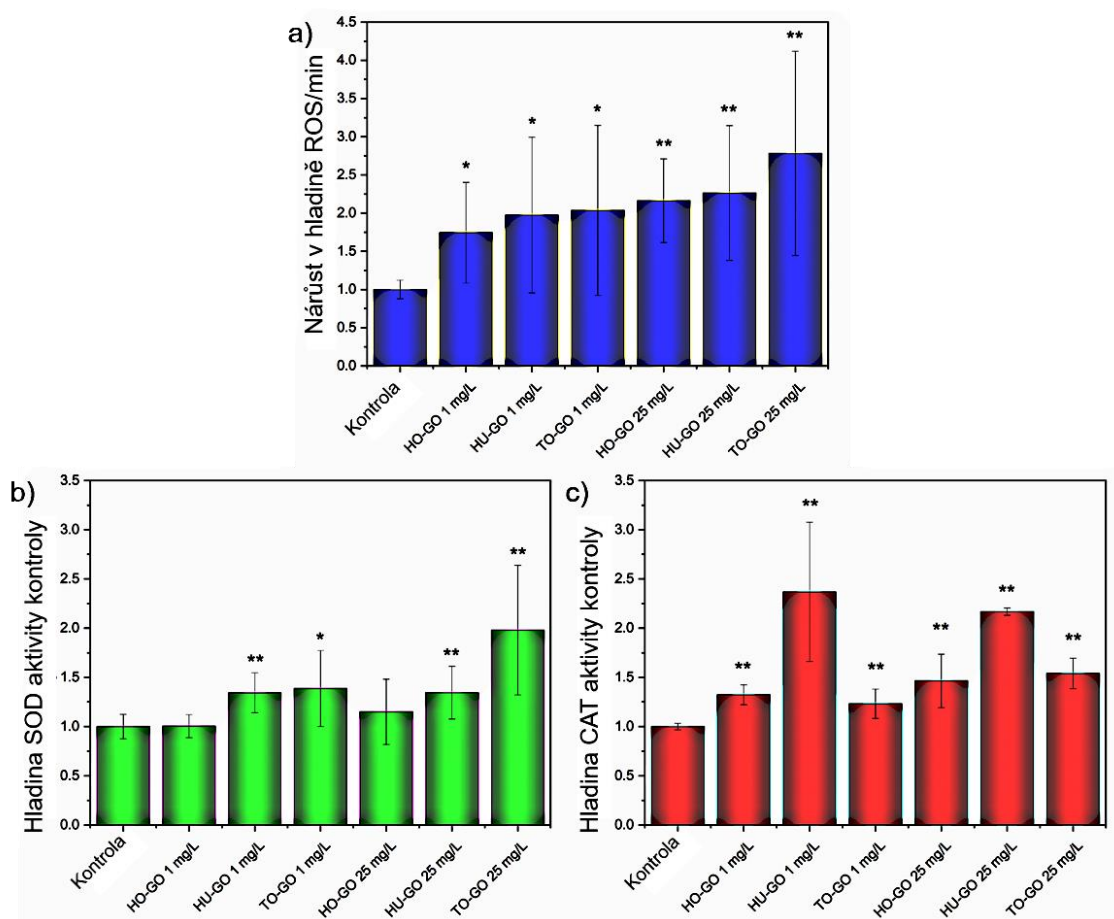
Oxidační stres dafnií po inkubaci s GOs byl sledován po 48 h pro koncentrace 1 a 25 mg/L GOs pomocí třech různých biomarkerů podle standardního protokolu. Nejprve jsme měřili nárůst v kyslíkových radikálech (ROS) za minutu pomocí fluorescenční

sondy H₂-DCFDA. Zjistili jsme, že obě koncentrace všech tří systémů GO způsobily výraznou generaci ROS, jelikož byly zaznamenány hodnoty přesahující 1,7 hladiny ROS/min kontrolního vzorku (Obrázek č. 24a). Opět byl pozorován určitý efekt povrchové oxidace, jelikož více oxidované vzorky HU-GO a především TO-GO generovaly více radikálů (2,3 a 2,8 zvýšení hladiny ROS/min pro HU-GO a TO-GO 25 mg/L) než nejméně oxidovaný HO-GO (2,2 zvýšení hladiny ROS/min pro 25 mg/L). V literatuře již byl popsán vliv stupně oxidace CNMs a zejména GO na jeho schopnost produkovat ROS,^{185, 186} což se shoduje s naměřenými výsledky. Jednalo se však o překvapivý výsledek, jelikož oxidační stres byl v literatuře naznačen jako hlavní mechanismus ecotoxicity GO vůči dafniím.¹⁸⁷ Podle našich výsledků však byla u vzorku HO-GO, způsobujícího nejnižší nárůst hladiny ROS, pozorována nejvyšší úmrtnost (Obrázek č. 22a).

Proto jsme následně studovali obrannou odpověď dafnií proti GOs pomocí aktivity dvou dalších biomarkerů, a to aktivity hlavních antioxidačních enzymů: superoxid dismutázy (SOD) a katalázy (CAT), které představují první linii obrany organismu proti nejrozšířenějším radikálům jako je superoxid (O₂⁻) a peroxid vodíku (H₂O₂).^{188, 189} Zatímco aktivita superoxid dismutázy byla významně zvýšena pouze pro více oxidované HU-GO a TO-GO (Obrázek č. 24b), u katalázy došlo stejně jako u analýzy nárůstu ROS k významnému zvýšení aktivity pro obě koncentrace všech tří GOs ve srovnání s kontrolním vzorkem. I zde však bylo zvýšení mnohem intenzivnější pro HU-GO a TO-GO ve srovnání s HO-GO vzorkem (Obrázek č. 24c). Více oxidované HU-GO a TO-GO vzorky však působily odlišně pro jednotlivé enzymy. Zatímco HU-GO způsobil nejvyšší efekt u katalázy (2,4 a 2,2 zvýšení úrovně kontroly CAT pro 1 a 25 mg/L HU-GO), u superoxid dismutázy to byl vzorek TO-GO, pro který byl pozorován výraznější efekt (1,4 a 2 úrovně kontroly SOD pro 1 a 25 mg/L TO-GO). Tento jev byl pravděpodobně

způsoben rozdílným složením funkčních skupin, protože zatímco TO-GO měl ze vzorků celkově nejvíce kyslík obsahujících skupin, HU-GO obsahoval více karboxylových skupin (Obrázek č. 17).²² Nejnižší aktivita antioxidantních enzymů byla pozorována u vzorku HO-GO, což se dobře shoduje s výsledky nárůstu ROS.

Z uvedených výsledků vyplývá, že i když oxidační stres hraje důležitou roli v ekotoxicitě GO, nejedná se o hlavní mechanismus, protože dafnie se dokáží s nárůstem radikálů vypořádat skrze intenzivnější antioxidantní reakci prostřednictvím hlavních antioxidantních enzymů.



Obrázek č. 24. Analýza oxidačního stresu *Daphnia magna* po 48 h inkubace s 1 a 25 mg/L HO-GO, HU-GO a TO-GO. a) Nárůst ROS/min, b) SOD aktivita a c) CAT aktivita úrovně kontrolního vzorku. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$. Převzato z²³ a upraveno.

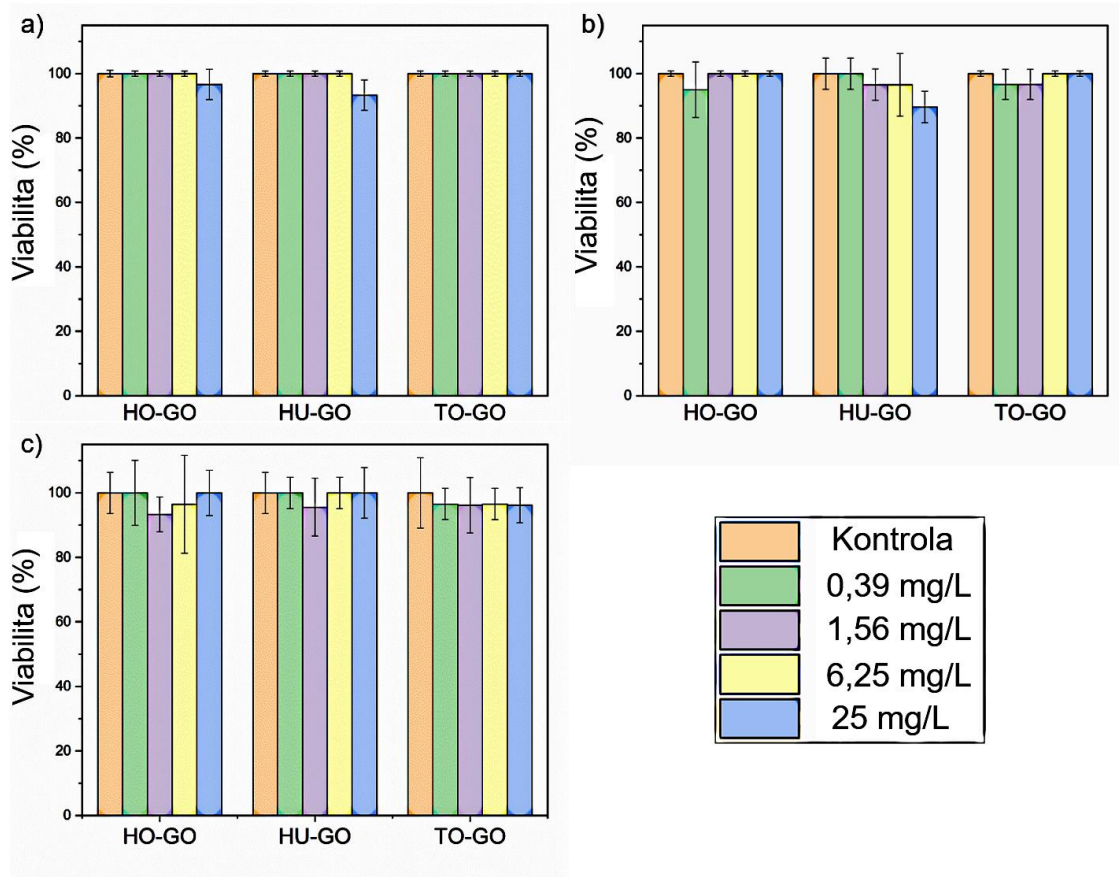
5.2.3.3. Akutní toxicita a analýza oxidačního stresu koryšů značených GOs s 24h předinkubací s řasami

V předchozí studii jsme poprvé popsali schopnost jednoduchých jednobuněčných zelených řas generovat obranou reakci proti GO prostřednictvím produkce bílkovin a sacharidů (Obrázek č. 21a a 21b).²² Abychom zjistili, zda tento jev může ovlivnit také akutní toxicity GOs vůči vodním koryšům, provedli jsme stejné testy znovu s modifikací, kterou představoval první krok, kdy byly GOs předinkubovány po 24 h se zelenou řasou *Chlorella kessleri*. Tato úprava současně lépe odrážela podmínky ve skutečných vodních ekosystémech, jelikož zelené řasy představují nejčastější druh potravy vodních koryšů. Bylo tak možné získat přesnější informace o osudu GO v životním prostředí.

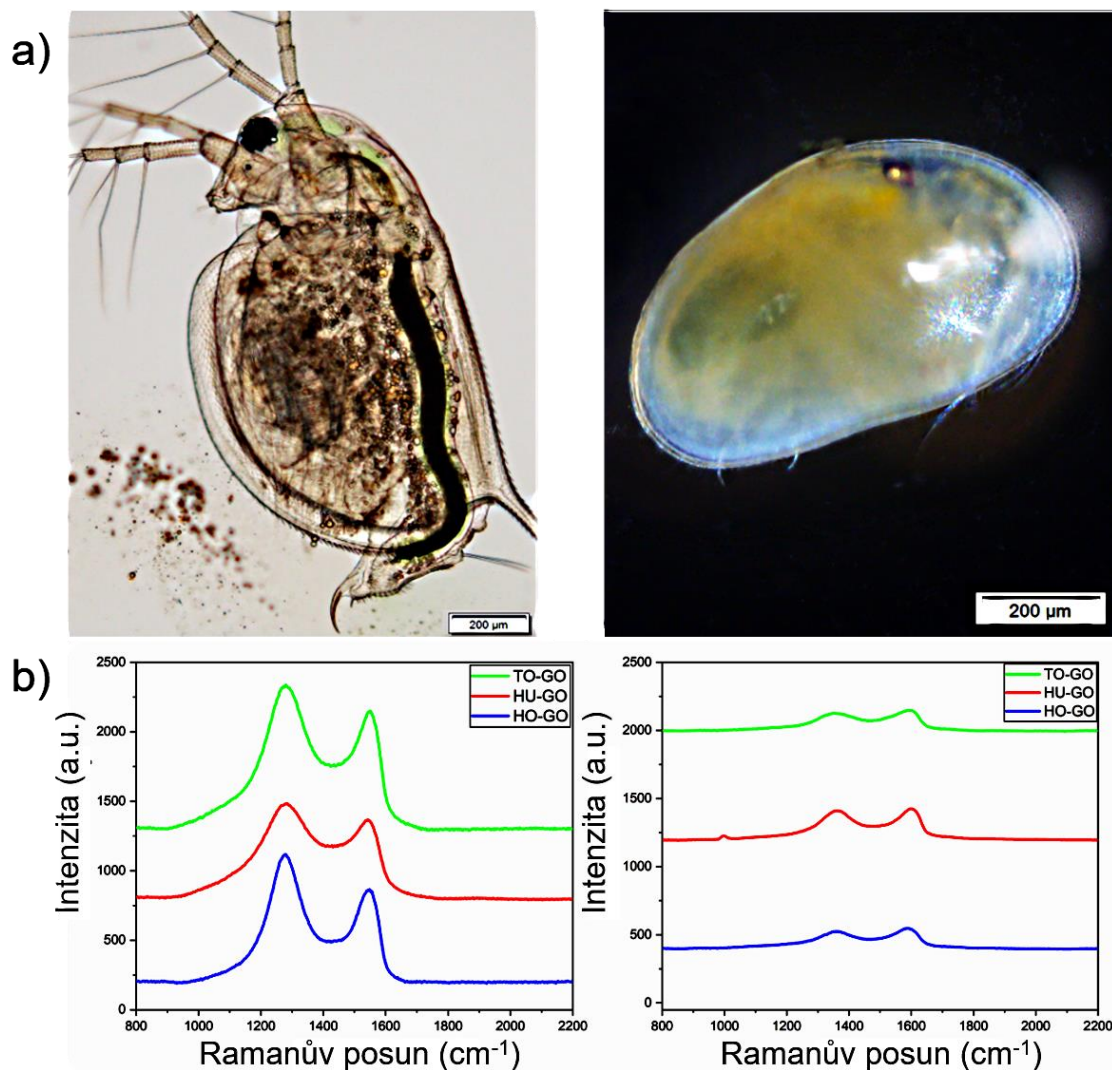
Výsledky na obrázku č. 25 jasně ukazují, že tato jednoduchá modifikace standardních testů dramaticky ovlivnila toxický účinek GO na vodní koryše. Obranná reakce jednobuněčných řas proti GOs se tak ukázala jako zásadní i pro mnohem složitější vodní organismy. Bylo pozorováno úplné potlačení akutní toxicity GOs pro planktonní a bentické koryše, jelikož životnost všech tří organismů neklesla pod 90 % ani při nejvyšší použité koncentraci všech tří GO (25 mg/L, Obrázek č. 25). Současně vnitřní a vnější expozice organismů GOs zůstala stejná i s touto modifikací, jelikož byly všechny systémy GO detekovány jak optickou mikroskopií, tak Ramanovým měřením střev a výkalů, kde byly pro systémy GOs opět detekovány typické D a G pásy (Obrázek č. 26).²³ Navíc se vliv obranné reakce řas projevil nejen ve viabilitě koryšů, ale také v analýze oxidačního stresu dafnií u všech tří pozorovaných biomarkerů (ROS, SOD a CAT) (Obrázek č. 27). Obě koncentrace všech tří systému GOs byly zodpovědné za takové exprese těchto biomarkerů, které byly na podobné úrovni jako neznačené kontrolní vzorky. Žádný vzorek nezpůsobil nárůst ROS/min vyšší než 1,5 nebo nárůst aktivity SOD a CAT 1,2 úrovně kontrolního vzorku (Obrázek č. 27). Pro lepší představu o míře tohoto efektu je

na obrázku 27 uvedena stejná stupnice jako na obrázku 24, kde byly silně zvýšeny všechny tři biomarkery oxidačního stresu (ROS, SOD a CAT). Ještě důležitější fakt byl ten, že zavedení kroku předinkubace s řasami zcela vymýtilo vliv koncentrace a míry povrchové oxidace GOs jak na životnost, tak na oxidační stres a následnou antioxidační reakci, kterou jsme pozorovali bez modifikace s řasovými buňkami (Obrázek č. 22 a 24).

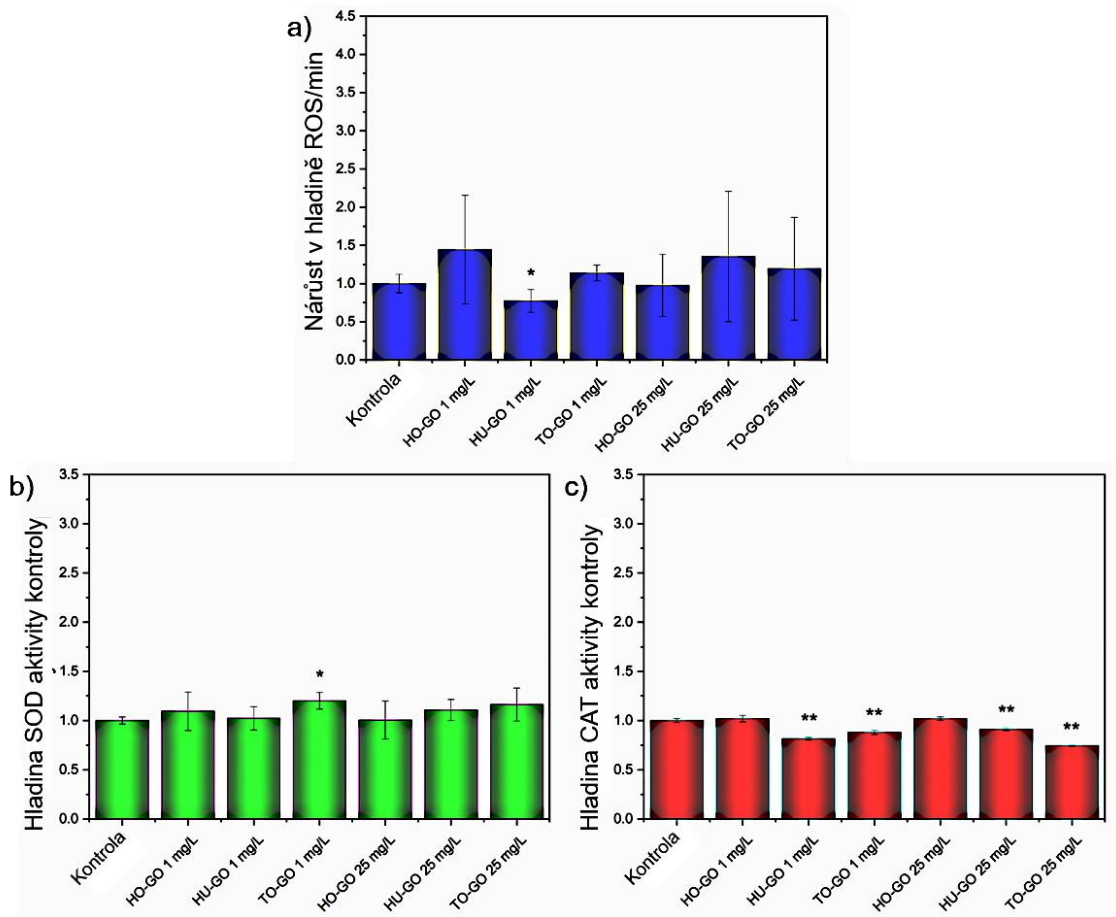
Upravení podmínek laboratorních testů s využitím řas, které mnohem lépe reflektují podmínky ve skutečných vodních ekosystémech tak podle výsledků vytvořilo bezstresové prostředí pro vodní korýše v přítomnosti GO i ve velmi vysokých koncentracích (25 mg/L). V současnosti není v literatuře žádná studie, která by zohledňovala faktor potravy pro vodní korýše a jeho vliv na akutní toxicitu GOs. Tato modifikace tak přináší zcela nový pohled na celkový osud GO v životním prostředí. Fenomén potlačení ecotoxicity GO vlivem řas je o to pozoruhodnější, že byl pozorován pro velmi vysoké koncentrace (mg/L), které jsou milionkrát vyšší, než v současnosti očekávané koncentrace materiálů na bázi grafenu v životním prostředí.¹⁹⁰ Tyto výsledky tak naznačují, že i v případě masivního zvýšení koncentrace GO ve vodním prostředí v následujících letech, nebude GO představovat nebezpečný materiál pro vodní organismy.



Obrázek č. 25. Viabilita planktonních korýšů a) *Daphnia magna* a b) *Thamnocephalus platyurus* po 48 h inkubace s různými koncentracemi HO-GO, HU-GO a TO-GO s přidaným krokem 24 h předinkubace GOs s řasami. Viabilita bentického korýše c) *Heterocypris incongruens* po 6 denní inkubaci s různými koncentracemi HO-GO, HU-GO a TO-GO s přidaným krokem 24 h předinkubace GOs s řasami. Výsledky byly normalizovány definováním 100% viability pro kontrolní neznačený vzorek. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Převzato z ²³ a upraveno.



Obrázek č. 26. a) Reprezentativní obrázky z optické mikroskopie *Daphnia magna* (vlevo) a *Heterocypris incongruens* (vpravo) inkubované s 25 mg/L HO-GO po 24 h (*Daphnia*) a 96 h (*Heterocypris*) s přidaným krokem 24 h předinkubace s řasami. Měřítko je 200 μm. b) Ramanova spektra *Daphnia magna* (vlevo) a *Heterocypris incongruens* (vpravo) po 24 h a 96 h inkubaci s 25 mg/L HO-GO (modrá linie), HU-GO (červená linie) a TO-GO (zelená linie) s přidaným krokem 24 h předinkubace s řasami. Převzato z²³ a upraveno.



Obrázek č. 27. Analýza oxidačního stresu *Daphnia magna* po 48 h inkubace s 1 a 25 mg/L HO-GO, HU-GO a TO-GO s přidáním krokem 24 h předinkubace s řasami. a) Nárůst ROS/min, b) SOD aktivity a c) CAT aktivity úrovně kontrolního vzorku. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$. Převzato z²³ a upraveno.

5.2.3.4. Shrnutí studie

V této studii byla důkladně popsána interakce mezi třemi systémy GO a planktonními a bentickými korýši. Prokázali jsme, že podle standardních testů toxicity hraje v ekotoxicitě GO vůči vodním korýšům důležitou roli jak strategie získávání potravy organismů, tak míra povrchové oxidace GO, která se projevuje v rozdílném mechanismu působení. Kromě toho jsme se pokusili přinést nový pohled na osud GO v prostředí vodních ekosystémů tím, že jsme do interakce přidali řasy jako faktor, který

představuje nejběžnější zdroj potravy pro vodní korýše. Předložili jsme první důkaz o kompletním potlačení akutní toxicity GO vůči vodním korýšům po úpravě laboratorních podmínek, které přesněji odráží podmínky v reálných ekosystémech. Potlačení bylo pozorováno jak na úrovni viability organismů, tak na úrovni oxidačního stresu a navíc zcela eliminovalo vliv povrchové oxidace GO na jeho mechanismus působení. Naše výsledky ukázaly, že faktor potravy organismů může hrát zásadní roli v potenciálním škodlivém účinku materiálů, a proto musí být brán v úvahu při posuzování jejich ekotoxicity ve vodním prostředí. Současně stejně jako závěry předchozí studie na řasách a sinicích, i zde výsledky potvrzují, že GO nepředstavuje výrazné ekologické riziko pro organismy v komplexním vodním prostředí.

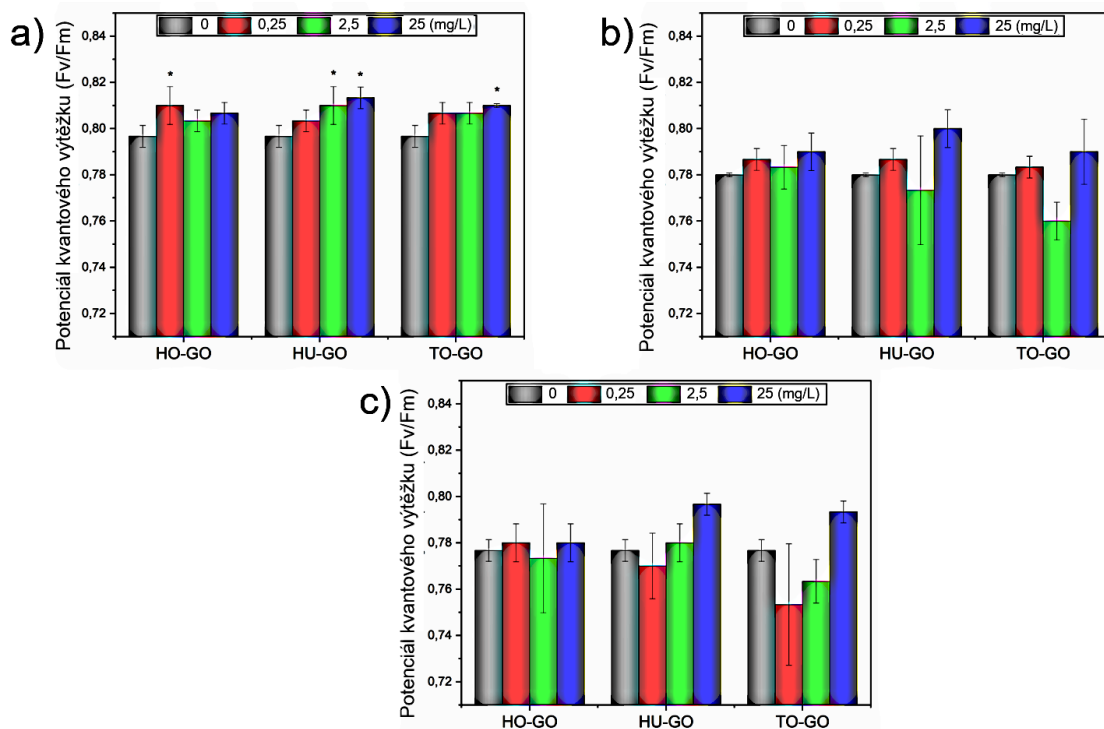
5.2.4. Interakce GOs s vodními rostlinami

Poslední skupinou organismů, u kterých byla studována interakce se třemi systémy GO s rozdílnou povrchovou oxidací, byly vodní rostliny. Tyto organismy byly vybrány ze zjevného důvodu, jelikož v současnosti neexistují v literatuře téměř žádná toxikologická data o potenciálním škodlivém účinku GO na tyto organismy s výjimkou práce *Castra et al*, který však popisoval účinek GO na několik organismů z různých úrovní potravního řetězce.¹⁹¹ Dále pak existují už jen dvě studie, které se zabývaly problematikou, jak může GO ovlivnit stres vodních rostlin způsobený těžkými kovy.¹⁹² ¹⁹³ Žádná ze zmíněných studií však nepřinesla detailní informace o mechanismu působení GO, zejména s ohledem na složení jeho povrchu, protože byl v každé studii studován pouze jeden systém GO. Jelikož vodní rostliny představují organismy patřící k trofické úrovni producentů vodního ekosystému a jeho životně důležitou součástí, je nezbytné získat více údajů ohledně mechanismu potenciálního škodlivého účinku GO. Současně již byla prokázána určitá ekotoxicita GO pro suchozemské rostliny,^{194, 195} což klade ještě větší důraz na potřebu získání údajů o interakci GO s rostlinami ve vodním prostředí.

Jako zástupce vodních rostlin byl vybrán okřehek *Lemna minor*, který patří mezi nejmenší volně plovoucí rostliny rostlinné říše.¹⁹⁶ Jeho malá velikost, jednoduché složení, asexuální rozmnožování, krátká generační doba a široké rozšíření v různých zeměpisných oblastech z něj navíc činí ideálního kandidáta pro testování toxicity různých polutantů, těžkých kovů nebo nanomateriálů.¹⁹⁷ Interakce mezi okřehekem a třemi systémy GOs byla pozorována pro koncentrace 0,25, 2,5 a 25 mg/L.

5.2.4.1. Fotosyntetická aktivita, počet lístků a hmotnost sušiny *Lemna minor* značených GOs

Nejprve jsme pozorovali, zda značení systémy GO může ovlivnit fotosyntetický potenciál okřehku. Na obrázku č. 28 jsou uvedeny hodnoty maximálního potenciálu kvantového výtěžku fotosystému II (Fv/Fm) *Lemna minor* pozorované po 3, 5 a 7 dní kultivace s materiály GOs. U všech vzorků se hodnoty po 3 dnech pohybovaly kolem 0,8 (Obrázek č. 28a) a po 5 a 7 dnech se potenciály kvantového výtěžku snížily na hodnotu kolem 0,78 (Obrázek č. 28b a 28c). Ačkoliv některé koncentrace GOs po 3 dnech inkubace způsobily statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolním neznačeným vzorkem, odchylka byla jen nepatrná, jelikož se všechny hodnoty pohybovaly v rozmezí od 0,75 do 0,82. Stejně jako u jiných druhů rostlin se optimální hodnoty potenciálu kvantového výtěžku fotosystému II okřehku pohybují mezi 0,7 a 0,83 a pouze účinek, který způsobí pokles hodnot pod 0,6 Fv/Fm je považován za stresující a ovlivňující fotosyntetický potenciál.¹⁹⁸⁻²⁰⁰ Proto jsme dle naměřených hodnot vyvodili závěr, že povrchová oxidace GO nemá vliv na stres rostlin, protože žádný ze tří systémů GO nezpůsobil inhibici fotosyntetického potenciálu *Lemna minor*.



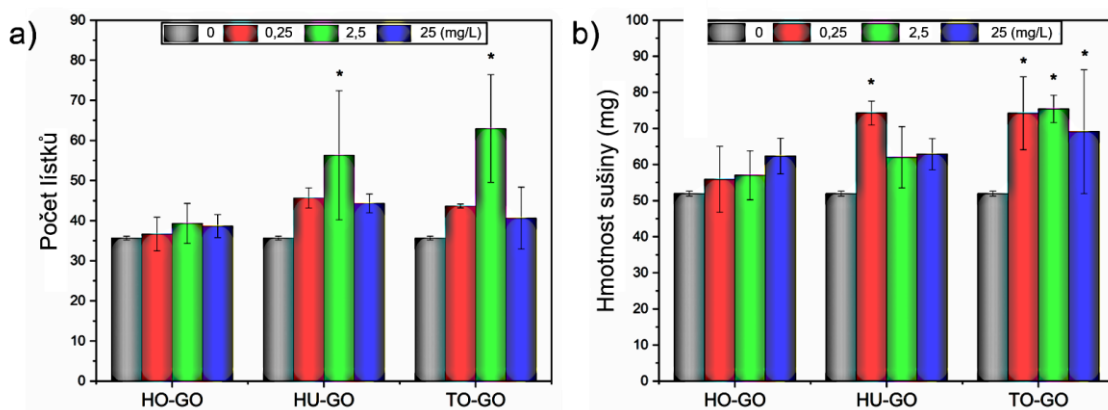
Obrázek č. 28. Maximální potenciál kvantového výtěžku (Fv/Fm) fotosystému II *Lemna minor* značeného různými koncentracemi HO-GO, HU-GO a TO-GO po dobu a) 3 dní, b) 5 dní a c) 7 dní. * $p \leq 0.05$.

Analýza vlivu GOs na růst okřehku je uvedena na obrázku č. 29 a byla provedena pomocí dvou parametrů: počtu lístků a hmotnosti sušiny okřehku po 7 denní inkubaci s GOs. Počet lístků neznačeného kontrolního vzorku se za dobu inkubace ztrojnásobil, z původních 12 na 36 (Obrázek č. 29a). Dále z výsledků vyplývá, že žádný GO nezpůsobil inhibici růstu, jelikož všechny vzorky značené různými koncentracemi třech systémů GO po dobu 7 dní měly počet lístků vyšší než 36 (Obrázek č. 29a). Přestože jsme nezaznamenali žádnou výraznou koncentrační závislost, pozorovali jsme vliv míry povrchové oxidace GO. Jediným vzorkem, který nezpůsobil statisticky významný rozdíl v počtu lístků ve srovnání s kontrolou, byl totiž nejméně oxidovaný HO-GO, u nějž počet lístků nepřekročil 40 pro žádnou koncentraci (Obrázek č. 29a). Na druhou stranu ošetření

okřehku více oxidovanými systémy HU-GO a TO-GO vedlo k překročení 40 lístků pro všechny koncentrace materiálů (Obrázek č. 29a).

Vážení sušiny okřehků po 7 dnech inkubace s GOs přineslo podobné výsledky (Obrázek č. 29b). Značení všemi vzorky GO mělo opět za následek vyšší hodnoty než neznačený kontrolní vzorek, u kterého bylo po 7 dnech naváženo 52 mg sušiny. Nejméně oxidovaný HO-GO opět způsobil nejslabší efekt, jelikož pouze značení nejvyšší koncentrací (25 mg/L) vedlo k nárůstu na 62 mg sušiny, zatímco vzorky ošetřené nižšími koncentracemi HO-GO měly hmotnost biomasy pod 60 mg (Obrázek č. 29b). U vzorků HU-GO a TO-GO byl pozorován výraznější stimulační účinek podobně jako u počtu lístků. Suchá biomasa okřehku ošetřeného vzorkem HU-GO byla pro všechny koncentrace vyšší než 62 mg (Obrázek č. 29b), zatímco systém TO-GO byl zodpovědný za ještě silnější odezvu s výslednou sušinou přes 69 mg u všech koncentrací (Obrázek č. 29b). Ani v tomto případě nebyla zjištěna výrazná závislost na koncentraci materiálů.

Dle naměřených výsledků tedy konstatujeme, že GOs neinhibovaly růst okřehku, naopak GOs s vyšším počtem funkčních skupin byly zodpovědné za pozitivní účinek a dokonce růst okřehku stimulovaly. V literatuře se prozatím ohledně vlivu GO na růst okřehku objevují různé závěry, kdy dvě studie uvádějí podobné výsledky a do koncentrace 5 mg/L nebyl pozorován žádný vliv na růst okřehku.^{192, 193} Třetí studie zabývající se okřehkem a GO však uvedla výrazné snížení suché biomasy již u vzorků značených koncentrací 2,59 mg/L, ačkoliv nebyl pozorován žádný vliv GO na počet lístků *Lemna minor*.¹⁹¹



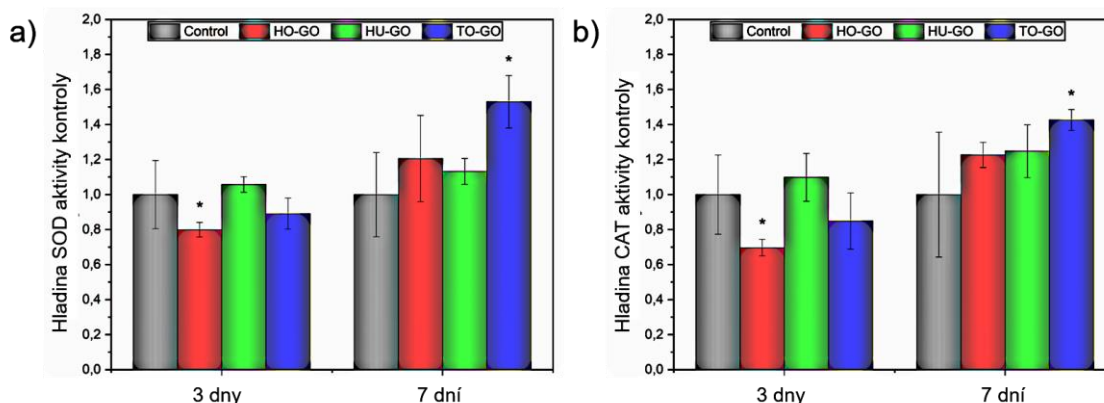
Obrázek č. 29. Analýza vlivu GOs na růst *Lemna minor*. a) Počet lístků a b) hmotnost sušiny *Lemna minor* inkubované 7 dní s různými koncentracemi HO-GO, HU-GO a TO-GO. * $p \leq 0.05$.

5.2.4.2. Aktivita antioxidantních enzymů *Lemna minor* po značení GOs

Pro získání dalších informací o mechanismu interakce GO s okřehkem byla stanovena aktivita dvou hlavních antioxidantních enzymů (superoxid dismutázy (SOD) a katalázy (CAT)) po 3 a 7 dnech inkubace s 25 mg/L vzorků GOs. I když po třech dnech inkubace došlo k mírnému poklesu aktivity obou enzymů u vzorků HO-GO i TO-GO, rozdíl byl statisticky významný pouze u vzorku HO-GO (0,8 a 0,7 pro CAT a SOD úrovně kontrolního vzorku, resp.) (Obrázek č. 30). 7 denní inkubace s materiálem však vedla ke zvýšení aktivity obou enzymů, ačkoliv žádná hodnota nepřesáhla 1,6 úrovně kontrolního vzorku (Obrázek č. 30). Systém TO-GO pak způsobil nejvyšší zvýšení u obou enzymů (1,5 a 1,4 pro CAT a SOD úrovně kontrolního vzorku, resp.), které bylo současně jako jediné statisticky významné ve srovnání s kontrolním vzorkem.

Z výsledků aktivity antioxidantních enzymů vyplývá, že míra povrchové oxidace GO ovlivňuje interakci GO a okřehku, jelikož nejvíce oxidovaný TO-GO způsobil po 7 dnech nejvyšší nárůst v aktivitě obou enzymů. Na druhou stranu, pouze výrazné odchylky

(pokles nebo nárůst) hladin SOD a CAT jsou považovány za indikátory vystavení rostlinného organismu poškozujícímu stresu.²⁰¹⁻²⁰³ Přestože byl po 3 dnech inkubace okřehku se systémem HO-GO pozorován statisticky významný pokles v antioxidační aktivitě obou enzymů, po 7 dnech došlo k jejich obnově zpátky na hodnotu podobnou kontrolnímu vzorku, což potvrzuje schopnost rostliny vypořádat se s účinkem GO po delší inkubaci. Statisticky významné zvýšení obou enzymů po 7 dnech u vzorku TO-GO zase dobře koreluje s pozorovanou stimulací růstu (Obrázek č. 29), protože hodnoty aktivit nebyly natolik vysoké, aby způsobily stres vyvolávající toxicitu. Ze třech zmíněných studií zabývajících se GO a okřehkem pouze jedna zkoumala efekt GO na antioxidační enzymy, přičemž do 5 mg/L nebyl zjištěn žádný účinek na jejich aktivitu.¹⁹² Získané výsledky analýzy aktivity antioxidačních enzymů tedy prokázaly, že ani jeden ze zkoumaných systémů GO nevyvolal oxidační stres vedoucí k toxickému efektu.



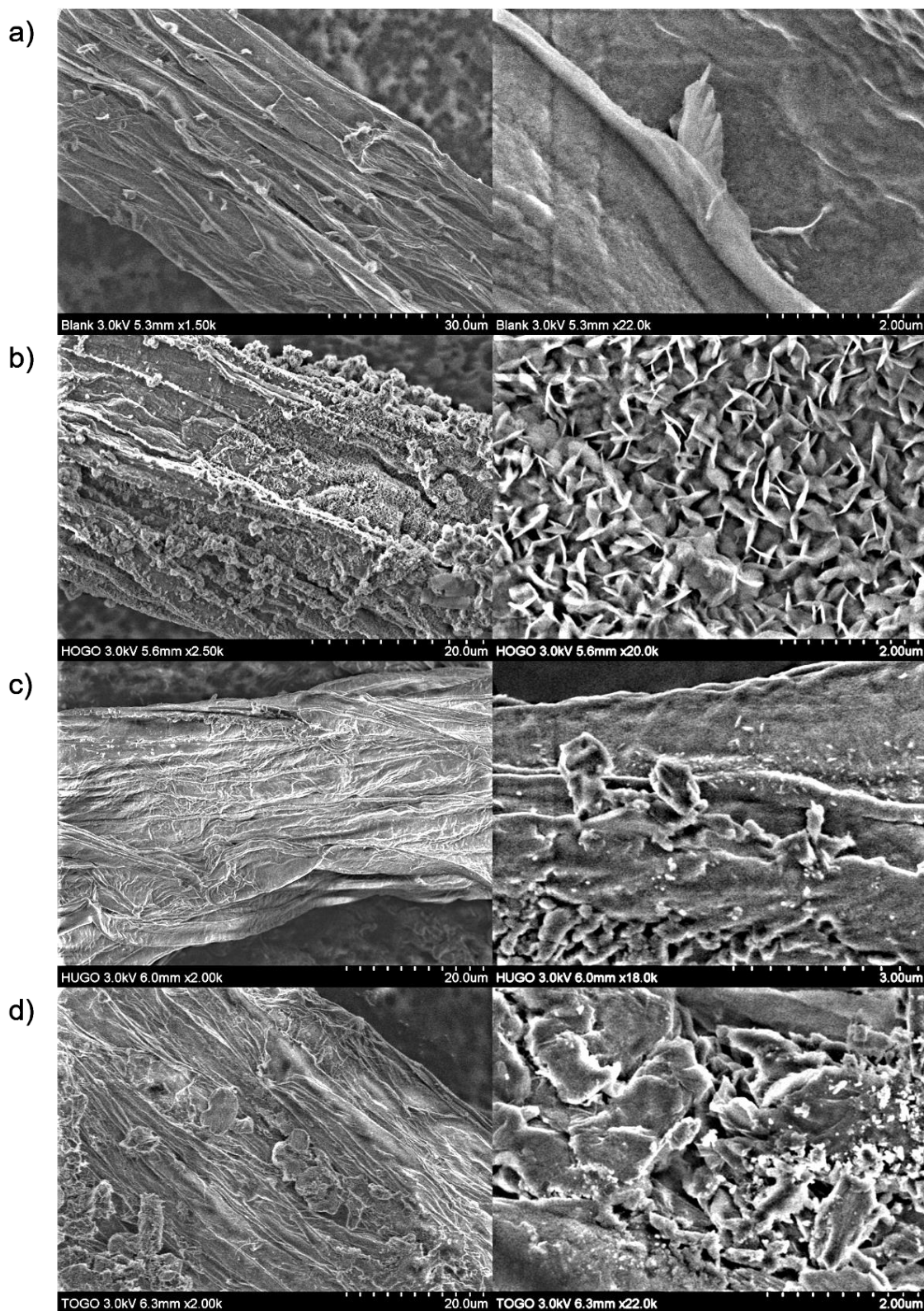
Obrázek č. 30. Aktivita a) Katalázy a b) Superoxid dismutázy *Lemna minor* po 3 a 7 dnech inkubace s 25 mg/L HO-GO, HU-GO a TO-GO. Data byla normalizována definováním aktivity 1 pro kontrolní nezačtený vzorek. * $p \leq 0.05$.

5.2.4.3. Detailní pozorování interakce mezi GOs a kořenem *Lemna minor* pomocí SEM

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byly získány obrázky kořenů okřehku po 7 dnech inkubace se systémy GOs pro co nejpodrobnější popis mechanismu interakce GO v závislosti na jeho povrchovém složení. Na obrázku č. 31 jsou zobrazeny jak přehledové snímky interakce, tak snímky přinášející detailní pohled na interakci mezi GOs a kořenem. První závěr, vyvozený z přehledových snímků byl ten, že množství materiálu, který je v přímém kontaktu s kořeny, bylo u vzorku HO-GO mnohem vyšší než u dalších dvou materiálů (Obrázek č. 31b vlevo). Současně byla z detailního pohledu skutečně patrná přímá interakce hydrofobního vzorku HO-GO, jelikož listy GO byly fyzicky zaseknuté do kořene okřehku (Obrázek č. 31b vpravo). Naopak vzorky HU-GO a TO-GO vykazovaly zcela odlišné chování. Jednak byly oba materiály na přehledových snímcích pozorovány spíše ve formě souvislé vrstvy na povrchu kořene okřehku, než ve formě jednotlivých listů GO (Obrázek č. 31c a 31d vlevo). Detailní snímky navíc odhalily, že listy HU-GO a TO-GO spíše leží na povrchu kořene díky svým hydrofilním vlastnostem a přednostní interakci prostřednictvím povrchových funkčních skupin (Obrázek č. 31c a 31d vpravo). Přímá interakce pozorovaná u systému HO-GO navíc také dobře vysvětluje, proč byl po 3 dnech inkubace pozorován pokles aktivity antioxidantních enzymů (Obrázek č. 30), jelikož rostlina potřebovala delší čas, aby se vypořádala se zaseklými listy HO-GO ve své struktuře.

Snímky z elektronové mikroskopie tak jasně prokázaly schopnost GO přímo interagovat s kořenem okřehku prostřednictvím jak jeho hran, tak také jeho bazální části s funkčními skupinami v závislosti na stupni povrchové oxidace GO. Mnohem zásadnější zjištění však bylo to, že tato přímá mechanická interakce nevyvolala žádnou významnou toxicitu, jelikož *Lemna minor* byla schopna obnovit svou antioxidantní aktivitu během

delší inkubace. Tyto výsledky tak potvrdily, že ochranná vnější vrstva nebo bariéra vodních organismů hraje zásadní roli v ekotoxicitě GO, protože během interakce s jednobuněčnými fotoautotrofními organismy a vodními korýši byl HO-GO schopen přímým kontaktem způsobit mechanické poškození organismů prostřednictvím svých ostrých hran.^{22, 23} U vodních rostlin se však obranná bariéra ve formě kořene ukázala jako dostatečně pevná a silná, jelikož se přímá fyzická interakce materiálů s kořenem neprojevila žádným škodlivým účinkem studovaných GO (Obrázek č. 28, č. 29 a č. 30).



Obrázek č. 31. Obrázky ze SEM a) neznačeného kořenu *Lemna minor* a kořenů *Lemna minor* značených po 7 dní 25 mg/L b) HO-GO, c) HU-GO, d) TO-GO. Uvedeny jsou přehledové snímky (vlevo) a detailní snímky (vpravo) kořenů.

5.2.4.4. Shrnutí studie

V této studii byla monitorována interakce modelového organismu *Lemna minor* vodních rostlin se třemi různě oxidovanými systémy GO. Podle naměřených výsledků nevyvolal ani jeden systém GO po 7 dnech inkubace s okřehkem toxický efekt. U více oxidovaných systémů byl dokonce pozorován určitý stimulační efekt na růst vodní rostliny. Podrobné mikroskopické analýzy prokázaly, že mechanismus interakce byl silně závislý na povrchové oxidaci GO. Hydrofobní (méně oxidovaný) GO interagoval s kořenem okřehku prostřednictvím ostrých okrajů listů GO, které byly přímo zaseknuty v kořenu rostliny. Hydrofilnější (více oxidované) GOs pak byly zodpovědné za slabší interakci skrze povrchové funkční skupiny, čímž pokrývaly kořen v nižším množství. Závěry tedy ukazují, že GO není materiálem, který by byl nebezpečný pro rostliny ve vodním prostředí, jelikož ani ve vysokých koncentracích (25 mg/L) nezpůsobuje žádný škodlivý účinek.

6. Závěr

V rámci předložené disertační práce byla diskutována humánní a environmentální toxicita uhlíkových nanomateriálů skrze interakci s buněčnými liniemi a organismy ve vodním prostředí.

První část zahrnující humánní toxicitu byla rozdělena na dvě kapitoly, kdy v obou představovalo testování *in vitro* akutní toxicity klíčový krok pro evaluaci potenciálního škodlivého účinku CNMs a jejich následné bezpečné použití v biomedicínských aplikacích. První kapitola se zabývala kvartérními uhlíkovými tečkami a studiem jejich interakce s mezenchymálními kmenovými buňkami. Pomocí komplexní baterie *in vitro* testů toxicity byla definována bezpečná koncentrace QCDs, která neovlivňovala viabilitu, buněčné procesy a charakter kmenových buněk a současně dávala silný fluorescenční signál uvnitř buněk. Kmenové buňky značené touto koncentrací pak byly aplikovány nejprve subkutánně do zadní končetiny myši, což potvrdilo dostatečný fluorescenční signál *in vivo*. Následně byly značené buňky aplikovány intravenózně do myši nesoucí nádor, který v tomto případě zastupoval místo vykazující zánětlivou reakci, a pomocí *in vivo* pozorovacího systému v kombinaci s konfokální mikroskopií tenkých řezů tumoru byla potvrzena neměnná migrační schopnost kmenových buněk po značení QCDs i v podmínkách *in vivo*. Bylo tak prokázáno, že QCDs mohou být v budoucnu využity jako sondy pro pozorování kmenových buněk v terapiích regenerační medicíny.

Ve druhé kapitole byla zkoumána interference uhlíkových nanomateriálů s klasickými *in vitro* testy pro vyhodnocení viability buněk. Bylo prokázáno, že nové typy CNMs interferují s klasickým testem MTT a mohou tak vést k falešným výsledkům viability buněk. Pro spolehlivé vyhodnocení cytotoxicity CNMs proto byla navržena analýza LIVE/DEAD pomocí průtokové cytometrie. Pokud však byl uplatněn standardní

postup, byly pro CNMs pozorovány různé typy interference i v této metodě v závislosti na rozdílných vlastnostech materiálů, které vedly k falešným výsledkům cytotoxicity. Byl proto definován nový postup s využitím dodatečných kontrol, díky kterému jsme byli schopni všechny typy interference překonat a získat tak spolehlivé výsledky cytotoxicity CNMs.

Část popisující environmentální toxicitu CNMs se celá věnovala studiu environmentálního osudu systémů grafen oxidu s různým stupněm povrchové oxidace ve vodním prostředí. Nejprve jsme provedli komplexní charakterizaci materiálů, která potvrdila, že různé syntézy vedou k přípravě systémů GO s podobnou velikostí a výškou listů, ale kompletně odlišnou mírou povrchové oxidace a různým množstvím kyslík-obsahujících funkčních skupin. Následně byl studován vliv povrchové oxidace na mechanismus interakce GO s organismy z různých trofických úrovní vodního ekosystému, a to řasami a sinicemi, vodními korýši a vodními rostlinami.

U všech organismů bylo prokázáno, že mechanismus interakce GO je vysoce závislý jak na jeho povrchové oxidaci, tak na životní strategii živočichů a jejich ochranných vrstvách. GO s nejnižším množstvím kyslík-obsahujících povrchových funkčních skupin totiž působil jako tzv. „nano-žiletka“ a dokázal přímo interagovat s organismy a mechanicky je poškozovat. Více oxidované systémy GO schopnost mechanicky interagovat neměly, jelikož větší množství povrchových funkčních skupin zabránilo přímému kontaktu jejich hran s organismy. Významnější zjištění však bylo, že jsme jako první předložili důkaz o dynamické obranné reakci řas a sinic vůči účinku GO, která se navíc projevila ve snížení dlouhodobého škodlivého účinku GO pro tyto organismy. Tento jev byl potvrzen také u vodních korýšů, kdy předinkubace se zelenými řasami, jako nejběžnějšího zdroje potravy korýšů vedl ke kompletnímu potlačení akutní toxicity GO vůči těmto organismům. Jedinými organismy, které nedokázal málo

oxidovaný GO mechanicky zranit, byly vodní rostliny, jelikož se jejich ochranná vrstva ve formě kořene ukázala být příliš silná na to, aby jí GO pronikl a způsobil poškození. Naše výsledky tak ukázaly, že environmentální rizika GO ve vodním prostředí nemusí být zdaleka tak výrazné, jak bylo v poslední době popsáno v literatuře, jelikož si vodní organismy dokáží z dlouhodobého hlediska s přítomností GO poradit.

V předložené disertační práci tak bylo nejprve v části humánní toxicity prokázáno, jak důležitou roli hrají spolehlivé *in vitro* testy, které umožňují nejen vybrat vhodnou koncentraci CNMs pro jejich budoucí biomedicínskou aplikaci, ale také překonat interferenci materiálů a zabránit tak publikování falešných výsledků cytotoxicity těchto materiálů. V environmentální části práce pak bylo ukázáno, že laboratorní testy vždy nedávají kompletní informaci o osudu grafen oxidu ve vodním prostředí a detailní pohled na jeho interakci s různými organismy více reflektující podmínky reálné expozice může výrazně snižovat potenciální rizika GO v životním prostředí, což je klíčové pro aplikace, které vlastností GO využívají.

7. Reference

1. Kroto, H.; Heath, J.; O'Brien, S.; Curl, R.; Smalley, R., C-60 - Buckminsterfullerene. *Nature* 1985, 318, 162-163.
2. Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 1991, 354, 56-58.
3. Novoselov, K.; Geim, A.; Morozov, S.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S.; Grigorieva, I.; Firsov, A., Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* 2004, 306, 666-669.
4. Hong, G.; Diao, S.; Antaris, A.; Dai, H., Carbon Nanomaterials for Biological Imaging and Nanomedicinal Therapy. *Chem Rev* 2015, 115, 10816-10906.
5. Jariwala, D.; Sangwan, V.; Lauhon, L.; Marks, T.; Hersam, M., Carbon nanomaterials for electronics, optoelectronics, photovoltaics, and sensing. *Chem Soc Rev* 2013, 42, 2824-2860.
6. Georgakilas, V.; Tiwari, J.; Kemp, K.; Perman, J.; Bourlinos, A.; Kim, K.; Zboril, R., Noncovalent Functionalization of Graphene and Graphene Oxide for Energy Materials, Biosensing, Catalytic, and Biomedical Applications. *Chem Rev* 2016, 116, 5464-5519.
7. Zhu, C.; Dan, D.; Lin, Y., Graphene and graphene-like 2D materials for optical biosensing and bioimaging: a review. *2D Mater* 2015, 2, 032004.
8. Devi, P.; Saini, S.; Kim, K. H., The advanced role of carbon quantum dots in nanomedical applications. *Biosens Bioelectron* 2019, 141, 111158.
9. Zhou, K. G.; Vasu, K. S.; Cherian, C. T.; Neek-Amal, M.; Zhang, J. C.; Ghorbanfekr-Kalashami, H.; Huang, K.; Marshall, O. P.; Kravets, V. G.; Abraham, J.; Su, Y.; Grigorenko, A. N.; Pratt, A.; Geim, A. K.; Peeters, F. M.; Novoselov, K. S.; Nair, R. R., Electrically controlled water permeation through graphene oxide membranes. *Nature* 2018, 559, 236-240.
10. Abraham, J.; Vasu, K. S.; Williams, C. D.; Gopinadhan, K.; Su, Y.; Cherian, C. T.; Dix, J.; Prestat, E.; Haigh, S. J.; Grigorieva, I. V.; Carbone, P.; Geim, A. K.; Nair, R. R., Tunable sieving of ions using graphene oxide membranes. *Nat Nanotechnol* 2017, 12, 546-550.
11. De Marchi, L.; Pretti, C.; Gabriel, B.; Marques, P. A. A. P.; Freitas, R.; Neto, V., An overview of graphene materials: Properties, applications and toxicity on aquatic environments. *Sci Total Environ* 2018, 631-632, 1440-1456.
12. Han, M.; Zhu, S.; Lu, S.; Song, Y.; Feng, T.; Tao, S.; Liu, J.; Yang, B., Recent progress on the photocatalysis of carbon dots: Classification, mechanism and applications. *Nano Today* 2018, 19, 201-218.
13. Hao, Q.; Jia, G.; Wei, W.; Vinu, A.; Wang, Y.; Arandiyana, H.; Ni, B., Graphitic carbon nitride with different dimensionalities for energy and environmental applications. *Nano Res* 2020, 13, 18-37.
14. Hola, K.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Giannelis, E.; Zboril, R.; Rogach, A., Carbon dots-Emerging light emitters for bioimaging, cancer therapy and optoelectronics. *Nano Today* 2014, 9, 590-603.
15. Liao, G.; He, F.; Li, Q.; Zhong, L.; Zhao, R.; Che, H.; Gao, H.; Fang, B., Emerging graphitic carbon nitride-based materials for biomedical applications. *Prog Mater Sci* 2020, 112, 100666.

16. Compton, O.; Nguyen, S., Graphene Oxide, Highly Reduced Graphene Oxide, and Graphene: Versatile Building Blocks for Carbon-Based Materials. *Small* 2010, 6, 711-723.
17. Bakandritsos, A.; Pykal, M.; Błoński, P.; Jakubec, P.; Chronopoulos, D. D.; Poláková, K.; Georgakilas, V.; Čépe, K.; Tomanec, O.; Ranc, V.; Bourlinos, A. B.; Zbořil, R.; Otyepka, M., Cyanographene and Graphene Acid: Emerging Derivatives Enabling High-Yield and Selective Functionalization of Graphene. *ACS Nano* 2017, 11, 2982-2991.
18. Drasler, B.; Sayre, P.; Steinhäuser, K.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B., In vitro approaches to assess the hazard of nanomaterials. *Nanoimpact* 2017, 8, 99-116.
19. Freixa, A.; Acuña, V.; Sanchís, J.; Farré, M.; Barceló, D.; Sabater, S., Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms. *Sci Total Environ* 2018, 619-620, 328-337.
20. Malina, T.; Polakova, K.; Skopalik, J.; Milotova, V.; Hola, K.; Havrdova, M.; Tomankova, K.; Cmiel, V.; Sefc, L.; Zboril, R., Carbon dots for in vivo fluorescence imaging of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Carbon* 2019, 152, 434-443.
21. Malina, T.; Poláková, K.; Hirsch, C.; Svoboda, L.; Zbořil, R., Toxicity of Carbon Nanomaterials—Towards Reliable Viability Assessment via New Approach in Flow Cytometry. *Int J Mol Sci* 2021, 22, 7750.
22. Malina, T.; Maršálková, E.; Holá, K.; Tuček, J.; Scheibe, M.; Zbořil, R.; Maršálek, B., Toxicity of graphene oxide against algae and cyanobacteria: Nanoblade-morphology-induced mechanical injury and self-protection mechanism. *Carbon* 2019, 155, 386-396.
23. Malina, T.; Marsalkova, E.; Hola, K.; Zboril, R.; Marsalek, B., The environmental fate of graphene oxide in aquatic environment-Complete mitigation of its acute toxicity to planktonic and benthic crustaceans by algae. *J Hazard Mater* 2020, 399, 123027.
24. Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Georgakilas, V.; Giannelis, E. P., Photoluminescent carbogenic dots. *Chem Mater* 2008, 20, 4539-4541.
25. Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Karakassides, M.; Giannelis, E. P., Surface functionalized carbogenic quantum dots. *Small* 2008, 4, 455-458.
26. Gupta, A.; Sakthivel, T.; Seal, S., Recent development in 2D materials beyond graphene. *Prog Mater Sci* 2015, 73, 44-126.
27. Novoselov, K.; Fal'ko, V.; Colombo, L.; Gellert, P.; Schwab, M.; Kim, K., A roadmap for graphene. *Nature* 2012, 490, 192-200.
28. Ruoff, R., Graphene: calling all chemists. *Nat Nanotechnol* 2008, 3, 10-11.
29. Zhu, Y.; Murali, S.; Cai, W.; Li, X.; Suk, J.; Potts, J.; Ruoff, R., Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Adv Mater* 2010, 22, 3906-3924.
30. Park, S.; An, J.; Jung, I.; Piner, R. D.; An, S. J.; Li, X.; Velamakanni, A.; Ruoff, R. S., Colloidal suspensions of highly reduced graphene oxide in a wide variety of organic solvents. *Nano Lett* 2009, 9, 1593-1597.
31. Shih, C.; Lin, S.; Sharma, R.; Strano, M.; Blankschtein, D., Understanding the pH-Dependent Behavior of Graphene Oxide Aqueous Solutions: A Comparative

- Experimental and Molecular Dynamics Simulation Study. *Langmuir* 2012, 28, 235-241.
32. Li, F.; Jiang, X.; Zhao, J.; Zhang, S., Graphene oxide: A promising nanomaterial for energy and environmental applications. *Nano Energy* 2015, 16, 488-515.
 33. Nurunnabi, M.; Parvez, K.; Nafiujjaman, M.; Revuri, V.; Khan, H.; Feng, X.; Lee, Y., Bioapplication of graphene oxide derivatives: drug/gene delivery, imaging, polymeric modification, toxicology, therapeutics and challenges. *RSC Adv* 2015, 5, 42141-42161.
 34. Chung, C.; Kim, Y.; Shin, D.; Ryoo, S.; Hong, B.; Min, D., Biomedical Applications of Graphene and Graphene Oxide. *Acc Chem Res* 2013, 46, 2211-2224.
 35. Liao, L.; Peng, H.; Liu, Z., Chemistry makes graphene beyond graphene. *J Am Chem Soc* 2014, 136, 12194-200.
 36. Park, J.; Yan, M., Covalent functionalization of graphene with reactive intermediates. *Acc Chem Res* 2013, 46, 181-189.
 37. Eng, A.; Chua, C.; Pumera, M., Refinements to the structure of graphite oxide: absolute quantification of functional groups via selective labelling. *Nanoscale* 2015, 7, 20256-20266.
 38. Zbořil, R.; Karlický, F.; Bourlinos, A. B.; Steriotis, T. A.; Stubos, A. K.; Georgakilas, V.; Šafářová, K.; Jančík, D.; Trapalis, C.; Otyepka, M., Graphene fluoride: a stable stoichiometric graphene derivative and its chemical conversion to graphene. *Small* 2010, 6, 2885-2891.
 39. Karlicky, F.; Datta, K.; Otyepka, M.; Zboril, R., Halogenated Graphenes: Rapidly Growing Family of Graphene Derivatives. *ACS Nano* 2013, 7, 6434-6464.
 40. Cheng, L.; Wang, X.; Gong, F.; Liu, T.; Liu, Z., 2D Nanomaterials for Cancer Theranostic Applications. *Adv Mater* 2019, 32, 1902333.
 41. Xu, M.; Liang, T.; Shi, M.; Chen, H., Graphene-Like Two-Dimensional Materials. *Chem Rev* 2013, 113, 3766-3798.
 42. Chen, Y.; Tan, C.; Zhang, H.; Wang, L., Two-dimensional graphene analogues for biomedical applications. *Chem Soc Rev* 2015, 44, 2681-2701.
 43. Xu, X.; Ray, R.; Gu, Y.; Ploehn, H.; Gearheart, L.; Raker, K.; Scrivens, W., Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. *J Am Chem Soc* 2004, 126, 12736-12737.
 44. Li, H.; Kang, Z.; Liu, Y.; Lee, S., Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. *J Mater Chem* 2012, 22, 24230-24253.
 45. Roy, P.; Chen, P.; Periasamy, A.; Chen, Y.; Chang, H., Photoluminescent carbon nanodots: synthesis, physicochemical properties and analytical applications. *Mater Today* 2015, 18, 447-458.
 46. Baker, S.; Baker, G., Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights. *Angew Chem Int Ed* 2010, 49, 6726-6744.
 47. Tang, L.; Ji, R.; Cao, X.; Lin, J.; Jiang, H.; Li, X.; Teng, K.; Luk, C.; Zeng, S.; Hao, J.; Lau, S., Deep Ultraviolet Photoluminescence of Water-Soluble Self-Passivated Graphene Quantum Dots. *ACS Nano* 2012, 6, 5102-5110.
 48. Sun, Y.; Zhou, B.; Lin, Y.; Wang, W.; Fernando, K.; Pathak, P.; Mezziani, M.; Harruff, B.; Wang, X.; Wang, H.; Luo, P.; Yang, H.; Kose, M.; Chen, B.; Veca, L.; Xie, S., Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *J Am Chem Soc* 2006, 128, 7756-7757.

49. Tang, L.; Ji, R.; Li, X.; Bai, G.; Liu, C.; Hao, J.; Lin, J.; Jiang, H.; Teng, K.; Yang, Z.; Lau, S., Deep Ultraviolet to Near-Infrared Emission and Photoresponse in Layered N-Doped Graphene Quantum Dots. *ACS Nano* 2014, 8, 6312-6320.
50. Hola, K.; Sudolska, M.; Kalytchuk, S.; Nachtigallova, D.; Rogach, A.; Otyepka, M.; Zboril, R., Graphitic Nitrogen Triggers Red Fluorescence in Carbon Dots. *ACS Nano* 2017, 11, 12402-12410.
51. Ding, H.; Wei, J.; Zhang, P.; Zhou, Z.; Gao, Q.; Xiong, H., Solvent-Controlled Synthesis of Highly Luminescent Carbon Dots with a Wide Color Gamut and Narrowed Emission Peak Widths. *Small* 2018, 14, 1800612.
52. Wang, K.; Gao, Z.; Gao, G.; Wo, Y.; Wang, Y.; Shen, G.; Cui, D., Systematic safety evaluation on photoluminescent carbon dots. *Nanoscale Res Lett* 2013, 8, 122.
53. Su, W.; Wu, H.; Xu, H.; Zhang, Y.; Li, Y.; Li, X.; Fan, L., Carbon dots: a booming material for biomedical applications. *Mater Chem Front* 2020, 4, 821-836.
54. Ding, H.; Zhou, X.; Wei, J.; Li, X.; Qin, B.; Chen, X.; Xiong, H., Carbon dots with red/near-infrared emissions and their intrinsic merits for biomedical applications. *Carbon* 2020, 167, 322-344.
55. Song, Y.; Zhu, S.; Yang, B., Bioimaging based on fluorescent carbon dots. *RSC Adv* 2014, 4, 27184-27200.
56. Zheng, X.; Ananthanarayanan, A.; Luo, K.; Chen, P., Glowing Graphene Quantum Dots and Carbon Dots: Properties, Syntheses, and Biological Applications. *Small* 2015, 11, 1620-1636.
57. Song, Y.; Yan, X.; Li, Z.; Qu, L.; Zhu, C.; Ye, R.; Li, S.; Du, D.; Lin, Y., Highly photoluminescent carbon dots derived from linseed and their applications in cellular imaging and sensing. *J Mater Chem B* 2018, 6, 3181-3187.
58. Peng, J.; Gao, W.; Gupta, B.; Liu, Z.; Romero-Aburto, R.; Ge, L.; Song, L.; Alemany, L.; Zhan, X.; Gao, G.; Vithayathil, S.; Kaiparettu, B.; Marti, A.; Hayashi, T.; Zhu, J.; Ajayan, P., Graphene Quantum Dots Derived from Carbon Fibers. *Nano Lett* 2012, 12, 844-849.
59. Tan, X.; Li, Y.; Li, X.; Zhou, S.; Fan, L.; Yang, S., Electrochemical synthesis of small-sized red fluorescent graphene quantum dots as a bioimaging platform. *Chem Comm* 2015, 51, 2544-2546.
60. Zhang, M.; Bai, L.; Shang, W.; Xie, W.; Ma, H.; Fu, Y.; Fang, D.; Sun, H.; Fan, L.; Han, M.; Liu, C.; Yang, S., Facile synthesis of water-soluble, highly fluorescent graphene quantum dots as a robust biological label for stem cells. *J Mater Chem* 2012, 22, 7461-7467.
61. Shang, W.; Zhang, X.; Zhang, M.; Fan, Z.; Sun, Y.; Han, M.; Fan, L., The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells. *Nanoscale* 2014, 6, 5799-5806.
62. Ding, H.; Wei, J.; Zhong, N.; Gao, Q.; Xiong, H., Highly Efficient Red-Emitting Carbon Dots with Gram-Scale Yield for Bioimaging. *Langmuir* 2017, 33, 12635-12642.
63. Liu, J.; Geng, Y.; Li, D.; Yao, H.; Huo, Z.; Li, Y.; Zhang, K.; Zhu, S.; Wei, H.; Xu, W.; Jiang, J.; Yang, B., Deep Red Emissive Carbonized Polymer Dots with Unprecedented Narrow Full Width at Half Maximum. *Adv Mater* 2020, 32, 1906641.
64. Li, H.; Yan, X.; Kong, D.; Jin, R.; Sun, C.; Du, D.; Lin, Y.; Lu, G., Recent advances in carbon dots for bioimaging applications. *Nanoscale Horiz* 2020, 5, 218-234.

65. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 2000, 65, 271-284.
66. Chen, B.; Liu, M.; Huang, C., Recent advances of carbon dots in imaging-guided theranostics. *Trends Anal Chem* 2021, 134, 116116.
67. Jia, Q.; Ge, J.; Liu, W.; Zheng, X.; Chen, S.; Wen, Y.; Zhang, H.; Wang, P., A Magnetofluorescent Carbon Dot Assembly as an Acidic H₂O₂-Driven Oxygenerator to Regulate Tumor Hypoxia for Simultaneous Bimodal Imaging and Enhanced Photodynamic Therapy. *Adv Mater* 2018, 30, 1706090.
68. Ge, J.; Jia, Q.; Liu, W.; Lan, M.; Zhou, B.; Guo, L.; Zhou, H.; Zhang, H.; Wang, Y.; Gu, Y.; Meng, X.; Wang, P., Carbon Dots with Intrinsic Theranostic Properties for Bioimaging, Red-Light-Triggered Photodynamic/Photothermal Simultaneous Therapy In Vitro and In Vivo. *Adv Healthc Mater* 2016, 5, 665-675.
69. Zheng, D.; Li, B.; Li, C.; Fan, J.; Lei, Q.; Li, C.; Xu, Z.; Zhang, X., Carbon-Dot-Decorated Carbon Nitride Nanoparticles for Enhanced Photodynamic Therapy against Hypoxic Tumor via Water Splitting. *ACS Nano* 2016, 10, 8715-8722.
70. Bao, X.; Yuan, Y.; Chen, J.; Zhang, B.; Li, D.; Zhou, D.; Jing, P.; Xu, G.; Wang, Y.; Hala, K.; Shen, D.; Wu, C.; Song, L.; Liu, C.; Zboril, R.; Qu, S., In vivo theranostics with near-infrared-emitting carbon dots-highly efficient photothermal therapy based on passive targeting after intravenous administration. *Light Sci Appl* 2018, 7, 91.
71. Ge, J.; Jia, Q.; Liu, W.; Guo, L.; Liu, Q.; Lan, M.; Zhang, H.; Meng, X.; Wang, P., Red-Emissive Carbon Dots for Fluorescent, Photoacoustic, and Thermal Theranostics in Living Mice. *Adv Mater* 2015, 27, 4169-4177.
72. Zhang, X.; Xie, X.; Wang, H.; Zhang, J.; Pan, B.; Xie, Y., Enhanced Photoresponsive Ultrathin Graphitic-Phase C₃N₄ Nanosheets for Bioimaging. *J Am Chem Soc* 2013, 135, 18-21.
73. Xu, D.; Lin, Q.; Chang, H., Recent Advances and Sensing Applications of Carbon Dots. *Small Methods* 2020, 4, 1900387.
74. Dhenadhayalan, N.; Lin, K.; Saleh, T., Recent Advances in Functionalized Carbon Dots toward the Design of Efficient Materials for Sensing and Catalysis Applications. *Small* 2020, 16, 1905767.
75. Wang, A.; Wang, C.; Fu, L.; Wong-Ng, W.; Lan, Y., Recent Advances of Graphitic Carbon Nitride-Based Structures and Applications in Catalyst, Sensing, Imaging, and LEDs. *Nano-Micro Lett* 2017, 9, 47.
76. Ghosal, K.; Sarkar, K., Biomedical Applications of Graphene Nanomaterials and Beyond. *ACS Biomater Sci Eng* 2018, 4, 2653-2703.
77. Liu, Z.; Robinson, J. T.; Sun, X.; Dai, H., PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. *J Am Chem Soc* 2008, 130, 10876-10877.
78. Tadyszak, K.; Wychowaniec, J. K.; Litowczenko, J., Biomedical Applications of Graphene-Based Structures. *Nanomaterials* 2018, 8, 944.
79. Song, M.; Giovannucci, E., Cancer risk: Many factors contribute. *Science* 2015, 347, 728-729.
80. Zuchowska, A.; Chudy, M.; Dybko, A.; Brzozka, Z., Graphene as a new material in anticancer therapy-in vitro studies. *Sens Actuators B Chem* 2017, 243, 152-165.
81. Barahuie, F.; Saifullah, B.; Dorniani, D.; Fakurazi, S.; Karthivashan, G.; Hussein, M.; Elfghi, F., Graphene oxide as a nanocarrier for controlled release and targeted

- delivery of an anticancer active agent, chlorogenic acid. *Mater Sci Eng C* 2017, 74, 177-185.
82. Rao, Z.; Ge, H.; Liu, L.; Zhu, C.; Min, L.; Liu, M.; Fan, L.; Li, D., Carboxymethyl cellulose modified graphene oxide as pH-sensitive drug delivery system. *Int J Biol Macromol* 2018, 107, 1184-1192.
 83. Zhang, L.; Xia, J.; Zhao, Q.; Liu, L.; Zhang, Z., Functional Graphene Oxide as a Nanocarrier for Controlled Loading and Targeted Delivery of Mixed Anticancer Drugs. *Small* 2010, 6, 537-544.
 84. Han, Z.; Huang, L.; Qu, H.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Rong, Q.; Sang, Z.; Wang, Y.; Kipper, M.; Tang, J., A review of performance improvement strategies for graphene oxide-based and graphene-based membranes in water treatment. *J Mater Sci* 2021, 56, 9545-9574.
 85. Wang, S.; Li, X.; Liu, Y.; Zhang, C.; Tan, X.; Zeng, G.; Song, B.; Jiang, L., Nitrogen-containing amino compounds functionalized graphene oxide: Synthesis, characterization and application for the removal of pollutants from wastewater: A review. *J Hazard Mater* 2018, 342, 177-191.
 86. Zhao, G.; Li, J.; Ren, X.; Chen, C.; Wang, X., Few-Layered Graphene Oxide Nanosheets As Superior Sorbents for Heavy Metal Ion Pollution Management. *Environ Sci Technol* 2011, 45, 10454-10462.
 87. Liu, L.; Liu, S.; Zhang, Q.; Li, C.; Bao, C.; Liu, X.; Xiao, P., Adsorption of Au(III), Pd(II), and Pt(IV) from Aqueous Solution onto Graphene Oxide. *J Chem Eng Data* 2013, 58, 209-216.
 88. Zhao, G.; Ren, X.; Gao, X.; Tan, X.; Li, J.; Chen, C.; Huang, Y.; Wang, X., Removal of Pb(II) ions from aqueous solutions on few-layered graphene oxide nanosheets. *Dalton Trans* 2011, 40, 10945-10952.
 89. Zhang, C.; Wu, L.; Cai, D.; Zhang, C.; Wang, N.; Zhang, J.; Wu, Z., Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Fluoranthene and Anthracenemethanol) by Functional Graphene Oxide and Removal by pH and Temperature-Sensitive Coagulation. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013, 5, 4783-4790.
 90. Konicki, W.; Aleksandrak, M.; Moszynski, D.; Mijowska, E., Adsorption of anionic azo-dyes from aqueous solutions onto graphene oxide: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *J Colloid Interface Sci* 2017, 496, 188-200.
 91. Coello-Fiallos, D.; Cazzanelli, E.; Tavolaro, A.; Tavolaro, P.; Arias, M.; Caputi, L., Cresyl Violet Adsorption on Sonicated Graphite Oxide. *J Nanosci Nanotechnol* 2018, 18, 3006-3011.
 92. Zhao, Y.; Zhao, D.; Chen, C.; Wang, X., Enhanced photo-reduction and removal of Cr(VI) on reduced graphene oxide decorated with TiO₂ nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 2013, 405, 211-217.
 93. Ma, H.; Zhang, Y.; Hu, Q.; Yan, D.; Yu, Z.; Zhai, M., Chemical reduction and removal of Cr(VI) from acidic aqueous solution by ethylenediamine-reduced graphene oxide. *J Mater Chem* 2012, 22, 5914-5916.
 94. Shi, P.; Dai, X.; Zheng, H.; Li, D.; Yao, W.; Hu, C., Synergistic catalysis of Co₃O₄ and graphene oxide on Co₃O₄/GO catalysts for degradation of Orange II in water by advanced oxidation technology based on sulfate radicals. *Chem Eng J* 2014, 240, 264-270.
 95. Zhang, Z.; Hao, J.; Yang, W.; Lu, B.; Ke, X.; Zhang, B.; Tang, J., Porous Co₃O₄ Nanorods-Reduced Graphene Oxide with Intrinsic Peroxidase-Like Activity and Catalysis in the Degradation of Methylene Blue. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013, 5, 3809-3815.

96. Sangermano, M.; Calza, P.; Lopez-Manchado, M., Graphene oxide-epoxy hybrid material as innovative photocatalyst. *J Mater Sci* 2013, 48, 5204-5208.
97. Tang, Y.; Luo, S.; Teng, Y.; Liu, C.; Xu, X.; Zhang, X.; Chen, L., Efficient removal of herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid from water using Ag/reduced graphene oxide co-decorated TiO₂ nanotube arrays. *J Hazard Mater* 2012, 241, 323-330.
98. Wang, P., Emerging investigator series: the rise of nano-enabled photothermal materials for water evaporation and clean water production by sunlight. *Environ Sci Nano* 2018, 5, 1078-1089.
99. Werber, J.; Osuji, C.; Elimelech, M., Materials for next-generation desalination and water purification membranes. *Nat Rev Mater* 2016, 1, 16018.
100. Li, X.; Zhu, B.; Zhu, J., Graphene oxide based materials for desalination. *Carbon* 2019, 146, 320-328.
101. Hu, X.; Xu, W.; Zhou, L.; Tan, Y.; Wang, Y.; Zhu, S.; Zhu, J., Tailoring Graphene Oxide-Based Aerogels for Efficient Solar Steam Generation under One Sun. *Adv Mater* 2017, 29, 1604031.
102. Finnerty, C.; Zhang, L.; Sedlak, D.; Nelson, K.; Mi, B., Synthetic Graphene Oxide Leaf for Solar Desalination with Zero Liquid Discharge. *Environ Sci Technol* 2017, 51, 11701-11709.
103. Li, Y.; Gao, T.; Yang, Z.; Chen, C.; Kuang, Y.; Song, J.; Jia, C.; Hitz, E.; Yang, B.; Hu, L., Graphene oxide-based evaporator with one-dimensional water transport enabling high-efficiency solar desalination. *Nano Energy* 2017, 41, 201-209.
104. Li, Y.; Gao, T.; Yang, Z.; Chen, C.; Luo, W.; Song, J.; Hitz, E.; Jia, C.; Zhou, Y.; Liu, B.; Yang, B.; Hu, L., 3D-Printed, All-in-One Evaporator for High-Efficiency Solar Steam Generation under 1 Sun Illumination. *Adv Mater* 2017, 29, 1700981.
105. Li, X.; Lin, R.; Ni, G.; Xu, N.; Hu, X.; Zhu, B.; Lv, G.; Li, J.; Zhu, S.; Zhu, J., Three-dimensional artificial transpiration for efficient solar waste-water treatment. *Natl Sci Rev* 2018, 5, 70-77.
106. Joshi, R.; Carbone, P.; Wang, F.; Kravets, V.; Su, Y.; Grigorieva, I.; Wu, H.; Geim, A.; Nair, R., Precise and Ultrafast Molecular Sieving Through Graphene Oxide Membranes. *Science* 2014, 343, 752-754.
107. Mi, B., Graphene Oxide Membranes for Ionic and Molecular Sieving. *Science* 2014, 343, 740-742.
108. Huang, H.; Song, Z.; Wei, N.; Shi, L.; Mao, Y.; Ying, Y.; Sun, L.; Xu, Z.; Peng, X., Ultrafast viscous water flow through nanostrand-channelled graphene oxide membranes. *Nat Commun* 2013, 4, 2979.
109. Chen, L.; Shi, G.; Shen, J.; Peng, B.; Zhang, B.; Wang, Y.; Bian, F.; Wang, J.; Li, D.; Qian, Z.; Xu, G.; Liu, G.; Zeng, J.; Zhang, L.; Yang, Y.; Zhou, G.; Wu, M.; Jin, W.; Li, J.; Fang, H., Ion sieving in graphene oxide membranes via cationic control of interlayer spacing. *Nature* 2017, 550, 415-418.
110. Morelos-Gomez, A.; Cruz-Silva, R.; Muramatsu, H.; Ortiz-Medina, J.; Araki, T.; Fukuyo, T.; Tejima, S.; Takeuchi, K.; Hayashi, T.; Terrones, M.; Endo, M., Effective NaCl and dye rejection of hybrid graphene oxide/graphene layered membranes. *Nat Nanotechnol* 2017, 12, 1083-1088.
111. Yuan, Y.; Gao, X.; Wei, Y.; Wang, X.; Wang, J.; Zhang, Y.; Gao, C., Enhanced desalination performance of carboxyl functionalized graphene oxide nanofiltration membranes. *Desalination* 2017, 405, 29-39.

112. Wang, L.; Boutilier, M.; Kidambi, P.; Jang, D.; Hadjiconstantinou, N.; Karnik, R., Fundamental transport mechanisms, fabrication and potential applications of nanoporous atomically thin membranes. *Nat Nanotechnol* 2017, 12, 509-522.
113. Bourlinos, A. B.; Zbořil, R.; Petr, J.; Bakandritsos, A.; Krysmann, M.; Giannelis, E. P., Luminescent Surface Quaternized Carbon Dots. *Chem Mater* 2012, 24, 6-8.
114. Svoboda, L.; Praus, P.; Lima, M.; Sampaio, M.; Matysek, D.; Ritz, M.; Dvorsky, R.; Faria, J.; Silva, C., Graphitic carbon nitride nanosheets as highly efficient photocatalysts for phenol degradation under high-power visible LED irradiation. *Mater Res Bull* 2018, 100, 322-332.
115. Chng, E.; Pumera, M., The Toxicity of Graphene Oxides: Dependence on the Oxidative Methods Used. *Chem Eur J* 2013, 19, 8227-8235.
116. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72, 248-54.
117. ISO 8692: Water quality -- Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. 2012.
118. ISO 6341: Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). 2012.
119. ISO 14380: Water quality — Determination of the acute toxicity to *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea, Anostraca). 2011.
120. ISO 14371: Water quality — Determination of fresh water sediment toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda). 2012.
121. OECD, Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test, OECD Publishing: Paris, 2006.
122. ČSN EN ISO 20079, Czech Technical Standard (75 7745): Water quality – Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test. Czech version of the European Standard EN ISO 20079:2006, Czech Standards Institute (2007)
123. Krewski, D.; Acosta, D.; Andersen, M.; Anderson, H.; Bailar, J.; Boekelheide, K.; Brent, R.; Charnley, G.; Cheung, V.; Green, S.; Kelsey, K.; Kerkvliet, N.; Li, A.; McCray, L.; Meyer, O.; Patterson, R.; Pennie, W.; Scala, R.; Solomon, G.; Stephens, M.; Yager, J.; Zeise, L.; Assess, S. C. T. T.; Assess, S. C. T. T., Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2010, 13, 51-138.
124. Andersen, M.; Krewski, D., Toxicity Testing in the 21st Century: Bringing the Vision to Life. *Toxicol Sci* 2009, 107, 324-330.
125. Kumar, S.; Geiger, H., HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. *Trends Mol Med* 2017, 23, 799-819.
126. Vining, K. H.; Mooney, D. J., Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017, 18, 728-742.
127. Kircher, M. F.; Gambhir, S. S.; Grimm, J., Noninvasive cell-tracking methods. *Nat Rev Clin Oncol* 2011, 8, 677-688.
128. Yang, S. T.; Wang, X.; Wang, H.; Lu, F.; Luo, P. G.; Cao, L.; Mezziani, M. J.; Liu, J. H.; Liu, Y.; Chen, M.; Huang, Y.; Sun, Y. P., Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents. *J Phys Chem C* 2009, 113, 18110-18114.
129. Chen, N.; He, Y.; Su, Y.; Li, X.; Huang, Q.; Wang, H.; Zhang, X.; Tai, R.; Fan, C., The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials* 2012, 33, 1238-1244.

130. Lutolf, M. P.; Gilbert, P. M.; Blau, H. M., Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature* 2009, 462, 433-41.
131. Fröhlich, E., The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2012, 7, 5577-5591.
132. Shao, D.; Lu, M.; Xu, D.; Zheng, X.; Pan, Y.; Song, Y.; Xu, J.; Li, M.; Zhang, M.; Li, J.; Chi, G.; Chen, L.; Yang, B., Carbon dots for tracking and promoting the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomater Sci* 2017, 5, 1820-1827.
133. Yan, J.; Hou, S.; Yu, Y.; Qiao, Y.; Xiao, T.; Mei, Y.; Zhang, Z.; Wang, B.; Huang, C.; Liu, C.; Suo, G., The effect of surface charge on the cytotoxicity and uptake of carbon quantum dots in human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B* 2018, 171, 241-249.
134. Das, A.; Roy, D.; Mandal, M.; Jaiswal, C.; Ta, M.; Mandal, P. K., Carbon Dot with pH Independent Near-Unity Photoluminescence Quantum Yield in an Aqueous Medium: Electrostatics-Induced Förster Resonance Energy Transfer at Submicromolar Concentration. *J Phys Chem Lett* 2018, 9, 5092-5099.
135. Geng, H.; Qiu, J.; Zhu, H.; Liu, X., Achieving stem cell imaging and osteogenic differentiation by using nitrogen doped graphene quantum dots. *J Mater Sci: Mater Med* 2018, 29, 85.
136. Basu, A., DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int J Mol Sci* 2018, 19, 970.
137. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, 8, 315-317.
138. Romeo, D.; Salieri, B.; Hischer, R.; Nowack, B.; Wick, P., An integrated pathway based on in vitro data for the human hazard assessment of nanomaterials. *Environ Int* 2020, 137, 105505.
139. Guadagnini, R.; Halamoda Kenzaoui, B.; Walker, L.; Pojana, G.; Magdolenova, Z.; Bilanicova, D.; Saunders, M.; Juillerat-Jeanneret, L.; Marcomini, A.; Huk, A.; Dusinska, M.; Fjellsbø, L. M.; Marano, F.; Boland, S., Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology* 2015, 9, 13-24.
140. Ong, K.; MacCormack, T.; Clark, R.; Ede, J.; Ortega, V.; Felix, L.; Dang, M.; Ma, G.; Fenniri, H.; Veinot, J.; Goss, G., Widespread Nanoparticle-Assay Interference: Implications for Nanotoxicity Testing. *PloS One* 2014, 9, e90650.
141. Wright, P.; Qin, H.; Choi, M.; Chiu, N.; Jia, Z., Carbon nanodots interference with lactate dehydrogenase assay in human monocyte THP-1 cells. *Springerplus* 2014, 3, 615.
142. Casey, A.; Herzog, E.; Davoren, M.; Lyng, F. M.; Byrne, H. J.; Chambers, G., Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon* 2007, 45, 1425-1432.
143. Monteiro-Riviere, N.; Inman, A., Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. *Carbon* 2006, 44, 1070-1078.
144. Worle-Knirsch, J. M.; Pulskamp, K.; Krug, H. F., Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett* 2006, 6, 1261-1268.
145. Holder, A.; Goth-Goldstein, R.; Lucas, D.; Koshland, C., Particle-Induced Artifacts in the MTT and LDH Viability Assays. *Chem Res Toxicol* 2012, 25, 1885-1892.

146. Belyanskaya, L.; Manser, P.; Spohn, P.; Bruinink, A.; Wick, P., The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction. *Carbon* 2007, 45, 2643-2648.
147. Bakke, A., The principles of flow cytometry. *Lab Med* 2001, 32, 207-211.
148. Bohmer, N.; Rippl, A.; May, S.; Walter, A.; Heo, M.; Kwak, M.; Roesslein, M.; Song, N.; Wick, P.; Hirsch, C., Interference of engineered nanomaterials in flow cytometry: A case study. *Colloids Surf B* 2018, 172, 635-645.
149. Svoboda, L.; Skuta, R.; Matejka, V.; Dvorsky, R.; Matysek, D.; Henych, J.; Mancik, P.; Praus, P., Graphene oxide and graphitic carbon nitride nanocomposites assembled by electrostatic attraction forces: Synthesis and characterization. *Mater Chem Phys* 2019, 228, 228-236.
150. Monopoli, M.; Aberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K., Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol* 2012, 7, 779-786.
151. Patil, S.; Sandberg, A.; Heckert, E.; Self, W.; Seal, S., Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* 2007, 28, 4600-4607.
152. Walkey, C.; Chan, W., Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev* 2012, 41, 2780-2799.
153. Zhu, Y.; Ji, H.; Cheng, H.-M.; Ruoff, R. S., Mass production and industrial applications of graphene materials. *Natl Sci Rev* 2018, 5, 90-101.
154. Lanphere, J.; Rogers, B.; Luth, C.; Bolster, C.; Walker, S., Stability and Transport of Graphene Oxide Nanoparticles in Groundwater and Surface Water. *Environ Eng Sci* 2014, 31, 350-359.
155. Lu, K.; Dong, S.; Petersen, E.; Niu, J.; Chang, X.; Wang, P.; Lin, S.; Gao, S.; Mao, L., Biological Uptake, Distribution, and Depuration of Radio-Labeled Graphene in Adult Zebrafish: Effects of Graphene Size and Natural Organic Matter. *ACS Nano* 2017, 11, 2872-2885.
156. Mao, L.; Liu, C.; Lu, K.; Su, Y.; Gu, C.; Huang, Q.; Petersen, E. J., Exposure of few layer graphene to *Limnodrilus hoffmeisteri* modifies the graphene and changes its bioaccumulation by other organisms. *Carbon* 2016, 109, 566-574.
157. Hofmann, U.; König, E., Untersuchungen über Graphitoxyd. *Z Anorg Allg Chem* 1937, 234, 311-336.
158. Hummers, W.; Offeman, R., Preparation of graphitic oxide. *J Am Chem Soc* 1958, 80, 1339-1339.
159. Marcano, D.; Kosynkin, D.; Berlin, J.; Sinitskii, A.; Sun, Z.; Slesarev, A.; Alemany, L.; Lu, W.; Tour, J., Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano* 2010, 4, 4806-4814.
160. Mermoux, M.; Chabre, Y.; Rousseau, A., FTIR and ¹³C NMR study of graphite oxide. *Carbon* 1991, 29, 469-474.
161. Lin-Vien, D.; Colthup, N.; Fateley, W.; Grasselli, J., *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. 1st ed.; 1991; p 503.
162. Chua, C.; Sofer, Z.; Pumera, M., Graphite Oxides: Effects of Permanganate and Chlorate Oxidants on the Oxygen Composition. *Chem Eur J* 2012, 18, 13453-13459.
163. Brodie, J.; Chan, C.; De Clerck, O.; Cock, J.; Coelho, S.; Gachon, C.; Grossman, A.; Mock, T.; Raven, J.; Smith, A.; Yoon, H.; Bhattacharya, D., The Algal Revolution. *Trends Plant Sci* 2017, 22, 726-738.

164. Falkowski, P. G.; Katz, M. E.; Knoll, A. H.; Quigg, A.; Raven, J. A.; Schofield, O.; Taylor, F. J., The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 2004, 305, 354-360.
165. Liu, S.; Zeng, T. H.; Hofmann, M.; Burcombe, E.; Wei, J.; Jiang, R.; Kong, J.; Chen, Y., Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress. *ACS Nano* 2011, 5, 6971-6980.
166. Nogueira, P. F.; Nakabayashi, D.; Zucolotto, V., The effects of graphene oxide on green algae *Raphidocelis subcapitata*. *Aquat Toxicol* 2015, 166, 29-35.
167. Zhao, J.; Cao, X.; Wang, Z.; Dai, Y.; Xing, B., Mechanistic understanding toward the toxicity of graphene-family materials to freshwater algae. *Water Res* 2017, 111, 18-27.
168. Hu, X.; Ouyang, S.; Mu, L.; An, J.; Zhou, Q., Effects of Graphene Oxide and Oxidized Carbon Nanotubes on the Cellular Division, Microstructure, Uptake, Oxidative Stress, and Metabolic Profiles. *Environ Sci Technol* 2015, 49, 10825-10833.
169. Hu, X.; Lu, K.; Mu, L.; Kang, J.; Zhou, Q., Interactions between graphene oxide and plant cells: Regulation of cell morphology, uptake, organelle damage, oxidative effects and metabolic disorders. *Carbon* 2014, 80, 665-676.
170. Du, S.; Zhang, P.; Zhang, R.; Lu, Q.; Liu, L.; Bao, X.; Liu, H., Reduced graphene oxide induces cytotoxicity and inhibits photosynthetic performance of the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Chemosphere* 2016, 164, 499-507.
171. Monici, M., Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev* 2005, 11, 227-256.
172. da Silva Ferreira, V.; Sant'Anna, C., Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World J Microbiol Biotechnol* 2017, 33, 20.
173. Klimova, K.; Pumera, M.; Luxa, J.; Jankovsky, O.; Sedmidubsky, D.; Matejkova, S.; Sofer, Z., Graphene Oxide Sorption Capacity toward Elements over the Whole Periodic Table: A Comparative Study. *J Phys Chem C* 2016, 120, 24203-24212.
174. Schwab, F.; Bucheli, T. D.; Lukhele, L. P.; Magrez, A.; Nowack, B.; Sigg, L.; Knauer, K., Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? *Environ Sci Technol* 2011, 45, 6136-6144.
175. Ebert, D., *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology: 2005.
176. Martens, K.; Schon, I.; Meisch, C.; Horne, D., Global diversity of ostracods (Ostracoda, Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* 2008, 595, 185-193.
177. Schmit, O.; Rossetti, G.; Vandekerkhove, J.; Mezquita, F., Food selection in *Eucypris virens* (Crustacea : Ostracoda) under experimental conditions. *Hydrobiologia* 2007, 585, 135-140.
178. Adema, D., *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia* 1978, 59, 125-134.
179. Liu, S.; Cui, M.; Li, X.; Thuyet, D. Q.; Fan, W., Effects of hydrophobicity of titanium dioxide nanoparticles and exposure scenarios on copper uptake and toxicity in *Daphnia magna*. *Water Res* 2019, 154, 162-170.
180. Blinova, I.; Lukjanova, A.; Muna, M.; Vija, H.; Kahru, A., Evaluation of the potential hazard of lanthanides to freshwater microcrustaceans. *Sci Total Environ* 2018, 642, 1100-1107.

181. Tarczynska, M.; Nalecz-Jawecki, G.; Romanowska-Duda, Z.; Sawicki, J.; Beattie, K.; Codd, G.; Zalewski, M., Tests for the toxicity assessment of cyanobacterial bloom samples. *Environ Toxicol* 2001, 16, 383-390.
182. Hamdi, H.; Manusadzianas, L.; Aoyama, I.; Jedidi, N., Effects of anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene spiking and sewage sludge compost amendment on soil ecotoxicity during a bioremediation process. *Chemosphere* 2006, 65, 1153-1162.
183. Manzo, S.; De Nicola, F.; De Luca Picione, F.; Maisto, G.; Alfani, A., Assessment of the effects of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests. *Chemosphere* 2008, 71, 1937-1944.
184. Heinlaan, M.; Ivask, A.; Blinova, I.; Dubourguier, H.; Kahru, A., Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 2008, 71, 1308-1316.
185. Kong, L.; Zepp, R. G., Production and consumption of reactive oxygen species by fullerenes. *Environ Toxicol Chem* 2012, 31, 136-143.
186. Zhao, F. F.; Wang, S. C.; Zhu, Z. L.; Wang, S. G.; Liu, F. F.; Liu, G. Z., Effects of oxidation degree on photo-transformation and the resulting toxicity of graphene oxide in aqueous environment. *Environ Pollut* 2019, 249, 1106-1114.
187. Lv, X.; Yang, Y.; Tao, Y.; Jiang, Y.; Chen, B.; Zhu, X.; Cai, Z.; Li, B., A mechanism study on toxicity of graphene oxide to *Daphnia magna*: Direct link between bioaccumulation and oxidative stress. *Environ Pollut* 2018, 234, 953-959.
188. Fridovich, I., Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995, 64, 97-112.
189. Gebicka, L.; Krych-Madej, J., The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *J Inorg Biochem* 2019, 197, 110699.
190. Goodwin, D.; Adeleye, A.; Sung, L.; Ho, K.; Burgess, R.; Petersen, E., Detection and Quantification of Graphene-Family Nanomaterials in the Environment. *Environ Sci Technol* 2018, 52, 4491-4513.
191. Castro, V. L.; Clemente, Z.; Jonsson, C.; Silva, M.; Vallim, J. H.; de Medeiros, A. M. Z.; Martinez, D. S. T., Nanoecotoxicity assessment of graphene oxide and its relationship with humic acid. *Environ Toxicol Chem* 2018, 37, 1998-2012.
192. Hu, C.; Liu, L.; Li, X.; Xu, Y.; Ge, Z.; Zhao, Y., Effect of graphene oxide on copper stress in *Lemna minor* L.: evaluating growth, biochemical responses, and nutrient uptake. *J Hazard Mater* 2018, 341, 168-176.
193. Yang, L.; Chen, Y.; Shi, L.; Yu, J.; Yao, J.; Sun, J.; Zhao, L.; Sun, J., Enhanced Cd accumulation by Graphene oxide (GO) under Cd stress in duckweed. *Aquat Toxicol* 2020, 229, 105579.
194. Begum, P.; Ikhtari, R.; Fugetsu, B., Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce. *Carbon* 2011, 49, 3907-3919.
195. Carniel, F.; Fortuna, L.; Nepi, M.; Cai, G.; Del Casino, C.; Adami, G.; Bramini, M.; Bosi, S.; Flahaut, E.; Martin, C.; Vazquez, E.; Prato, M.; Tretiach, M., Beyond graphene oxide acidity: Novel insights into graphene related materials effects on the sexual reproduction of seed plants. *J Hazard Mater* 2020, 393, 122380.
196. Gupta, C.; Prakash, D., Duckweed: an effective tool for phyto-remediation. *Toxicol Environ Chem* 2013, 95, 1256-1266.

197. Ekperusi, A.; Sikoki, F.; Nwachukwu, E., Application of common duckweed (*Lemna minor*) in phytoremediation of chemicals in the environment: State and future perspective. *Chemosphere* 2019, 223, 285-309.
198. Kitajima, M.; Butler, W., Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim Biophys Acta* 1975, 376, 105-115.
199. Maxwell, K.; Johnson, G., Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot* 2000, 51, 659-668.
200. Ritchie, G., Chlorophyll fluorescence: What is it and what do the numbers mean? *National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations* 2005 2006, 43, 34-43.
201. Cui, Y.; Zhao, N., Oxidative stress and change in plant metabolism of maize (*Zea mays* L.) growing in contaminated soil with elemental sulfur and toxic effect of zinc. *Plant Soil Environ* 2011, 57, 34-39.
202. Kachout, S.; Ben Mansoura, A.; Leclerc, J.; Mechergui, R.; Rejeb, M.; Ouerghi, Z., Effects of heavy metals on antioxidant activities of *Atriplex hortensis* and *A. rosea*. *J Food Agric Environ* 2009, 7, 938-945.
203. Xue, Y.; Wang, J.; Huang, J.; Li, F.; Wang, M., The Response of Duckweed (*Lemna minor* L.) Roots to Cd and Its Chemical Forms. *J Chem* 2018, 2018, 7274020.

8. Seznam příloh

Příloha A

Malina, T.; Polakova, K.; Skopalik, J.; Milotova, V.; Hola, K.; Havrdova, M.; Tomankova, K.; Cmiel, V.; Sefc, L.; Zboril, R. 2019. Carbon dots for in vivo fluorescence imaging of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Carbon*, 152, 434-443.

Příloha B

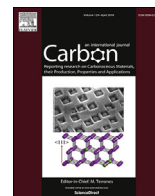
Malina, T.; Polakova, K.; Hirsch, C.; Svoboda, L.; Zboril, R. 2021. Toxicity of Carbon Nanomaterials—Towards Reliable Viability Assessment via New Approach in Flow Cytometry. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 7750.

Příloha C

Malina, T.; Marsalkova, E.; Hola, K.; Tucek, J.; Scheibe, M.; Zboril, R. and Marsalek, B. 2019. Toxicity of graphene oxide against algae and cyanobacteria: Nanoblade-morphology-induced mechanical injury and self-protection mechanism. *Carbon* 155, 386-396.

Příloha D

Malina, T.; Marsalkova, E.; Hola, K.; Zboril, R. and Marsalek, B. 2020. The environmental fate of graphene oxide in aquatic environment-Complete mitigation of its acute toxicity to planktonic and benthic crustaceans by algae. *Journal of Hazardous Materials*, 399, 123027.



Carbon dots for *in vivo* fluorescence imaging of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells



Tomáš Malina^a, Kateřina Poláková^{a, **}, Josef Skopalík^b, Věra Milotová^c, Kateřina Holá^a, Markéta Havrdová^a, Kateřina Bartoň Tománková^d, Vratislav Čmiel^b, Luděk Šefc^c, Radek Zbořil^{a, *}

^a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. Listopadu 12, 77146, Olomouc, Czech Republic

^b Department of Biomedical Engineering, Faculty of Electrical Engineering and Communication, Brno University of Technology, Technická 3082/12, 61600, Brno, Czech Republic

^c Center for Advanced Preclinical Imaging (CAPI), First Faculty of Medicine, Charles University, Salmovská 3, 12000, Praha 2, Czech Republic

^d Department of Medical Biophysics, Faculty of Medicine and Dentistry, Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacký University Olomouc, Hněvotínská 3, 77515, Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2019

Received in revised form

29 April 2019

Accepted 22 May 2019

Available online 23 May 2019

Keywords:

Carbon dots

Stem cell tracking

Cytotoxicity

In vitro and *in vivo* optical imaging

Photoluminescence

ABSTRACT

Tissue regeneration based on stem cell therapy is one of the most rapidly developing fields of modern medicine. Several properties of human mesenchymal stromal cells (MSCs), such as tropism toward a tumor or injury site, make them promising candidates for regenerative medicine, targeted therapy, or treating injured tissues. However, to fully understand the role of stem cells in therapeutic function, their visualization *in vivo* is essential. Here, we describe, for the first time, the use of biocompatible quaternized carbon dots (QCDs) as a novel stem-cell tracking probe for *in vivo* fluorescence imaging of transplanted human MSCs. By studying the *in vitro* cytotoxicity, intracellular distribution, and precise uptake mechanism, we showed that QCDs had a high biocompatibility and excellent fluorescence properties after 24 h incubation with MSCs. Further to demonstrate the *in vivo* feasibility of the system, QCD-labeled MSCs (100 µg/mL of QCDs, 24 h incubation time) were transplanted subcutaneously into an immunodeficient mouse and visualized by optical *in vivo* imaging. The labeled cells were strongly fluorescent, allowing their semi-quantitative detection. Moreover, the homing of intravenously transplanted QCD-labeled MSCs into the solid tumor was clearly shown. The results demonstrated that QCD-labeling of human MSCs is a highly promising approach for *in vivo* tracking during stem cell therapy.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Regeneration based on stem cell delivery is one of the most promising approaches in current medicine. Stem cells interacting with a tissue microenvironment (niche) differentiate into required cell types, and thus contribute to healing and tissue formation [1,2].

Activation of cytokine production and extracellular matrix protein secretion may also contribute to the regeneration process [3]. Hematopoietic stem cell transplantation has been used as a stem cell therapy in routine clinical practice for decades [4]. Stem cell treatments for cardiology and neurology diseases, diabetes and other disorders have also been clinically tested [5]. Mesenchymal stromal cells (MSCs) are one of the most promising types of stem cells used in applications of regenerative medicine; they can be easily obtained from lipoaspirate and can differentiate in various tissues, including bone, cartilage, and fat [6]. Stem cells are either introduced directly into the target organ or, more often, infused intravenously. After their introduction, stem cells must find the target tissue, followed by homing, i.e., interaction with cellular components of their niches [7].

To understand how stem cells contribute to healing, detailed

* Corresponding author. Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Departments of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. listopadu 12, 77146, Olomouc, Czech Republic. .

** Corresponding author. Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Departments of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. listopadu 12, 77146, Olomouc, Czech Republic.

E-mail addresses: katerina.polakova@upol.cz (K. Poláková), radek.zboril@upol.cz (R. Zbořil).

knowledge of the homing process is important. This dynamic process can be revealed by the noninvasive *in vivo* visualization of stem cell accumulation. To date, there is no single imaging technique capable of observing all relevant aspects of stem cell therapy [8]. Several techniques for stem cell tracking, such as radionuclide imaging, magnetic resonance imaging (MRI), magnetic particle imaging (MPI), ultrasound, and optical imaging, are already being used in clinical practice, each with their own advantages and disadvantages [9,10]. Among these techniques, optical fluorescence imaging offers real-time tracking and excellent detection sensitivity with the ability to image and track stem cells at a cellular level [11]. On the other hand, background tissue fluorescence and photobleaching of fluorescent probes pose limitations when imaging stem cells. Compared with organic fluorophores or fluorescent proteins, metal chalcogenide-based quantum dots (QDs) show almost 100 times brighter fluorescence and 100 to 1000 times higher fluorescence stability against photobleaching [12]. Owing to these benefits, there have already been reports of using QDs for *in vitro* and *in vivo* stem cell imaging [13–15]. However, one of the major drawbacks of metal-containing quantum dots hampering their bioapplication is their cytotoxicity [16]. Thus, the development of novel non-toxic fluorescence imaging probes allowing stem cell tracking is highly desirable.

Carbon dots are a promising group of materials that exhibit superior biocompatibility compared to metal chalcogenide-based QDs [17]. The term carbon quantum dots (CDs) generally describes fluorescent small carbon nanoparticles (<10 nm) with a graphitic core modified with various surface functional groups depending on the synthetic route [18]. Whereas metal chalcogenide-based QDs reduce the viability of cells even at low concentrations (10 µg/mL) [19–21], CDs exhibit first significant toxic effects at concentrations at least 10 times higher, usually several times higher than the concentrations needed for potential biological applications (10–100 µg/mL) [22,23]. Furthermore, several studies have suggested that CDs cause lower or similar cytotoxic effects to polymers used as passivation agents (PEI, PEG, etc.) [24,25]. Importantly, the photoluminescence of CDs can be precisely tuned via the properties of the surface shell and suitable doping in the graphitic core [26,27].

Even though CDs exhibit extraordinary properties that make them suitable for potential use in regenerative medicine, there are only few papers reporting stem cell labeling by CDs. Shao et al. reported acid-based CDs showing biocompatibility in rat bone mesenchymal stem cells (rBMSCs) up to a concentration of 50 µg/mL of CDs [28]. At this concentration, the CDs also promoted osteogenic differentiation of the rBMSCs. Liu et al. reported on the selectivity of rat stem cells toward different CD surface functionalities compared to cancer cell lines [29]. In another study, the influence of the surface charge on the cytotoxicity and uptake of CDs into human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUCMSCs) was investigated [30]. Chen et al. combined two different imaging modalities and developed a multimodal nanoprobe comprising gadolinium CDs (Gd-CDs). They showed that Gd-CDs promoted the proliferation of stem cells by tracking them with fluorescence/magnetic resonance imaging [31]. Although CDs have already been used in stem cell research, to the best of our knowledge, no report has yet described use of CD-labeled stem cells for *in vivo* applications.

In this study, we showed for the first time, highly efficient *in vivo* imaging of MSCs by stable and water dispersible positively charged quaternized carbon dots (QCDs) together with complex analysis of the cytotoxicity, biodistribution, and mechanism of uptake of QCDs within the cells. *In vivo* migration and homing of intravenously administered QCD-labeled MSCs into a tumor of an immunodeficient mouse was proved. The results showed that QCDs may serve

as a suitable and biocompatible imaging probe for understanding the therapeutic mechanism of stem cells. Thus, we demonstrate the high application potential of CD-labeled MCS for *in vivo* tissue regeneration.

2. Materials and methods

2.1. Mesenchymal stromal cells (MSCs)

Human adipose tissue-derived MSCs were isolated from the fatty tissue of three healthy donors who had undergone cosmetic liposuction (one male, two females). Isolation of the MSCs was based on incubation of lipoaspirates with collagenase. MSCs were expanded in complete Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) medium supplemented with 5% platelet lysate and 1% penicillin for three weeks. Details of the isolation and incubation procedures are described in Supplement 1. Adipose tissue was obtained from healthy patients undergoing abdominal liposuction (collected waste tissue) after signature of written informed consent, which is in accordance with the Czech Republic law 372/2011 and Declaration of Helsinki.

2.2. Preparation and physical-chemical properties of QCDs

QCDs with a fluorescent surface were synthesized by thermal decomposition of the biocompatible low-cost precursors tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and betaine hydrochloride. Details of the synthesis are described in our previous study [32]. The synthesized nanoparticles were highly water dispersible and colloidal stable owing to the presence of quaternary ammonium groups on their surface. Their fluorescence was measured by laser scanning confocal microscopy (Leica TCS SP8 X, Leica Microsystems), whereas the size and shape of the QCDs were characterized by transmission electron microscopy (TEM, JEOL 2100 operating at 160 kV). Their size distribution was determined using ImageJ software and fitted a Gaussian distribution curve. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was performed using a PHI VersaProbe II (Physical Electronics) spectrometer equipped with an Al K α source (15 kV, 50 W). The spectra were referenced to the C 1s peak at 284.80 eV. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) was recorded on an iS5 Thermo Nicolet spectrometer using the Smart Orbit ZnSe ATR technique. The zeta potential and hydrodynamic size were recorded at neutral pH on a Zetasizer Nano Zs instrument (Malvern, UK).

2.3. *In vitro* cytotoxicity of QCDs

For *in vitro* tests, MSCs were seeded in 24-well plates (2×10^4 cells/well) to analyze viability and cell cycle or 96-well plates (5×10^3 cells/well) to analyze reactive oxygen species (ROS) and genotoxicity in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (low glucose) and cultivated overnight. The cells were then exposed to QCDs of various concentrations (50–400 µg/mL) for 24 h or longer.

2.3.1. Viability, reactive oxygen species (ROS), cell cycle, and genotoxicity analyses

Cell viability and cell cycle analyses were performed using a BD FACVerse flow cytometer (BD Biosciences, USA). Cell viability was measured after 24 h incubation with QCDs, the supernatant was removed and the cells were gently washed with phosphate-buffered saline (PBS) solution (0.1 M, pH 7.4). The cells were then detached with trypsin (0.25% in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Sigma-Aldrich) and resuspended in 300 µL of medium. Viability analysis of the treated cells was performed using a LIVE/

DEAD[®] viability/cytotoxicity kit (Thermo Fisher Scientific). The cells were incubated with 2 μ L of ethidium bromide (2 mM) and 2 μ L of calcein-AM (50 μ M), diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) for 30 min in the dark. Fluorescence signal was then measured on a flow cytometer (red: ex. 488/em. 700 nm, green: ex. 488/em. 527 nm). A red signal due to ethidium bromide revealed dead cells that had lost membrane integrity, whereas a green signal indicated live cells with active intracellular esterases that could catalyze the non-fluorescent calcein-AM to highly fluorescent green calcein.

A cell cycle analysis was performed using a DNA kit (BD Cycletest[™] Plus DNA kit, Becton Dickinson, USA) according to the BD protocol. The cell cycle was analyzed using ex. 488/em. 586 nm for detection of propidium iodide (PI).

Oxidative stress caused by QCDs was investigated using two different types of ROS analysis as published previously [17]. Firstly, MSCs were treated with 50–400 μ g/mL of QCDs and incubated for 24 h. Afterwards, 2 μ L of fluorescent ROS probe (general oxidative stress indicator CM-H2DCFDA, Thermo Fisher Scientific) pre-dissolved in DMSO was added to each well (final concentration 10 μ mol/L). The plate was placed in a CO₂ incubator for 45 min and the fluorescent signal was measured using an Infinite PRO M200 microplate reader (Tecan, Austria) with ex. 505/em. 529 nm. In parallel, the development of ROS was also observed in a ROS kinetic study, in which cultivated cells were treated with various concentrations of QCDs (50, 100, 200, 300, and 400 μ g/mL), 2 μ L of ROS probe was added to each well immediately after the treatment and the amount of oxygen radicals was measured using a microplate reader after 45 min of incubation.

The comet assay was used in the same way as already reported [33]. Briefly, microscope slides were precoated with 1% HMP agarose. The cells were trypsinized, rinsed with DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS) and centrifuged (6 min, 1000 g). 85 μ L of 1% LMP agarose was added to the pellet, the cells were resuspended and 85 μ L of the cell suspension was placed on a microscope slide with agarose gel. The microscope slides were immersed in a lysis buffer for 1 h, then placed in a slide electrophoretic tank and dipped into a cool electrophoresis solution for 40 min. Electrophoresis was run at 0.8 V/cm and 380 mA for 20 min. After neutralization in buffer (0.4 M Tris, pH = 7.5), the samples were stained with SYBR[®] Green and immediately scored using the SV Comet Score. All the measurements were performed at least in triplicate and the mean \pm standard deviation (SD) was calculated.

2.4. Uptake efficiency and distribution of QCDs within the cells

Visual determination of the cell uptake and incorporation of QCDs was performed on a IX70 optical fluorescent microscope (Olympus, Japan) using a U-MWG2 FILTER BLOCK (ex. 510–550 nm/em. \leq 590 nm). Before imaging, the cells were washed twice with PBS.

For detailed analysis of the intracellular distribution of QCDs, a Leica TCS SP8 X laser scanning confocal microscopy (Leica Microsystems) was used. The excitation beam of the confocal unit was vertically propagated (the objective was positioned under the bottom of the culture cup) and imaging data of fluorescence in a series of parallel *x-y* horizontal cross-sections (*z* stack) were collected (typical settings: *x-y* plane 500 \times 500 μ m, *z* distance between planes 5 μ m). A 3D overview was constructed using Leica LAS X software, which allowed selection of a zoom overview and visualization of cross-sections of cells at different sites and angles. As QCDs exhibit non-traditional and relatively wide peak fluorescence spectra, the effect of varying the wavelength of the excitation beam was tested over the range 430–630 nm (based on previously

tested excitation and emission spectral characteristics [32]). Based on this test, the excitation wavelength was set to 490, 530, or 630 nm for subsequent experiments. For better visualization of the QCDs distribution and orientation in the intracellular space, the cells were visualized using ActinGreen[™] 488 (Thermo Fisher Scientific, ex. 490 nm/em. 500–525 nm). A final 3D overview of the cells was prepared by combining time-independent scans on the green channel (actin visualization) and red channel (QCDs visualization). The signal of the cells after labeling was also compared to the signal from non-labeled cells to confirm their minimal autofluorescence. Furthermore, the co-localization of QCDs with lysosomes using Cell Navigator[™] Lysosomal Staining Kit (ABD Bioquest, USA) was performed.

2.5. *In vitro* and *in vivo* imaging of QCD-labeled MSCs

QCD-labeled MSCs were prepared as described above using a non-toxic labeling concentration of QCDs of 100 μ g/mL for 24 h. The cells were collected, then resuspended in amounts of 1.3, 2.6, 10, 27, 54 \times 10⁴ in microtubes, washed in PBS, and diluted in 100 μ L PBS.

The fluorescence intensity was measured on an Xtreme *In Vivo* Imaging System (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) using an excitation filter of 520 nm, emission filter of 600 nm, and acquisition time of 10 s. Bruker Molecular Imaging Software (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) was used for image processing. The correlation coefficient between the number of QCD-labeled MSCs and the fluorescence intensity was calculated with Fiji software [34].

Athymic immunodeficient nude (Nu/Nu) mice (CD-1-Foxn1^{nu}) bred under specific-pathogen-free (SPF) conditions in the animal facility of the Center for Experimental Biomodels, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague were used for all the animal experiments. Three mice were used per group and the experiment was repeated twice. The breeding core was purchased from Charles River, Germany. The mice were housed in a controlled environment (12 h light/dark cycles at 22 °C) with ad libitum access to water and a standard chow diet. The experiments were performed in accordance with the Act on the Protection of Animals Against Cruelty No. 246/1992 (latest amendment No. 359/2012) of the Czech Republic, which is fully compatible with the corresponding European Union directives.

Prior to imaging, the mice were anesthetized with 2% isoflurane (Aerrane, Baxter, UK) in air. QCD-labeled MSCs (2.6 \times 10⁵) in PBS (50 μ L) were then subcutaneously injected into the Nu/Nu mice. Fluorescence images and intensities of the mice were obtained using an Xtreme *In Vivo* Imaging System (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) with excitation filter of 520 nm, emission filter of 600 nm, and acquisition time of 10 s. The images were processed with Bruker Molecular Imaging Software.

2.6. Migration properties of QCD-labeled MSCs *in vitro* and *in vivo*

In vitro migration assays were carried out in a 24-well plate with Transwell permeable inserts and 8 μ m pore polycarbonate membranes (Corning Costar, Cambridge, MA, USA). MSC-CXCR4/Fluc2 cells at a density of 1 \times 10⁵ cells in 500 μ L of serum-free medium were placed in the upper chambers of the Transwell assembly. The lower chambers contained 2% FBS. After incubation at 37 °C under 5% CO₂ for 20 h, the upper surface of the membranes was scraped gently to remove non-migrating cells and washed with PBS. Then, the migrated cells on the lower surface of the membrane were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and stained with Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) for 10 min for visualization of the nucleus.

The number of migrating cells per one wide field was measured using a fluorescence microscope and the percentage of migrated cells was calculated.

The *in vivo* homing potential of QCD-labeled MSCs was checked after intravenously administering 2.6×10^5 cells into an immunodeficient Nu/Nu mouse bearing subcutaneous PaTu (human pancreatic adenocarcinoma tumor) cells. After 24 h, the mouse was anesthetized with 2% isoflurane (Aerrane, Baxter, UK) in air and its organs (tumor, spleen, kidney, and liver) were removed and fixed with 4% paraformaldehyde. The organs were imaged *ex vivo* using an Xtreme *In Vivo* Imaging System and then microsections of the tumor were examined by confocal microscopy using the same excitation/emission wavelengths (520/600 nm) as used for the *in vivo* studies. Microsections of tumor were additionally stained by hematoxylin and eosin (H&E).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of QCDs

The prepared particles exhibited typical excitation wavelength dependent emission [32]. However, only the red-shifted part of their fluorescence (Fig. 1A) with excitation at 490–520 nm and emission at 600 nm was used for their further *in vitro* and *in vivo* applications. The particles exhibited a very narrow particle size distribution of 2–4 nm according to TEM (Fig. 1B). The hydrodynamic size of the particles was established as 5 nm in water and 8 nm in physiological saline solution according to DLS measurements (Fig. S9). The high degree of colloidal stability and stability on physiological media is highly beneficial for any kind of *in vivo* experiments. XPS characterization revealed the presence of carbon

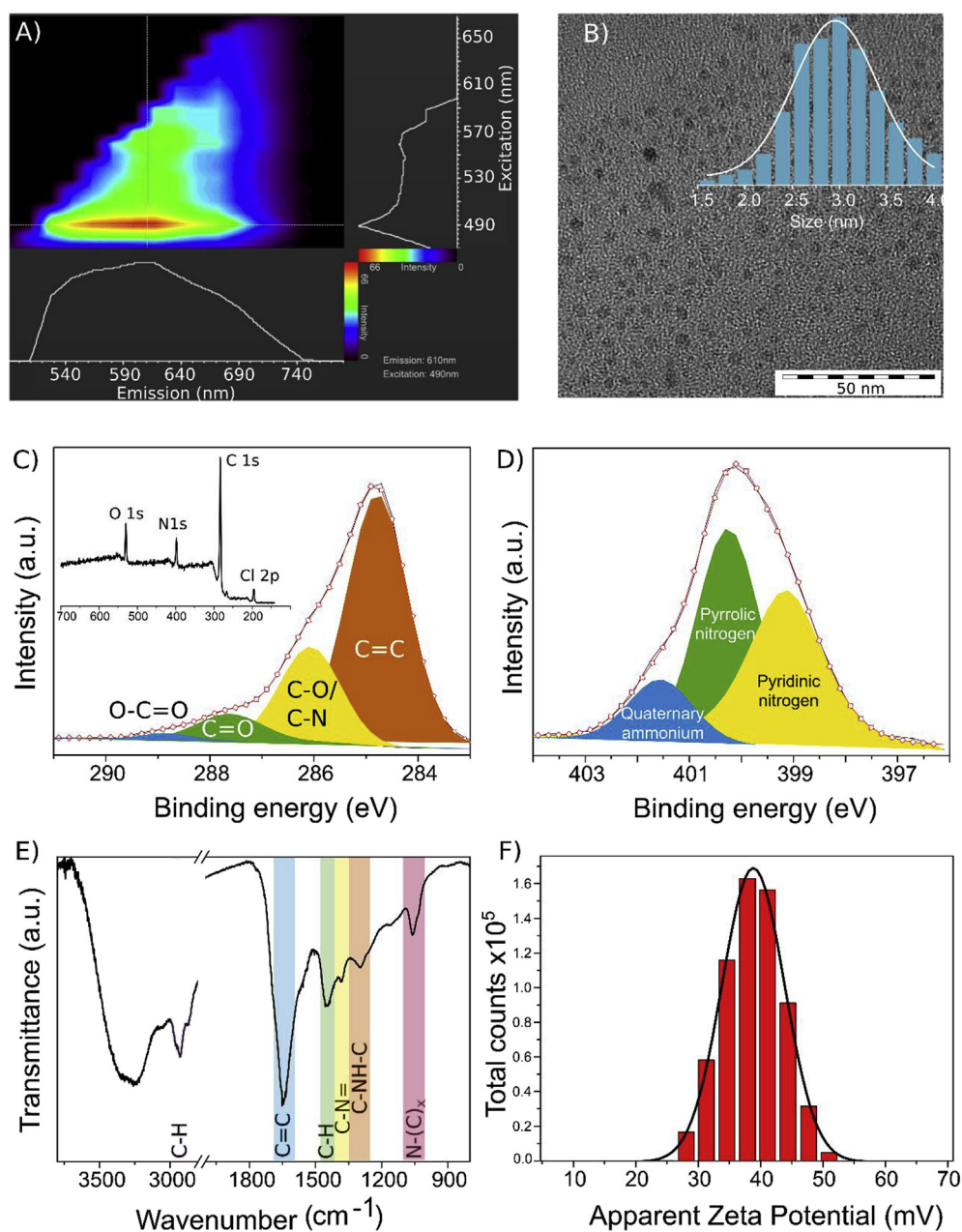


Fig. 1. (A) Excitation–emission color map of QCDs measured by confocal microscopy. (B) TEM image of QCDs with size distribution in the inset; the scale bar is 100 nm. (C) High resolution C 1s XPS spectrum of QCDs with survey XPS spectrum in the inset. (D) High resolution N 1s XPS spectrum. (E) Zeta potential of QCDs. (F) FT-IR spectrum of QCDs. (A colour version of this figure can be viewed online.)

(78.2%), oxygen (9.7%), nitrogen (9.2%), and residual amounts of ionic chlorine (2.9%) originating from the precursors (see Table S1). A high resolution C 1s XPS spectrum of the particles showed a high amount of C=C bonds located at 284.8 eV, indicating a very well carbonized core of the particles. C–O/C–N bonds, carbonyl and carboxyl groups were also present (Fig. 1C). A high resolution N 1s XPS spectrum (Fig. 1D) revealed the presence of pyrrolic and pyridinic nitrogen groups. Importantly, the characteristic peak for quaternary ammonium located at 401.5 eV was also significant [35]. FT-IR spectroscopy of the QCDs (Fig. 1E) showed similar results as the XPS characterization. There was a very strong peak at 1650 cm^{-1} typical for C=C bond vibrations of aromatic regions in the core of the particles. Characteristic C–H stretching and C–H bending vibrations at 2930 cm^{-1} and 1448 cm^{-1} , respectively, confirmed the presence of methyl groups of quaternary ammonium originating from the betaine precursor [36]. The peak at 1379 cm^{-1} was assigned to C–N=C vibration, which is often observed in samples of carbon nitride and corresponds to pyridinic nitrogen [36]. The peak at 1291 cm^{-1} was characteristic of an amide/lactame/pyrrolic nitrogen (O=C–NH–C stretching mode [36]. The last significant peak at 1058 cm^{-1} was assigned to a C–OH stretching mode. However, there was also strong overlap with the antisymmetric NC_3 stretching of quaternary ammonium [36]. The low amount of carboxyl groups (Fig. 1C) and high amount of surface quaternary ammonium resulted in a high positive surface charge, as reflected by the strong positive value of the zeta potential (Fig. 1F; +40 mV). The results clearly showed that the particles were very well carbonized and had quaternary ammonium (positively charged) groups on their surface.

3.2. *In vitro* cytotoxicity — ROS, viability, cell cycle, and comet assay

For the viability analysis, we used the LIVE/DEAD cytotoxicity/viability kit because the classical MTT test (metabolic activity of esterases) is not recommended for establishing the viability of cells treated with carbon-based materials owing to potential false-positive or false-negative signals [37]. The percentage of live and

dead cells after 24 h MSCs incubation with QCDs (50, 100, 200, and $400\text{ }\mu\text{g/mL}$) was measured by flow cytometry and compared with control unlabeled cells (Fig. 2A). It was evident that the QCDs did not cause cytotoxicity even at the highest concentration tested ($400\text{ }\mu\text{g/mL}$), for which the percentage of live cells was higher than 90%. A high positive charge on nanoparticles has been linked to high toxic effects in all cell lines studied [38]. However, in our case, the QCDs did not appear to be cytotoxic because the largest decrease in viability of the MSCs was only about 10% in comparison with the control, showing better biocompatibility than stem cells treated with other CDs [28,30,39,40]. The data in Figs. S1–S3 and Fig. 5 also demonstrate that the MSCs treated with QCDs did not lose their ability to adhere, migrate, differentiate into typical cell types, and express specific surface markers of MSCs. These results verify the unchanged character of the MSCs; even after QCDs treatment, they met the standard criteria for MSCs set by The International Society of Cellular Therapy [41]. Moreover, unaffected secretion activity and paracrine immunomodulative activity were also confirmed by pilot tests (results not shown) and are subjects of ongoing study. It is well known that the survival rate of transplanted stem cells is usually very low [42]. Thus, the unchanged viability and character of the MSCs after treatment with QCDs are important for their potential application in regenerative medicine.

The effect of QCDs on ROS formation, i.e., production of hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot\text{HO}$), and superoxide (O_2^-), in the MSCs was determined after 45 min and 24 h of treatment with 25, 100, 200, 300, and $400\text{ }\mu\text{g/mL}$ of QCDs (Fig. 2C). Immediately after treatment for 45 min, a time- and dose-dependent increase in ROS was observed up to $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ of QCDs, reaching up to 2.2 times the ROS levels of the control. No further increase was registered at higher concentrations. After 24 h, a similar trend in ROS production was observed, with the QCDs concentration of $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ generating the highest ROS levels. However, after 24 h, ROS levels had increased to only 1.5 times those of the control. Therefore, the QCDs generated only negligible ROS levels in MSCs after treatment for 24 h, suggesting that they may even protect cells from oxidative stress and have antioxidant properties [43,44].

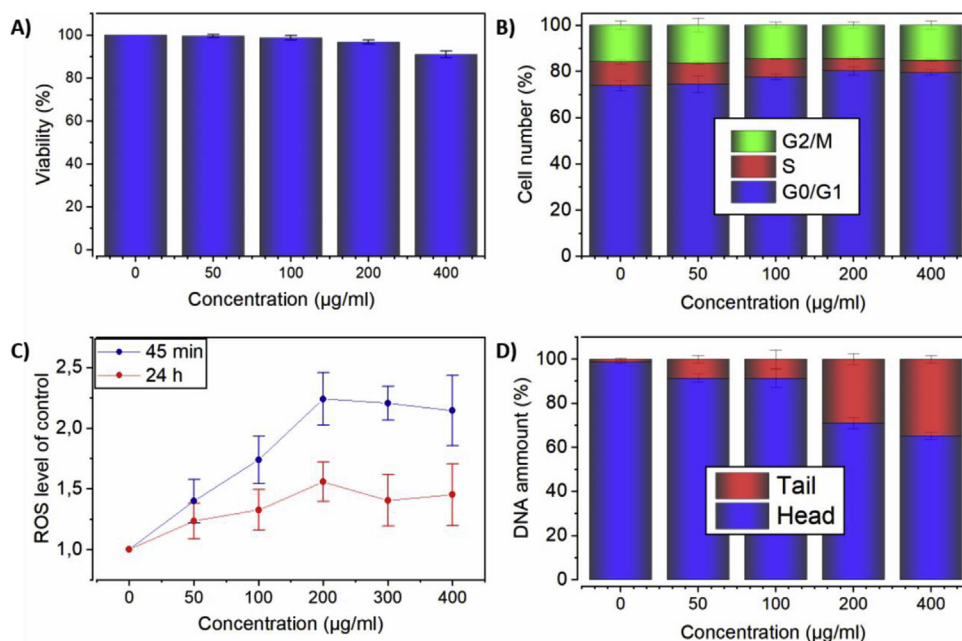


Fig. 2. Cell viability (A), cell cycle (B), ROS generation (C), and DNA fragmentation assay (D) after 24 h MSCs incubation with various concentrations of QCDs. (A colour version of this figure can be viewed online.)

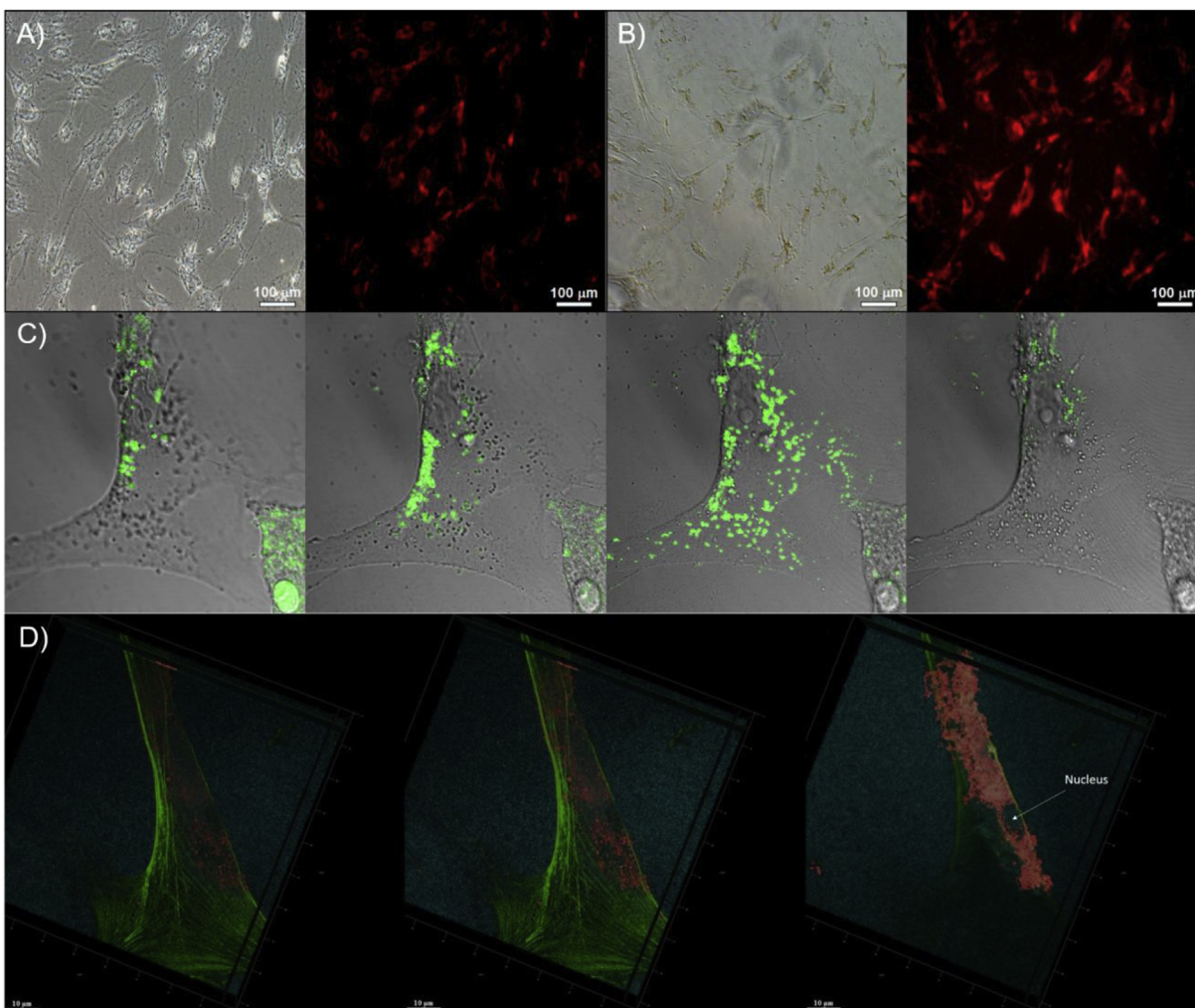


Fig. 3. Images of MSCs labeled with 100 µg/mL of QCDs after 4 h (A) and 24 h (B) incubation. Left - bright field images; Right - fluorescence images with filter U-MWG2 (ex. 510–550 nm/em. >590 nm) obtained using an Olympus IX70 microscope. Confocal microscopy scans of a representative mesenchymal stromal cell. (C) Bright field images overlain with fluorescent images of QCDs (ex./em. 488/590 nm) of four horizontal layers. (D) Dual fluorescence images of three horizontal layers showing localization of QCDs (ex. 490/em. 600–650 nm) within the cell and fibrin dyed with ActinGreen™ 488 (ex. 490/em. 500–525). (A colour version of this figure can be viewed online.)

For analysis of the QCDs effect on the cell cycle of MSCs, flow cytometry using PI DNA staining was used. Whereas concentrations of 50 and 100 µg/mL of QCDs caused no significant difference in the G_0/G_1 phase (74.43 and 77.57% compared with control untreated cells 73.88%), for concentrations of 200 and 400 µg/mL, the number of cells in the G_0/G_1 phase slightly increased (80.19 and 79.44%), mainly at the expense of the S phase (Fig. 2B). The slightly prolonged delay in the G_0/G_1 phase may reflect slower proliferation of the cells, i.e., they remained longer in G_1 in order to reach sufficient mass for doubling and entering the S phase or arresting the cells in the G_1 restriction point due to DNA damage [45,46].

The comet assay can be used for determination of genotoxicity. We tested the fragmentation of DNA after 24 h of treatment with QCDs. The percentage of DNA in the tail is depicted as histograms in Fig. 2D. The comet length started to increase significantly at concentrations of 200 and 400 µg/mL, where the damage of DNA in the tail was 28% and 35%, respectively. Thus, we concluded that care should be taken at high concentrations of QCDs. Even though the DNA damage was not high enough to decrease the viability of the MSCs, it may eventually lead to the mutagenesis and cancerous growth of cells [47]. The genotoxic effect of higher concentrations of QCDs may explain the accumulation of MSCs in the G_0/G_1 phase if

the cells were arrested in the G_1 restriction point.

It is well known that after interaction with negatively charged cellular membranes, positively charged nanoparticles are usually taken up and internalized into cells by a process called endocytosis [48]. In the case of our QCDs, we confirmed this by analyzing the fluorescence intensity of MSCs treated with QCDs incubated under different conditions. MSCs incubated at 4 °C and with depleted ATP, for which endocytosis is inhibited [49], showed a significant decrease in the fluorescence intensity (over 70%) in comparison with MSCs incubated at 37 °C (Fig. S5A). The uptake of nanoparticles was concentration dependent but only up to a QCDs concentration of 200 µg/mL. Higher concentrations caused only a negligible increase in the fluorescence intensity, implying that maximum saturation of the MSCs with QCDs had already occurred by 200 µg/mL (Fig. S4A). QCDs were detected in MSCs after 4 h incubation and the intensity of fluorescence increased to a maximum value after 24 h. With longer incubations (48 and 72 h), there was no further increase in fluorescence intensity, confirming that the MSCs were already fully saturated by QCDs (Fig. S4B). A study of exocytosis showed that the cells were able to get rid of the QCDs naturally over time as the fluorescence intensity of the QCDs significantly decreased after 72 h (Fig. S5B).

3.3. Uptake efficiency and distribution of QCDs within the cells

The intracellular distribution of 100 µg/mL of QCDs in MSCs was analyzed by fluorescent and confocal microscopy. Fluorescent microscopy showed red fluorescent clusters of QCDs, demonstrating the presence of QCDs inside the cells after 4 and 24 h incubation (Fig. 3A and B). We suggest that these clusters were contained within endosomes and their formation was a consequence of endocytosis. The distribution of the fluorescent clusters inside the MSCs cells was also checked by confocal microscopy. Images of four and three different horizontal layers (z stack optical cross-sections of cells) are depicted in Fig. 3C and D, respectively. The confocal microscopy scans and analysis of fluorescence intensity confirmed that the intracellular deposit of QCDs increased during the time period from 4 h to 24 h incubation. The fluorescence intensity of the clusters was more than 100 times higher than the autofluorescence of unlabeled cells. Moreover, in our labeling procedure, we only used bare CDs without a surface polymer, transfection agent, or cell-penetrating peptides that can enhance CDs internalization.

The confocal images also confirmed the long-time stability of the intracellular QCDs fluorescence after labeling during the testing period of 1–2 weeks by monitoring the intensity of fluorescence per µm² plan view for 50 randomly selected scans of cells using data sets from the image analysis of 3D confocal snapshots (Fig. S6). We observed the decrease in fluorescence intensity of QCDs inside the MSCs that correlated well with the rate of cell division. As another stability test, we examined the resistance of QCDs to photobleaching during long-time laser irradiation (Fig. S7). The results from independent samples showed that the average decrease in the red fluorescence of the QCDs in the “bleaching area” was negligible (4.2%).

An important issue when treating cells with nanomaterials is the possibility of penetration of small particles (<10 nm) into the cell nucleus. The presence of material inside the nucleus poses a risk of long-term distortion of the genome or proliferation [47]. Both the fluorescence and confocal microscopy images showed no penetration of 100 µg/mL of QCDs into the nucleus of MSCs. Instead,

97.4% of all QCDs positive pixels inside MSCs displayed co-localization with lysosome area (Fig. S10).

3.4. *In vitro* and *in vivo* imaging efficacy and homing potential of QCD-labeled MSCs toward a human pancreatic adenocarcinoma tumor (PaTu)

To examine whether MSCs labeled with 100 µg/mL of QCDs were optically visible and quantifiable, a series of samples with varying numbers of QCD-labeled MSCs (1.3×10^4 , 2.6×10^4 , 1×10^5 , 2.6×10^5 , and 5.4×10^5) were prepared and imaged by an Xtreme *In Vivo* Imaging System. The labeled cells were centrifuged in 1.5 mL microtubes and then quantitatively detected at high levels of fluorescence intensity (Fig. 4A). The relationship between fluorescence intensity and number of QCD-labeled MSCs was fitted using regression analysis (Fig. 4B). The results indicated that the fluorescent intensity of the QCD-labeled MSCs was sufficient for cell visualization by *in vivo* fluorescence imaging using at least 10^4 cells.

Before the *in vivo* testing, the hemolysis assay was performed to analyze the *in vivo* compatibility of QCDs. The 100 µg/mL of QCDs had the hemolysis rate at 2.9%, which was comparable with the negative control used (2.3%) (see Fig. S11). This result proved harmless interaction of QCDs with blood components and its suitability for *in vivo* testing. To assess whether transplanted QCD-labeled MSCs were able to be visualized in mice, we subcutaneously administered 2.6×10^5 MSCs to the hind limb of a mouse. The transplanted QCD-labeled MSCs were clearly detected by *in vivo* fluorescence imaging (Fig. 4C), confirming that it was possible to track the location of the QCD-labeled MSCs after transplantation. These results suggest that QCDs could be used to track stem cells in future investigations of regeneration medicine, e.g., in cutaneous wound healing processes.

In addition to the need for high fluorescence and viability of labeled stem cells, their non-affected migration capacity is another important requirement for applications in stem cell therapy. The homing potential of MSCs was first checked by an *in vitro* experiment before and after labeling them with 100 µg/mL QCDs for 24

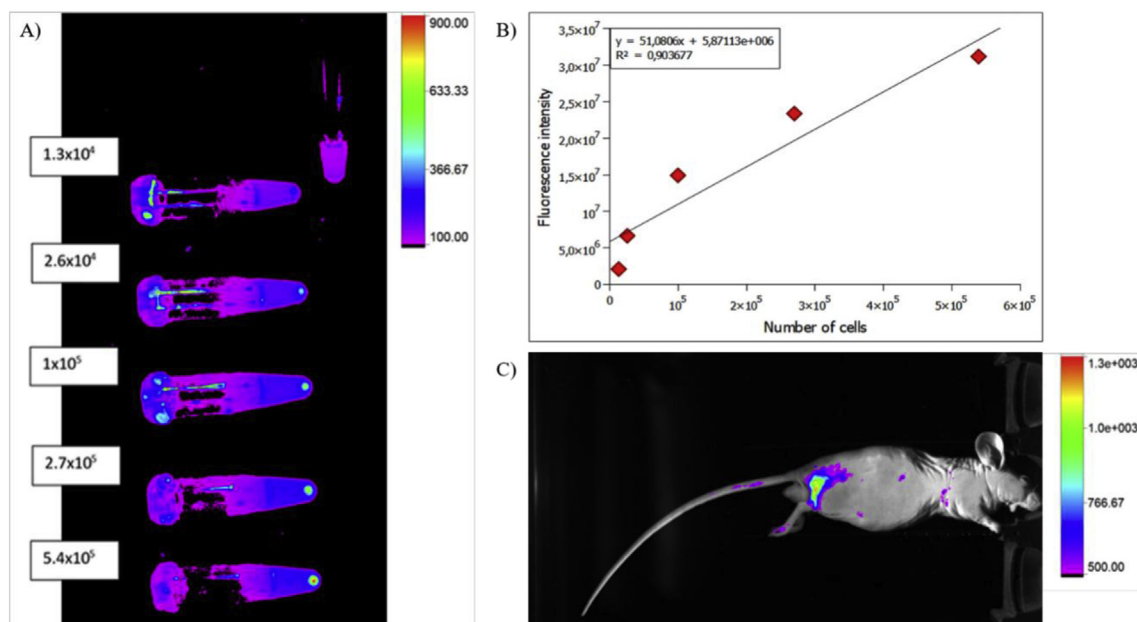


Fig. 4. (A) *In vitro* fluorescence imaging of different numbers of MSCs (1.3×10^4 , 2.6×10^4 , 1×10^5 , 2.7×10^5 , 5.4×10^5 cells) labeled with QCDs (100 µg/mL) and a plot of regression analysis (B) (ex. 520 nm/em. 600 nm). (C) *In vivo* fluorescence imaging of MSCs (2.6×10^5) labeled with QCDs (100 µg/mL) after subcutaneous transplantation into a mouse hind limb (ex. 520 nm/em. 600 nm). (A colour version of this figure can be viewed online.)

and 48 h. Confocal microscopy images from 50 fields of views were recorded. The results in Fig. 5A show that the transmigration potential and migration velocity of the QCD-labeled MSCs were almost unaffected compared with non-labeled MSCs.

To confirm that the homing potential of the QCD-labeled cells was not influenced under *in vivo* conditions, the targeting of stem cells into a tumor bearing mouse was analyzed. Twenty four hours after intravenous administration of 2.5×10^5 labeled cells through the tail vein (Fig. 6A), isolated organs (liver, kidney, spleen, and tumor) were removed and imaged *ex vivo* by an Xtreme *In Vivo* Imaging System. Compared to a control mouse with non-labeled MSCs, mainly the tumor and partially the liver in the mouse treated with the QCD-labeled MSCs were significantly more fluorescent (Fig. 6B). When microsections of the tumor were imaged by confocal microscopy, red fluorescent clusters representing the QCD-labeled MSCs were clearly detected (Fig. 5B). Furthermore, the confocal microscopy images of tumor after hematoxylin and eosin (H&E) staining also confirmed the presence of QCD-labeled MSCs inside tumor (Fig. 5C). These results confirm that the QCDs had no influence on the migration and homing of the MSCs into the pathologic area *in vivo* conditions. An unaffected homing potential and chemotaxis of MSCs after QCDs treatment are critically important for their potential use in tissue regeneration and cellular therapy. The targeting of MSCs to specific pathologies in the nearest tissue (chemotactic migration to wound and inflammation [50],

ischemic muscle region [51], and tumors [52]) is a normal process. Furthermore, transplanted stem cells may serve as a source for tissue-forming progenitors and also trigger tissue regeneration by endogenous cell recruitment. Tissues with a high endogenous regeneration activity show an increased rate of regeneration and formation of new tissue [53]. Monitoring the dynamic process of the migration and homing of the stem cells after their intravenous transplantation could aid understanding of their potential therapeutic use in the management of life-threatening diseases and treatment of cancer [54]. By using optical fluorescent imaging techniques, currently the most sensitive non-invasive techniques enabling cellular level resolution, and by using CDs as a biocompatible fluorescent marker for stem cells without the need for other supporting compounds, such as transfection agents or cell-penetrating fluorescent proteins, this work demonstrates a novel strategy for extending the knowledge of stem cell therapies.

4. Conclusions

For the first time we report use of carbon dots for safe *in vivo* application of adipose tissue-derived MSCs in tumor bearing mouse. We found that the QCDs were highly biocompatible even at the highest concentration tested (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Moreover, up to a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, QCDs did not cause any negative effect on the native function and behavior of the cells. Using the optimal

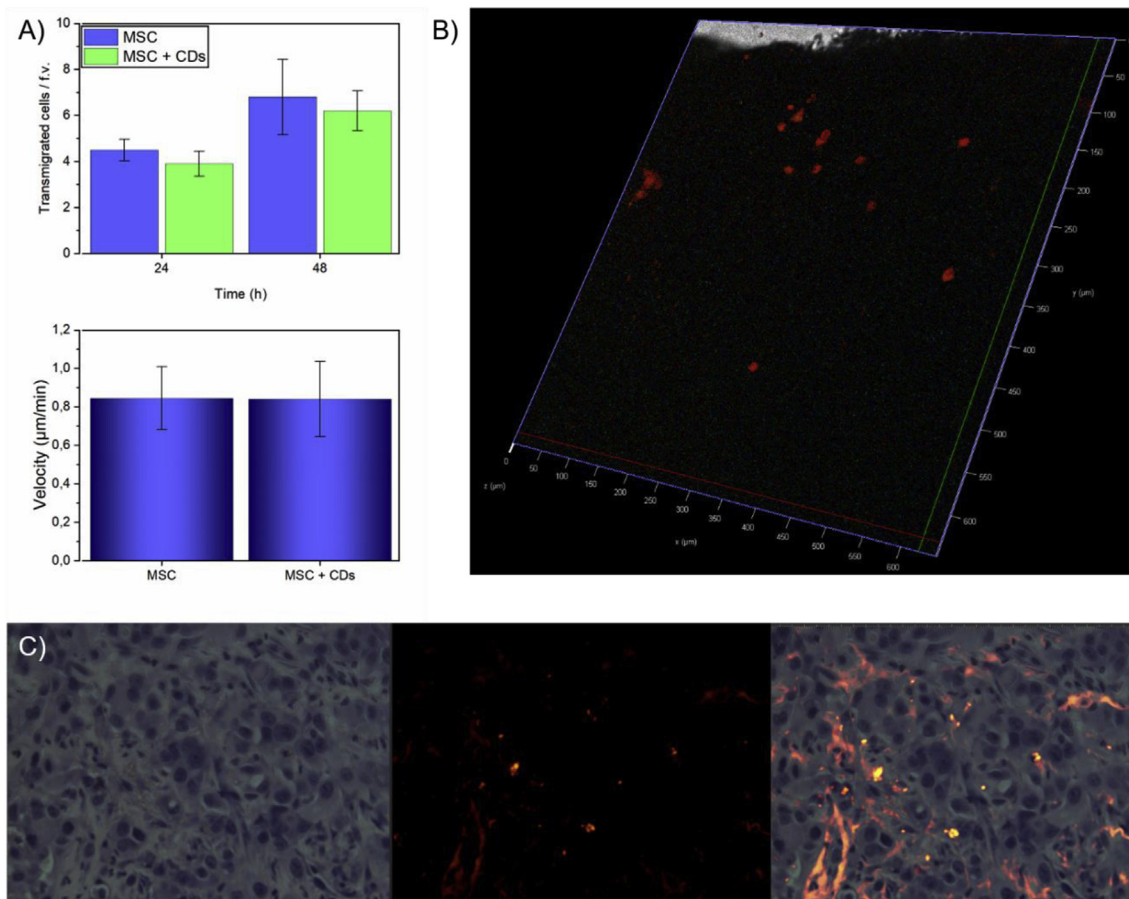


Fig. 5. (A) MSCs migration ability (top) and velocity (bottom) averaged from 50 fields of view. (B) Homing of cells into tumor tissue 24 h after cell transplantation. Transplanted cells (red circles) were visualized by fluorescence microscopy in a thin microsection of the tumor tissue (setup – ex. 520/em. 600 nm, further details on the animal experiment on the mouse are provided in the Materials and methods section). (C) Tumor tissue image after H&E staining (left), fluorescence image showing orange fluorescence spots of QCD-labeled MSCs (middle, setup – ex. 520/em. 560–640 nm) and merged image showing distribution of QCD-labeled MSCs in tumor (right). The tissue was fixed by 4% paraformaldehyde. (A colour version of this figure can be viewed online.)

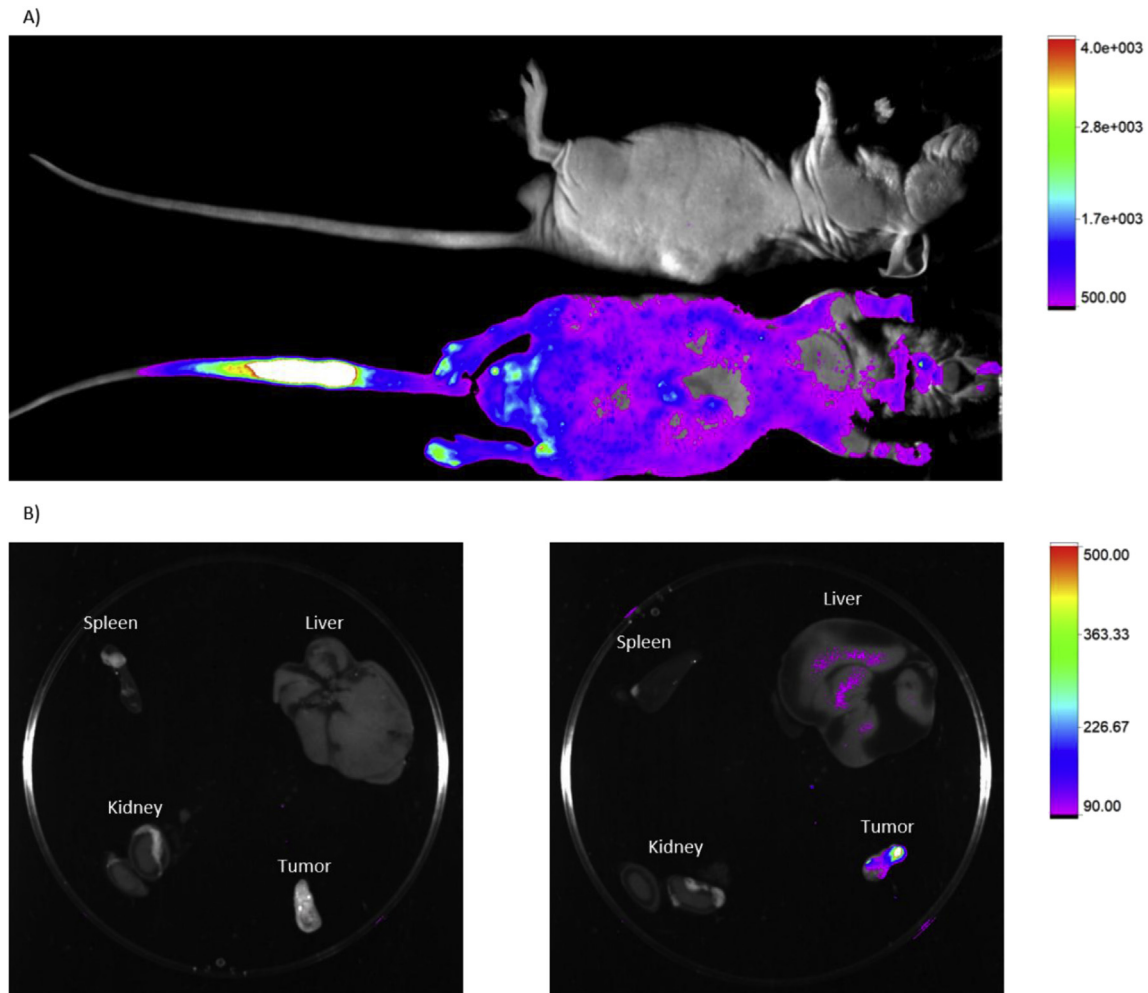


Fig. 6. Images acquired using an Xtreme *In Vivo* Imaging System after intravenous application of 10^5 MSCs to athymic immunodeficient nude (Nu/Nu) mice. (A) *In vivo* fluorescence imaging of control mouse with non-labeled MSCs (top) and mouse treated with MSCs labeled by QCDs (bottom). (B) *Ex vivo* fluorescent imaging of selected organs from the control mouse (left) and mouse treated with MSCs labeled by QCDs (right) after 24 h of transplantation. Note that the intensity of fluorescence is especially high in the tumor and partly in the liver of the mouse treated with QCD-labeled MSCs. (A colour version of this figure can be viewed online.)

non-toxic conditions (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of QCDs and 24 h incubation), QCDs were clearly visible inside MSCs and the standard migration character of MSCs was preserved. Strong fluorescence of QCD-labeled MSCs was detected first *in vitro* and then *in vivo* after subcutaneous administration of MSCs cells into a mouse hind limb. The unaffected chemotaxis capability of QCD-labeled MSCs administered intravenously into a tumor bearing mouse was also confirmed. Taken together, these results demonstrate that this type of positively charged QCDs, being highly water dispersible, uniform, stable, and biocompatible, represents a promising material for *in vivo* optical imaging and monitoring of MSCs used in regenerative medicine (e.g., in wound healing processes).

Declarations of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank Jana Jiravová for Comet assay preparation. The authors gratefully acknowledge support from the Czech-Bio-Imaging large RI project (LM2015062 funded by MEYS CR), project SVV 260 371/2017, project CZ.1.05/2.1.00/19.0377 of the Ministry of

Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Operational Programme Research, Development and Education - European Regional Development Fund, project CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000754 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, project NanoEnvi: Research Infrastructure NanoEnviCz, supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under Project No. LM2015073 and project IGA_PrF_2019_33 of the Internal Grant Agency of the Charles University in Prague. This work was also partially supported by the Czech Science Foundation GACR - project no. 18-240895.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.05.061>.

References

- [1] S. Kumar, H. Geiger, HSC niche biology and HSC expansion *ex vivo*, *Trends Mol. Med.* 23 (9) (2017) 799–819.
- [2] K.H. Vining, D.J. Mooney, Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (12) (2017) 728–742.
- [3] A.A. Karpov, D.V. Udalovala, M.G. Pliss, M.M. Galagudza, Can the outcomes of mesenchymal stem cell-based therapy for myocardial infarction be improved?

- Providing weapons and armour to cells, *Cell Prolif* 50 (2) (2017), e12316.
- [4] A. Gratwohl, D. Niederwieser, History of hematopoietic stem cell transplantation: evolution and perspectives, *Curr. Probl. Dermatol.* 43 (2012) 81–90.
- [5] Home Home - ClinicalTrials, gov, Available from: URL: <https://clinicaltrials.gov/>. (Accessed 15 November 2018).
- [6] R.M. Samsonraj, M. Raghunath, V. Nurcombe, J.H. Hui, A.J. van Wijnen, S.M. Cool, Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine, *Stem Cell. Transl. Med.* 6 (12) (2017) 2173–2185.
- [7] A. De Becker, I.V. Riet, Homing and migration of mesenchymal stromal cells: how to improve the efficacy of cell therapy? *World J. Stem Cell.* 8 (3) (2016) 73–87.
- [8] T. Schroeder, Imaging stem-cell-driven regeneration in mammals, *Nature* 453 (7193) (2008) 345–351.
- [9] A.V. Naumova, M. Modo, A. Moore, C.E. Murry, J.A. Frank, Clinical imaging in regenerative medicine, *Nat. Biotechnol.* 32 (8) (2014) 804–818.
- [10] P.K. Nguyen, J. Riegler, J.C. Wu, Stem cell imaging: from bench to bedside, *Cell Stem Cell.* 14 (4) (2014) 431–444.
- [11] M.F. Kircher, S.S. Gambhir, J. Grimm, Noninvasive cell-tracking methods, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8 (11) (2011) 677–688.
- [12] J. Jaiswal, S. Simon, Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging, *Trends Cell Biol.* 14 (9) (2004) 497–504.
- [13] H. Yukawa, Y. Baba, In vivo fluorescence imaging and the diagnosis of stem cells using quantum dots for regenerative medicine, *Anal. Chem.* 89 (5) (2017) 2671–2681.
- [14] H. Yukawa, M. Watanabe, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi, Y. Miyamoto, H. Noguchi, Y. Baba, S. Hayashi, Monitoring transplanted adipose tissue-derived stem cells combined with heparin in the liver by fluorescence imaging using quantum dots, *Biomaterials* 33 (7) (2012) 2177–2186.
- [15] H. Yukawa, Y. Kagami, M. Watanabe, K. Oishi, Y. Miyamoto, Y. Okamoto, M. Tokeshi, N. Kaji, H. Noguchi, K. Ono, M. Sawada, Y. Baba, N. Hamajima, S. Hayashi, Quantum dots labeling using octa-arginine peptides for imaging of adipose tissue-derived stem cells, *Biomaterials* 31 (14) (2010) 4094–4103.
- [16] N. Chen, Y. He, Y. Su, X. Li, Q. Huang, H. Wang, X. Zhang, R. Tai, C. Fan, The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots, *Biomaterials* 33 (5) (2012) 1238–1244.
- [17] M. Havrdova, K. Hola, J. Skopalik, K. Tomankova, M. Petr, K. Cepe, K. Polakova, J. Tucek, A.B. Bourlinos, R. Zboril, Toxicity of carbon dots – effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle, *Carbon* 99 (2016) 238–248.
- [18] K. Hola, Y. Zhang, Y. Wang, E. Giannelis, R. Zboril, A. Rogach, Carbon dots-emerging light emitters for bioimaging, cancer therapy and optoelectronics, *Nano Today* 9 (5) (2014) 590–603.
- [19] F. Kauffer, C. Merlin, L. Balan, R. Schneider, Incidence of the core composition on the stability, the ROS production and the toxicity of CdSe quantum dots, *J. Hazard Mater.* 268 (2014) 246–255.
- [20] B. Manshian, S. Soenen, A. Al-Ali, A. Brown, N. Hondow, J. Wills, G. Jenkins, S. Doak, Cell type-dependent changes in CdSe/ZnS quantum dot uptake and toxic endpoints, *Toxicol. Sci.* 144 (2) (2015) 246–258.
- [21] J. Liu, R. Hu, J. Liu, B. Zhang, Y. Wang, X. Liu, W. Law, L. Liu, L. Ye, K. Yong, Cytotoxicity assessment of functionalized CdSe, CdTe and InP quantum dots in two human cancer cell models, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 57 (2015) 222–231.
- [22] Y. Yang, J. Cui, M. Zheng, C. Hu, S. Tan, Y. Xiao, Q. Yang, Y. Liu, One-step synthesis of amino-functionalized fluorescent carbon nanoparticles by hydrothermal carbonization of chitosan, *Chem. Commun.* 48 (3) (2012) 380–382.
- [23] F. Du, L. Zhang, L. Zhang, M. Zhang, A. Gong, Y. Tan, J. Miao, Y. Gong, M. Sun, H. Ju, C. Wu, S. Zou, Engineered gadolinium-doped carbon dots for magnetic resonance imaging-guided radiotherapy of tumors, *Biomaterials* 121 (2017) 109–120.
- [24] S. Yang, X. Wang, H. Wang, F. Lu, P. Luo, L. Cao, M. Mezziani, J. Liu, Y. Liu, M. Chen, Y. Huang, Y. Sun, Carbon dots as nontoxic and high-performance fluorescence imaging agents, *J. Phys. Chem. C* 113 (42) (2009) 18110–18114.
- [25] H. Tao, K. Yang, Z. Ma, J. Wan, Y. Zhang, Z. Kang, Z. Liu, In vivo NIR fluorescence imaging, biodistribution, and toxicology of photoluminescent carbon dots produced from carbon nanotubes and graphite, *Small* 8 (2) (2012) 281–290.
- [26] K. Hola, A. Bourlinos, O. Kozak, K. Berka, K. Siskova, M. Havrdova, J. Tucek, K. Safarova, M. Otyepka, E. Giannelis, R. Zboril, Photoluminescence effects of graphitic core size and surface functional groups in carbon dots: COO-induced red-shift emission, *Carbon* 70 (2014) 279–286.
- [27] K. Hola, M. Sudolska, S. Kalytchuk, D. Nachtigallova, A. Rogach, M. Otyepka, R. Zboril, Graphitic nitrogen triggers red fluorescence in carbon dots, *ACS Nano* 11 (12) (2017) 12402–12410.
- [28] D. Shao, M. Lu, D. Xu, X. Zheng, Y. Pan, Y. Song, J. Xu, M. Li, M. Zhang, J. Li, G. Chi, L. Chen, B. Yang, Carbon dots for tracking and promoting the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Biomater. Sci.* 5 (9) (2017) 1820–1827.
- [29] J.H. Liu, L. Cao, G.E. LeCroy, P. Wang, M.J. Mezziani, Y. Dong, Y. Liu, P.G. Luo, Y.P. Sun, Carbon quantum dots for fluorescence labeling of cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (34) (2015) 19439–19445.
- [30] J. Yan, S. Hou, Y. Yu, Y. Qiao, T. Xiao, Y. Mei, Z. Zhang, B. Wang, C. Huang, C. Liu, G. Suo, The effect of surface charge on the cytotoxicity and uptake of carbon quantum dots in human umbilical cord derived mesenchymal stem cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 171 (2018) 241–249.
- [31] H. Chen, L. Wang, H. Fu, Z. Wang, Y. Xie, Z. Zhang, Y. Tang, Gadolinium functionalized carbon dots for fluorescence/magnetic resonance dual-modality imaging of mesenchymal stem cells, *J. Mater. Chem. B* 4 (46) (2016) 7472–7480.
- [32] A.B. Bourlinos, R. Zboril, J. Petr, A. Bakandritsos, M. Krysmann, E.P. Giannelis, Luminescent surface quaternized carbon dots, *Chem. Mater.* 24 (1) (2012) 6–8.
- [33] K. Tomankova, K. Kejlova, S. Binder, A. Daskova, J. Zapletalova, H. Bendova, H. Kolarova, D. Jirova, In vitro cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants, *Toxicol. Vitro* 25 (6) (2011) 1242–1250.
- [34] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods* 9 (7) (2012) 676–682.
- [35] G. Li, J. Pan, J. Han, C. Chen, J. Lu, L. Zhuang, Ultrathin composite membrane of alkaline polymer electrolyte for fuel cell applications, *J. Mater. Chem.* 1 (40) (2013) 12497–12502.
- [36] D. Lin-Vien, N. Colthup, W. Fateley, J. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, first ed., Academic Press, 1991.
- [37] J.M. Worle-Knirsk, K. Pulskamp, H.F. Krug, Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays, *Nano Lett.* 6 (6) (2006) 1261–1268.
- [38] E. Fröhlich, The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles, *Int. J. Nanomed.* 7 (2012) 5577–5591.
- [39] H. Geng, J. Qiu, H. Zhu, X. Liu, Achieving stem cell imaging and osteogenic differentiation by using nitrogen doped graphene quantum dots, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29 (6) (2018) 85.
- [40] A. Das, D. Roy, M. Mandal, C. Jaiswal, M. Ta, P.K. Mandal, Carbon dot with pH independent near-unity photoluminescence quantum yield in an aqueous medium: electrostatics-induced Förster resonance energy transfer at sub-micromolar concentration, *J. Phys. Chem. Lett.* 9 (17) (2018) 5092–5099.
- [41] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells, *Int. Soc. Cell. Ther. Position Statement Cytotherapy* 8 (4) (2006) 315–317.
- [42] M.P. Lutolf, P.M. Gilbert, H.M. Blau, Designing materials to direct stem-cell fate, *Nature* 462 (7272) (2009) 433–441.
- [43] Z. Xu, J. Lan, J. Jin, P. Dong, F. Jiang, Y. Liu, Highly photoluminescent nitrogen-doped carbon nanodots and their protective effects against oxidative stress on cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (51) (2015) 28346–28352.
- [44] I. Christensen, Y. Sun, P. Juzenas, Carbon dots as antioxidants and prooxidants, *J. Biomed. Nanotechnol.* 7 (5) (2011) 667–676.
- [45] D.A. Foster, P. Yellen, L. Xu, M. Saqena, Regulation of G1 cell cycle progression: distinguishing the restriction point from a nutrient-sensing cell growth checkpoint(s), *Genes Cancer* 1 (11) (2010) 1124–1131.
- [46] S.J. Elledge, Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis, *Science* 274 (5293) (1996) 1664–1672.
- [47] A. Basu, DNA damage, mutagenesis and cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (4) (2018) 970.
- [48] O. Harush-Frenkel, E. Rozenur, S. Benita, Y. Altschuler, Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells, *Biomacromolecules* 9 (2) (2008) 435–443.
- [49] N. Zhou, S. Zhu, S. Maharjan, Z. Hao, Y. Song, X. Zhao, Y. Jiang, B. Yang, L. Lu, Elucidating the endocytosis, intracellular trafficking, and exocytosis of carbon dots in neural cells, *RSC Adv.* 4 (107) (2014) 62086–62095.
- [50] A. Sohni, C.M. Verfaillie, Mesenchymal stem cells migration homing and tracking, *Stem Cell. Int.* 2013 (2013) 130763.
- [51] A. Cselenyak, E. Pankotai, E. Horvath, L. Kiss, Z. Lacza, Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections, *BMC Cell Biol.* 11 (2010) 29.
- [52] M. Matuskova, Z. Kozovska, L. Toro, E. Durinkova, S. Tyciakova, Z. Cierna, R. Bohovic, L. Kucerova, Combined enzyme/prodrug treatment by genetically engineered AT-MSC exerts synergy and inhibits growth of MDA-MB-231 induced lung metastases, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 34 (2015) 33.
- [53] F.M. Chen, L.A. Wu, M. Zhang, R. Zhang, H.H. Sun, Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: promises, strategies, and translational perspectives, *Biomaterials* 32 (12) (2011) 3189–3209.
- [54] D.J. Laird, U.H. von Andrian, A.J. Wagers, Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease, *Cell* 132 (4) (2008) 619–630.



Article

Toxicity of Carbon Nanomaterials—Towards Reliable Viability Assessment via New Approach in Flow Cytometry

Tomáš Malina ^{1,2,*} , Kateřina Poláková ^{1,*} , Cordula Hirsch ³, Ladislav Svoboda ^{4,5} and Radek Zbořil ^{1,4}

¹ Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Czech Advanced Technology and Research Institute (CATRIN), Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, 779 00 Olomouc, Czech Republic; radek.zboril@upol.cz

² Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. Listopadu 12/1192, 771 00 Olomouc, Czech Republic

³ Laboratory for Particles-Biology Interactions, Empa, Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology, Lerchenfeldstrasse 5, 9014 St. Gallen, Switzerland; cordula.hirsch@empa.ch

⁴ Nanotechnology Centre, Centre of Energy and Environmental Technologies, VŠB–Technical University of Ostrava, 17. Listopadu 15/2172, 708 00 Ostrava-Poruba, Czech Republic; ladislav.svoboda@vsb.cz

⁵ IT4Innovations National Supercomputing Center, VŠB–Technical University of Ostrava, 17. Listopadu 15/2172, 708 00 Ostrava, Czech Republic

* Correspondence: tomas.malina@upol.cz (T.M.); katerina.polakova@upol.cz (K.P.)

Abstract: The scope of application of carbon nanomaterials in biomedical, environmental and industrial fields is recently substantially increasing. Since in vitro toxicity testing is the first essential step for any commercial usage, it is crucial to have a reliable method to analyze the potentially harmful effects of carbon nanomaterials. Even though researchers already reported the interference of carbon nanomaterials with common toxicity assays, there is still, unfortunately, a large number of studies that neglect this fact. In this study, we investigated interference of four bio-promising carbon nanomaterials (graphene acid (GA), cyanographene (GCN), graphitic carbon nitride (g-C₃N₄) and carbon dots (QCDs)) in commonly used LIVE/DEAD assay. When a standard procedure was applied, materials caused various types of interference. While positively charged g-C₃N₄ and QCDs induced false results through the creation of free agglomerates and intrinsic fluorescence properties, negatively charged GA and GCN led to false signals due to the complex quenching effect of the fluorescent dye of a LIVE/DEAD kit. Thus, we developed a new approach using a specific gating strategy based on additional controls that successfully overcame all types of interference and lead to reliable results in LIVE/DEAD assay. We suggest that the newly developed procedure should be a mandatory tool for all in vitro flow cytometry assays of any class of carbon nanomaterials.

Keywords: carbon nanomaterials; flow cytometry; cell viability; cytotoxicity; interference



Citation: Malina, T.; Poláková, K.; Hirsch, C.; Svoboda, L.; Zbořil, R. Toxicity of Carbon Nanomaterials—Towards Reliable Viability Assessment via New Approach in Flow Cytometry. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7750. <https://doi.org/10.3390/ijms22147750>

Academic Editor: Vladimír N. Uversky

Received: 29 April 2021

Accepted: 14 July 2021

Published: 20 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Carbon nanostructures rank among the most promising materials in the field of nanotechnology. They include the well-known fullerenes and carbon nanotubes; however, the attention of researchers has recently shifted more towards 2D carbon nanomaterials (CNMs) and carbon dots [1,2]. As for 2D materials, the discovery of graphene in 2004 [3] was the key point, which led to the syntheses of a large number of new emerging derivatives [4]. These derivatives possess several extraordinary properties that are promising for a broad spectrum of applications [4,5]. This applies mostly to those derivatives that overcome graphene's hydrophobicity through selective functionalization. Highly hydrophilic derivatives are especially attractive for various fields of biomedical research [4–7]. Furthermore, graphitic carbon nitrides (g-C₃N₄) are a new class of graphene-like materials that offer desirable optical properties similar to another type of emerging carbon nanomaterial of the last decade—carbon dots (CDs) [8,9]. Both of these materials are highly promising

for applications in biosensing and bioimaging because, compared to the fluorescent inorganic semiconductors, they consist mainly of environmentally friendly elements such as carbon (C), hydrogen (H) and nitrogen (N), giving them a tremendous advantage in their biocompatibility [8,10–12].

The potential adverse effects of nanomaterials (NMs) on human health have been of general concern in recent years. An understanding of the cellular consequences of NMs after direct contact *in vitro* is the first important step and a crucial premise for their safe and successful use in biomedical applications [13]. Furthermore, the paradigm for the toxicology of the 21st century is to reliably test on the basis of high throughput *in vitro* cell culture-based models to minimize animal use [14,15]. One of the most important endpoints of *in vitro* NMs testing is acute cytotoxicity. Based on this result, it is possible to define the dose-response characteristics of nanomaterials and further focus on the understanding of the NMs' cellular interactions with additional assays [16]. Therefore, it is crucial to have a working methodology for this endpoint to produce reliable and justified results.

It is widely known that NMs cause interference with standard viability assays [17–20], which further highlights the need for a reliable and valid procedure for NMs *in vitro* testing. What is alarming is that studies referring to nanomaterial toxicity do not generally take this information into account (over 85% of papers) [18,20,21]. This fact can cause a huge problem for future safe and sustainable applications of specific nanomaterials and therefore needs to be addressed as soon as possible because different NMs can cause various types of interference [20]. Carbon nanomaterials are no exception, and interference of CNMs with common toxicity assays such as Alamar blue, neutral red, MTT and WST-1 assay has already been reported [22–27]. Therefore, for CNMs, using assays based on spectroscopic detection is recommended only with great caution. Flow cytometry is a fast and highly accurate technique providing information about individual cells in the whole population [28,29]. Thus, it represents a suitable alternative to *in vitro* viability testing. The LIVE/DEAD assay uses two fluorescence probes (Propidium Iodide (PI) and Calcein-AM) to distinguish between the population of dead and alive cells. PI is able to intercalate into the DNA of dead cells with a ruptured membrane, while active esterases in alive cells transform the non-fluorescent calcein-AM to highly fluorescent calcein. On the other hand, there is already a report showing interference of nanomaterials even with flow cytometry [30]. Therefore, a question should be raised whether CNMs can also cause interference with flow cytometry and, more importantly, if there is a way to overcome it.

In this study, we investigated potential interference reactions of new promising CNMs such as 2D graphene acid (GA), cyanographene (GCN), graphitic carbon nitride (g-C₃N₄) and 0D carbon dots (QCDs) in a basic flow cytometry assay (LIVE/DEAD). The first interference reaction was triggered by the interaction of the material with the used fluorescence probes. The second and more complicated was the interference of nanomaterials inside of the cells that caused changes in the fluorescence properties of the probes. In the case study with human skin fibroblast cells (BJ), we overcame both of these interferences and obtained reliable results for the LIVE/DEAD assay of these CNMs with a newly developed protocol using additional controls.

2. Results and Discussion

2.1. Properties of Materials

The four representatives of CNMs were selected to demonstrate how different properties of materials could influence their interference with *in vitro* testing. The size, surface charge and shape of materials are known to generally influence not only *in vitro* assays. The characterization of materials is summarized in Table 1. It should be noted that Table 1 only presents information given in our previous papers. GA and GCN had similar properties in the surface charge (zeta potential of –32 and –30 mV for GA and GCN, respectively), size (<500 nm according to DLS) and shape (both GA and GCN were mono/few layer sheets) (Table 1). Furthermore, neither of them exhibited fluorescence properties. On the other hand, as mentioned before, both QCDs and g-C₃N₄ are known for their fluorescence

qualities and especially QCDs as representatives of carbon dots have wide emission spectra with strong fluorescence signals [9]. Both QCDs and g-C₃N₄ exhibited positive surface charge (+40 mV for QCDs and +24 mV g-C₃N₄), but they had a completely different size and shape. While QCDs were very small sphere nanodots (5 nm) [12], the g-C₃N₄ were loose agglomerates with irregular shapes with the Z-average of 880 nm (according to DLS) [31,32]. To have a greater awareness of the shape of NMs, we included our own TEM images, which are displayed in Figure 1.

Table 1. Characterization of carbon nanomaterials g-C₃N₄, QCDs, GA and GCN.

	g-C ₃ N ₄ [31,32]	QCDs [12]	GA [7]	GCN [7]
Size (DLS, nm)	880	5	200	300
Zeta potential (mV)	+24	+40	−32	−30
Shape	loose agglomerates with irregular shape	sphere	mono/few layer sheets	

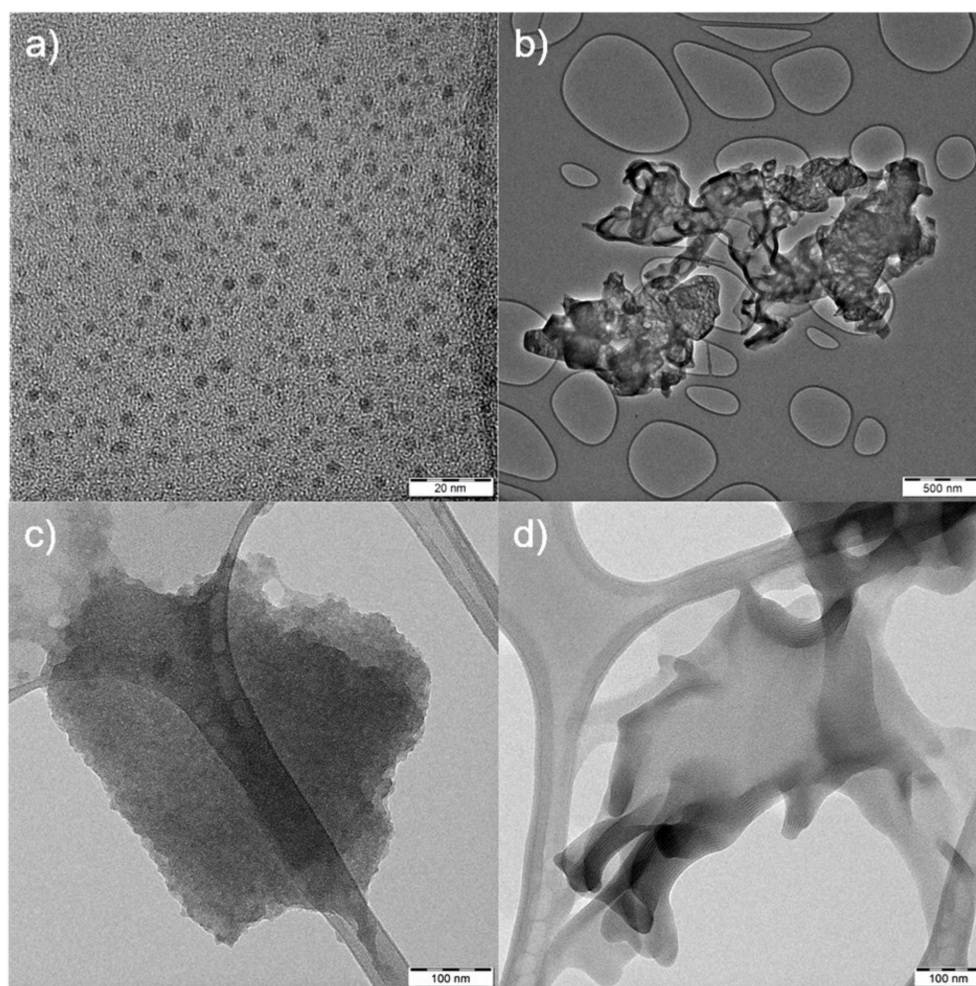


Figure 1. Transmission electron microscopy images of (a) QCDs (scale 20 nm); (b) g-C₃N₄ (scale 500 nm); (c) GA and (d) GCN (both scales 100 nm).

2.2. Optical Microscopy Imaging and MTT Interference

The first important factor influencing possible interference of nanomaterials is their behavior in cell culture media. Although we had information about physico-chemical properties of studied nanomaterials (Table 1), these can quickly change due to the interaction with proteins present in the culture medium (precisely in FBS) [33]. Simple optical

microscopy images presented in Figures S1 and S2 showed that the colloidal behavior of NMs in culture media differed greatly, depending mainly on the surface charge of carbon nanomaterials. For the positively charged g-C₃N₄ and QCDs, free agglomerates of NMs were observed for samples treated with 300 µg/mL (Figure S1b,c). For the g-C₃N₄ sample, agglomeration also occurred at a concentration of 50 µg/mL (Figure S1c). It should be noted that prior to optical microscopy imaging, the samples were washed and observed in PBS, meaning that a huge amount of free agglomerates was already washed away. When we observed the BJ cells treated with QCDs and g-C₃N₄ in more detail, we found that both materials at both concentrations were either internalized or attached to the membrane of the cells (Figure S2b,c). On the other hand, in the samples treated with negatively charged GA and GCN, there were fewer agglomerates seen outside of the cells (mostly only in samples treated with 300 µg/mL), but more importantly, the size of the agglomerates was much smaller than in the case of g-C₃N₄ and QCDs (Figure S1d,e). However, again, both materials were seen uptaken or attached to the membrane of the cells even for a concentration of 50 µg/mL and cells were completely covered with GA and GCN for the concentration of 300 µg/mL (Figure S2d,e).

At the beginning of our study, we wanted to show the inappropriateness of using the common toxicity assay for CNMs. In Figure S3, it is clearly shown that especially in the samples treated with GA and GCN, the nanomaterials could massively interfere with any type of spectrophotometric or spectrofluorometric evaluation as the supernatants are completely dark when compared to control samples. Even for the g-C₃N₄ and QCDs samples, the color in supernatants is different from the control samples. To assess the potential interference, we performed an MTT assay as an example. We included Blank controls (empty wells with the same treatment as for wells with cells) to try to avoid interference, as it is a standard protocol for this type of assay. From the result presented in Figure S4, it is clear that GA, GCN and g-C₃N₄ samples caused interference, as their MTT viability values were all below 90% of control (Figure S5). The most pronounced drop was observed for the g-C₃N₄ sample, as the MTT viabilities were under 50% for both concentrations, which normally indicates a huge cytotoxic effect. However, it was definitely due to the strong interference. The white color of the stock solution interfered with the blue/purple color of the dissolved formazan crystals because the microscopy imaging showed almost no dead or damaged cells (Figures S1 and S2). Additionally, Figure S4 shows that cells treated with the g-C₃N₄ sample were much brighter than the untreated control. For the GA and GCN samples, we again observed almost no dead cells in microscopy images (Figures S1 and S2). On the other hand, we saw many NMs either covering the cells' surface or being inside of the cells, which could potentially cause a decrease in the MTT signal through interaction with formazan crystals, as was already reported for other CNMs [25,27]. We could not determine any interference for the QCDs sample, as all the values were similar to the untreated control and there was no change observed in the color (Figures S4 and S5).

2.3. Interference of CNMs in Forward and Side Scatter Profiles in Flow Cytometry

Different colloidal behavior of CNMs in culture media was confirmed by flow cytometry in the forward and the side scatter profiles as well (Figure 2). The extra population of events, besides populations of cells and debris, occurred only in those samples treated with g-C₃N₄ and QCDs, which can be solely assigned to agglomerated NMs (Figure 2b,c). We proved this hypothesis by using spike-in controls, the first crucial controls that have to be definitely used, where a similar population of events was observed especially for the g-C₃N₄ and slightly also for the QCDs sample (Figure 2d). Spike-in controls are meant to mimic the highest possible concentration of free NMs in samples by adding the appropriate volume of NMs stock solutions in water to the negative control sample right before the measurement. There was also a clear shift in the cells' population scatter profile compared to the untreated sample, which indicates either internalization or membrane attachment of both g-C₃N₄ and QCDs samples. Even though we did not see for the samples treated with

GA and GCN any events representing free agglomerates in scatter profiles (including spike-in controls), the cells' population shifted again greatly, compared to the untreated sample (Figure 2). These results agreed well with observations from optical microscopy images.

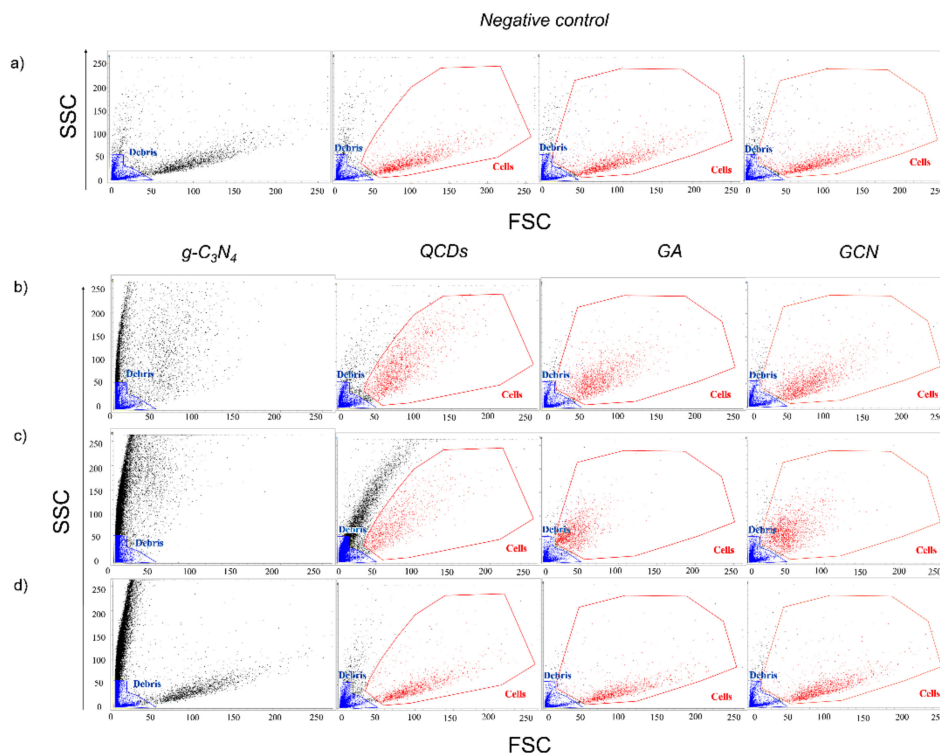


Figure 2. Forward and side scatter profiles for samples: (a) negative control of BJ cells (4× same sample with specific gates for each NMs); BJ cells treated for 24 h with (b) 50 µg/mL and (c) 300 µg/mL of carbon nanomaterials and (d) spike-in controls (from left to right: g-C₃N₄, QCDs, GA and GCN). The population of cells is highlighted in red, the population of debris is marked blue and the remaining black population in samples g-C₃N₄ and QCDs is considered NMs agglomerates.

As it is known from the literature [34], positively charged NMs show significantly higher interaction with proteins (especially albumin and globulins that are present in FBS) than negatively or neutral charged NMs. The reason behind this phenomenon is most probably the fact that the most abundant proteins in FBS (albumin and globulins) carry a negative net charge at physiological pH [35]. Therefore, a nanomaterial with positive zeta potential would preferentially interact with such proteins. It was already reported that the zeta potential of NMs with the protein corona is negative in most cases, which further supports the hypothesis of higher adsorption of proteins on NMs with a positively charged surface [35,36]. Regarding g-C₃N₄, it was understandable that the interaction of large positively charged NMs with proteins resulted in the formulation of agglomerates of a size significant enough to be seen in microscopy images and scatter profiles (Figures 2, S1 and S2). Surprisingly, even 5 nm QCDs produced agglomerates with proteins big enough to be detected by those techniques. As mentioned before, one of the reasons is definitely the strong positive surface charge of QCDs (+40 mV) resulting in a massive interaction with proteins. However, as Glancy et al. recently reported, the protein corona of sub-10 nm nanoparticles is more complex and nanoparticles can serve more as cargo on a protein rather than as a carrier of the protein, as is usually the case of larger NMs [37]. Hence, the agglomerates of QCDs in the culture medium could be a mix of several nanoparticles in combination with various proteins, which could explain the size of those agglomerates.

2.4. Interference of CNMs in Spike-in Controls

Having in mind a formation of agglomerates of g-C₃N₄ and QCDs in culture media these CNMs are famous for their extraordinary fluorescence properties [12,32]. Logically, it was crucial to check if those agglomerates could interfere with the fluorescence probes (PI, Calcein) used in the LIVE/DEAD assay. This was carried out using spike-in controls again.

First, we measured the spike-in controls for all NMs and analyzed them in a dot plot of red channel (FL 2: ex. 488/em. 700 nm) for PI-positive cells against green channel (FL 3: ex. 488/em. 527 nm) of calcein positive cells. To see if the free NMs can interfere with the fluorescence probes, we gated out the population of debris shown in Figure 2 (blue population of events). The dot plots of the LIVE/DEAD assay are shown in Figure 3. The first important thing to observe is that even after we discarded the debris population of events, there were still some events of unstained cells (*unstained* gate) with the fluorescence intensity in both channels lower than 10³ in the log scale in negative and positive control samples (Figure 3a). This was not included in the evaluation of viability. Then, we created gates according to the positive and negative control samples for dead (red, PI-positive) and alive (green, calcein positive) cells (Figure 3a) and used them for evaluation of the viability of spike-in controls for NMs (Figure 3d). As expected for the negatively charged GA and GCN, no population of free agglomerates of NMs was present to interfere with the results (Figures 2d, 3b and S7b), as the viability of spike-in controls for both of these materials remained over 90%, similar to the negative control (Figure 3d). However, for positively charged g-C₃N₄ and QCDs, an additional population of events appeared in the scatter profiles (Figure 2d) as well as in the dot plots (Figures 3c and S7c). This population represents the agglomerates of NMs because the only difference between those samples and the negative control (or positive control in the case of spike-in PC samples) was the addition of NMs right before the measurement. The spike-in control for g-C₃N₄ generated a huge number of agglomerates, comparable to the amount we saw in the sample after 24 h of treatment (Figure 2c,d). Furthermore, the agglomerates interfered greatly with the evaluation as the viability of the g-C₃N₄ spike-in sample dropped to 42% (Figure 3d). On the other hand, in spike-in control for QCDs, the amount of agglomerates was significantly lower than after 24 h (Figure 2c,d). This is most probably due to the difference in the size of g-C₃N₄ and QCDs because the formulation of agglomerates takes more time with ultra-small nanoparticles and the spike-in controls are measured immediately after adding the NMs. However, even a lower amount of agglomerates was responsible for the decrease in viability of the QCDs spike-in control sample to 74% (Figure 3d).

Spike-in controls are a necessary tool in flow cytometry and should be used in every measurement, where any interference of NMs is expected. Only when spike-in controls are used, gating—the most important step in flow cytometry—is performed properly. It is crucial that we have information only about the population of cells in the sample. Nevertheless, spike-in controls cannot give information about cells' scatter profiles, characterizing the cell size and granularity (complexity) [38]. Of course, the size and granularity of cells are influenced after 24 h of treatment with NMs. However, this is not the case with spike-in controls as the NMs are added just before the measurement.

Even though spike-in controls helped massively with choosing the specific gates correctly (Figure 2), they did not give us any information about the behavior of NMs inside the cells or on their membrane. Given that all NMs somehow influenced the cells' scatter profiles (Figure 2), we needed to introduce another important type of control named nanomaterial positive control (NM PCs). In these controls, we mimicked the situation where all the cells treated with NMs for 24 h would be dead to get information about the profile of dead cells with NMs on their membrane or inside. We heat-killed the cells treated with NMs for 24 h before the measurement. We did not need any control for alive cells treated with NMs for 24 h as, according to the optical microscopy, the majority of the cells were alive in all samples (Figure S2).

In the next chapters, we will give detailed information on how it is possible to select correct gating, avoiding different types of interference, and get reliable results in

LIVE/DEAD assay for all four types of our chosen CNMs following our newly developed approach using a combination of both additional controls. For a standard procedure, we applied the well-known method of gating using negative (over 90% viability) and positive control (under 10% viability). In our new approach, gates were set as follows: viability of negative and spike-in controls over 90%, the viability of positive and nanomaterial positive controls (NM PCs) under 10%.

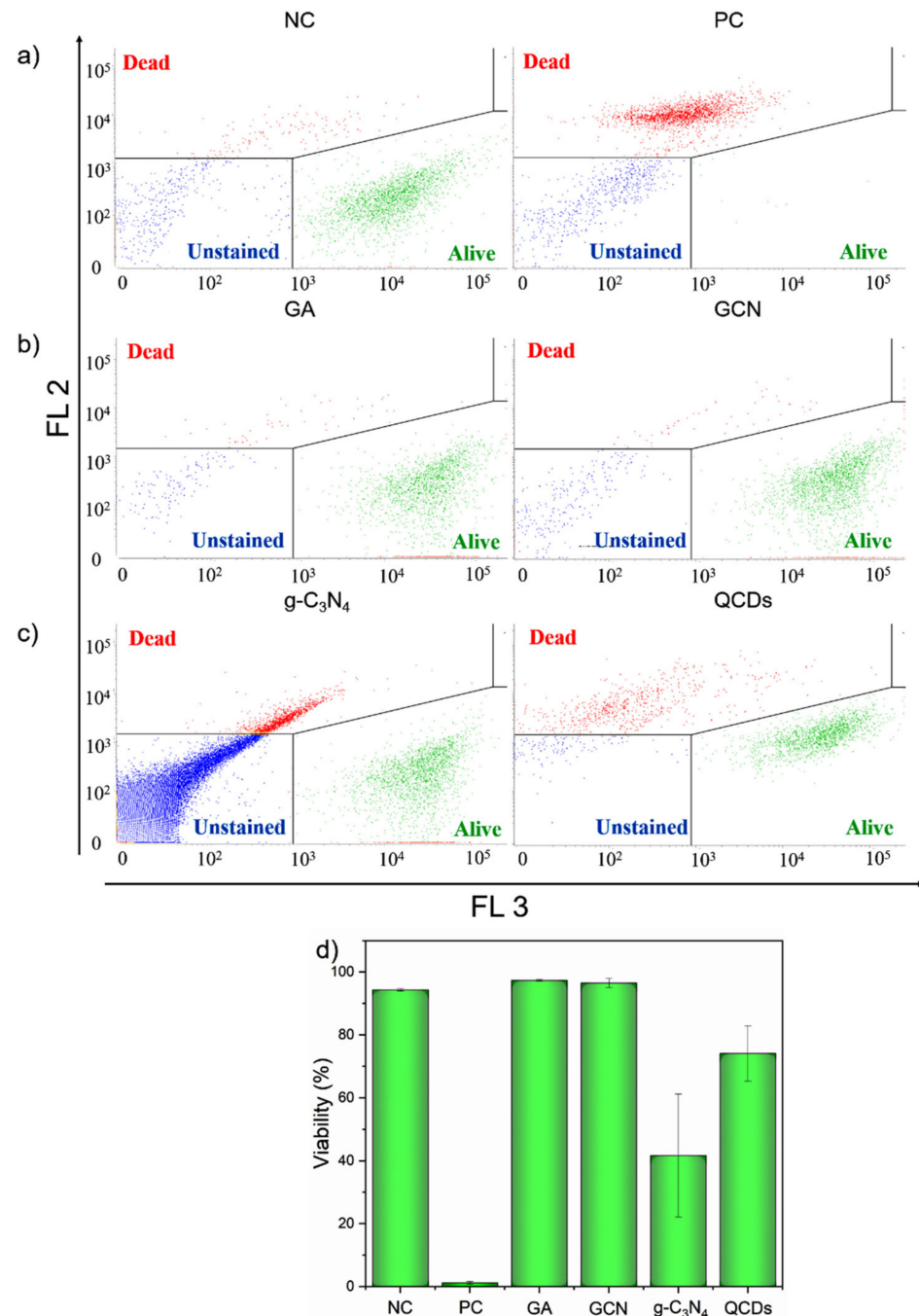


Figure 3. Dot plot showing LIVE/DEAD assay of: (a) negative and positive control of BJ cells; (b) BJ cells spike-in controls for GA (left) and GCN (right) and (c) BJ cells spike-in controls for g-C₃N₄ (left) and QCDs (right). Gates were selected according to the NC and PC samples. (d) The evaluation of the viability of spike-in controls' samples ($n = 3$). The events in the *alive* gate are shown in green, events in the *dead* gate in red and events in the *unstained* gate are highlighted in blue.

2.5. Interference of QCDs in LIVE/DEAD Assay

As it is seen in Figure 2, for samples treated with QCDs, there was a clear change in the scatter profiles and another population of agglomerates emerged for the samples treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and especially 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. That is why it was quite challenging to gate only the population of cells as agglomerates might also intermingle to some extent. Using the spike-in control, we could observe the profile of free agglomerates in the dot plot of red against green channels (Figures 3c and S7c). Therefore, when there were almost no events in the dot plot of the sample after 24 h, which correlated with the free agglomerates in the dot plot of spike-in control, we knew we had the correct gate, as it displayed the population of cells with as few agglomerates as possible (Figure 2). With this gating, we performed LIVE/DEAD assay evaluation using dot plots of two fluorescent channels.

First, we analyzed the samples with standard gating using only negative and positive control. From Figure 4a–e, it is clear that there was the interference of optical properties of QCDs [12,31,32] even though the viability of NM PCs was under 10%, which was correct for heat-killed cells (Figure 4e). Interaction of QCDs with cells resulted in the shift in the fluorescence intensity in the red detector (FL 2: ex. 488/em. 700 nm), which was strong enough to move some of the cells from the *alive* gate to the *dead* gate (Figure 4b). Additionally, although we carefully tried to gate only the population of cells (Figure 2), there were still some events representing free agglomerates left in the samples, as the viability of spike-in control for QCDs decreased to 86% (Figure 4d,e). Therefore, there was an interference with the evaluation as the fluorescence shift and the presence of agglomerates in gating according to the control samples resulted in decreasing the viability to 70 and 32% for samples treated with 50 and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of QCDs, respectively (Figure 4e).

Thus, there were two challenges for the LIVE/DEAD assay of BJ cells treated with QCDs. First was the influence of the optical properties of QCDs, and, second was the presence of free agglomerates in culture media that were not gated out of evaluation. To show how to overcome these challenges, we analyzed the same dataset with a new gating protocol according to the additional controls, which is displayed in Figure 4f–j. Using these gates, the whole population of alive cells remained in the *alive* gate despite the fluorescence shift (Figure 4g) and the events representing free agglomerates were now in the *unstained* gate, and were not included in the evaluation (Figure 4i). This setup resulted in 98 and 80% of the viability of BJ cells after 24 h of incubation with 50 and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of QCD, respectively (Figure 4j).

Therefore, due to the interference in the analysis according to standard gating, QCDs could be falsely considered toxic to BJ cells, although the reliable viability of BJ cells did not drop under 80% even for concentration 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of QCDs.

2.6. Interference of $g\text{-C}_3\text{N}_4$ in LIVE/DEAD Assay

For the $g\text{-C}_3\text{N}_4$ sample, even before the LIVE/DEAD assay itself, we observed another challenge. The interaction of cells with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and especially 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of $g\text{-C}_3\text{N}_4$ caused the side scatter values of these samples to shift out of the defined scale (Figure 2). We have not observed this phenomenon with any other material before. As for the right evaluation, we needed only the population of cells (parameters of measurement were set according to the controls and those cannot be changed during the measurement). That is why we used a dot plot profile of forward scatter values against values of the fluorescent channel (FL–1: ex. 405/em. 528 nm) for gating the population of cells where we did not expect any increase in the fluorescence intensity for calcein and PI (Figure S6). Even with the use of another detector, there was an overlap between some events of the populations of free NMs and events from the population of cells (Figure S6b). We used the same procedure as we did for the QCDs samples to try to gate only the population of cells without any free agglomerates of $g\text{-C}_3\text{N}_4$ (Figure S6a). However, at a concentration of 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, some of $g\text{-C}_3\text{N}_4$ free agglomerates had to be gated as well as there was no clear line that would separate them from the cells (Figure S6b).

In the standard gating, even though the fluorescence intensity of $g\text{-C}_3\text{N}_4$ was not as distinctive as for QCDs, there was a shift in some cells from the *alive* to the *dead* gate in the sample treated with $300\ \mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 5b). A more serious problem was free agglomerates that were gated in the population of cells, as was mentioned above, and were now presented in the *dead* gate. This was pronounced in the spike-in control $g\text{-C}_3\text{N}_4$ sample, which had 88% viability (Figure 5d,e). Although the decrease in viability was slighter than for QCDs, it was another indication that there was interference in the sample. Furthermore, the events presented in Figure 5d showed a dot plot profile comparable to the one in the spike-in control for $g\text{-C}_3\text{N}_4$ displayed in Figure 3c. Nevertheless, because of the mentioned overlap of agglomerates with cells in the samples after 24 h (Figure S6), we had to include them, as we could not afford to lose information about those cells. Thus, due to the standard gating according to the positive and negative control, events representing free agglomerates in the *dead* gate were responsible for the drop in the viability of samples treated with 50 and $300\ \mu\text{g}/\text{mL}$ of $g\text{-C}_3\text{N}_4$ to 86 and 63%, respectively (Figure 5e).

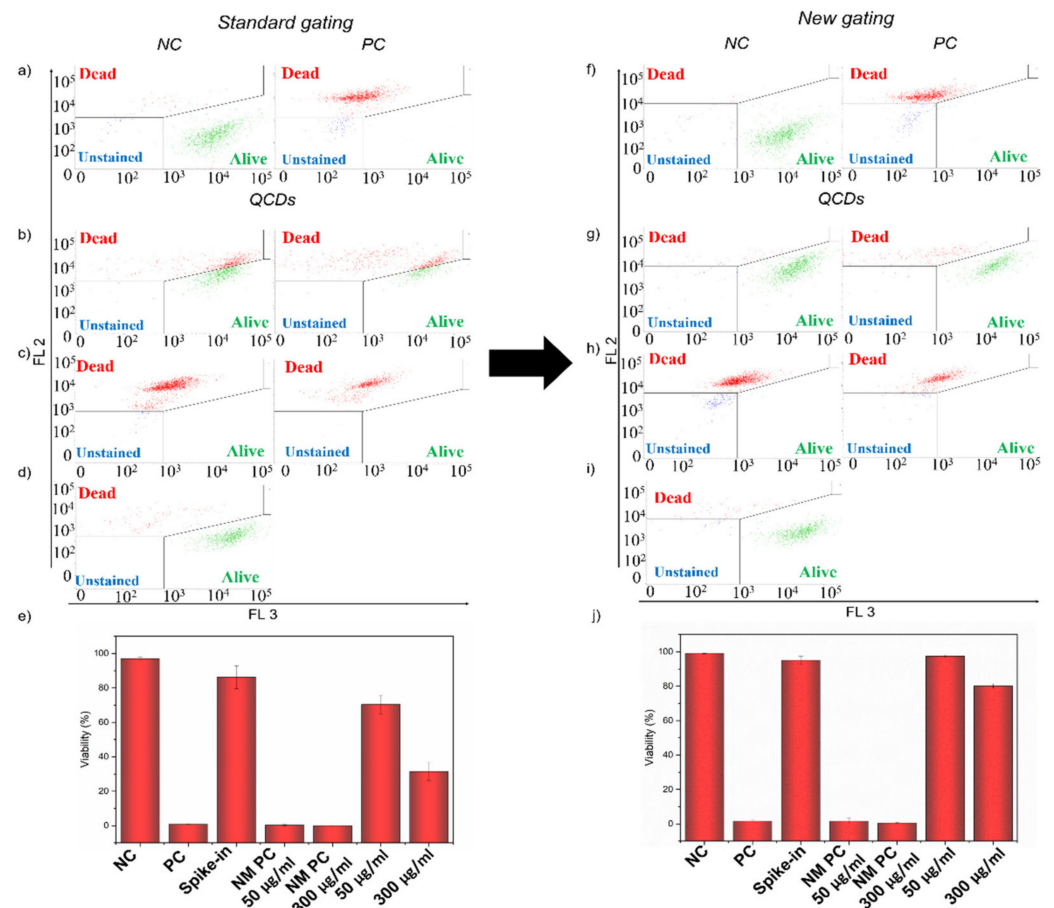


Figure 4. Dot plot showing LIVE/DEAD assay of: (a,f) negative and positive control of BJ cells and (b–d,g–i) BJ cells treated with QCDs samples with (a–d) standard gating and (f–i) new gating approach. (b,g) Samples treated with $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ (left) and $300\ \mu\text{g}/\text{mL}$ (right) of QCDs for 24 h; (c,h) Samples treated with NM PC $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ (left) and NM PC $300\ \mu\text{g}/\text{mL}$ (right); (d,i) Spike-in control for QCDs. (e,j). The evaluation of the viability of BJ cells treated with QCDs and additional control samples ($n = 3$). The events in the *alive* gate are shown in green, events in the *dead* gate in red and events in the *unstained* gate are highlighted in blue.

By applying new gating according to additional controls presented in Figure 5f–j, we managed to avoid this interference. Using specific gates in the LIVE/DEAD dot plot, we evaluated only the population of cells. Events representing free agglomerates of $g\text{-C}_3\text{N}_4$

were now in the *unstained* gate and the spike-in control viability was over 90% (Figure 5i,j). Therefore, the reliable results of the viability of BJ cells after 24 h of incubation were 94 and 83% for 50 and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of $\text{g-C}_3\text{N}_4$, respectively (Figure 5j).

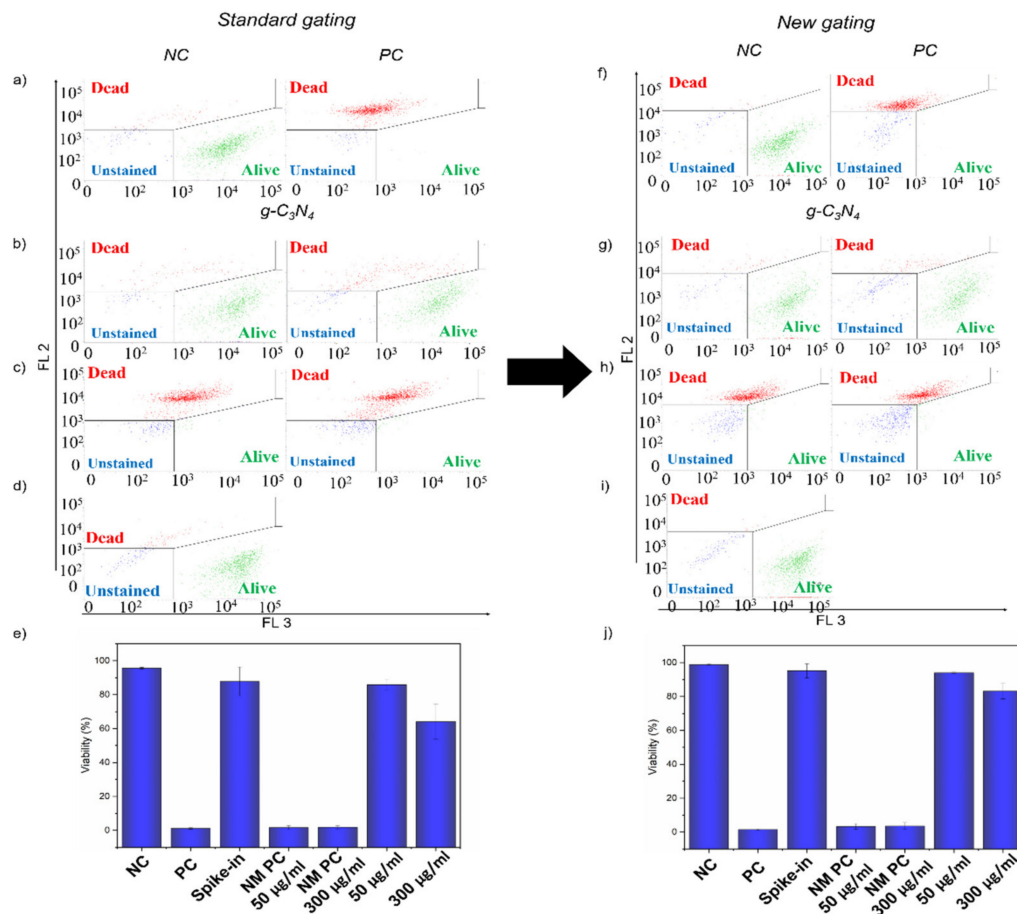


Figure 5. Dot plot showing LIVE/DEAD assay of: (a,f) negative and positive control of BJ cells and (b–d,g–i) BJ cells treated with $\text{g-C}_3\text{N}_4$ samples with (a–d) standard gating and (f–i) new gating approach. (b,g) Samples treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (left) and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (right) of $\text{g-C}_3\text{N}_4$ for 24 h; (c,h) Samples treated with NM PC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (left) and NM PC 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (right); (d,i) Spike-in control for $\text{g-C}_3\text{N}_4$. (e,j) The evaluation of the viability of BJ cells treated with $\text{g-C}_3\text{N}_4$ and additional control samples ($n = 3$). The events in the *alive* gate are shown in green, events in the *dead* gate in red and events in the *unstained* gate are highlighted in blue.

2.7. Interference of GA and GCN Samples in LIVE/DEAD Assay

Both GA and GCN samples formed much smaller agglomerates in culture media, which did not interfere with gating in the scatter profiles, as the population of cells was still clearly distinguishable (Figure 2). On the other hand, there was still a notable shift in scatter profiles, and optical microscopy showed the cells either filled with NMs or with NMs attached to the membrane after 24 h of incubation (Figures 2 and S2). Therefore, there was a high probability that both materials would interfere with the dyes of the LIVE/DEAD assay. As the interference was the same for both materials, we used a similar methodology including gating to avoid it. That is why only the example of GA is presented in Figure 6, while the results of GCN were moved to SI (Figure S8).

The evaluation with standard gating displayed in Figure 6a–e confirmed the interference of the GA sample. However, it was a completely different type of interference than the one observed for QCDs and $\text{g-C}_3\text{N}_4$ materials. There was a decrease in the fluorescence intensity of PI in the red channel (FL 2) caused by a quenching effect of the GA sample. This phenomenon was clearly manifested in NM PCs. While events representing dead

cells in positive control showed the fluorescent intensity of around 10^4 in the FL 2 channel (Figure 6a), there was a slight decrease even in the events' intensity for the NM PC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (fl. intensity between 10^3 and 10^4 , Figure 6c). For the NM PC 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sample, the reduction was distinctly more pronounced as events representing the dead cells showed fluorescent intensity values of around 10^2 (Figure 6c). Therefore, although samples treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ had viability over 96%, the evaluation was not reliable as the quenching effect of the GA sample towards PI caused the events representing the dead cells to drop from the *dead* gate to the *alive* or *unstained* gate (Figure 6b,c,e). This interference led to a false increase in the viability of NM PCs to 26% and 85% for the NM PC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the NM PC 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, when standard gating was applied (Figure 6e). For GCN, the quenching effect was even more profound as the viability of NM PC 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was 95% (Figure S8e).

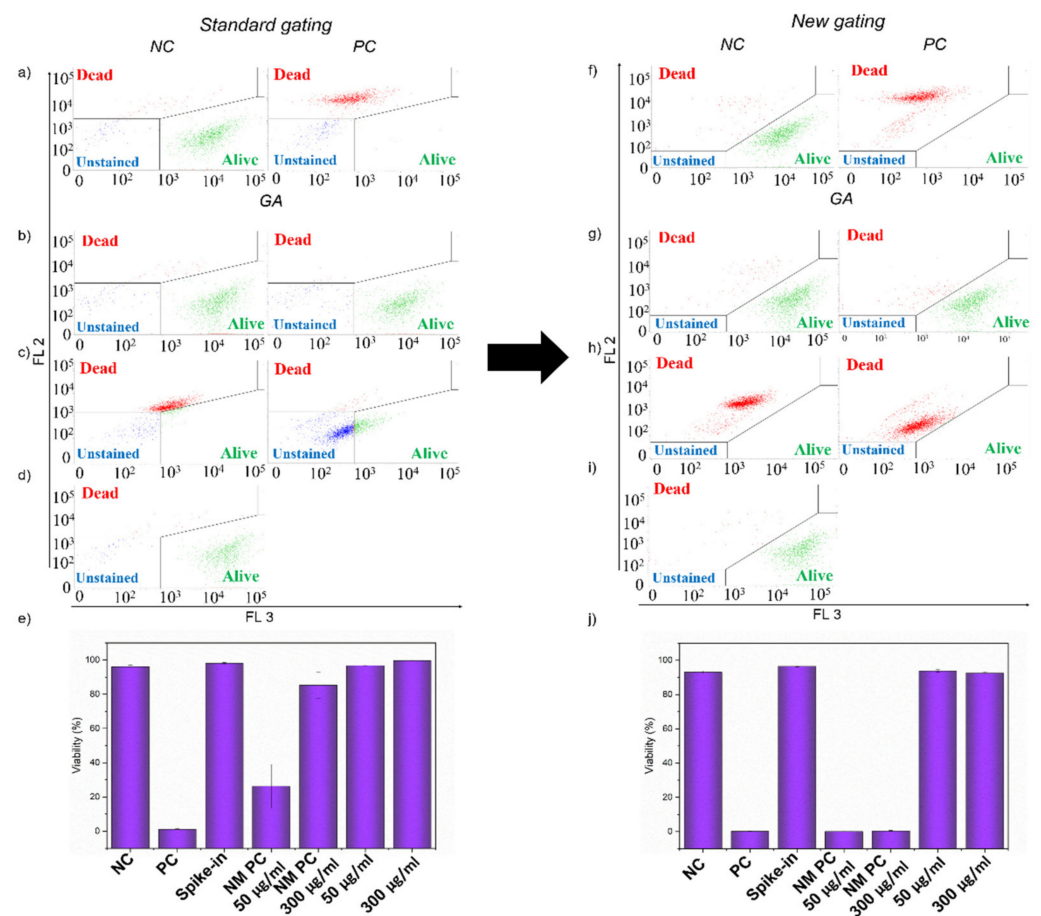


Figure 6. Dot plot showing LIVE/DEAD assay of: (a,f) negative and positive control of BJ cells and (b–d,g–i) BJ cells treated with GA samples with (a–d) standard gating and (f–i) new gating approach. (b,g) Samples treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (left) and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (right) of GA for 24 h; (c,h) Samples treated with NM PC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (left) and NM PC 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (right); (d,i) Spike-in control for GA. (e,j). The evaluation of the viability of BJ cells treated with GA and additional control samples ($n = 3$). The events in the *alive* gate are shown in green, events in the *dead* gate in red and events in the *unstained* gate are highlighted in blue.

Through a new gating procedure according to the additional controls, we managed to avoid the negative influence of quenching, which resulted in the viability of NM PCs samples dropping below 10% (Figure 6h,j). We thus knew that even with the quenching of GA, events representing dead cells would be in the *dead* gate in the samples treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of GA (Figure 6g). Therefore, reliable viabilities of the BJ cells treated for 24 h with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of GA were 94 and 92%, respectively

(Figure 6j). The treatment with GCN resulted in viabilities of 96 and 93% for 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively (Figure S8j).

3. Materials and Methods

3.1. Materials and Characterization

For this study, we have chosen four emerging CNMs: (1) new graphene derivatives graphene acid and cyanographene, (2) positive carbon dots with quaternary ammonium groups on their surface, and (3) exfoliated carbon nitride. Details about the synthesis and characterization of the mentioned materials can be found in the following papers: GA and GCN [7], QCDs [12] and $\text{g-C}_3\text{N}_4$ (material labeled as NS500 [31] and NS [32]). Samples were also characterized by transmission electron microscopy (TEM, JEOL 2100 operating at 160 kV).

3.2. Cell Culture

Human skin fibroblasts BJ (ATCC, CRL-2522) were used for this study. Cells were cultivated at 37 °C under a 5% CO_2 atmosphere in EMEM—Eagle's Minimum Essential Medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) supplemented with (final concentrations in medium): L-Glutamine (2 mM), Non-essential amino acids (NEAA, 1x), fetal bovine serum (FBS, 10%), PenStrep (5 U penicillin, 50 μg streptomycin/mL) and sodium bicarbonate (2 g/L).

3.3. Flow Cytometry Scatter Profiles and LIVE/DEAD Assay

The LIVE/DEAD assay was performed using a BD FACSVerser flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). First, the BJ cells were seeded into a 96-well plate at a density of 10,000 cells/well. Then we treated the cells with 50 and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of GA, GCN, QCDs and $\text{g-C}_3\text{N}_4$ diluted in 100 μL of culture media and incubated for 24 h. After 24 h, we collected the supernatant (100 μL), washed the cells with phosphate-buffered saline (PBS; 0.1 M, pH 7.4; 25 μL), detached the cells with 0.25% trypsin-EDTA solution (Sigma Aldrich; 25 μL), and, after 5 min, we resuspended the cells in 150 μL of a culture medium (final volume 300 μL). There was no volume discarded during the preparation (even PBS for washing was collected), so we obtained information about all cells in our samples. Then, the cells were incubated with PI (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and calcein-AM (50 μM) diluted in a culture medium for 30 min in the dark. Finally, the fluorescence signal was measured on a flow cytometer using the first two scatters (Forward scatter channel vs. Side scatter channel intensity using linear scale—0, 50, 100, 150, 200, 250 RFU) and then two fluorescence channels (red FL 2: ex. 488/em. 700 nm and green FL 3: ex. 488/em. 527 nm intensity using logarithmic scale—0, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 RFU). Heat-killed cells that were incubated at 60 °C for 30 min before measurements were used as a positive control. As we worked with materials with fluorescence properties, we turned off automatic compensation and compensated fluorescence channels two and three manually. Three independent experiments were performed and mean and standard deviation \pm (SD) were calculated.

3.4. Flow Cytometry Controls

As there was an interference of carbon nanomaterials with the flow cytometry measurement, the use of only one positive control was not enough. That is why we used two types of additional controls. The first type of control was called spike-in control and was based on a type that was already presented in Bohmer et al. [30]. Because of the particular cell harvesting procedure that collects everything (supernatants, PBS, cells) in the same tube, the nanomaterials were present in the staining solution. Therefore, we added the same volume of stock solutions, equaling the highest concentration (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) right before the measurement in order to mimic the situation where no NMs were uptaken and ended up free in the staining solution, potentially interfering with free fluorescence probes. The second type of control was named nanomaterial positive control (NM PC). The preparation of the NM PCs was the same as for the cells treated with NMs, but the NM PCs were heat-killed (60 °C for 30 min) right before the measurement in the same way

as the positive control. This way, we obtained information about the possible interference of internalized NMs with fluorescence probes.

4. Conclusions

In this study, we showed that carbon nanomaterials caused different types of interference in flow cytometry LIVE/DEAD assay, and correct gating was identified as a crucial step in the evaluation of real viability. We carefully performed gating in scatter profiles to display only the population of cells, along with specific gating in a LIVE/DEAD dot plot distinguishing between the alive and dead population of cells. When a standard gating procedure according to negative and positive control was applied, CNMs' optical properties, together with the ability to form agglomerates and the quenching of fluorescence of commercial probes, led to false results. Here, we demonstrated how to overcome CNMs' interference using a new gating procedure with careful selection of specific gates according to spike-in and nanomaterial positive controls. Our reliable approach improved the false toxic effect caused by interference by 28 and 48% for QCDs (50 and 300 µg/mL, respectively) and by 8 and 20% for g-C₃N₄ (50 and 300 µg/mL, respectively). Moreover, our procedure overcame the quenching effect and correctly decreased the viability of dead cells in NM PC 50 µg/mL NM PC 300 µg/mL by 26 and 84% for GA and by 22 and 92% for GCN.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22147750/s1>.

Author Contributions: T.M.: Conceptualization, Investigation, Methodology, Data Curation, Writing—Original Draft, Visualization. K.P.: Conceptualization, Writing—Review and Editing. C.H.: Conceptualization, Methodology, Writing—Review and Editing. L.S.: Resources, Funding acquisition. R.Z.: Writing—Review and Editing, Supervision, Funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the European Regional Development Fund in the IT4Innovations national supercomputing center—path to exascale project (project No. EF16_013/0001791), by project Gamma PP1 No. TP01010036 by Technology Agency of the Czech Republic, by Doctoral grant competition VŠB TU-Ostrava grant number CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016945 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and by the project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_049/0008441 “Innovative therapeutic methods of the musculoskeletal system in accident surgery” within the Operational Programme Research, Development and Education financed by the European Union and from the state budget of the Czech Republic. In addition, the project Nano4Future: No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000754 and the support from the Internal Grant Agency of the Palacký University Olomouc (project No. IGA_PrF_2021_028) is acknowledged. The operation of facilities was partly supported by the Research Infrastructure NanoEnviCz, supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under Project No. LM2018124. R.Z. also acknowledges the project GACR-EXPRO, 19-27454X.

Data Availability Statement: All data from this paper are available upon reasonable request to the corresponding author.

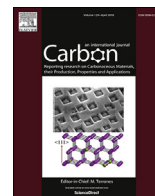
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Li, Z.; Wang, L.; Li, Y.; Feng, Y.; Feng, W. Carbon-based functional nanomaterials: Preparation, properties and applications. *Compos. Sci. Technol.* **2019**, *179*, 10–40. [[CrossRef](#)]
2. Jaleel, J.A.; Pramod, K. Artful and multifaceted applications of carbon dot in biomedicine. *J. Control. Release* **2018**, *269*, 302–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Novoselov, K.S.; Geim, A.K.; Morozov, S.V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S.V.; Grigorieva, I.V.; Firsov, A.A. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* **2004**, *306*, 666–669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gupta, A.; Sakthivel, T.; Seal, S. Recent development in 2D materials beyond graphene. *Prog. Mater. Sci.* **2015**, *73*, 44–126. [[CrossRef](#)]

5. Georgakilas, V.; Tiwari, J.N.; Kemp, K.; Pernal, J.A.; Bourlinos, A.B.; Kim, K.S.; Zboril, R. Noncovalent Functionalization of Graphene and Graphene Oxide for Energy Materials, Biosensing, Catalytic, and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 5464–5519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Zhu, C.; Du, D.; Lin, Y. Graphene and graphene-like 2D materials for optical biosensing and bioimaging: A review. *2D Mater.* **2015**, *2*, 032004. [[CrossRef](#)]
7. Bakandritsos, A.; Pykal, M.; Błoński, P.; Jakubec, P.; Chronopoulos, D.D.; Poláková, K.; Georgakilas, V.; Čépe, K.; Tomanec, O.; Ranc, V.; et al. Otyepka, Cyanographene and Graphene Acid: Emerging Derivatives Enabling High-Yield and Selective Functionalization of Graphene. *ACS Nano* **2017**, *11*, 2982–2991. [[CrossRef](#)]
8. Liao, G.; He, F.; Li, Q.; Zhong, L.; Zhao, R.; Che, H.; Gao, H.; Fang, B. Emerging graphitic carbon nitride-based materials for biomedical applications. *Prog. Mater. Sci.* **2020**, *112*, 100666. [[CrossRef](#)]
9. Hola, K.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Giannelis, E.P.; Zboril, R.; Rogach, A.L. Carbon dots—Emerging light emitters for bioimaging, cancer therapy and optoelectronics. *Nano Today* **2014**, *9*, 590–603. [[CrossRef](#)]
10. Wang, A.-J.; Li, H.; Huang, H.; Qian, Z.-S.; Feng, J.-J. Fluorescent graphene-like carbon nitrides: Synthesis, properties and applications. *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 8146–8160. [[CrossRef](#)]
11. Devi, P.; Saini, S.; Kim, K.-H. The advanced role of carbon quantum dots in nanomedical applications. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *141*, 111158. [[CrossRef](#)]
12. Malina, T.; Poláková, K.; Skopalík, J.; Milotová, V.; Hola, K.; Havrdová, M.; Tománková, K.B.; Čmiel, V.; Sefc, L.; Zbořil, R. Carbon dots for in vivo fluorescence imaging of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Carbon* **2019**, *152*, 434–443. [[CrossRef](#)]
13. Drasler, B.; Sayre, P.; Steinhäuser, K.G.; Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B. In vitro approaches to assess the hazard of nanomaterials. *NanoImpact* **2017**, *8*, 99–116. [[CrossRef](#)]
14. Krewski, D.; Acosta, D.; Andersen, M.; Anderson, H.; Bailar, J.C.; Boekelheide, K.; Brent, R.; Charnley, G.; Cheung, V.G.; Green, S.; et al. Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* **2010**, *13*, 51–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Andersen, M.E.; Krewski, D. Toxicity Testing in the 21st Century: Bringing the Vision to Life. *Toxicol. Sci.* **2008**, *107*, 324–330. [[CrossRef](#)]
16. Romeo, D.; Salieri, B.; Hischier, R.; Nowack, B.; Wick, P. An integrated pathway based on in vitro data for the human hazard assessment of nanomaterials. *Environ. Int.* **2020**, *137*, 105505. [[CrossRef](#)]
17. Kroll, A.; Pillukat, M.H.; Hahn, D.; Schnekenburger, J. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 1123–1136. [[CrossRef](#)]
18. Ong, K.J.; MacCormack, T.; Clark, R.J.; Ede, J.D.; Ortega, V.A.; Felix, L.; Dang, M.K.M.; Ma, G.; Fenniri, H.; Veinot, J.G.C.; et al. Widespread Nanoparticle-Assay Interference: Implications for Nanotoxicity Testing. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90650. [[CrossRef](#)]
19. Guadagnini, R.; Kenzaoui, B.H.; Walker, L.; Pojana, G.; Magdolenova, Z.; Bilanicova, D.; Saunders, M.; Juillerat-Jeanneret, L.; Marcomini, A.; Huk, A. Boland, Toxicity screenings of nanomaterials: Challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology* **2015**, *9*, 13–24. [[CrossRef](#)]
20. Andraos, C.; Yu, I.J.; Gulumian, M. Interference: A Much-Neglected Aspect in High-Throughput Screening of Nanoparticles. *Int. J. Toxicol.* **2020**, *39*, 397–421. [[CrossRef](#)]
21. Labouta, H.; Asgarian, N.; Rinker, K.; Cramb, D.T. Meta-Analysis of Nanoparticle Cytotoxicity via Data-Mining the Literature. *ACS Nano* **2019**, *13*, 1583–1594. [[CrossRef](#)]
22. Wright, P.C.; Qin, H.; Choi, M.M.; Chiu, N.H.; Jia, Z. Carbon nanodots interference with lactate dehydrogenase assay in human monocyte THP-1 cells. *SpringerPlus* **2014**, *3*, 615. [[CrossRef](#)]
23. Casey, A.; Herzog, E.; Davoren, M.; Lyng, F.; Byrne, H.; Chambers, G. Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon* **2007**, *45*, 1425–1432. [[CrossRef](#)]
24. Monteiro-Riviere, N.; Inman, A.O. Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. *Carbon* **2006**, *44*, 1070–1078. [[CrossRef](#)]
25. Wörle-Knirsch, J.M.; Pulskamp, A.K.; Krug, H.F.; Wörle-Knirsch, J.M.; Pulskamp, A.K.; Krug, H.F. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1261–1268. [[CrossRef](#)]
26. Holder, A.; Goth-Goldstein, R.; Lucas, D.; Koshland, C.P. Particle-Induced Artifacts in the MTT and LDH Viability Assays. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1885–1892. [[CrossRef](#)]
27. Belyanskaya, L.; Manser, P.; Spohn, P.; Bruinink, A.; Wick, P. The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction. *Carbon* **2007**, *45*, 2643–2648. [[CrossRef](#)]
28. Tuchin, V.V.; Tárnok, A.; Zharov, V.P. In vivo flow cytometry: A horizon of opportunities. *Cytom. Part A* **2011**, *79*, 737–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Bakke, A.C. The Principles of Flow Cytometry. *Lab. Med.* **2001**, *32*, 207–211. [[CrossRef](#)]
30. Bohmer, N.; Rippl, A.; May, S.; Walter, A.; Heo, M.B.; Kwak, M.; Roesslein, M.; Song, N.W.; Wick, P.; Hirsch, C. Interference of engineered nanomaterials in flow cytometry: A case study. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2018**, *172*, 635–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Svoboda, L.; Praus, P.; de Lima, M.J.B.P.; Sampaio, M.J.; Matýsek, D.; Ritz, M.; Dvorský, R.; Faria, J.L.; Silva, C.G. Graphitic carbon nitride nanosheets as highly efficient photocatalysts for phenol degradation under high-power visible LED irradiation. *Mater. Res. Bull.* **2018**, *100*, 322–332. [[CrossRef](#)]

32. Svoboda, L.; Škuta, R.; Matějka, V.; Dvorský, R.; Matýsek, D.; Henych, J.; Mančík, P.; Praus, P. Graphene oxide and graphitic carbon nitride nanocomposites assembled by electrostatic attraction forces: Synthesis and characterization. *Mater. Chem. Phys.* **2019**, *228*, 228–236. [[CrossRef](#)]
33. Monopoli, M.P.; Åberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K.A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 779–786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Patil, S.; Sandberg, A.; Heckert, E.; Self, W.; Seal, S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4600–4607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Walkey, C.D.; Chan, W.C.W. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2780–2799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Doorley, G.W.; Payne, C.K. Cellular binding of nanoparticles in the presence of serum proteins. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 466–468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Glancy, D.; Zhang, Y.; Wu, J.L.; Ouyang, B.; Ohta, S.; Chan, W.C. Characterizing the protein corona of sub-10 nm nanoparticles. *J. Control. Release* **2019**, *304*, 102–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Longin, C.; Petitgonnet, C.; Guilloux-Benatier, M.; Rousseaux, S.; Alexandre, H. Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiol.* **2017**, *62*, 221–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Toxicity of graphene oxide against algae and cyanobacteria: Nanoblade-morphology-induced mechanical injury and self-protection mechanism

Tomáš Malina^{a, b}, Eliška Maršálková^a, Kateřina Holá^b, Jiří Tuček^b, Magdalena Scheibe^b, Radek Zbořil^{b, *}, Blahoslav Maršálek^{a, b, **}

^a Institute of Botany, Czech Academy of Sciences, Lidická 25/27, 602 00, Brno, Czech Republic

^b Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, 783 71, Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2019

Received in revised form

29 August 2019

Accepted 30 August 2019

Available online 30 August 2019

Keywords:

Graphene oxide

Toxicity mitigation

Algae

Cyanobacteria

Ecotoxicity

Mechanical damage

ABSTRACT

Graphene oxide (GO) is the most extensively studied two-dimensional material and has many potential applications in biomedicine, biotechnologies, and environmental technologies. However, its toxicological effects on aquatic organisms have not been properly investigated. Here, we compare the toxicity of differently oxidized graphene oxide systems towards the green alga *Raphidocelis subcapitata* and the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. The cyanobacterium exhibited higher GO sensitivity and more rapid growth inhibition than the alga, in keeping with the established antibacterial properties of GO. The toxic effects of GO included shading/aggregation of GOs and nutrient depletion; however a detailed mechanistic study revealed that GO acted against *R. subcapitata* via an additional, new mechanism. Remarkably, lightly oxidized GO samples induced significantly greater membrane integrity damage than more heavily oxidized GO samples. Flow cytometry and microscopy experiments revealed that lightly oxidized GO can act as a “nano-blade” that causes mechanical damage to algal cells, probably because of the comparatively low coverage of oxygen-bearing functionalities at the edges of such GO sheets. The degree of oxidation of GO samples thus affects their ecotoxicity. Interestingly, longer incubations activated stress-induced defense reactions involving extracellular protein and carbohydrate biosynthesis in both algae and cyanobacteria.

© 2019 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Nanotechnology is a very dynamic and rapidly evolving field; new nanomaterials with unique physical and chemical properties tuned for diverse applications are regularly introduced. Two-dimensional nanomaterials such as graphene and its derivatives have attracted particular interest because of their remarkable properties, which originate from confinement-related phenomena, their very high surface area:volume ratios, the flatness of their

* Corresponding author. Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Departments of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. listopadu 12, 77146, Olomouc, Czech Republic.

** Corresponding author. Institute of Botany, Czech Academy of Sciences, Lidická 25/27, 602 00, Brno, Czech Republic.

E-mail addresses: radek.zboril@upol.cz (R. Zbořil), blahoslav.marsalek@ibot.cas.cz (B. Maršálek).

surfaces, and their amenability to functionalization/activation [1]. Graphene consists of sp² hybridized carbon atoms arranged hexagonally in a 2D structure, resulting in a large surface area on both sides of the planar structure [1]. Because of its unique characteristics, which include excellent mechanical strength, conductivity, and electrocatalytic performance, it has many potential applications in fields such as energy storage, electronics, and biomedicine [2]. However, it also has some properties that are unfavorable in certain contexts (e.g., zero bandgap, hydrophobicity, no magnetic response, and susceptibility to oxidative environments). Therefore, graphene is frequently chemically modified, giving rise to many technologically interesting derivatives [3]. One such derivative, graphene oxide (GO), is a highly oxidized, negatively charged 2D material with numerous carboxyl, hydroxyl, carbonyl and epoxide functional groups attached to the graphene backbone [4]. Compared to graphene, GO exhibits superior colloidal behavior and higher surface reactivity while also being cheap to produce [5].

Consequently, it has considerable potential for use in bioengineering, medicine, and industrial applications [6].

Unfortunately, the surface reactivity of GO gives rise to significant toxicity [7]; several studies have shown GO to be toxic to bacteria, animals, and human cells [8–10]. In the long term, GO could present significant ecological problems: because of its excellent stability, GO released into the environment could end up distributed over a very wide area and persist for a considerable time [11]. More importantly, graphene family materials have been shown to have a high bioaccumulation potential in the bodies of organisms and could also play a role in the food chain of aquatic ecosystem [12,13]. The extent to which graphene-based nanosystems have been released into the environment is largely unknown at present [14]. Additionally, many companies are expected to make commercial use of GO-based materials in the near future (in applications such as water desalination and environmental filtration) [15–17], making their release into aquatic, terrestrial, and atmospheric environments highly probable [18]. Consequently, there is an urgent need to understand how GO and other graphene-based materials interact with living cells, and to assess their toxicity [19].

Algae and cyanobacteria are photoautotrophic organisms that play similar roles in the environment, although they differ in that cyanobacteria are prokaryotic while algae are eukaryotes. As primary producers of organic compounds, they are both key components of aquatic ecosystems and are highly exposed to particulate matter in the aquatic environment (including GO). Because they provide many essential ecosystem services, including oxygen evolution, biomass production, CO₂ and N₂ fixation, and self-purification of polluted water [20,21], their sensitivity to GO releases must be evaluated.

Only a few publications have examined the toxicity of GO towards algae, and its effects on cyanobacteria have not been addressed at all. GO has been shown to cause growth inhibition, reactive oxygen species (ROS) production, and oxidative stress in two algal genera (*Raphidocelis* [22] and *Chlorella* [23]), and to induce changes in cell division in *Chlorella* [24]. Moreover, Zhao et al. found that GO may have indirect ecotoxic effects resulting from nutrient adsorption and shading [23]. However, entrapment of *Chlorella* in GO layers did not result in any discernible toxicity or reduce the viability of the algae [25].

The few published studies on the ecotoxicological effects of GO [26,27] have not elucidated the mechanisms responsible for its toxicity towards photoautotrophic organisms. Here we address this knowledge gap by using flow cytometry and various microscopy techniques to study the ecotoxic effects of GO systems with different degrees of oxidation on algae and cyanobacteria. GO systems were synthesized using three different synthetic methods (the Hofmann, Hummers, and Tour protocols) that afford different degrees of oxidation. After structural and chemical characterization of the resulting materials, we evaluated their potential for nutrient adsorption, their shading effects, their influence on the growth of cyanobacteria and algae, and their impact on the production of extracellular proteins and carbohydrates by these microorganisms. The results presented here constitute the first evaluation of the toxicity of differently oxidized GO systems towards algae and cyanobacteria. Cyanobacteria were found to be more sensitive to GO toxicity, in keeping with the known antibacterial properties of GO. Additionally, GO was found to exert toxic effects on algae via multiple mechanisms including shading, nutrient adsorption, and most importantly, a previously unrecognized “nano-blade” effect that causes direct physical damage to cell membranes. However, these mechanisms were only effective during the first few hours of interaction with GO materials. Over longer periods of time, the microorganisms were able to activate resistance mechanisms and

mitigate these adverse effects by producing extracellular proteins and carbohydrates. The existence of distinct short- and long-term GO toxicity effects and their dependence on the degree of oxidation of the GO must be taken into account when considering large scale applications of GO in water and technologies that may lead to the release of graphene oxide into aquatic environments.

2. Materials and methods

2.1. GOs preparation and characterization

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich unless stated otherwise. Potassium chlorate was obtained from Lach-Ner. Graphite powder with a particle size below 20 μm was used as the graphitic precursor for GO synthesis. Graphene oxides were synthesized using the methods of Hofmann [28] (HO-GO), Hummers [29] (HU-GO), and Tour [30] (TO-GO). All three methods were implemented using a variant of the protocol developed by Chng et al. [31] in which the final filtration step was replaced by repeated centrifugation. The materials were then re-dispersed in pure water and exfoliated by ultrasonication for 3 h. It should be noted that the main difference between the three methods of GO preparation lies in the oxidants they use: Hofmann's method uses potassium chlorate and nitric acid [28], Hummers' method uses permanganate and nitric acid generated in situ [29], and Tour's method uses permanganate and phosphoric acid generated in situ [30]. These synthetic procedures yielded GO samples with different degrees of oxidation and distributions of oxygenated functional groups. After the synthesis, the GOs were lyophilized and fresh stock solutions were prepared before measurements. We weighed the lyophilized powder of each GO (10 mg) and dissolved it in 5 mL of ultrapure water for a final concentration of 2 mg/mL. Then the stock solutions were sonicated in the Sonication bath (Bandelin, Germany; 160 W, 35 kHz) with ice for 60 min and also using probe Sonoplus Ultrasonic homogenizers HD 2070 (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG Heinrichstraße 3–4 • D-12207 Berlin) amplitude setting 70%, pulsing ultrasonic operating mode three times for five seconds. From these stock solutions, the relevant volumes were used for all tests.

Electron microscopy was performed using a HITACHI SU 6600 scanning electron microscope (SEM) and for Atomic force microscopy (AFM), combined system NTEGRA Spectra (NT-MDT, Russia) was utilized to acquire sample topography (software Nova Px. 3.4.0 rev. 19040). The surface morphology was obtained by the means of semi-contact mode (height) with a NSG_30 (NT-MDT, Russia) cantilever having a force constant of 22–100 N/m and resonant frequency of 240–440 kHz. The scanning rate was 0.3 Hz. Detailed surveys and high-resolution X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) were performed using a PHI VersaProbe II (Physical Electronics) spectrometer with an Al K α source (15 kV, 50 W). The obtained spectra were analyzed using the MultiPak program (Ulvac-PHI, Inc.) and referenced against a peak at 284.80 eV in the high-resolution C 1s spectrum. The materials were also characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) using an iS5 Thermo Nicolet spectrometer (with ZnSe ATR technique) and Raman spectroscopy using a DXR Raman microscope.

2.2. Algae and cyanobacteria culturing

The green alga *Raphidocelis subcapitata* (Korshikov) and the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* (Nägeli) were chosen as test organisms. Cultures of both species were obtained from the Algal Culture Collection CCALA, Treboň, Czech Republic. The organisms were incubated in 100 mL Erlenmeyer flasks at 24 ± 1 °C under continuous illumination (90 μmol m²/s) by fluorescent lamps

(Phillips, TLD 36W/33) in growth media. The chosen cultivation medium was ZBB medium—a 1:1 combination of Z-medium (Zehnder and Staub medium) and BB-medium (Bristol and Bold medium).

2.3. Growth inhibition test

The growth inhibition of unicellular green algae and cyanobacteria by GO in the growth medium was evaluated using a modified variant of the ISO 8692 test procedure. The GO concentrations used in these experiments were 0.39, 6.25, 25, 100, and 200 µg/mL.

The purpose of these tests was to determine the effects of GOs on the growth, metabolism, and reproduction of freshwater microalgae or cyanobacteria. The growing test organisms were exposed to the three selected GOs in 24-well cell culture plates from Thermo Fisher Scientific containing 750 µL of media per well over a period of 24–72 h. The growth rate in the first experiments (data not shown) was evaluated by performing *in vivo* fluorescence measurements using a microplate fluorescence reader GENios (Tecan, Switzerland). This method produced distorted results because of the interaction of GO with algal cells and the shading effect, so we subsequently used an alternative direct method based on counting cells using a fluorescence microscope. Growth inhibition by different concentrations of GO was used as the end point, with cells not exposed to GO serving as controls, and was expressed as the number of cells during the exposure period [32,33].

The growth media and inoculum cultures were prepared and used according to EN ISO 8692:2012 (Table S4). Three independent experiments were performed for each GO concentration and control. The initial cell concentrations for the alga and cyanobacterium were 50 000 cells per mL and 200 000 cells per mL, respectively. To minimize evaporation of the medium, the plates were covered with a transparent film and incubated under standard light and temperature conditions without shaking/mixing. At the end of the test period (i.e., after 24–72 h), a drop of Lugol solution was added (to algal cultures) or the culture was cooled to 4 °C (for cyanobacterial cultures). The cultures were then topped up with media to a final volume of 2 mL and homogenized by sonication. The sonication of the cultures was done using probe Sonoplus Ultrasonic homogenizers HD 2070 (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG Heinrichstraße 3–4 • D-12207 Berlin) amplitude setting 70%, pulsing ultrasonic operating mode for 5 s to break aggregations/flocks of algae and GO. Because of the short sonication time, there was no impact on the cells. Cell number was measured using fluorescence microscopy Olympus BX60 with power supply unit U-RFL-T to avoid the artefacts generated by the automatic fluorescence reader.

2.4. Flow cytometry analysis

To further investigate the mechanism of GO toxicity, flow cytometry (Sysmex Partec GmbH, Germany) was used to measure membrane integrity loss, reactive oxygen species (ROS) generation, and cellular autofluorescence. Because of practical difficulties, these measurements could not be performed for the cyanobacterium; consequently, only the alga *R. subcapitata* was studied (see Supplementary material). The algal cells were incubated with different concentrations of GOs (1, 6.25, 25, 50, 100, and 200 µg/mL) for 2, 24, or 48 h under specific conditions (see section 2.2 Algae and cyanobacteria culturing) before performing flow cytometric analyses. During these analyses, the flow rate was set to 2 µL/s and at least 20 000 events (algal cells) were measured in each case.

Propidium iodide (PI) was used as a fluorescent probe to determine changes in the algal cells' membrane integrity of the

algal cells. PI can enter cells with damaged membranes and stain their nucleic acids, generating a strong fluorescence signal. However, it cannot enter cells with intact membranes, and thus does not generate a fluorescence signal in such cases. The excitation and emission wavelengths for PI fluorescence are 488 and 575 nm, respectively. PI is a good probe for analyzing cell membrane integrity because it clearly discriminates between cells with membrane damage and those with intact membranes. PI was added to the cells at a concentration of 5 µg/mL after they had been incubated with GO for the prescribed length of time. They were then incubated in darkness for 15 min, after which their mean fluorescence intensity was measured (setup – exc. 488/em. 565–585 nm).

Because they are photoautotrophs, algae produce multiple pigments that absorb visible light. An appreciable proportion (1–3%) of the photons not used in photosynthesis are re-emitted by these pigments as fluorescence [34]. The main pigments in algae are chlorophyll *a* and *b*, which emit in the UV-blue (<450 nm) and far-red (>650 nm) spectral ranges [35]. The fluorescence intensity of chlorophylls reflects their metabolic activity and physiological state [36]. Chlorophyll fluorescence measurements require no exogenous probes, so they were simply performed by collecting the cells in suitable tubes and measuring their mean fluorescence intensity (setup – exc. 488/em. 660–680 nm).

The last parameter investigated by flow cytometry was ROS formation and oxidative stress. The probe used in this case was 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (also known as DCFDA or H2DCFDA), which is a fluorescent dye that indicates the presence of hydroxyl and peroxy radicals and other ROS in cells. DCFDA diffuses into cells, where it is deacetylated by cellular esterases to a non-fluorescent compound that can be oxidized by ROS to the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). The excitation and emission wavelengths of DCF are 495 and 529 nm, respectively. A fresh 1 mM stock solution of DCFDA was prepared prior to each measurement and then added to the algal cell culture to a final concentration of 20 µM. The cells were then incubated in darkness for 45 min, after which their mean fluorescence intensity was measured (setup – exc. 488/em. 517–537 nm).

To confirm that the choices of probe and labeling conditions were suitable, control experiments were performed using 3% H₂O₂ (v/v) and heat-killed cells for the ROS generation measurements and membrane integrity analyses, respectively (Fig. S3).

2.5. Nutrient depletion by GOs and microscopy evaluation of algae after the treatment with GOs

Nutrient depletion from the growth medium by GOs was evaluated by adding 100 µg/mL of GOs to 50% algal ZBB medium and shaking it with a FalcF205 (FALC INSTRUMENTS, Italy) culture rotator for 24 h. The suspension was then filtered using nylon LUT syringe filters (0.45 µm). The concentration of Ca (as Ca²⁺) in the supernatant and algal media without GO was determined by titration, while the concentrations of Mg (as Mg²⁺), N (as N-NO₃³⁻ and N-NH₄⁴⁺), and P (P-total and P-PO₄³⁻) were determined using the spectrophotometric phosphomolybdate method.

Various microscopy techniques were used to study the interactions of algae with GOs. For this purpose, algae were first incubated with 200 µg/mL of HO-GO, HU-GO, and TO-GO for 24 h and then prepared for imaging. Optical microscopy was used to investigate the shading effect of GOs, and scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) were used to analyze their interactions with the algal cells in detail. Only HO-GO and TO-GO samples were studied by SEM. These samples were fixed with a solution of 0.25% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde for 24 h, then washed three times with PBS and

dehydrated with increasing concentrations of ethanol (30, 50, 70, 90, and 100%). Finally, the samples were coated with 15 nm layer of gold nanoparticles and observed by SEM. For AFM imaging, samples were dropped onto a fresh cleaved muscovite mica substrate and air dried. Images were then obtained in the amplitude-modulated semi-contact mode using an NT-MDT NTegra system equipped with an NSG10_DLC AFM probe with a typical tip-curvature radius of 1–3 nm. The amplitude set point was adjusted to 62% of the cantilever free amplitude, and the scanning speed was 0.3 Hz per line.

2.6. Determination of extracellular proteins and carbohydrates

The total extracellular carbohydrate content of the culture media after centrifugation of the algal cells (4000 RPM, 10 min) was determined using the phenol-sulfuric acid procedure [37]. The quantities of the reagents were chosen based on the volume of cells in the plates used for the absorbance measurements; a 33 μL sample was mixed with 33 μL of a 5% phenol solution and 170 μL H_2SO_4 . After adding the reagents, the mixture was left to stand for 15 min and then its absorbance was measured at 490 nm. The resulting data were analyzed using STATISTICA 12.0. A calibration curve was generated using glucose as a standard by starting with a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution and performing a two-fold serial dilution.

The production of extracellular proteins by the algal cells exposed to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of GOs for 2, 24, and 48 h was evaluated using the protocol of Lowry et al. [38]. Briefly, extracellular proteins in 50 mL of algal suspension were collected by centrifugation (10 min at 4000 RPM at 4 °C). The concentration of protein in the supernatant was then measured by spectrophotometric detection (680 nm) of the colored complex formed by the reaction of the Folin-Ciocalteu phenol reagent with the proteins. Bovine serum albumin was used as a standard for protein calibration.

2.7. Statistical analysis

For all measurements, three independent experiments were performed at least in duplicates, and the mean \pm standard deviation (SD) was calculated.

3. Results and discussion

3.1. Structural and chemical characterization of GOs

The GO systems synthesized using the protocols of Hofmann, Hummers, and Tour are denoted HO-GO, HU-GO, and TO-GO, respectively. Analyses of representative SEM and AFM images revealed that all of the prepared GO samples had similar sheet sizes (up to 5 μm ; see Fig. 1a) and similar mono layer sheet height (around 1 nm; see Fig. 1b). The size distribution and AFM height profile distribution for all the prepared samples are given in Fig. S4. However, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) measurements showed that they differ in their degree of oxidation: the C/O ratio, which is a measure of the degree of oxidation, was 2.60 for HO-GO, 1.95 for HU-GO, and 1.72 for TO-GO. TO-GO thus had the highest oxygen content and HO-GO the lowest. The different abundances of oxygen-containing functional groups in the GO samples were reflected in their high-resolution C 1s XPS patterns (see Fig. 1c–e and Tables S1 and S2). Epoxide groups, which give rise to C 1s XPS peaks at 286.8 eV were the most abundant functional groups in HO-GO; they are frequently observed in GO samples prepared by chlorate oxidation like HO-GO [39]. Conversely, the HU-GO and TO-GO samples were oxidized with permanganate; their most abundant surface functionalities were hydroxyl (285.9 eV), carbonyl

(287.5 eV), and carboxyl (288.8 eV) groups. However, surface carboxyl groups were more abundant in HU-GO (see Table S2).

The GO samples' different levels of oxidation were also apparent in their Fourier transform infrared (FT-IR) spectra (see Fig. 1f). The characteristic band at 1615 cm^{-1} due to aromatic C=C systems was visible in the spectra of all three samples. However, in keeping with the XPS results, the spectrum of HO-GO lacked the C=O band at 1735 cm^{-1} characteristic of carbonyl and carboxyl groups. However, it did feature strong symmetric and asymmetric C–O–C ring deformation bands at 1041 and 956 cm^{-1} , which are characteristic of epoxy groups [40]. Two bands characteristic of hydroxyl groups [40] were also clearly observed: the broad C–O–H bending band at 1392 cm^{-1} , and the C–C–O stretch band at 1223 cm^{-1} . The spectra of both HU-GO and TO-GO feature very dominant C=O bands at 1735 cm^{-1} , as well as bands characteristic of epoxy and hydroxyl groups. However, the intensity of these bands was greater in the spectrum of the TO-GO sample, which was oxidized using permanganate. The Raman spectra (see Fig. 1g) of the GO samples feature two peaks at 1330 cm^{-1} and 1596 cm^{-1} , corresponding to the graphene D and G bands, respectively. The G band is associated with sp^2 hybridized aromatic carbon atoms in the graphene lattice, while the D band is associated with sp^3 defects in the sp^2 lattice [41]. The I_D/I_G ratio (see Fig. 1g) therefore indicates the level of disorder in the sp^2 lattice and the degree of oxidation of the GO system. The ratios for HO-GO, HU-GO, and TO-GO are 0.75, 0.98, and 1.16, respectively, in accordance with the FTIR and XPS measurements. It is thus clear that TO-GO was the most extensively oxidized of the samples, and HO-GO the least, with HU-GO having an intermediate degree of oxidation. Because it had the lowest degree of oxidation, HO-GO also had the lowest content of carboxyl groups, which are usually located at GO edges; this proved to be important in relation to its ecotoxicity, as discussed below.

3.2. Growth inhibition test

The GO samples' inhibitory effects on the proliferation of the green alga *Raphidocelis subcapitata* and the unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* were observed over periods of 24, 48, and 72 h. There was almost no influence on the growth by the byproducts of the syntheses of GOs (Fig. S5), so the observed inhibition was caused only by materials. Fig. 2a, d shows the sensitivity of the alga and cyanobacterium to the GO systems after 24 h. The GO systems inhibited the growth of *S. elongatus* more strongly than that of *R. subcapitata*: all three GOs inhibited the cyanobacterium's growth by at least 50% but none achieved this level of inhibition for the alga. The greater sensitivity of the cyanobacterium is probably due to its simple prokaryotic cellular structure (compared to the eukaryotic alga) and the established antibacterial properties of GO [9]. Fig. 2b,c,e,f shows the growth inhibition observed after 48 and 72 h. All three GO systems induced higher levels of growth inhibition in both organisms over these longer periods; growth inhibition of around 50% or higher occurred at a significantly lower GO concentration than in the 24 h case (EC50 values are presented in Table S3). These results are consistent with previous reports on the toxic effects of graphene-based materials, including GO, on algae [22–24,42]. However, most earlier studies only considered the effects of one material on one organism, or compared completely different carbon nanomaterials (e.g., CNTs, graphene, and graphene oxide). Conversely, we exposed two different photoautotrophic microorganisms to three GO samples with similar particle sizes and structures but different surface charges and levels of oxidation in order to systematically analyze their responses to this material. Two new conclusions were drawn from the growth inhibition data. First, the least oxidized GO sample (HO-GO) inhibited the growth of both organisms more strongly

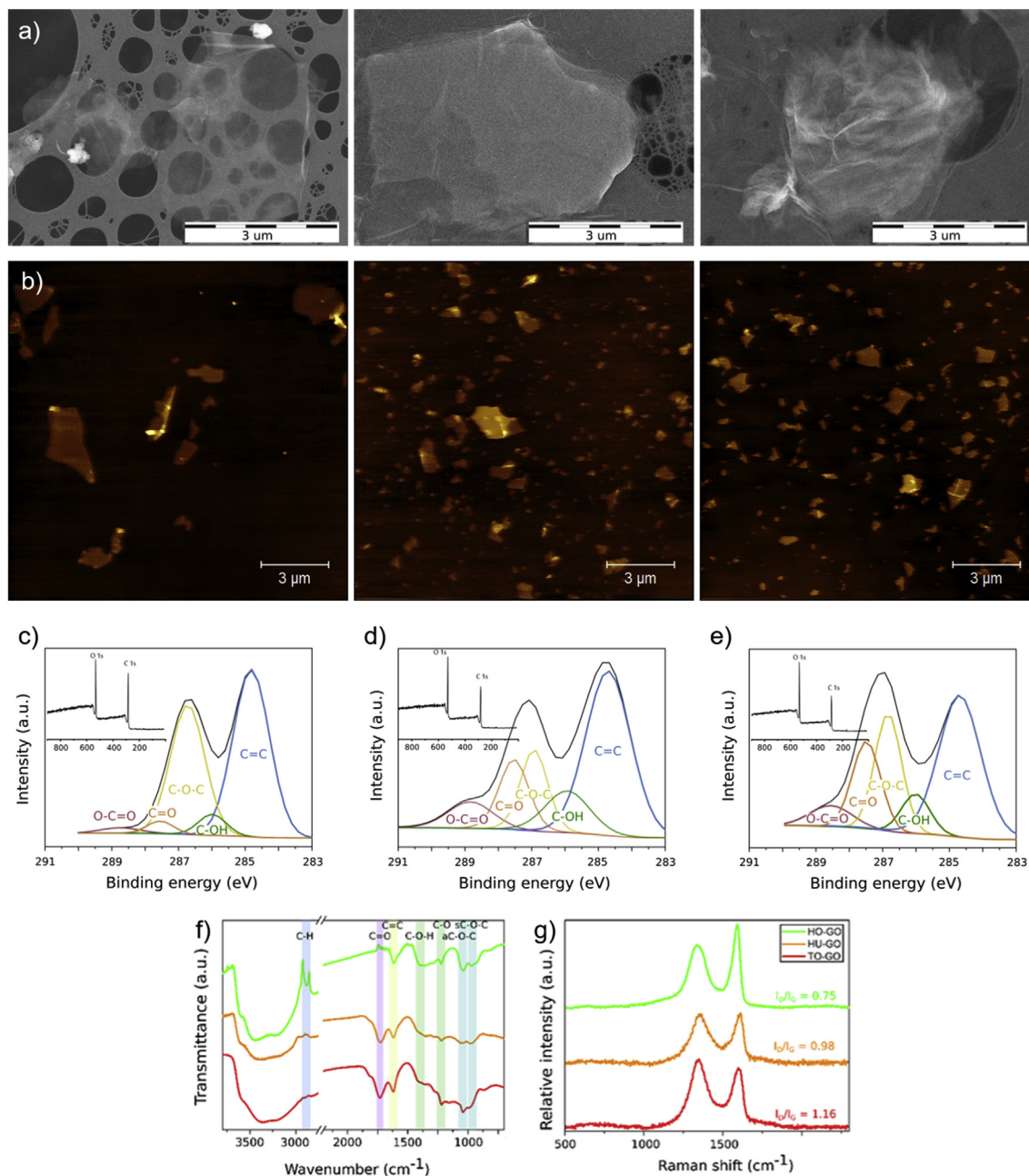


Fig. 1. Representative SEM images (a) and AFM images (b) of (from left to right) HO-GO, HU-GO, and TO-GO. Deconvoluted high-resolution C 1s XPS spectra of (c) HO-GO, (d) HU-GO, and (e) TO-GO. The insets in panels (c), (d), and (e) show the survey XPS spectra for the corresponding GO samples. (f) FTIR and (g) Raman spectra of HO-GO (green), HU-GO (orange), and TO-GO (red). The most important vibration bands in the FT-IR spectra are highlighted with different colors (sC-O-C: symmetric epoxy vibration; aC-O-C: asymmetric epoxy vibration). The Raman I_D/I_G ratios for HO-GO, HU-GO, and TO-GO are shown next to their Raman spectra. (A colour version of this figure can be viewed online.)

than the more highly oxidized HU-GO and TO-GO. This suggests that the interactions between GO and algae and cyanobacteria are sensitive to the physicochemical features of the GO. However, all three GO materials inhibited the growth of *S. elongatus* to a similar degree when applied at higher concentrations (from 100 $\mu\text{g/mL}$). Conversely, HO-GO inhibited the growth of *R. subcapitata* more strongly than HU-GO or TO-GO at all tested concentrations. This suggests that HO-GO (the least oxidized of the GO samples) affects the alga by some mode of action that does not occur with the cyanobacterium and higher concentrations of GOs (from 100 $\mu\text{g/mL}$) and which depends strongly on its surface properties. Second, the magnitude of the growth inhibiting effects for lower

concentrations (below 100 $\mu\text{g/mL}$) increased markedly when the incubation period was increased from 24 to 48 h, but not when it was increased from 48 h to 72 h, especially for algal cells. This could be due to the activation of defense mechanisms that allow the organisms to tolerate the presence of GOs in the culture medium.

3.3. Flow cytometry

No specific mechanism explaining the toxicity of carbon nano-materials and graphene derivatives towards algae has yet been proposed. Instead, their toxicity has been attributed to a combination of several factors [43]. To clarify this issue, we used flow

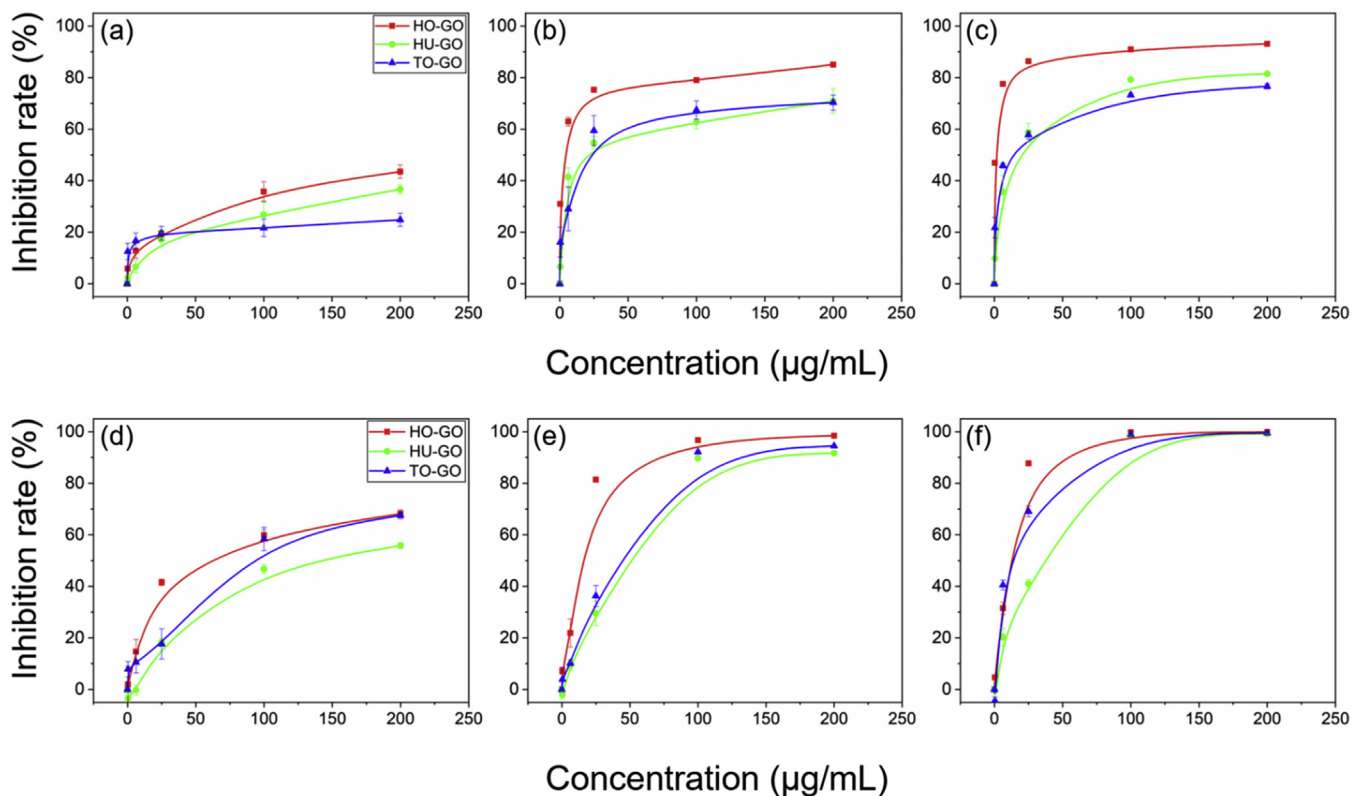


Fig. 2. Growth inhibition of (a–c) the alga *R. subcapitata* and (d–f) the cyanobacterium *S. elongatus* induced by incubation with GO systems at various concentrations over (a,d) 24 h, (b,e) 48 h, and (c,f) 72 h. The data were normalized by defining the growth rate of 100% for control cells not exposed to GO and the difference from 100% were used as an inhibition rate (e.g. the sample with 60% growth rate compared to control sample had the inhibition rate of 40%). (A colour version of this figure can be viewed online.)

cytometry to study the membrane integrity, ROS generation, and chlorophyll *a* and *b* contents of the alga *R. subcapitata* after incubation with GOs. Fig. 3 shows the results of the membrane integrity (panels a–c) and ROS generation (panels d–f) measurements. The most severe losses of membrane integrity occurred during the first 2 h of incubation with GOs (see Fig. 3a). HO-GO had stronger adverse effects on membrane integrity than the other GO systems, causing an integrity loss of around 50% at a concentration of 50 µg/mL. HU-GO and TO-GO were markedly less harmful: they only caused significant losses of integrity (13 and 29% for HU-GO and TO-GO, respectively) at the highest tested concentration (200 µg/mL). HO-GO also induced the highest level of ROS generation (see Fig. 3d), which is probably due to the algal cells' responses to membrane damage. In contrast, levels of ROS generation in cells exposed to HU-GO and TO-GO were similar to those for control cells. The membrane integrity measurements performed after incubations of 24 and 48 h (see Fig. 3b and c) strongly suggest a degree of membrane regeneration and the activation of some defense mechanism against GO toxicity. The only appreciable changes in membrane integrity after the first 2 h of incubation occurred when using the highest concentrations of HO-GO after 24 and 48 h (55 and 50% integrity loss, respectively) and TO-GO after 24 h (30% integrity loss). These data are consistent with the ROS formation measurements at the corresponding time points: significant levels of ROS were only detected at the highest concentrations of HO-GO and TO-GO (see Fig. 3e and f). This suggests that the mechanism of GO toxicity depends on the number of oxidized functional groups on its surface. The least oxidized GO system, HO-GO, caused the greatest degree of algal membrane damage and the highest levels of ROS generation, suggesting a direct interaction with the algal

cells that causes membrane damage and subsequent ROS generation. Conversely, the most oxidized GO system, TO-GO, imposed oxidative stress without significantly affecting membrane integrity; in this case, ROS generation was attributed to interactions between the algae and oxygen-containing groups on the GO surface. The intermediate GO system, HU-GO, presumably had sufficient surface functional groups to interact with the algae without damaging cell membranes, but too few surface functional groups to cause oxidative stress. To our knowledge, this is the first report describing such complex interactions between algae and graphene oxide materials. Furthermore, previous studies in this area found that the toxic effects of GO on algae were most pronounced after long incubation times, and did not reveal any evidence of an algal defense reaction during the first few hours of GO exposure [22,23,44].

Measurements of chlorophyll *a* and *b* levels in algal cells can complement cytotoxicity studies by shedding light on changes in the cells' metabolic and physiological state. As shown in Fig. 3g–i, the changes in the chlorophyll *a* and *b* levels of *R. subcapitata* cells exposed to GO correlated well with the observed changes in membrane integrity and oxidative stress, supporting our hypothesis that algae can regenerate and defend themselves against the detrimental effects of GOs in the growth medium. The cells' chlorophyll levels declined sharply during the first 2 h of exposure to the highest GO concentrations (by 44, 20, and 25%, respectively, for HO-GO, HU-GO, and TO-GO at 200 µg/mL), suggesting that the cells were adversely affected during the first few hours of GO exposure. However, chlorophyll levels rose after 24 h at almost all GO concentrations, in keeping with the activation of a defense mechanism and regeneration processes resulting in elevated metabolic activity. It has been reported that algae can increase their chlorophyll

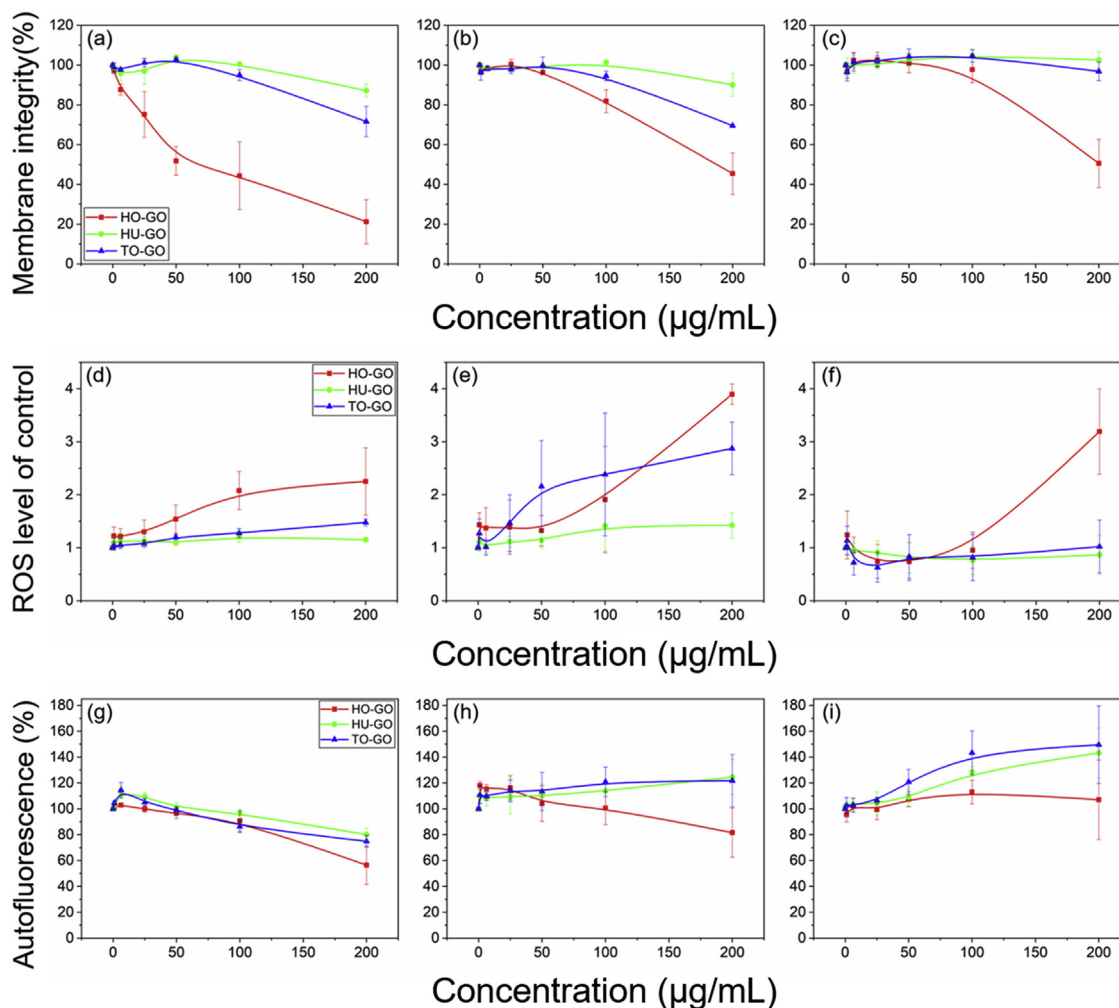


Fig. 3. Flow cytometric analysis of algal cells after incubation with different concentrations of GOs. (a–c) Membrane integrity loss after (a) 2 h, (b) 24 h, and (c) 48 h. (d–f) ROS generation after (d) 2 h, (e) 24 h, and (f) 48 h. (g–i) Chlorophyll *a* and *b* levels after (g) 2 h, (h) 24 h, and (i) 48 h. The data were normalized by defining a membrane integrity of 100%, an ROS level of 1, and a chlorophyll content of 100% as the corresponding values observed in control cells not exposed to GO. (A colour version of this figure can be viewed online.)

content under stressful conditions [45]. This claim is supported by the fact that the chlorophyll levels of algal cells exposed to the highest tested GO concentrations for 48 h were higher than those at the start of the experiment. Therefore, we can conclude that the higher concentration of GOs, the longer it takes algal cells to develop tolerance towards GOs. The flow cytometry data thus revealed that the toxic effects of GO are due to both mechanical and oxidative processes, and depend on the GO's degree of surface oxidation. The results presented here also indicate that the short-term effects of interactions between GO and algal cells differ from those observed after longer incubations. Presumably, the activation of defense mechanisms and regeneration processes to mitigate the detrimental effects of GO exposure reduces the amount of energy available to the cells for growth, causing them to proliferate more slowly than control cells.

3.4. Nutrient depletion by GOs and microscopic evaluation of algae after GO treatment

GOs with different degrees of oxidation removed nutrients from the algal growth medium (see Fig. 4a). The GO system with the lowest sorption capacity for phosphate and total phosphorus was HO-GO (i.e., the GO system with the lowest oxidation level),

possibly because of its hydrophobicity and tendency to aggregate. The most highly oxidized GO system, TO-GO, exhibited a substantially higher P sorption capacity (9.5% for total P). The sorption capacities of all three GOs for nitrate were higher than those for phosphate but lower than those for ammonium, and the nutrients exhibiting the highest removal from the algal growth medium were Ca and Mg. In both cases, the extent of removal correlated with the degree of oxidation of the GO system: the rates of Ca and Mg removal were highest (88 and 89%, respectively) for TO-GO. These results support the findings of Zhao et al., who concluded that K removal by graphene-family nanomaterials was very inefficient but the extent of Ca and Mg removal correlated positively with the oxygen content of GO [23]. Calcium and magnesium play key physiological roles in cell signaling, photosynthetic assimilation, and chlorophyll biosynthesis, so indirect toxicity resulting from their depletion (and that of other nutrients) could contribute significantly to the overall toxicity of GO towards algae and cyanobacteria. Notably, the sorption capacity of the GO systems correlated strongly with their content of oxygenated functional groups (and thus with their hydrophilicity) [46].

Microscopy was used to further probe the mechanisms of GO toxicity towards algae. Even low magnification optical micrographs clearly showed that all three GO systems interacted with algal cells,

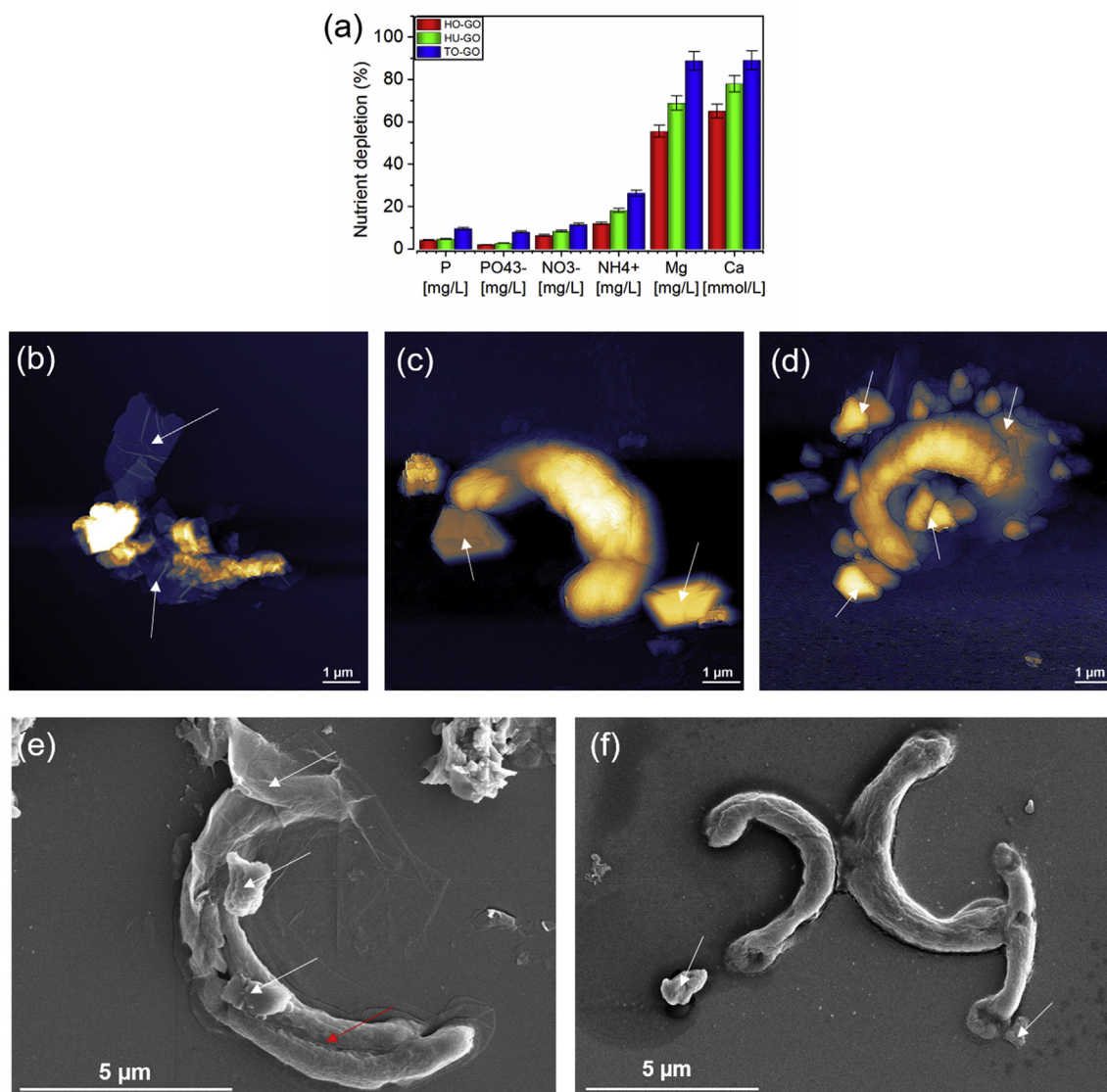


Fig. 4. (a) Nutrient depletion from 50% ZBB algal growth medium by GOs after 24 h of incubation at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The depletion of each nutrient is given in terms of the ratio of the nutrient's concentration in GO-containing media to that in GO-free control media, expressed as a percentage. (b–d) AFM images of algal cells after 24 h incubation with (b) HO-GO, (c) HU-GO, and (d) TO-GO at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (e,f) SEM images of algal cells after 24 h incubation with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of (e) HO-GO and (f) TO-GO. White arrows indicate GO sheets, and the red arrow in panel (e) indicates a cut on the cell surface. (A colour version of this figure can be viewed online.)

causing them to be surrounded by GO flakes (see Figs. S2a,c,e). Thus, during the incubations, GO flakes were in close contact with algal cells. This may have restricted the cells' access to light, which is known as the shading effect of carbon nanomaterials [47]. In addition, optical micrographs of fixed samples revealed that the algal cells were more extensively coated with HO-GO flakes than with flakes of HU-GO or TO-GO (see Figs. S2b,d,f). This confirmed our hypothesis that HO-GO interacts directly and physically with algal cells in a way that could cause mechanical damage. AFM imaging yielded deeper insight into this phenomenon, revealing that algal cells incubated with HO-GO were surrounded by GO flakes, and their shapes indicated that they were severely damaged (see Fig. 4b). Conversely, cells incubated with HU-GO or TO-GO were in close contact with GO sheets but their shapes were unaffected (see Fig. 4c and d). Cells incubated with TO-GO in particular were surrounded by many GO sheets, which presumably interact with the cells via the oxygenated functional groups on their surface; this may explain the relatively high ROS generation observed in algal

cells incubated with TO-GO (see Fig. 3e). The micrographs strongly suggest that the shading effect of GO contributes significantly to its toxicity because the presence of any large nanosheets in close proximity to the algal cells must appreciably reduce their access to incoming light. This would be expected to reduce the efficiency of photosynthesis and thus inhibit growth (see Fig. 2a–c) [22]. The SEM observations also confirmed that both the most and the least oxidized GO systems (i.e., TO-GO and HO-GO) form direct physical interactions with algal cells GO (see Fig. 4e and f). However, while cells incubated with HO-GO exhibited visible surface scarring, with HO-GO sheets penetrating into the cell membrane (see Fig. 4e), cells incubated with TO-GO were observed to be in close proximity to the GO sheets but undamaged (see Fig. 4f). HO-GO sheets can thus act as “nano-blades,” causing mechanical damage to algal cells. This phenomenon appears to be highly sensitive to the surface functionalization of the GO: the relative lack of carboxyl groups at the edges of HO-GO appears to be central to its ability to “cut” algal cell membranes in this way.

3.5. Determination of extracellular proteins and carbohydrates

Algae and cyanobacteria have lived in the presence of natural carbon nanoparticles for millions of years, resulting in the evolution of natural defense mechanisms that prevent long-term injury of phytoplankton and phytobenthic populations in real aquatic ecosystems. Our experimental data show that both the cyanobacterium *S. elongatus* and the alga *R. subcapitata* started producing extracellular proteins and carbohydrates (EPCs) within an hour of GO exposure. Moreover, EPC production increased with the length of the incubation: the EPC production of both the algae and the cyanobacteria after 2 h' exposure was only slightly above that in control cells, but incubations of 24 h or 48 h resulted in very pronounced increases in EPC production (see Fig. 5). The largest increase in algal protein production (59%) was induced by exposure to HO-GO, but HU-GO and TO-GO also induced significant increases (30 and 35%, respectively; see Fig. 5a). The increases in carbohydrate production were less pronounced, but the trends were identical to those for proteins, with more highly oxidized GO systems inducing lower levels of production (see Fig. 5b). These findings are fully consistent with the conclusions drawn from the flow cytometry data (see Fig. 3): algal cells exposed to HO-GO suffered mechanical damage and thus exhibited a stronger defense reaction and more intense regeneration activity than cells exposed to other GO systems, resulting in greater production of proteins and carbohydrates. HU-GO and TO-GO did not cause mechanical damage to the cells, but their high content of oxygenated surface groups promoted oxidative damage, activating the algal defense response. In cyanobacteria, exposure to more highly oxidized GO systems caused lower increases in the production of extracellular proteins (53%, 30%, and 21% for HO-GO, HU-GO, and TO-GO, respectively; Fig. 5c) and carbohydrates (32%, 21%, and 11% for HO-GO, HU-GO, and TO-GO, respectively; Fig. 5d). This is consistent with the comparative weakness of the defense mechanisms in cyanobacteria and the stronger inhibition of their growth by GO systems (see Fig. 2). As noted above, this outcome is unsurprising because cyanobacteria are prokaryotes with simpler

cellular structures than algae, and GO is known to have significant antibacterial activity [9].

Recent studies on the mechanisms of GO ecotoxicity have neglected their effects on EPC production, which is a major drawback because EPC biosynthesis is vital for the long-term survival of phytoplankton assemblages in aquatic ecosystems. Despite the concerns that have been expressed about the potential ecotoxicity of GO, our results indicate that GO causes only short-term damage to algal and cyanobacterial populations, and that within 24 h of GO exposure, these microorganisms start producing EPCs that protect them against the detrimental effects of GO systems and particularly the membrane-damaging “nano-blade” activity of GO systems with low levels of surface oxidation. EPC production thus enhances the recovery capacity of algal populations but may lead to the incorporation of GO-organic aggregates into the aquatic food web.

4. Conclusion

We have thoroughly described the interactions of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* and the green alga *Raphidocelis subcapitata* with three GO systems having different degrees of oxidation. This is the first study on GO ecotoxicity to examine cyanobacteria and to show that cyanobacteria may be more sensitive to GO than algae. The results obtained reveal that GO exerts growth-inhibiting effects via several mechanisms of action. These mechanisms include known indirect processes such as nutrient absorption and shading, as well as an entirely new mechanism observed in *R. subcapitata* whereby GO sheets with a low degree of surface oxidation act as “nano-blades” that cause mechanical damage to cell membranes. More highly oxidized GO systems do not cause damage in this way because their extensive surface functionalization prevents direct physical interaction with algal cell membranes. We also present the first evidence that algae can dynamically protect themselves against the toxic effects of GOs by secreting extracellular proteins and carbohydrates into the culture media. These results show that the chemical composition of GO, and particularly its degree of oxidation, must be taken into account

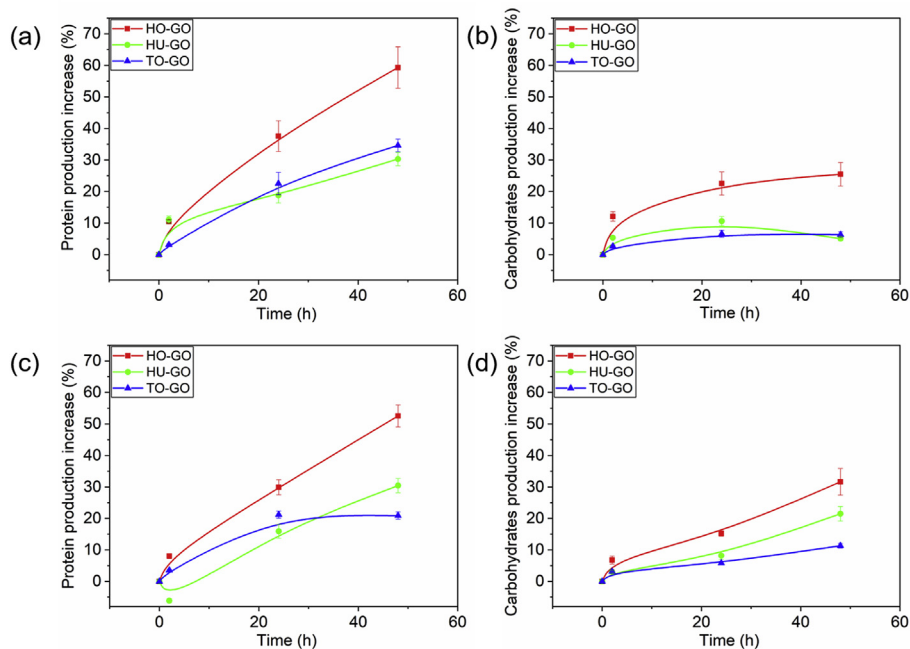


Fig. 5. Changes in (a,c) protein and (b,d) carbohydrate production (%) relative to that in control cells of (a,b) *R. subcapitata* and (c,d) *S. elongatus* after 2, 24, and 48 h of incubation with HO-GO, HU-GO, and TO-GO material. (A colour version of this figure can be viewed online.)

when considering its likely ecotoxicity in aquatic environments. However, the observed self-defense mechanisms indicate that the general long-term environmental risks of GO may be significantly lower than has been suggested.

Declarations of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Ariana Opletalová and Ms. Jana Stráská for AFM measurements, Dr. Cecilia Maria Reyes Pérez for SEM measurements, and Mr. Martin Petr for XPS measurements (all from the Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Czech Republic). This work is supported by the project No. DG16P02M041 of the Ministry of Culture (“Biotic Threats to Garden Monuments: Algae, Cyanobacteria and Invasive Plant Species”). The authors also gratefully acknowledge the support of project No. CZ.1.05/2.1.00/19.0377 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, support from the Operational Programme Research, Development and Education – European Regional Development Fund, project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000754 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, project NanoEnvi: Research Infrastructure NanoEnviCz, supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under Project No. LM2015073 and the support from the Internal Grant Agency of the Palacký University in Olomouc (project No. IGA_PrF_2019_033).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.08.086>.

References

- [1] K. Novoselov, A. Geim, S. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. Dubonos, I. Grigorieva, A. Firsov, Electric field effect in atomically thin carbon films, *Science* 306 (5696) (2004) 666–669.
- [2] K. Novoselov, V. Fal'ko, L. Colombo, P. Gellert, M. Schwab, K. Kim, A roadmap for graphene, *Nature* 490 (7419) (2012) 192–200.
- [3] R. Ruoff, Graphene: calling all chemists, *Nat. Nanotechnol.* 3 (1) (2008) 10–11.
- [4] Y. Zhu, S. Murali, W. Cai, X. Li, J. Suk, J. Potts, R. Ruoff, Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications, *Adv. Mater.* 22 (35) (2010) 3906–3924.
- [5] S. Park, J. An, I. Jung, R.D. Piner, S.J. An, X. Li, A. Velamakanni, R.S. Ruoff, Colloidal suspensions of highly reduced graphene oxide in a wide variety of organic solvents, *Nano Lett.* 9 (4) (2009) 1593–1597.
- [6] V.C. Sanchez, A. Jachak, R.H. Hurt, A.B. Kane, Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (1) (2012) 15–34.
- [7] E. Hondroulis, Z. Zhang, C. Chen, C. Li, Impedance based nanotoxicity assessment of graphene nanomaterials at the cellular and tissue level, *Anal. Lett.* 45 (2–3) (2012) 272–282.
- [8] K.H. Liao, Y.S. Lin, C.W. Macosko, C.L. Haynes, Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3 (7) (2011) 2607–2615.
- [9] S. Liu, T.H. Zeng, M. Hofmann, E. Burcombe, J. Wei, R. Jiang, J. Kong, Y. Chen, Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress, *ACS Nano* 5 (9) (2011) 6971–6980.
- [10] C. Fu, T. Liu, L. Li, H. Liu, Q. Liang, X. Meng, Effects of graphene oxide on the development of offspring mice in lactation period, *Biomaterials* 40 (2015) 23–31.
- [11] J. Lanphere, B. Rogers, C. Luth, C. Bolster, S. Walker, Stability and transport of graphene oxide nanoparticles in groundwater and surface water, *Environ. Eng. Sci.* 31 (7) (2014) 350–359.
- [12] L. Mao, C. Liu, K. Lu, Y. Su, C. Gu, Q. Huang, E.J. Petersen, Exposure of few layer graphene to *Limnodrilus hoffmeisteri* modifies the graphene and changes its bioaccumulation by other organisms, *Carbon* 109 (2016) 566–574.
- [13] K. Lu, S. Dong, E. Petersen, J. Niu, X. Chang, P. Wang, S. Lin, S. Gao, L. Mao, Biological uptake, distribution, and depuration of radio-labeled graphene in adult zebrafish: effects of graphene size and natural organic matter, *ACS Nano* 11 (3) (2017) 2872–2885.
- [14] C. Hendren, X. Mesnard, J. Droge, M. Wiesner, Estimating production data for five engineered nanomaterials as a basis for exposure assessment, *Environ. Sci. Technol.* 45 (7) (2011) 2562–2569.
- [15] Y. Zhu, H. Ji, H.-M. Cheng, R.S. Ruoff, Mass production and industrial applications of graphene materials, *Nat. Sci. Rev.* 5 (1) (2018) 90–101.
- [16] K.G. Zhou, K.S. Vasu, C.T. Cherian, M. Neek-Amal, J.C. Zhang, H. Ghorbanfekr-Kalashami, K. Huang, O.P. Marshall, V.G. Kravets, J. Abraham, Y. Su, A.N. Grigorenko, A. Pratt, A.K. Geim, F.M. Peeters, K.S. Novoselov, R.R. Nair, Electrically controlled water permeation through graphene oxide membranes, *Nature* 559 (7713) (2018) 236–240.
- [17] J. Abraham, K.S. Vasu, C.D. Williams, K. Gopinadhan, Y. Su, C.T. Cherian, J. Dix, E. Prestat, S.J. Haigh, I.V. Grigorieva, P. Carbone, A.K. Geim, R.R. Nair, Tunable sieving of ions using graphene oxide membranes, *Nat. Nanotechnol.* 12 (6) (2017) 546–550.
- [18] M. Crane, R. Handy, J. Garrod, R. Owen, Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles, *Ecotoxicology* 17 (5) (2008) 421–437.
- [19] A. Seabra, A. Paula, R. de Lima, O. Alves, N. Duran, Nanotoxicity of graphene and graphene oxide, *Chem. Res. Toxicol.* 27 (2) (2014) 159–168.
- [20] J. Brodie, C.X. Chan, O. De Clerck, J.M. Cock, S.M. Coelho, C. Gachon, A.R. Grossman, T. Mock, J.A. Raven, A.G. Smith, H.S. Yoon, D. Bhattacharya, The algal revolution, *Trends Plant Sci.* 22 (8) (2017) 726–738.
- [21] P.G. Falkowski, M.E. Katz, A.H. Knoll, A. Quigg, J.A. Raven, O. Schofield, F.J. Taylor, The evolution of modern eukaryotic phytoplankton, *Science* 305 (5682) (2004) 354–360.
- [22] P.F. Nogueira, D. Nakabayashi, V. Zucolotto, The effects of graphene oxide on green algae *Raphidocelis subcapitata*, *Aquat. Toxicol.* 166 (2015) 29–35.
- [23] J. Zhao, X. Cao, Z. Wang, Y. Dai, B. Xing, Mechanistic understanding toward the toxicity of graphene-family materials to freshwater algae, *Water Res.* 111 (2017) 18–27.
- [24] X. Hu, S. Ouyang, L. Mu, J. An, Q. Zhou, Effects of graphene oxide and oxidized carbon nanotubes on the cellular division, microstructure, uptake, oxidative stress, and metabolic profiles, *Environ. Sci. Technol.* 49 (18) (2015) 10825–10833.
- [25] M. Wahid, E. Eroglu, X. Chen, S. Smith, C. Raston, Entrapment of *Chlorella vulgaris* cells within graphene oxide layers, *RSC Adv.* 3 (22) (2013) 8180–8183.
- [26] J. Zhao, Z. Wang, J. White, B. Xing, Graphene in the aquatic environment: adsorption, dispersion, toxicity and transformation, *Environ. Sci. Technol.* 48 (17) (2014) 9995–10009.
- [27] B. Fadeel, C. Bussy, S. Merino, E. Vázquez, E. Flahaut, F. Mouchet, L. Evariste, L. Gauthier, A.J. Koivisto, U. Vogel, C. Martín, L.G. Delogu, T. Buerki-Thurnherr, P. Wick, D. Beloin-Saint-Pierre, R. Hischer, M. Pelin, F. Candotto Carniel, M. Treiachi, F. Cesca, F. Benfenati, D. Scaini, L. Ballerini, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco, Safety assessment of graphene-based materials: focus on human health and the environment, *ACS Nano* 12 (11) (2018) 10582–10620.
- [28] U. Hofmann, E. König, Untersuchungen über Graphitoxyd, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 234 (4) (1937) 311–336.
- [29] W. Hummers, R. Offeman, Preparation of graphitic oxide, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (6) (1958) 1339–1339.
- [30] D. Marcano, D. Kosynkin, J. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L. Alemany, W. Lu, J. Tour, Improved synthesis of graphene oxide, *ACS Nano* 4 (8) (2010) 4806–4814.
- [31] E. Chng, M. Pumera, The toxicity of graphene oxides: dependence on the oxidative methods used, *Chem. Eur. J.* 19 (25) (2013) 8227–8235.
- [32] OECD, Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD Publishing, Paris, 2011.
- [33] ISO 8692, Water Quality – Fresh Water Algal Growth Inhibition Test with Unicellular Green Algae, 2012.
- [34] J. Garcia-Plazaola, B. Fernandez-Marin, S. Duke, A. Hernandez, F. Lopez-Arbeloa, J. Becerril, Autofluorescence, Biological functions and technical applications, *Plant Sci.* 236 (2015) 136–145.
- [35] T. Teplicky, M. Danisova, M. Valica, D. Chorvat, A. Chorvatova, Fluorescence properties of *Chlorella* sp. algae, *Adv. Electr. Electron. Eng.* 15 (2) (2017) 352–357.
- [36] M. Monici, Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications, *Biotechnol. Annu. Rev.* 11 (2005) 227–256.
- [37] M. Dubois, K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (3) (1956) 350–356.
- [38] O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr, R. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1) (1951) 265–275.
- [39] M. Mermoux, Y. Chabre, A. Rousseau, FTIR and C-13 NMR-study of graphite oxide, *Carbon* 29 (3) (1991) 469–474.
- [40] D. Lin-Vien, B.N. Colthup, G.W. Fateley, G.J. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, San Diego, 1991, pp. 61–72.
- [41] C. Chua, Z. Sofer, M. Pumera, Graphite oxides: effects of permanganate and chlorate oxidants on the oxygen composition, *Chem. Eur. J.* 18 (42) (2012) 13453–13459.
- [42] X. Hu, K. Lu, L. Mu, J. Kang, Q. Zhou, Interactions between graphene oxide and plant cells: regulation of cell morphology, uptake, organelle damage,

- oxidative effects and metabolic disorders, *Carbon* 80 (2014) 665–676.
- [43] Z. Long, J. Ji, K. Yang, D. Lin, F. Wu, Systematic and quantitative investigation of the mechanism of carbon nanotubes' toxicity toward algae, *Environ. Sci. Technol.* 46 (15) (2012) 8458–8466.
- [44] S. Du, P. Zhang, R. Zhang, Q. Lu, L. Liu, X. Bao, H. Liu, Reduced graphene oxide induces cytotoxicity and inhibits photosynthetic performance of the green alga *Scenedesmus obliquus*, *Chemosphere* 164 (2016) 499–507.
- [45] V. da Silva Ferreira, C. Sant'Anna, Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33 (1) (2017) 20.
- [46] K. Klimova, M. Pumera, J. Luxa, O. Jankovsky, D. Sedmidubsky, S. Matejkova, Z. Sofer, Graphene oxide sorption capacity toward elements over the whole periodic table: a comparative study, *J. Phys. Chem. C* 120 (42) (2016) 24203–24212.
- [47] F. Schwab, T.D. Bucheli, L.P. Lukhele, A. Magrez, B. Nowack, L. Sigg, K. Knauer, Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? *Environ. Sci. Technol.* 45 (14) (2011) 6136–6144.



The environmental fate of graphene oxide in aquatic environment—Complete mitigation of its acute toxicity to planktonic and benthic crustaceans by algae



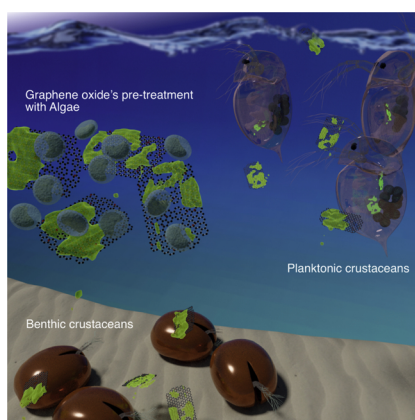
Tomáš Malina^{a,b,c}, Eliška Maršálová^a, Kateřina Holá^b, Radek Zbořil^{b,*}, Blahoslav Maršálek^{a,b,*}

^a Institute of Botany, Czech Academy of Sciences, Lidická 25/27, 602 00 Brno, Czech Republic

^b Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

^c Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Editor: R Teresa

Keywords:

Graphene oxide
Aquatic crustaceans
Toxicity mitigation
Algae
Aquatic environment

ABSTRACT

Graphene oxide (GO) as the most studied hydrophilic graphene derivative can be deployed in a broad spectrum of environmental technologies opening the issue of its ecotoxicity. Nevertheless, the information about its behavior in complex aquatic environment is still not sufficient. Here, we studied the interaction of three differently oxidized GO systems with planktonic and benthic crustaceans. By standard toxicity tests, we observed the importance of feeding strategy as well as the surface oxidation of GO with respect to GO's ecotoxicity. However, to gain a clearer insight into GO's environmental fate, we introduced a pre-treatment with algae as the most common source of food for crustaceans. Such an adjustment mimicking the conditions in real aquatic ecosystems resulted in complete mitigation of acute toxicity of GOs to all organisms and, more importantly, to the eradication of oxidative stress caused by GOs. We argue, that the pre-exposition of food is a crucial factor in GO's overall environmental fate, even though this fact has been completely neglected in recent studies. These ex-

* Corresponding authors at: Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic and Institute of Botany, Czech Academy of Sciences, Lidická 25/27, 602 00 Brno, Czech Republic

E-mail addresses: radek.zboril@upol.cz (R. Zbořil), blahoslav.marsalek@ibot.cas.cz (B. Maršálek).

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123027>

Received 22 January 2020; Received in revised form 21 May 2020; Accepted 24 May 2020

Available online 27 May 2020

0304-3894/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

periments proved that GO is not a hazardous material in complex aquatic environments because its acute toxicity can be successfully mitigated through the interaction with algae even at very high concentrations (25 mg/L).

1. Introduction

Graphene oxide (GO) represents one of the most studied two-dimensional carbon nanomaterials over the last decade. GO is a dominant derivative of graphene with a similarly high surface area and numerous hydroxyl, epoxide, carboxyl, and carbonyl functional groups on its basal planes and edges (Chen et al., 2012; Zhu et al., 2010). In addition to the two-dimensional structure and exceptional physicochemical properties, the presence of oxygen-containing groups on the surface gives GO excellent dispersibility in many solvents, particularly in water (Compton and Nguyen, 2010). That makes GO an attractive material for fundamental research as well as for many applications including adsorption, filtration, desalination, and biomedicine (Abraham et al., 2017; Celebi et al., 2014; Zhou et al., 2018). Given the interest in GO research and the boom in its production in recent years, it is inevitable that it will eventually leak or be released into the natural environment, aquatic ecosystems in particular (Zhu et al., 2018). Therefore, one of the biggest advantages of GO, which is its high hydrophilicity and mobility in water, can quickly turn into an ecological challenge. It has been previously reported that graphene family materials have a strong tendency to accumulate in bodies of organisms and influence the food chain of aquatic ecosystem (Lu et al., 2017; Mao et al., 2016). Similar behavior can be expected in GO as it would intensively interact with aquatic organisms. In order to tackle the concerns regarding GO ecotoxicity and its fate in aquatic environment, it is essential to understand its potential toxic mechanism against aquatic organisms. However, the interaction of GO with organisms in freshwater ecosystems has barely been investigated.

Once the graphene oxide enters the water environment, it will eventually get in contact with both planktonic and benthic crustaceans. Due to the crustaceans' size (mm range), the GO nanoflakes can interact either with the body, skin, and gills or get ingested and affect the inside of those organisms. Crustaceans have an important role as primary consumers in the food chain of freshwater ponds and lakes, but they have also recently become model species for the potential behavior and toxicology effects of newly developed materials (Ebert, 2005). Their bodies have an overall length ranging from 1 to 5 mm and are enclosed by an uncalcified shell, which is largely made of the polysaccharide chitin (planktonic crustaceans) or by calcified carapax that envelops their whole body (benthic crustaceans) (Martens et al., 2008). The other important behavior is their feeding strategy. While planktonic crustaceans are suspension feeders (filter-feeders) that feed on small, suspended particles in the water, with planktonic algae being the most common type of food (Ebert, 2005), the benthic crustaceans feed on different types of food in the sediments (Martens et al., 2008). There are even reports that benthic crustaceans are able to select their preferable food (Schmit et al., 2007).

Even though the awareness of graphene oxide's potential ecotoxicity has been raised in recent years, there is still lack of studies dealing with the interaction of GO with the aquatic crustaceans, which represent an essential component of freshwater food web (Freixa et al., 2018). There are several studies investigating the possible ecotoxicity of GO towards *Daphnia magna*. Lv et al. found that GO caused acute toxicity after 72 h to *D. magna* at a concentration of 45 mg/L, which is most likely caused by oxidative stress. They have also demonstrated that there is a direct link between bioaccumulation of GO and oxidative stress in *Daphnia*'s guts (Lv et al., 2018). Other studies have shown that GO can cause a chronic toxicity to *D. magna* and *Ceriodaphnia dubia* even at very low concentrations (1 mg/L), significantly inhibiting both growth and reproduction (Liu et al., 2018; Souza et al., 2018). Despite an indication

that oxidative stress plays a role in the acute toxicity of GO towards crustaceans, further details about its toxic mechanism are still required.

We have evaluated acute toxicity of three GO systems synthesized by combining three different methods of synthesis (the Hofmann, Hummers, and Tour protocols) that resulted in three different levels of oxidation (HO-GO, HU-GO, and TO-GO sample) against planktonic crustaceans *Daphnia magna* (the most commonly used crustacean in toxicity testing (Adema, 1978; Liu et al., 2019)) and *Thamnocephalus platyurus* (crustacean with high sensitivity to toxicants (Blinova et al., 2018; Tarczynska et al., 2001)) and benthic crustacean *Heterocypris incongruens* (widespread freshwater crustacean used in soil and sediment monitoring (Hamdi et al., 2006; Manzo et al., 2008)). Detailed information about the synthesis and characterization of the materials were shown in our previous work (Malina et al., 2019). We tested the GO's effect on the viability of crustaceans, used Raman measurements of guts and feces to observe the potential difference in the excretion, and evaluated the potential of GO to cause oxidative stress to *Daphnia magna* by three biomarkers (reactive oxygen species—ROS; superoxide dismutase—SOD; and catalase—CAT activity). The results presented here are the first evaluation of differently oxidized GO ecotoxicity against planktonic and benthic crustaceans, especially *Thamnocephalus* and *Heterocypris*, that have never been used in a study on GO before.

We have previously shown that even the unicellular organisms (Algae and Cyanobacteria) are able to successfully mitigate the GO's toxic mechanisms through protein and carbohydrate production (Malina et al., 2019). Hence, we wanted to obtain additional information regarding this theory on the level of multicellular organisms. Furthermore, algae are the most common type of food for both aquatic and benthic crustaceans; therefore, this study can bring a new and vital insight into the fate of graphene oxide in complex aquatic environments as these conditions realistically simulate the interaction of GOs in an aquatic food web. Thus, we performed the same assays, but we added a first step in which GOs were incubated for 24 h with the alga *Chlorella kessleri*. We found that this simple addition, which better imitated the conditions in real aquatic ecosystems, would result in the mitigation of GOs' acute toxicity (both in viability and oxidative stress) to the tested organisms (both planktonic and benthic).

2. Materials and methods

2.1. Test organisms

From Ostracods, a class of the Crustacea, species *Heterocypris incongruens* was used for tests. These organisms were hatched from cysts that were included in Toxkit Ostracodtoxkit F (Microbiotest, Belgium). The test species *Thamnocephalus platyurus*, a freshwater crustacean, was hatched from cysts from Thamnotoxkit F (Microbiotests, Belgium). *Daphnia magna*, a small planktonic crustacean originated from Daphtoxkit F (Microbiotests, Belgium) *Daphnia magna* ephippia. Nowadays, we have our own test organisms cultured and maintained according to ISO and OECD standards (stock animals were cultured in M4 medium, see Supporting Information for medium composition). Alga *Chlorella kessleri*, a synonym for *Parachlorella kessleri* (Fott & Nováková) Krienitz, E.H.Hegewald, Hepperle, V.Huss, T.Rohr & M.Wolf, strain LARG/1 originated from CCALA Třeboň (Czech Republic) as a representative of common coccal algae was used in tests.

2.2. Acute toxicity tests

The acute toxicity tests of all organisms were performed for concentrations of 0.39, 1.56, 6.25, and 25 mg/L of GOs. The modifications

made for each organism are described below in greater detail.

Daphnia magna: A modified acute toxicity test (ISO 6341 (2018)) was used for *Daphnia magna*. A medium for a routine culture of daphnids was used for the test (M4 medium, see Supporting Information for composition). Then young daphnids, aged less than 24 h at the start of the test, were exposed to GOs. Test tubes were used instead of multiwell test plates. Fifteen daphnids were exposed to 30 mL of each solution. To keep GOs in a water column, the aeration from the bottom of test tubes was used. The test included the room temperature and 12/12 h day/night light period. The viability was scored after 48 h and compared with control samples (samples without GOs exposition).

Thamnocephalus platyurus: To test acute toxicity of GOs against *Thamnocephalus platyurus*, Thamnotoxkit F (MicroBioTests, Belgium), which has been approved by the International Organization for Standardization (ISO 14380 (2011)), was used. This assay is usually performed in a multiwell test plate composed of 6×4 wells. Thamnotoxkit F contains all the necessary materials including cysts from which *Thamnocephalus platyurus* was hatched. Standard freshwater was prepared from deionized water and the 5 vials of concentrated salt solution were prepared according to standard operational procedure. Modification of

this assay was used. The exposition was prolonged from 24 to 48 h, for this reason aeration was applied to the test tubes, which were used instead of multiwell plates. Ten individuals per 10 mL in each test tube were incubated with GOs for 48 h under the room temperature, day and night light conditions. Subsequently, the viability of organisms was evaluated.

Heterocypris incongruens: Modification of Ostracodtoxkit F (MicroBioTests, Belgium), which has been approved by the International Organization for Standardization (ISO 14371 (2012)), was used to test acute toxicity of GOs against *Heterocypris incongruens*. Multiwell test plates were used for the standard operational procedure as well as for hatching the organisms from cysts. The viability of ostracods was determined after 6 days of exposure. The difference from the standard test consisted in the fact that the wells were filled only with GOs and not with the sediments. Multiwell plate with 10 ostracods in each well was incubated at 25 °C in darkness.

2.3. Oxidative stress assay

The oxidative stress production in *Daphnia magna* was determined after 48 h of incubation with 1 and 25 mg/L concentrations of HO-GO,

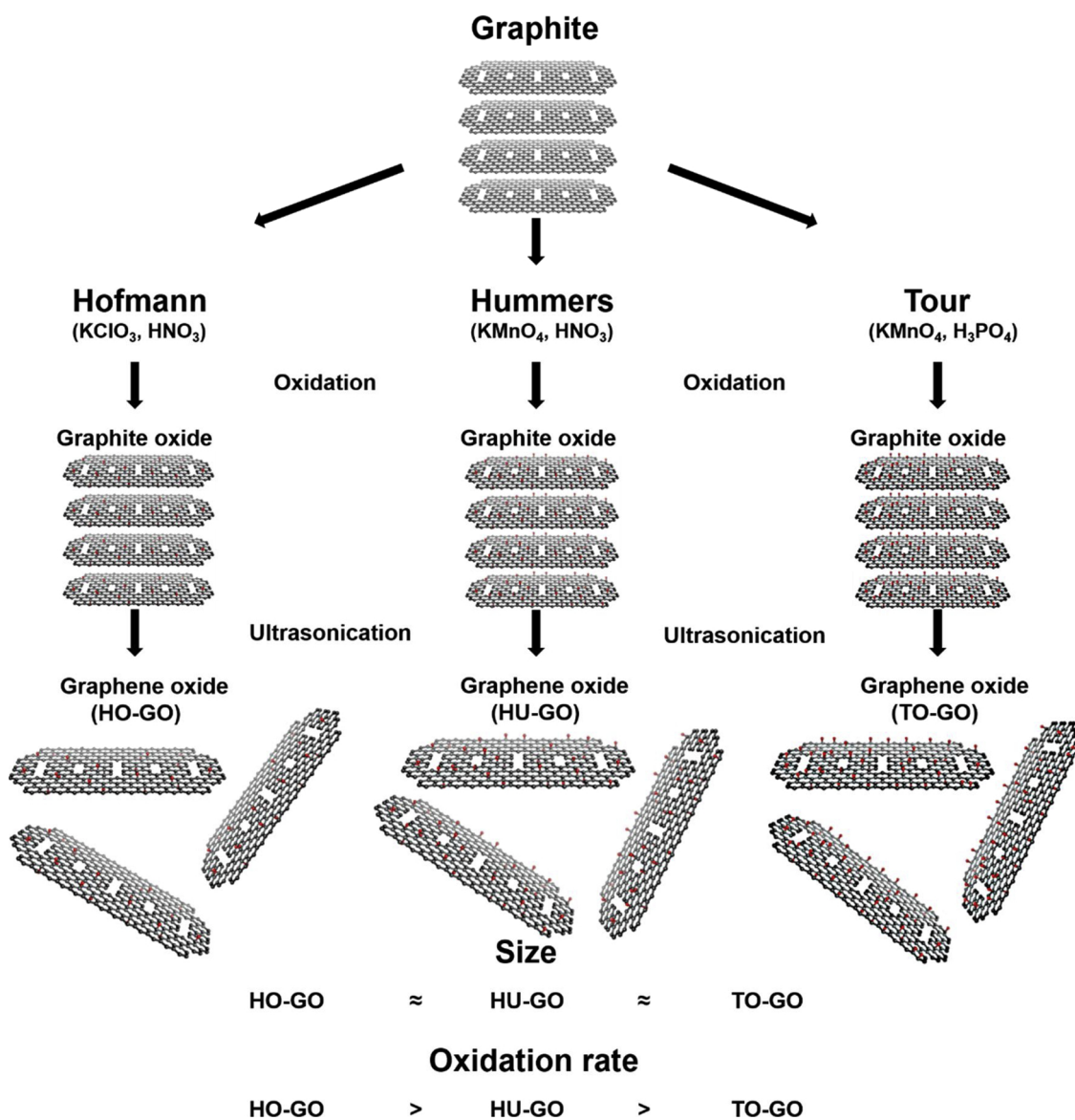


Fig. 1. Schematic of Hofmann, Hummers, and Tour protocols for synthesis of graphene oxides from graphite. Different oxidants used resulted in the three graphene oxide systems with similar size, but with different level of surface oxidation.

HU-GO, and TO-GO. We chose three biomarkers for the oxidative stress determination. The first biomarker was the fluorescence probe H₂-DCFDA (Thermo Fisher Scientific, USA), which indicated the presence of hydroxyl, peroxy radicals and other types of ROS. After 48 h of incubation with each material, we put two individuals in the well of 96-well plate, added 200 µL of medium with the H₂-DCFDA (final concentration 10 µM), and incubated the plate for 2 h at room temperature in the dark. After that we replaced the medium by the fresh cultivation one without the probe and measured fluorescence on the plate reader (setup: excitation 485 nm/emission 520 nm). The setup was designed to measure the fluorescence every 5 min for the 2 h to get the value of the increase in the ROS level per minute. We used 10 individuals for one experiment.

The other two biomarkers were the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) that gave information about the response of *Daphnia* to the oxidative stress. We incubated 15 individuals per sample for 48 h with 1 and 25 mg/L of HO-GO, HU-GO, and TO-GO. Then, we homogenized the samples in 150 µL of cold PBS, centrifuged samples at 10,000 g for 10 min (4 °C), measured the protein level using Bradford assay (Bradford, 1976) and performed SOD and CAT activity colorimetric assays according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.4. Optical microscopy and Raman measurements after GO treatment

For optical microscopy, the organisms were incubated for 24 h (*Daphnia*) and 96 h (*Heterocypris*) with 25 mg/L of HO-GO to obtain representative image of GO exposition. Then, the organisms were dropped on the slide and optical microscopy images were taken

(Olympus, Japan). The optical microscopy was conducted also on the samples with 24 h algae pre-treatment. For Raman measurements, organisms were incubated for 24 h with 25 mg/L of HO-GO, HU-GO, and TO-GO. Then, the feces of organisms were collected and also the SZX7 stereo microscope Olympus was used to dissect guts by entomology tools. After collection, 10 µL the mixture of guts and feces was dropped on the CaF₂ Raman grade 13 mm dia by 0.5 mm polished disc and the measurement was performed on DRX Raman microscope of Raman spectroscopy. To check if the introduction of the pre-treatment of materials with algae would change the exposition of organisms to materials, we have incubated 25 mg/L of the materials with the *Chlorella kessleri* (3×10^6 cells, 24 h) and then followed the same protocol as described above.

2.5. Assays with algae-GO pre-treatment

For acute toxicity assays of all organisms and oxidative stress assay of *Daphnia magna*, we added a first step, which was a pre-treatment of the materials with alga *Chlorella kessleri*. We incubated the samples with *Chlorella* (3×10^6 cells/mL, 24 h) for 24 h using culture rotator FalcF205 (FALC INSTRUMENTS, Italy). Further, the tested organism was added and we performed the same protocol as described above. *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna* were exposed to the 25% ZBB medium (see Supporting Information for composition) for 48 h before the experiment. No impact of the change of the media was found (data not shown).

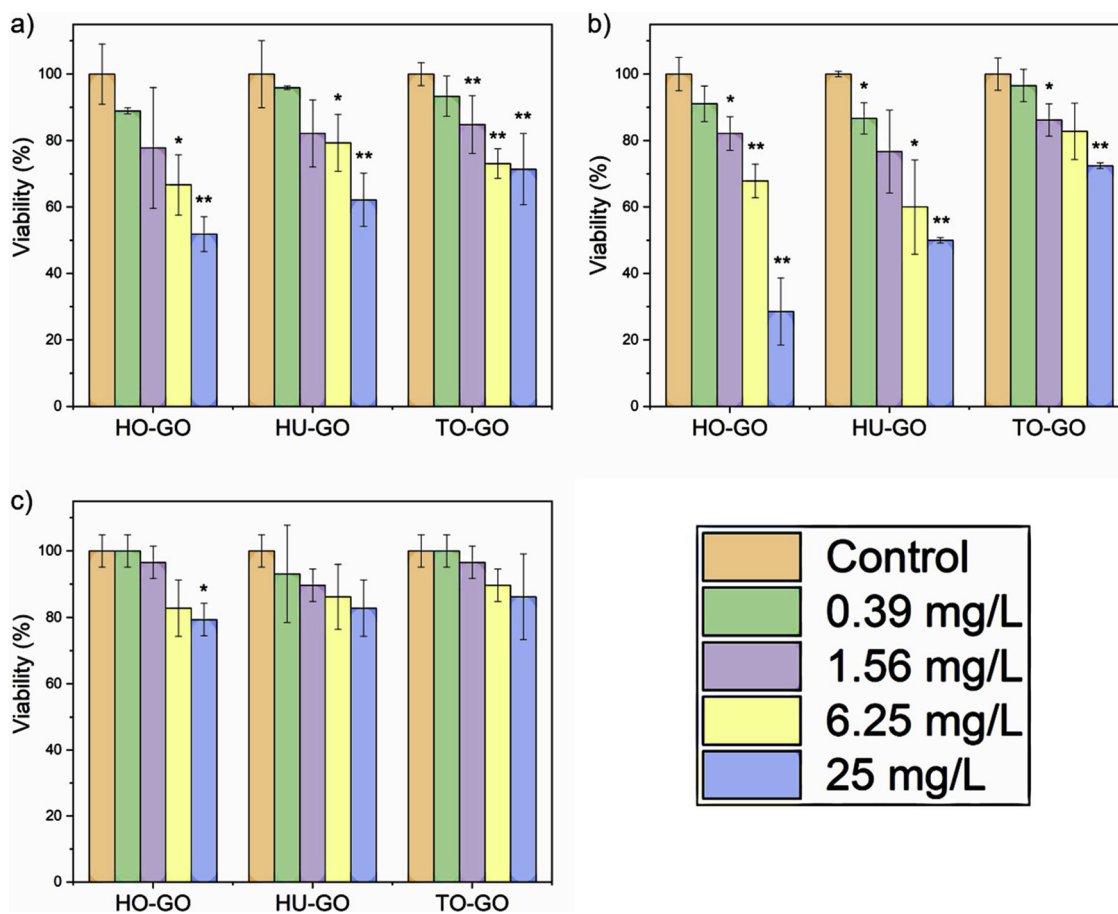


Fig. 2. The viability of planktonic crustaceans a) *Daphnia magna* and b) *Thamnocephalus platyurus* after 48 h of incubation with various concentrations of HO-GO, HU-GO, and TO-GO. The viability of benthic crustacean c) *Heterocypris incongruens* after 6 days of incubation with various concentrations of HO-GO, HU-GO, and TO-GO. The results were normalized for control sample to have 100% viability. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2.6. Statistical analysis

We performed three independent experiments for each measurement and the mean \pm standard deviation (SD) was calculated. Dixon's Q test was performed for outlier values. Student *t*-test was performed using Statistica software (TIBCO, 2018). Any difference was considered significant and very significant at $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and characterization of GOs

The synthesis and characterization of the materials used in this study was described in detail in our previous study (Malina et al., 2019). Briefly, the GOs were synthesized by three different methods of synthesis that resulted in three GOs with a different level of surface oxidation. According to the synthesis, we named the materials HO-GO (Hofmann protocol), HU-GO (Hummers synthesis), and TO-GO (Tour protocol) (Fig. 1). The materials were similar in size (up to 5 μm) and monolayer sheet height (around 1 nm) (Fig. S1a,b)(Malina et al., 2019). The main difference was the number of oxygen-containing groups on the surface, which resulted in three different oxidation rates, confirmed by various characterization methods (Fig. S1c,d)(Malina et al., 2019).

TO-GO was the most extensively oxidized sample and HO-GO the least, with HU-GO having an intermediate degree of oxidation (Fig. 1)(Malina et al., 2019).

The XPS spectra also did not show any peaks typical for impurities originated from the synthesis (manganese chlorate for HU-GO and TO-GO and potassium chlorate for HO-GO samples) (Malina et al., 2019). We additionally performed TGA to further confirm there are no inorganic residues from synthesis that could affect the toxicity of GO samples (under 1% of residual mass for all three GOs) (Fig. S2). To further access the complete chemical composition of GO samples, we also performed the ICP measurements of GOs. The only element that significantly differed between GO samples was manganese, where there was 0.6, 64, and 3061 ppm for HO-GO, HU-GO, and TO-GO, respectively (Table S11). According to the study by Barbolina et al., purified graphene oxide sample containing 1734 ppm of manganese is already pure and does not possess the antibacterial activity anymore. On the other hand, the sample with manganese level of 7872 ppm can cause "false positive" antimicrobial activity of the sample (Barbolina et al., 2016). From this perspective, the HU-GO sample and its 64 ppm of manganese should not determine the measurement. On the other hand, the significantly higher amount in the TO-GO sample could potentially increase the toxicity of the sample. However, the toxicity profile for both of these samples was very comparable. Nevertheless, we also

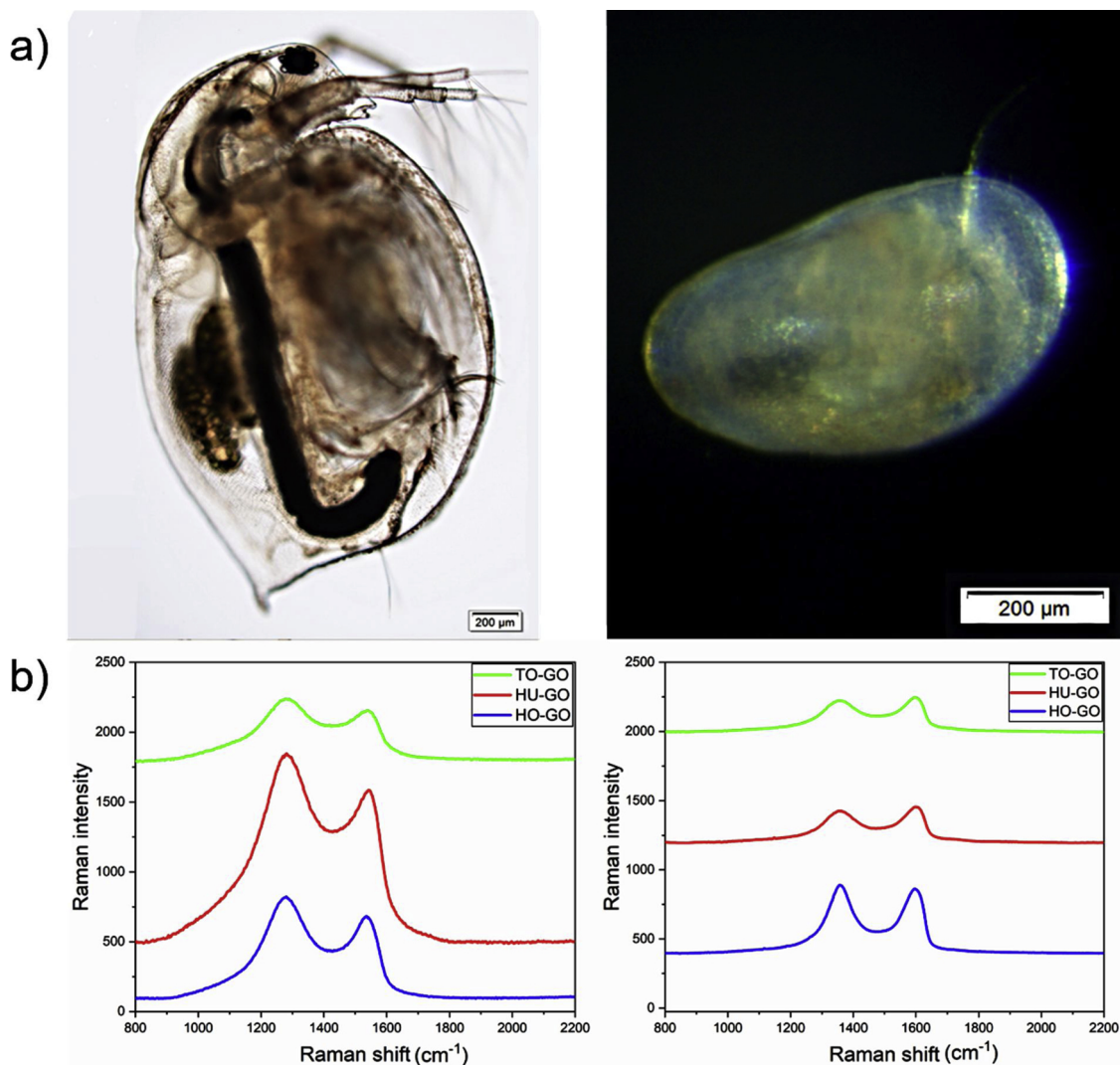


Fig. 3. a) Representative optical microscopy images of *Daphnia magna* (left) and *Heterocypris incongruens* (right) after 24 (*Daphnia*) and 96 h (*Heterocypris*) with 25 mg/L of HO-GO. The scale bar is 200 μm . b) The Raman spectra of *Daphnia magna* (left) and *Heterocypris incongruens* (right) after 24 h incubation with 25 mg/L of HO-GO (blue), HU-GO (red), and TO-GO (green).

performed the acute toxicity test of filtrate controls of GO samples for *Daphnia magna*. There was no influence of the filtrates on viability of *Daphnia magna* and therefore all the toxic effects we observed for the GOs are definitely caused by materials (Fig. S5).

3.2. Acute toxicity tests

In the first experiments, we tested acute toxicity of selected concentrations of GOs to planktonic and benthic crustaceans according to the relevant toxicity standards. The viability of *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus* was evaluated after 48 h of incubation, while *Heterocypris incongruens* after 6 days of incubation. The UV-Vis stability test in culture media showed high aggregation of all three GOs after 4 h (Fig. S3). It is quite expectable phenomenon for this kind of large samples. However, even very gentle shaking of the water dispersions resulted into another 30 min before another aggregation. Given the aeration from the bottom of test tubes was used for incubation of organisms, the sedimentation of materials was not so dramatic. Interestingly though, when we observed some sedimentation of materials, planktonic organisms swam to the bottom of the testing tube to feed with material. Therefore, the sedimentation did not affect the exposure organisms. The results displayed in Fig. 2 show that benthic crustacean *Heterocypris incongruens* was the most resilient organism in this study. Its viability did not drop under 79% even for the highest concentration used (25 mg/L), while for the two planktonic organisms *Daphnia* and *Thamnocephalus*, the viability after 48 h was under 73% for all three materials at this concentration (EC 50 values are presented in Table S1). One of the reasons is definitely the different composition of the shell because *Heterocypris* has a strong calcified carapax, while

Daphnia and *Thamnocephalus*' outer shell is made only of the polysaccharide chitin (Dole-Olivier et al., 2000; Ebert, 2005), so it can be more sensitive to potential external damage. The different composition of outer carapax is clearly shown in the optical microscopy images in Fig. 3a, where GOs inside the *Daphnia*'s guts were clearly visible, while with *Heterocypris* it was very hard to see the inner structure of the body. However, Raman measurements of both organisms showed that all three GOs were present inside the guts and feces. Fig. 3b features Raman spectra of the guts and feces with the typical two peaks at 1330 cm^{-1} and 1596 cm^{-1} , corresponding to the GO D and G bands, respectively, for samples treated with GOs. Raman spectra of untreated samples did not show any typical peak of GO (Fig. S4). This proved that all three GOs interacted with the internal digestive system of both planktonic and benthic crustaceans. Therefore, we state that according to the results obtained from acute toxicity tests conducted under relevant toxicity standards, GO is more hazardous for aquatic crustaceans with the filter-feeding strategy than for the crustaceans that selectively feed on the food sources in the sediment. From planktonic crustaceans, *Thamnocephalus platyurus* was more sensitive to GOs than *Daphnia magna*, but, surprisingly, only to the lower oxidized HO-GO and HU-GO. These GOs caused the viability to drop after 48 h to 50% or lower at a concentration of 25 mg/L for *Thamnocephalus* (29% for HO-GO and 50% for HU-GO), while for *Daphnia*, the viability remained to be over 50% for this concentration (52% for HO-GO and 62% for HU-GO). The highly oxidized TO-GO had an almost identical effect for both *Daphnia* and *Thamnocephalus*; furthermore, the viability remained over 70% for 25 mg/L after 48 h (71% for *Daphnia* and 72% for *Thamnocephalus*). This higher sensitivity in the case of *Thamnocephalus* than in the case of *Daphnia* has already been reported for the ecotoxicity of other

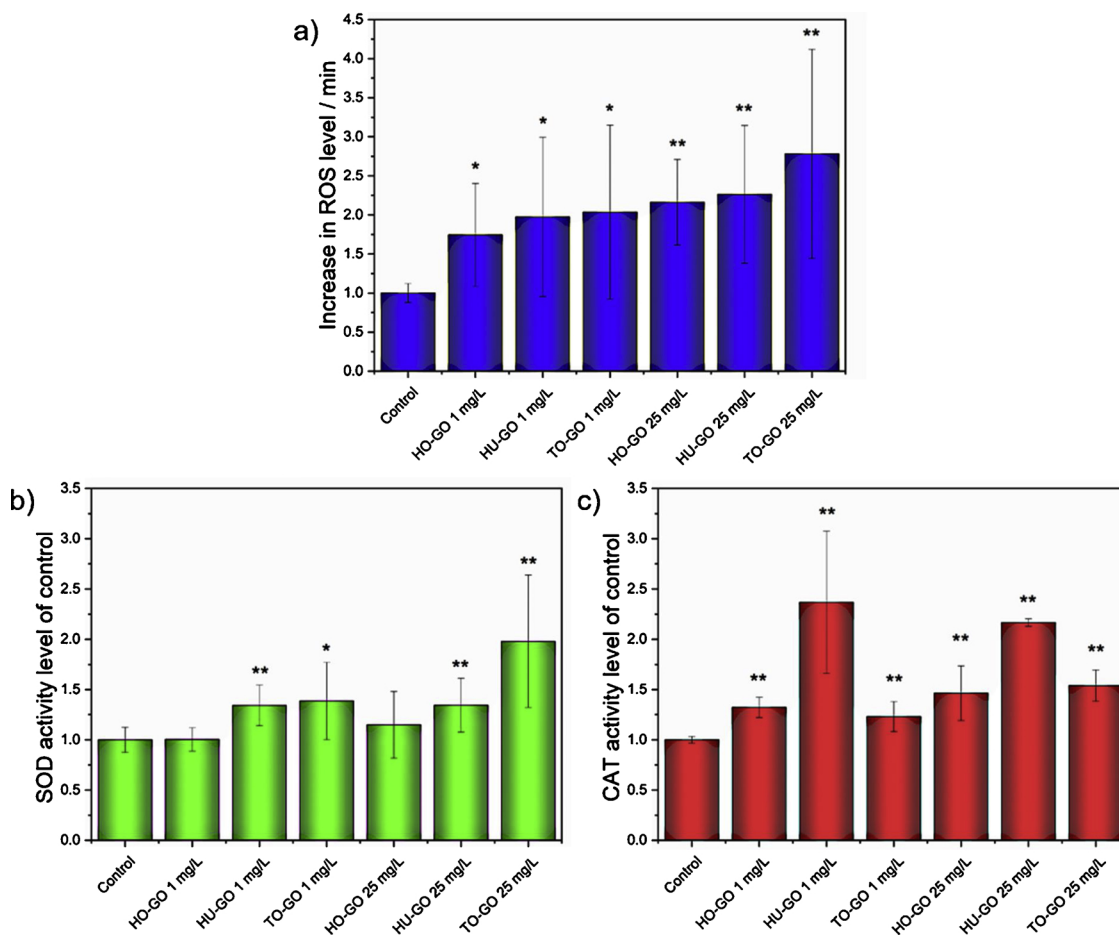


Fig. 4. The oxidative stress response of *Daphnia magna* after 48 h incubation with 1 and 25 mg/L of HO-GO, HU-GO, and TO-GO. a) Increase in ROS generation per minute, b) SOD activity and c) CAT activity level of control. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

nanomaterials (Heinlaan et al., 2008). As mentioned before, the effect of surface oxidation of GO has strongly been manifested in the acute toxicity assays because HO-GO caused the highest mortality of all the tested organisms (Fig. 2). With the lowest number of oxygen-containing functional groups and the highest hydrophobicity, HO-GO can interact directly especially with the filtration apparatus of planktonic crustaceans and inflict a mechanical damage resulting into higher mortality (Malina et al., 2019).

3.3. Oxidative stress assay

The potential oxidative stress of *Daphnia magna* to the GOs was again checked by three biomarkers strictly according to the protocols without any modification. Firstly, we measured the generation of ROS per minute in *Daphnia* after 48 h of incubation with GOs by the H₂-DCFDA probe. We found that both concentrations (1 and 25 mg/L) of all the three GOs induced pronounced oxidative stress (over 1.7 increase in the ROS level/min compared to the control sample) (Fig. 4a). More importantly, the ROS number was dependent on the oxidation level of GO, especially for the higher concentration of GO (25 mg/L). The higher oxidized HU-GO and TO-GO generated more ROS (2.3 and 2.8 increase in ROS level/min for HU-GO and TO-GO, respectively) than the HO-GO, which caused 2.2 increase in ROS level/min. There are reports indicating the influence of oxidation degree on the ROS production of carbon nanomaterials and especially GO (Kong and Zepp, 2012; Zhao et al., 2019), which is in a good agreement with these results. These were still interesting findings though, given that the HO-GO inflicted the highest loss in viability (Fig. 2a), and oxidative stress had been identified as the main mechanism of GO toxicity before (Lv et al.,

2018). Therefore, we additionally studied the defense response of *Daphnia* against GOs using the activity of the main antioxidant enzymes SOD and CAT that are in the first line of defense against the most common ROS as superoxide (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂) (Fridovich, 1995; Gebicka and Krych-Madej, 2019). Again, there was a relevant increase in the activity of both enzymes for both concentrations of all three GOs when compared to the control sample (Fig. 4b,c). However, the higher oxidized HU-GO and TO-GO were responsible for the more intensive antioxidant response and, surprisingly, both GOs increased the activity of different enzyme. While HU-GO inflicted a significant increase of catalase (2.4 and 2.2 increase in the CAT level of control for 1 and 25 mg/L of HU-GO), the highest increase in the SOD level of control was caused by TO-GO (1.4 and 2.0 for 1 and 25 mg/L of TO-GO). This is more likely due to the difference in the functional groups because while TO-GO had an overall higher number of oxygen-containing groups, surface carboxyl groups were more abundant in the HU-GO sample (Fig. S1d)(Malina et al., 2019). The antioxidant enzymes activity of HO-GO samples was lowest, which is in good agreement with the increase in the ROS level. Therefore, we state that even though the oxidative stress is important factor in the ecotoxicity of GOs, it is not the main mechanism because *Daphnia* can deal with the increasing generation of ROS by more intensive antioxidant response through the main antioxidant enzymes.

3.4. Assays with algae pre-treatment

We have already reported the ability of algae to generate defensive reaction against GO through protein and carbohydrate production (Malina et al., 2019). To see whether this behavior can also affect the

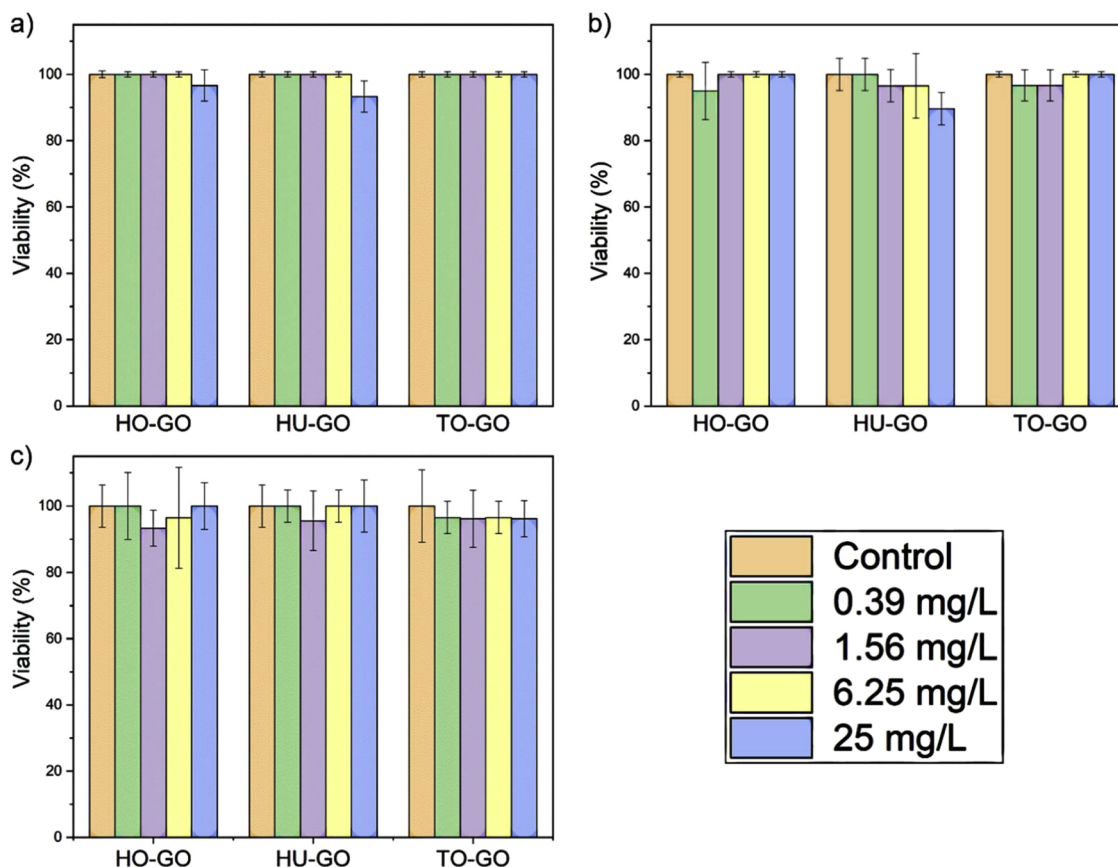


Fig. 5. The viability of planktonic crustaceans a) *Daphnia magna* and b) *Thamnocephalus platyurus* after 48 h incubation with various concentrations of HO-GO, HU-GO, and TO-GO with the added step of 24 h algae pre-treatment. The viability of benthic crustacean c) *Heterocypris incongruens* after 6 days of incubation with various concentrations of HO-GO, HU-GO, and TO-GO with the added step of 24 h algae pre-treatment. The results were normalized for control sample to have 100% viability. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

acute toxicity of GOs towards crustaceans, we performed the same assays including a first step during which the GOs samples were incubated for 24 h with alga *Chlorella kessleri*. This modification also more precisely reflected the conditions in real aquatic ecosystems, yielding more accurate information about the environmental fate of graphene oxide.

The results shown in Fig. 5 clearly demonstrate that this simple adjustment of the protocol dramatically influenced the GOs' toxic effect on the crustaceans. Therefore, the algae's protein and carbohydrate production during the 24 h of incubation with GOs is essential even for the acute toxicity of GO to much more complex organisms. We observed complete mitigation of GO's acute toxicity to both planktonic and benthic crustaceans, because the viability of all the three organisms did not drop under 90% even for highest concentration (25 mg/L) of the three GO samples and did not significantly differ from control sample (Fig. 5). Fig. 6 demonstrates that both internal and external exposition of organisms to GOs remained the same after algae pre-treatment as was proved again by optical microscopy and Raman measurements of guts and feces (typical D and G bands were present for all three GOs). Furthermore, the influence of algae has been manifested not only in the viability of organisms, but also in the oxidative stress of *Daphnia magna* (ROS, SOD, and CAT activity). Both concentrations of all the three GOs were responsible for the expression levels that were on the similar level as the control samples (no sample caused 1.5 or higher increase in ROS

and 1.2 or higher increase in SOD or CAT level of control) (Fig. 7). The scales in Fig. 7 are the same as in Fig. 4, where the oxidative stress parameters (ROS, SOD and CAT activity) were strongly elevated. This was further evidence for the significant difference between the results with and without algae pre-treatment. More importantly, the introduction of algae completely eradicated the influence of the GO's concentration and oxidation rate on the viability and oxidative stress, followed by subsequent antioxidative response, which was seen without an algae pre-treatment (Figs. 2 and 4) and created a stress-free environment for organisms even for as high concentrations of GO as 25 mg/L.

No report has taken into consideration acute toxicity protocols with algae, as the most common source of food for aquatic crustaceans, and their influence on the toxicity of GO. This modification brings a completely new insight into the overall environmental fate of GO. The phenomenon of algae mitigating GO ecotoxicity is even more remarkable with respect to the fact that the concentrations used in this study were within the range of mg/L, which is a million times higher than the concentration of graphene-family materials expected in the environment (ng/L) (Goodwin et al., 2018). Therefore, we state that even in case of a massive boost in the GO concentration in the environment, GO will not pose a threat for aquatic organisms since nature, through millions of years of experience with natural carbon nanoparticles,

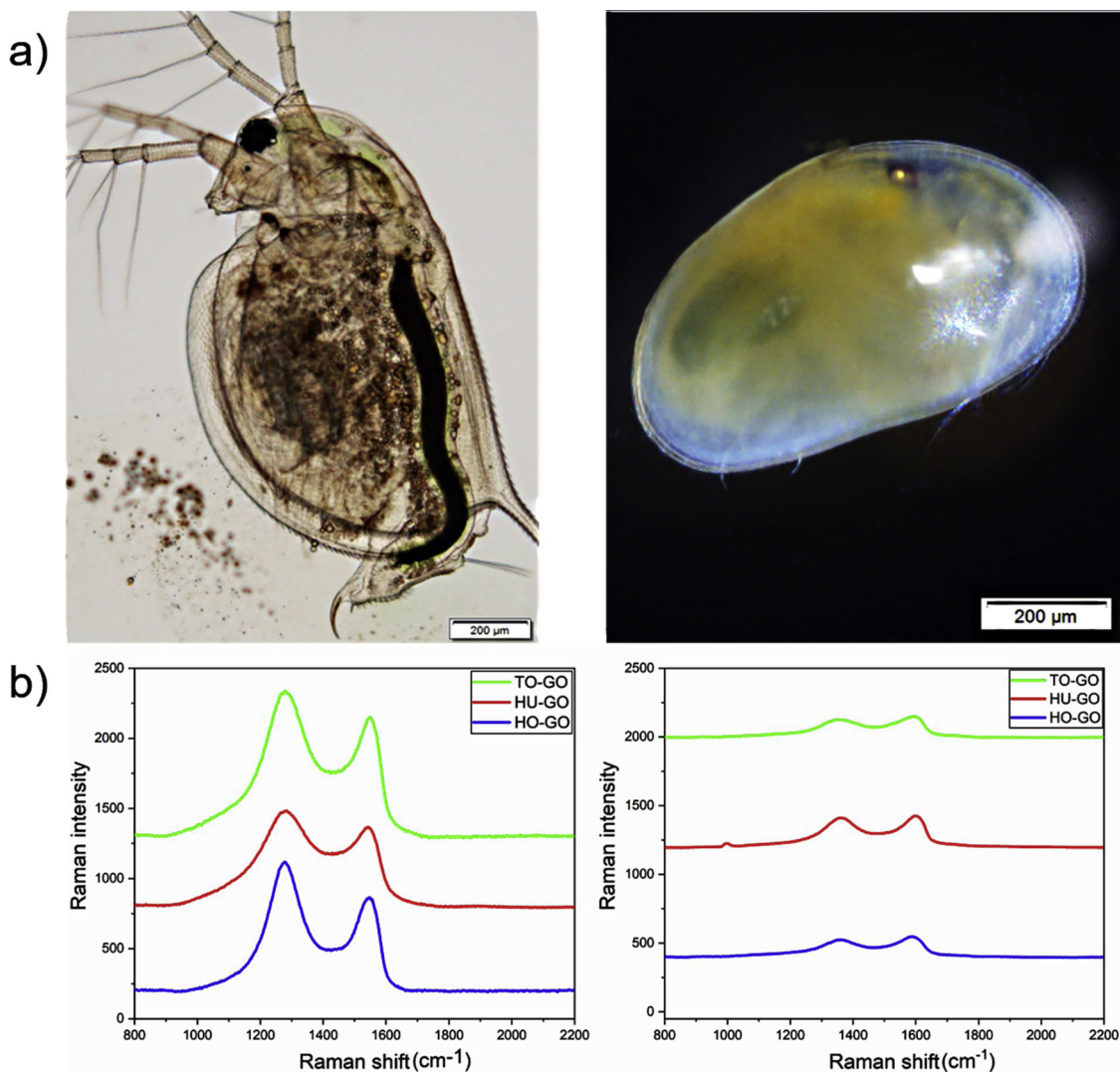


Fig. 6. a) Representative optical microscopy images of *Daphnia magna* (left) and *Heterocypris incongruens* (right) after 24 (*Daphnia*) and 96 h (*Heterocypris*) with 25 mg/L of HO-GO with 24 h of algae pre-treatment. The scale bar is 200 μm . b) The Raman spectra of *Daphnia magna* (left) and *Heterocypris incongruens* (right) after 24 h incubation with 25 mg/L of HO-GO (blue), HU-GO (red), and TO-GO (green) with 24 h of algae pre-treatment.

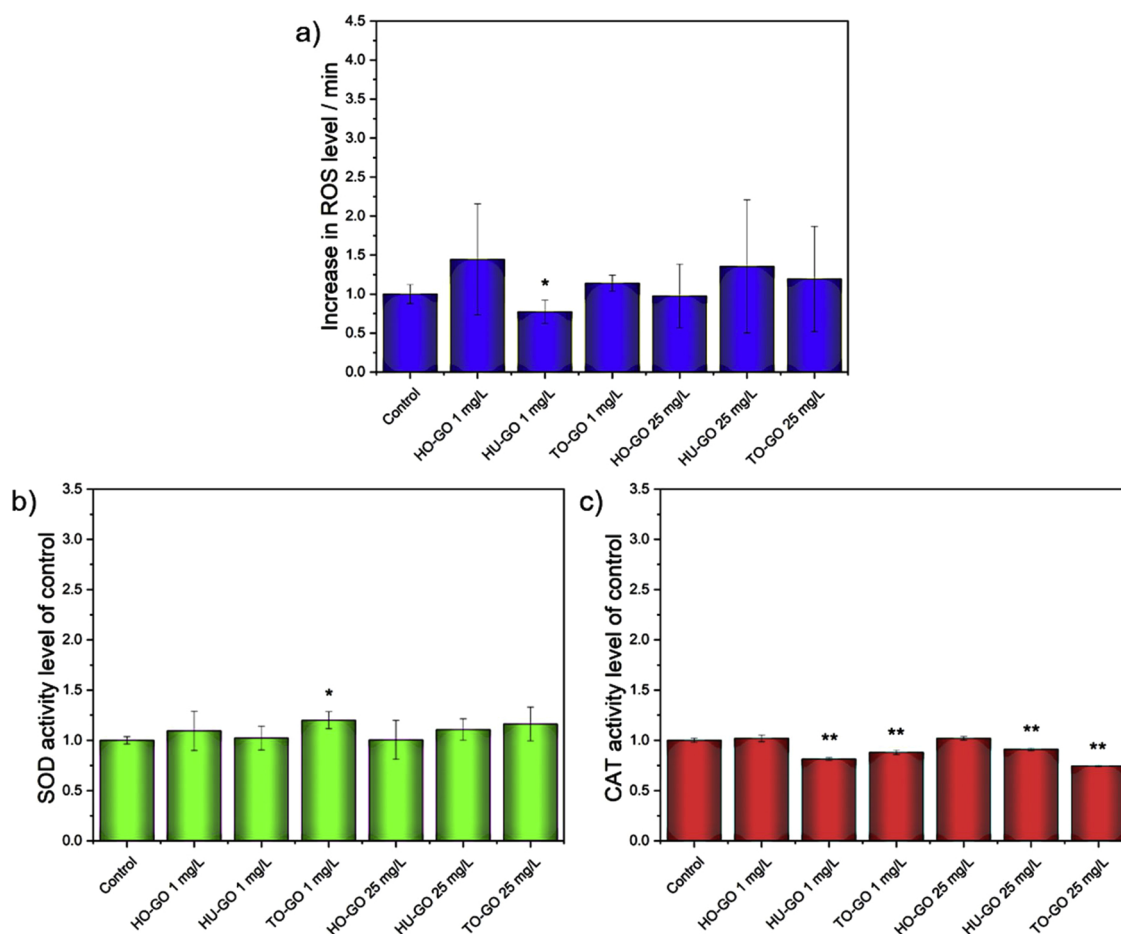


Fig. 7. The oxidative stress response of *Daphnia magna* after 48 h incubation with 1 and 25 mg/L of HO-GO, HU-GO, and TO-GO with the added step of 24 h algae pre-treatment. a) Increase in ROS generation per minute, b) SOD activity, and c) CAT activity level of control. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

evolved mechanisms that successfully mitigate any potentially significant GO ecotoxicity in aquatic ecosystem.

4. Conclusion

We have thoroughly described the interaction between planktonic and benthic crustaceans and GO systems at different levels of the surface oxidation. Additionally, we tried to bring a new insight into the GO's environmental fate in aquatic ecosystems by adding algae, as a factor that represents the most common source of food for crustaceans, to the interaction. This is the first study showing higher sensibility of *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna* to GO's acute toxicity than *Heterocypris incongruens*, which was most likely caused by a filter-feeding strategy of planktonic crustaceans. We also demonstrated the difference in the GOs' mechanism of action on the basis of their level of oxidation. While the least oxidized HO-GO caused major injury to all organisms through mechanical damage, the more oxidized HU-GO and TO-GO acted through their oxygen-containing functional groups and generated higher oxidative stress. However, the increased ROS generation by HU-GO and TO-GO was successfully suppressed by more intense activity of antioxidant enzymes; therefore, oxidative stress did not have significant effect on the viability. More importantly, we presented a first evidence of complete mitigation of GO's acute toxicity against aquatic crustaceans after introducing their pre-treatment with algae, which more accurately reflected the conditions in the real ecosystems. Furthermore, this alleviation was observed at both the viability and oxidative stress level, and completely eradicated the effect of surface oxidation of GO on its ecotoxicity. We proved that the factor of organisms' food plays a crucial role in the potential hazardous effect of

materials, and must be taken into account when considering their ecotoxicity in aquatic environments. Therefore, we state that the environmental risk of GO in complex aquatic environment may be significantly lower than the data recently suggested in literature.

CRediT authorship contribution statement

Tomáš Malina: Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft, Visualization. **Eliška Maršálková:** Methodology, Validation, Investigation. **Kateřina Holá:** Resources. **Radek Zbořil:** Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition. **Blahoslav Maršálek:** Conceptualization, Writing - review & editing, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Vojtěch Kupka, Dr. Juri Ugolotti, and Mgr. Jana Havláková for the help with TGA measurements. This work was supported by the project No. DG16P02M041 of the Ministry of Culture ("Biotic Threats to Garden Monuments: Algae, Cyanobacteria and Invasive Plant Species"). The authors also gratefully acknowledge the support from the Operational Programme Research, Development and

Education – European Regional Development Fund, project Nano4Future: No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000754 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and the support from the Internal Grant Agency of the Palacký University Olomouc (project No. IGA_PrF_2020_034).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123027>.

References

- Abraham, J., Vasu, K.S., Williams, C.D., Gopinadhan, K., Su, Y., Cherian, C.T., Dix, J., Prestat, E., Haigh, S.J., Grigorieva, I.V., Carbone, P., Geim, A.K., Nair, R.R., 2017. Tunable sieving of ions using graphene oxide membranes. *Nat. Nanotechnol.* 12 (6), 546–550.
- Adema, D., 1978. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia* 59 (2), 125–134.
- Barbolina, I., Woods, C.R., Lozano, N., Kostarelos, K., Novoselov, K.S., Roberts, I.S., 2016. Purity of graphene oxide determines its antibacterial activity. *2d Mater.* 3 (2), 025025.
- Blinova, I., Lukjanova, A., Muna, M., Vija, H., Kahru, A., 2018. Evaluation of the potential hazard of lanthanides to freshwater microcrustaceans. *Sci. Total Environ.* 642, 1100–1107.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Celebi, K., Buchheim, J., Wyss, R., Droudian, A., Gasser, P., Shorubalko, I., Kye, J., Lee, C., Park, H., 2014. Ultimate permeation across atomically thin porous graphene. *Science* 344 (6181), 289–292.
- Chen, D., Feng, H., Li, J., 2012. Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications. *Chem. Rev.* 112 (11), 6027–6053.
- Compton, O., Nguyen, S., 2010. Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: versatile building blocks for carbon-based materials. *Small* 6 (6), 711–723.
- Dole-Olivier, M., Galassi, D., Marmonier, P., Des Chatelliers, M., 2000. The biology and ecology of lotic microcrustaceans. *Freshw. Biol.* 44 (1), 63–91.
- Ebert, D., 2005. *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*, Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). National Center for Biotechnology.
- Freixa, A., Acuña, V., Sanchís, J., Farré, M., Barceló, D., Sabater, S., 2018. Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms. *Sci. Total Environ.* 619–620, 328–337.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 97–112.
- Gebicka, L., Krych-Madej, J., 2019. The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *J. Inorg. Biochem.* 197, 110699.
- Goodwin, D., Adeleye, A., Sung, L., Ho, K., Burgess, R., Petersen, E., 2018. Detection and quantification of graphene-family nanomaterials in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 52 (8), 4491–4513.
- Hamdi, H., Manusadzian, L., Aoyama, I., Jedidi, N., 2006. Effects of anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene spiking and sewage sludge compost amendment on soil ecotoxicity during a bioremediation process. *Chemosphere* 65 (7), 1153–1162.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H., Kahru, A., 2008. Toxicity of nano-sized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71 (7), 1308–1316.
- Kong, L., Zepp, R.G., 2012. Production and consumption of reactive oxygen species by fullerenes. *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (1), 136–143.
- Liu, Y., Han, W., Xu, Z., Fan, W., Peng, W., Luo, S., 2018. Comparative toxicity of pristine graphene oxide and its carboxyl, imidazole or polyethylene glycol functionalized products to *Daphnia magna*: a two generation study. *Environ. Pollut.* 237, 218–227.
- Liu, S., Cui, M., Li, X., Thuyet, D.Q., Fan, W., 2019. Effects of hydrophobicity of titanium dioxide nanoparticles and exposure scenarios on copper uptake and toxicity in *Daphnia magna*. *Water Res.* 154, 162–170.
- Lu, K., Dong, S., Petersen, E., Niu, J., Chang, X., Wang, P., Lin, S., Gao, S., Mao, L., 2017. Biological uptake, distribution, and depuration of radio-labeled graphene in adult zebrafish: effects of graphene size and natural organic matter. *ACS Nano* 11 (3), 2872–2885.
- Lv, X., Yang, Y., Tao, Y., Jiang, Y., Chen, B., Zhu, X., Cai, Z., Li, B., 2018. A mechanism study on toxicity of graphene oxide to *Daphnia magna*: direct link between bioaccumulation and oxidative stress. *Environ. Pollut.* 234, 953–959.
- Malina, T., Maršálková, E., Holá, K., Tuček, J., Scheibe, M., Zbořil, R., Maršálek, B., 2019. Toxicity of graphene oxide against algae and cyanobacteria: nanoblade-morphology-induced mechanical injury and self-protection mechanism. *Carbon* 155, 386–396.
- Manzo, S., De Nicola, F., De Luca Picione, F., Maisto, G., Alfani, A., 2008. Assessment of the effects of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests. *Chemosphere* 71 (10), 1937–1944.
- Mao, L., Liu, C., Lu, K., Su, Y., Gu, C., Huang, Q., Petersen, E.J., 2016. Exposure of few layer graphene to *Limnodrilus hoffmeisteri* modifies the graphene and changes its bioaccumulation by other organisms. *Carbon* 109, 566–574.
- Martens, K., Schon, I., Meisch, C., Horne, D., 2008. Global diversity of ostracods (Ostracoda, Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 185–193.
- Schmit, O., Rossetti, G., Vandekerckhove, J., Mezquita, F., 2007. Food selection in *Eucypris virens* (Crustacea: ostracoda) under experimental conditions. *Hydrobiologia* 585, 135–140.
- Souza, J., Venturini, F., Santos, F., Zucolotto, V., 2018. Chronic toxicity in *Ceriodaphnia dubia* induced by graphene oxide. *Chemosphere* 190, 218–224.
- Tarczyska, M., Nalecz-Jawecki, G., Romanowska-Duda, Z., Sawicki, J., Beattie, K., Codd, G., Zalewski, M., 2001. Tests for the toxicity assessment of cyanobacterial bloom samples. *Environ. Toxicol.* 16 (5), 383–390.
- TIBCO Software Inc, 2018. *Statistica (data Analysis Software System), Version 13*. <http://tibco.com>.
- Zhao, F.F., Wang, S.C., Zhu, Z.L., Wang, S.G., Liu, F.F., Liu, G.Z., 2019. Effects of oxidation degree on photo-transformation and the resulting toxicity of graphene oxide in aqueous environment. *Environ. Pollut.* 249, 1106–1114.
- Zhou, K.G., Vasu, K.S., Cherian, C.T., Neek-Amal, M., Zhang, J.C., Ghorbanfekr-Kalashami, H., Huang, K., Marshall, O.P., Kravets, V.G., Abraham, J., Su, Y., Grigorenko, A.N., Pratt, A., Geim, A.K., Peeters, F.M., Novoselov, K.S., Nair, R.R., 2018. Electrically controlled water permeation through graphene oxide membranes. *Nature* 559 (7713), 236–240.
- Zhu, Y., Murali, S., Cai, W., Li, X., Suk, J., Potts, J., Ruoff, R., 2010. Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. *Adv. Mater.* 22 (35), 3906–3924.
- Zhu, Y., Ji, H., Cheng, H.-M., Ruoff, R.S., 2018. Mass production and industrial applications of graphene materials. *Natl. Sci. Rev.* 5 (1), 90–101.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE



Toxicita nanomateriálů na bázi uhlíku

Toxicity of carbon-based nanomaterials

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. TOMÁŠ MALINA

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Fyzikální chemie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2021

Školitel: prof. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D.

Obsah

1.	Úvod.....	3
2.	Teoretická část	5
2.1.	Typy a vlastnosti uhlíkových materiálů.....	5
2.2.	Aplikace uhlíkových nanomateriálů v biomedicině a životním prostředí.....	6
3.	Cíle disertační práce.....	8
4.	Výsledky a diskuze	9
4.1.	Interakce uhlíkových nanomateriálů s buněčnými liniemi – humánní toxicita.....	9
4.1.1.	Uhlíkové tečky pro <i>in vivo</i> fluorescenční pozorování mezenchymálních kmenových buněk.....	9
4.1.2.	Toxicita uhlíkových materiálů – spolehlivá metoda pro sledování viability pomocí nového přístupu v průtokové cytometrii	13
4.2.	Interakce uhlíkových nanomateriálů s organismy ve vodním prostředí – environmentální toxicita.....	21
4.2.1.	Grafen oxidy s rozdílným stupněm povrchové oxidace.....	21
4.2.2.	Interakce GOs s řasami a sinicemi	23
4.2.3.	Interakce GOs s vodními korýši.....	31
4.2.4.	Interakce GOs s vodními rostlinami	38
5.	Závěr	44
6.	Reference	45

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního doktorského studijního programu na Katedře Fyzikální Chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Název práce: Toxicita nanomateriálů na bázi uhlíku

Uchazeč: Mgr. Tomáš Malina

Školitel: Prof. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D.

Oponenti:

Místo a termín obhajoby:

Místo, kde se bude možné s disertační prací a posudky alespoň 14 dnů před vykonáním obhajoby seznámit:

1. Úvod

Nanotechnologie je dynamický a velmi rychle se vyvíjející obor. V současnosti dochází v celosvětovém měřítku k vývoji nejrůznějších nových materiálů se specifickými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Uhlíkové nanomateriály (Carbon nanomaterials – CNMs) představují třídu nízkodimenzionálních materiálů, která od objevu prvního alotropu, fullerenů v roce 1985, vyvolala ve vědecké komunitě značný rozruch.¹ Uvedení dvou dalších alotropů CNMs, uhlíkových nanotrubiček a grafenu v roce 1991 a 2004, mělo podobný impakt.^{2, 3} Za objev a studium dvou ze tří alotropů byla dokonce udělena Nobelova cena (fullereny – 1996 (Chemie) a grafen – 2010 (Fyzika)), což názorně ilustruje význam a důležitost těchto materiálů pro celou společnost. Díky velikostem v nanometrickém měřítku tyto alotropy vykazují mimořádné optické, elektronické, magnetické a chemické vlastnosti, které se dají využít v širokém portfoliu aplikací např. v elektronice, katalýze, fotonice, energetice a medicíně.^{4, 5}

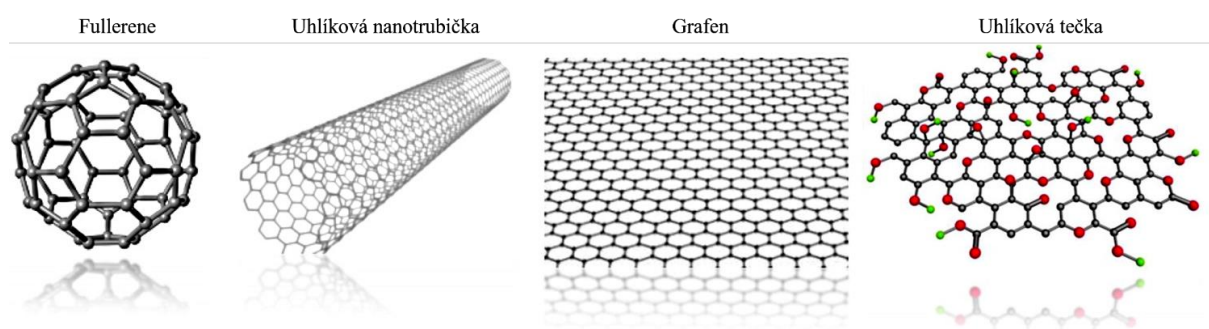
V poslední době se pozornost vědců zaměřuje na stále novější typy CNMs nacházející uplatnění především v aplikacích spojených s biomedicínou a životním prostředím.⁶⁻¹³ Patří zde například uhlíkové tečky (carbon dots – CDs), čili velice malé fluorescenční nanomateriály (< 10 nm) s grafitovým jádrem a různými povrchovými skupinami.¹⁴ Velice atraktivní jsou také materiály, vycházející ze struktury grafenu, které jsou tvořeny jednou nebo několika uhlíkovými vrstvami, souhrnně nazvané 2D uhlíkové materiály.¹⁵ Struktura těchto materiálů může být navíc dále chemicky modifikována pro usnadnění disperze ve vodných roztocích, která je pro mnoho biomedicínských a environmentálních aplikací klíčová.^{16, 17} Se stále rostoucí aplikací těchto materiálů jde však ruku v ruce také otázka jejich bezpečného použití. Pochopení následků in vitro interakce CNMs s buněčnými liniemi je důležitým prvním krokem a klíčovým předpokladem k jejich následnému využití v jakékoliv biomedicínské aplikaci.¹⁸ Podobně je tomu také v případě životního prostředí, kde jsou však buněčné linie nahrazeny organismy

vyskytující se ve vodním prostředí, do kterého se mohou materiály v důsledku aplikace uvolňovat.¹⁹ Předkládaná disertační práce se zabývá právě studiem interakce uhlíkových nanomateriálů jak s buněčnými liniemi, tak s organismy z různých trofických úrovní vodního ekosystému.

2. Teoretická část

2.1. Typy a vlastnosti uhlíkových materiálů

Jak již bylo zmíněno v úvodu, mezi hlavní tři třídy uhlíkových nanomateriálů se řadí fullereny, uhlíkové nanotrubičky a materiály na bázi grafenu (Obrázek č. 1). Poněkud mladší, nově představenou třídou jsou uhlíkové tečky, diskrétní nanočástice téměř sférické geometrie s velikostí pod 10 nm, které přidávají nové možnosti do už tak všestranných vlastností CNMs (Obrázek č. 1).^{20, 21} Grafen se skládá z uhlíkových atomů s sp^2 hybridizací, které jsou uspořádány do hexagonální 2D struktury poskytující grafenu obrovskou plochu povrchu na obou stranách jeho planární struktury.³ I grafen však vykazuje několik znaků, které mohou být v určitém kontextu různých aplikací nežádoucí. Proto se vědci neustále snaží najít nové cesty k chemické modifikaci grafenu, díky které vznikají nové technologicky zajímavé deriváty, mezi které patří především grafen oxid (GO), deriváty vzniklé přímou kovalentní funkcionalizací grafenu^{17, 22} nebo další, grafenu-podobné 2D uhlíkové materiály.^{23, 24} Uhlíkové tečky představují fluorescenční materiály s grafitovým jádrem obaleným slupkou s různými chemickými skupinami,¹⁴ které mají ve většině případů velikost pod 10 nm ve všech 3 dimenzích, díky čemu jsou CDs považovány za tzv. 0D uhlíkový nanomateriál.²⁵



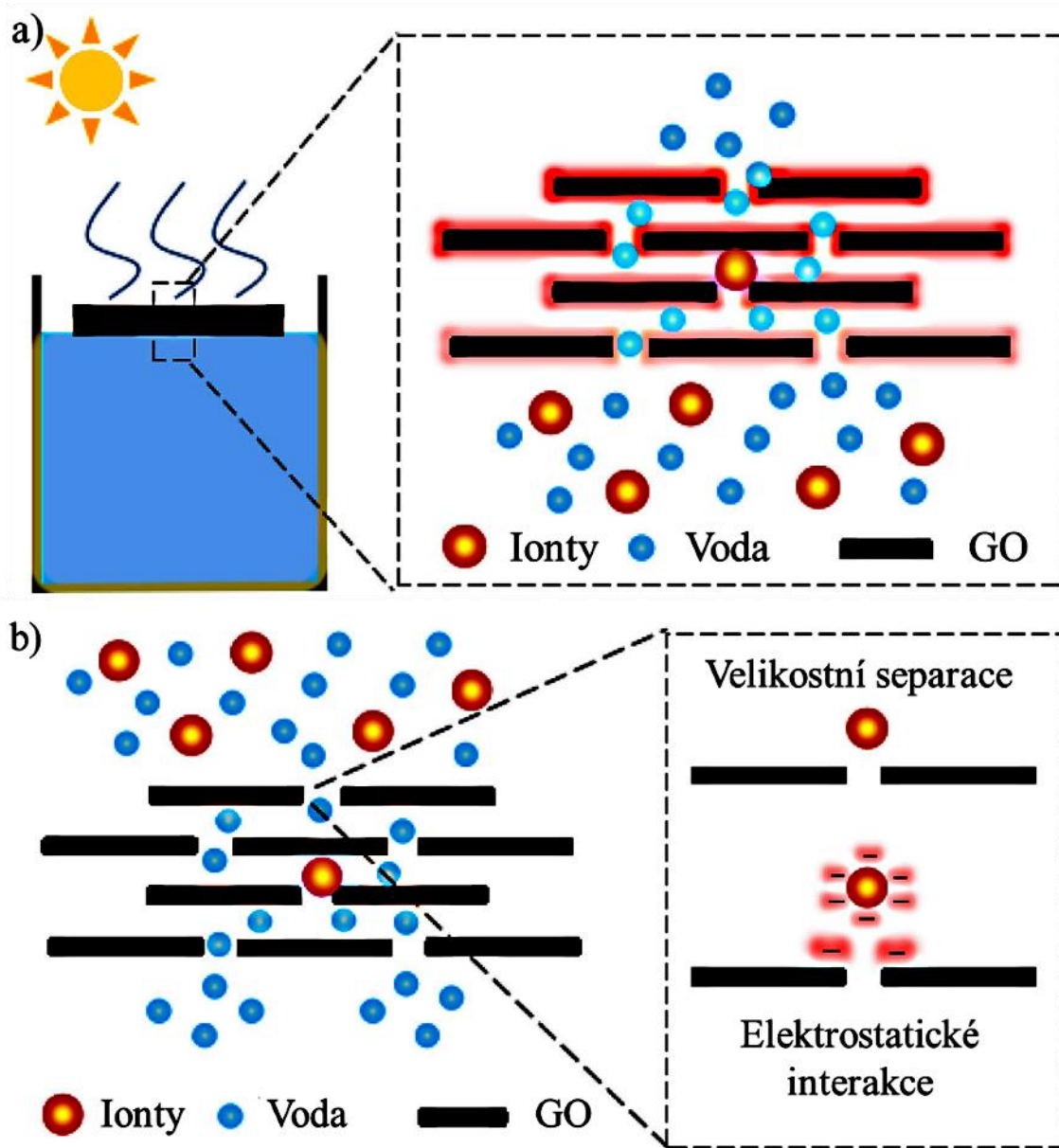
Obrázek č. 1. Uhlíkové nanomateriály, zahrnující fullereny, uhlíkové nanotrubičky, materiály na bázi grafenu a uhlíkové tečky. Převzato z ⁴ a upraveno.

2.2. Aplikace uhlíkových nanomateriálů v biomedicině a životním prostředí

Portfolio biomedicínských aplikací, kde nachází CNMs využití je velice rozsáhlé a zahrnuje několik oblastí. Zobrazování a detekce biologických procesů v živých systémech patří mezi jedny z nejrozšířenějších aplikací CNMs, především pak uhlíkových teček.²⁶ Nízká toxicita a mimořádné fluorescenční vlastnosti z nich totiž dělají ideální kandidáty pro pozorování ať už *in vitro* buněčných linií, nebo *in vivo* na úrovni orgánů a organismů.²⁷ Distribuce CDs v organismu se však může výrazně změnit v přítomnosti nádoru, jelikož byla u CDs popsána schopnost akumulace v nádoru skrze efekt zvýšené permeability a retence (EPR effect).^{28, 29} Současně se zobrazováním tak mohou být CDs využity jako nanoplatformy pro klinické biomedicínské aplikace, zahrnující hlavně fototermální (PTT) a fotodynamickou terapii (PDT) nádorů.³⁰⁻³⁴ S fluorescenčním zobrazováním biologických systémů je úzce spojena také další aplikace CNMs, a to využití materiálů jako biosenzorů například k detekci kovových iontů, malých organických molekul jako markerů nemoci, vnitrobuněčných změn pH nebo environmentálních polutantů.^{15, 35} Poslední hlavní směr aplikace CNMs v biomedicině představuje cílené doručování léčiv nebo biomolekul, kde zase grafenové deriváty mohou přispět svými jedinečnými vlastnostmi jako ideální platformy pro navázání různých léčiv.³⁶

V životním prostředí představuje jednu z největších výzev dnešního světa otázka čisté a pitné vody, jelikož se jedná o téma, které má přímý vztah, jak ke zdraví lidstva, tak volně žijících živočichů. Vzhledem k rychlému rozvoji průmyslu se do životního prostředí uvolňuje stále více znečišťujících látek, zatímco prudký růst populace zase neustále zvyšuje poptávku po pitné vodě.³⁷ V tomto případě si grafen oxid (GO) získal výraznou pozornost vědecké komunity, jelikož jako nano adsorbent byl již využit například pro adsorpci iontů těžkých kovů,³⁸⁻⁴⁰ polycyklických aromatických uhlovdíků⁴¹ nebo organických barviv^{42, 43} při

aplikacích spojených s čištěním odpadních vod. Druhá hlavní technologie pro získávání čisté vody je odsolování mořské vody. I zde již byl GO využit ať už v technologiích solárního odpařování vody, kde GO slouží jako vynikající absorbér (Obrázek č. 2a),⁴⁴⁻⁴⁸ tak v technologiích filtrace přes membránu, kdy GO materiály vytvářejí „nanokanály“ mezi sousedními GO „nanolisty“, skrz které lze provádět odsolování pomocí filtrace (Obrázek č. 2b).^{10, 49-54}



Obrázek č. 2. Ilustrační schéma znázorňující a) solární odpařování mořské vody založenou na GO a b) filtraci mořské vody přes GO filtrační membránu. Převzato z ⁵⁵ a upraveno.

3. Cíle disertační práce

Hlavním cílem předkládané disertační práce bylo studium interakce nových uhlíkových nanomateriálů, zahrnujících uhlíkové tečky, grafenové deriváty a příbuzné materiály na bázi grafenu s různými buněčnými liniemi a organismy z různých vrstev trofického řetězce vodního ekosystému.

Jednotlivé specifické cíle práce pak lze shrnout do těchto bodů:

- Stanovení bezpečné koncentrace uhlíkových teček, která neovlivňuje viabilitu, buněčné procesy a charakter mezenchymálních kmenových buněk a následné použití této koncentrace uhlíkových teček pro *in vivo* pozorování mezenchymálních kmenových buněk.
- Analýza interference nových uhlíkových nanomateriálů s klasickými *in vitro* testy viability a optimalizace nové metody pro překonání této interference.
- Studium environmentálního osudu grafen oxidu ve vodním prostředí a jeho mechanismu potenciálního toxického účinku vůči různým vodním organismům v závislosti na: i) úrovni povrchové oxidace grafen oxidu, ii) komplexnosti a morfologii vodních organismů a iii) životní strategii vodních organismů.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Interakce uhlíkových nanomateriálů s buněčnými liniemi – humánní toxicita

Jak již bylo zmíněno v literární části práce, CNMs představují mimořádné materiály nacházející uplatnění v mnoha odvětvích biomedicínské oblasti. Současně se však dostává do povědomí otázka potenciálních nepříznivých účinků těchto materiálů na lidské zdraví, což může v souvislosti s využitím těchto materiálů vyvolávat značné obavy. Pochopení důsledků CNMs po přímém kontaktu s buněčnými liniemi *in vitro* je proto klíčovým prvním krokem a zcela zásadním předpokladem pro jejich následné bezpečné a úspěšné využití především v biomedicínských aplikacích.¹⁸ Mimoto, paradigma toxikologie 21. století se zaměřuje na spolehlivé a rychlé testování ať už nanomateriálů či jiných látek na buněčných *in vitro* kulturách, aby docházelo k co nejvyšší redukci *in vivo* testů využívající zvířata.^{56, 57} *In vitro* toxikologické metody tak představují velice důležitou část výzkumu spojeného prakticky s jakýmkoliv aplikačním odvětvím.

4.1.1. Uhlíkové tečky pro *in vivo* fluorescenční pozorování mezenchymálních kmenových buněk

Regenerační terapie založené na cíleném doručování mezenchymálních kmenových buněk (MSCs – mesenchymal stem cells) patří mezi jedny z nejslibnějších technik v současné medicíně. Kmenové buňky totiž dokáží interagovat s mikroprostředím poškozeného místa, diferenciovat se na požadované typy buněk a tím přispívat k hojení a tvorbě nové tkáně.^{58, 59} Jedná se však o poměrně složitý proces, a proto se o něm vědci neustále snaží získávat co nejvíce detailních informací zaváděním nových strategií pro jeho sledování. Jednu takovou

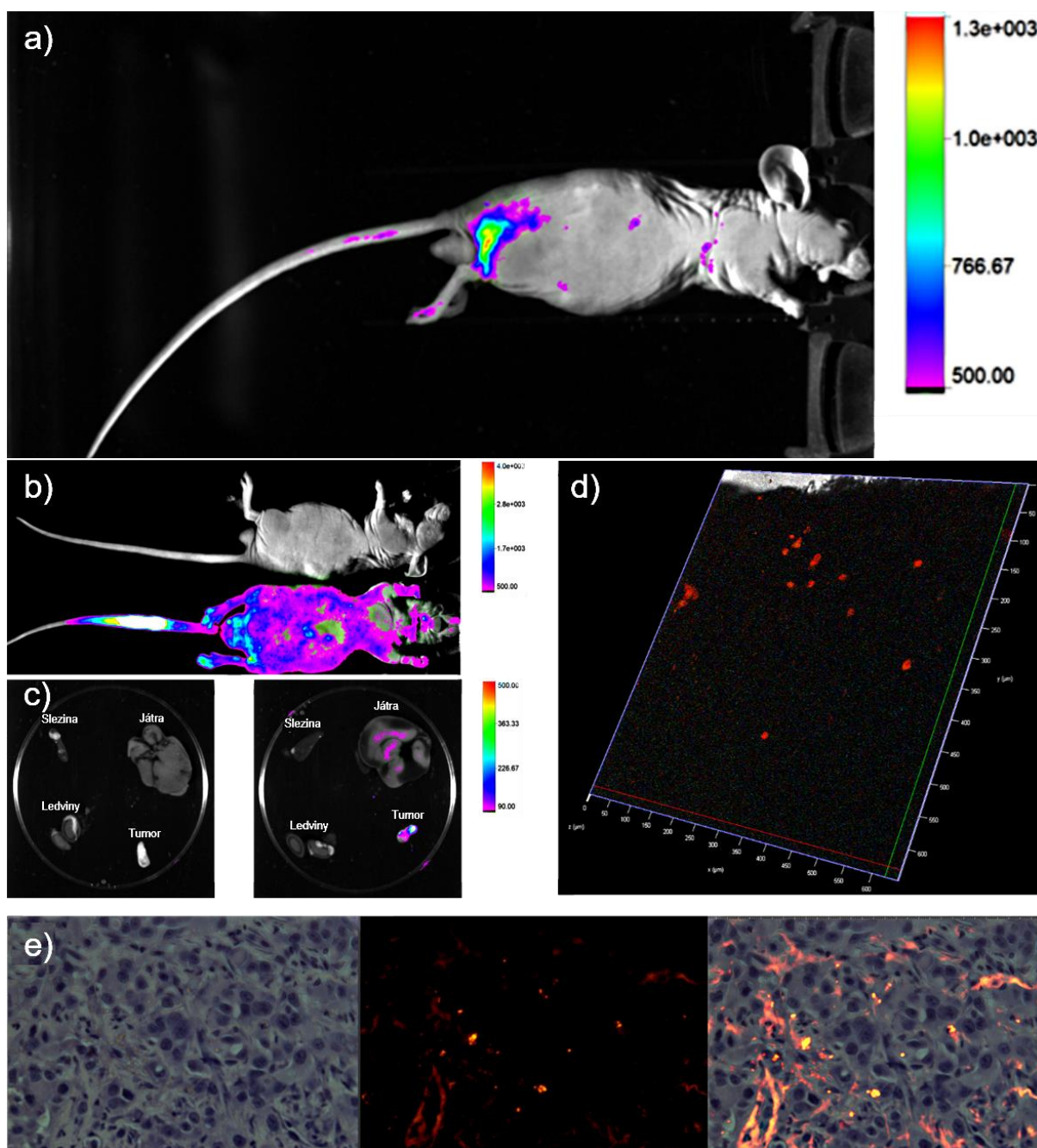
představuje i optické fluorescenční zobrazování, které umožňuje neinvazivní *in vivo* pozorování kmenových buněk dokonce až na buněčné úrovni.⁶⁰ I tato strategie má však své nedostatky zahrnující autofluorescenci tkání a vybělování tradičních organických fluoroforů. Proto byly vybrány uhlíkové tečky jako ideální kandidáti pro studium jejich uplatnění v této oblasti. CDs totiž vykazují výrazně lepší fluorescenční vlastnosti než klasické fluorescenční sondy, výbornou fotostabilitu a rezistenci proti vybělování, a současně také vynikající biokompatibilitu v porovnání s toxickými polovodičovými kvantovými tečkami.^{14, 61, 62}

V naší studii byly použity uhlíkové tečky, které na svém povrchu obsahovaly kvartérní amoniové skupiny (proto QCDs – quaternary carbon dots). Komplexní charakterizace vzorku QCDs následně potvrdila, že syntéza vedla k vytvoření velmi malých, uniformních, velmi dobře karbonizovaných uhlíkových teček se silně pozitivním nábojem díky přítomnosti kvartérního amonia.⁶³ Poté byla provedena baterie *in vitro* testů, pomocí které jsme byli schopni selektovat koncentraci QCDs (100 µg/ml), která dávala výrazný fluorescenční signál uvnitř MSCs a zároveň žádným způsobem neovlivňovala jak viabilitu a další buněčné procesy MSCs, tak jejich charakter.⁶³ Současně byla ověřena *in vivo* kompatibilita QCDs pomocí testu hemolýzy a také otestován správný počet QCD-značených MSCs, který dával maximální fluorescenční signál *ex vivo*.⁶³

Pro posouzení, zda je signál QCD-značených MSCs dostatečný i uvnitř organismu *in vivo* a lze takto označené buňky sledovat, byla následně provedena jejich subkutánní aplikace do zadní končetiny myši. Aplikované buňky označené QCDs byly jasně detekovány pomocí *in vivo* fluorescenčního pozorování (Obrázek č. 3a). Tento výsledek tak potvrdil premisu, že QCDs mohou být využity pro sledování kmenových buněk v různých terapiích regenerační medicíny, zahrnující např. procesy hojení kožních ran.

Potvrdili jsme tedy, že QCD-značené MSCs dávají dostatečný signál pro jejich *in vivo* fluorescenční detekci. Současně byly pomocí *in vitro* testů potvrzeny jejich migrační vlastnosti,

kteře zůstaly i po označení QCDs neměnné.⁶³ Živý organismus však představuje kompletně odlišné prostředí od *in vitro* testů, a proto je pro potenciální využití v regeneračních terapiích nezbytné, aby schopnost navádění do zánětlivého místa organismu MSCs, byla po značení QCDs ověřena také *in vivo*. Proto byly QCD-značené MSCs intravenózně aplikovány do myši nesoucí tumor, který zastupoval místo vykazující zánětlivou reakci (Obrázek č. 3b). Po 24 h od aplikace byly odebrány vybrané orgány myši (játra, ledviny, slinivka a tumor) a byla provedena jejich fluorescenční detekce *ex vivo*. V porovnání s kontrolní myši, které byly aplikovány neznačené MSCs, byl fluorescenční signál detekován hlavně v tumoru a částečně také v játrech myši, které byly aplikovány QCD-značené MSCs (Obrázek č. 3c). Současně byla provedena konfokální mikroskopie tenkých řezů nejprve samotné tumorové tkáně a následně také tumorové tkáně po barvení hematoxylinem a eosinem (H&E). U obou pozorování byla potvrzena přítomnost QCD-značených MSCs v tumorové tkáni ve formě červených fluorescenčních klastrů (Obrázek č. 3d a 3e). Bylo tedy potvrzeno, že značení pomocí QCDs neměnní schopnost navádění MSCs do zánětlivého místa organismu ani při *in vivo* aplikaci, což je klíčové zjištění pro jejich potenciální aplikaci v buněčné a regenerační terapii.



Obrázek č. 3. a) *In vivo* fluorescenční sledování MSCs značených QCDs po subkutánní aplikaci do zadní končetiny myši. b) *In vivo* fluorescenční sledování myši nesoucí tumor po intravenózní aplikaci neznačených MSCs (horní myš) a po aplikaci MSCs značených QCDs (spodní myš). c) *Ex vivo* fluorescenční sledování vybraných orgánů (slezina, játra, ledviny, tumor) z myši po 24 h intravenózní aplikace neznačených MSCs (vlevo) a MSCs značených QCDs (vpravo). d) Obrázek tenkého řezu tumoru pořízený konfokálním mikroskopem. e) Tumorová tkáň po H&E barvení: obrázek v režimu světlého pole (vlevo), obrázek ve fluorescenčním režimu (uprostřed) a obrázek zobrazující překryv obou režimů (vpravo). Pro všechna fluorescenční měření byl použit setup ex. 520 nm/em. 600 nm. Převzato z ⁶³ a upraveno.

4.1.2. Toxicita uhlíkových materiálů – spolehlivá metoda pro sledování viability pomocí nového přístupu v průtokové cytometrii

Hodnocení viability buněk představuje jeden z nejdůležitějších testů *in vitro* akutní toxicity nanomateriálů (nanomaterials – NMs) pro jejich jakoukoliv další aplikaci. Na základě tohoto výsledku je totiž možné stanovit křivku závislosti odezvy na dávce (dose-response) a dále se zaměřit na pochopení mechanismů interakce mezi NMs a buněčnými liniemi.⁶⁴ Již bylo několikrát popsáno, že NMs mohou interferovat se standardními testy viability.^{65, 66} O to více alarmující je zjištění, že stále existuje velké množství studií, které tuto informaci neberou v potaz. Důsledkem toho dochází v literatuře k publikování falešných výsledků akutní toxicity NMs, které jsou způsobeny interferencí a ne účinkem NMs, což může představovat obrovský problém pro budoucí bezpečnou a udržitelnou aplikaci specifických nanomateriálů.⁶⁶ Uhlíkové nanomateriály nejsou výjimkou a v literatuře už byly publikovány zprávy o jejich interferenci s běžnými testy viability jako je např. barvení alamarovou modří a neutrální červení nebo MTT a WST-1 test.⁶⁷⁻⁷² Proto se použití těchto metod pro studium viability CNMs doporučuje pouze s velkou opatrností. Průtoková cytometrie je rychlá a vysoce přesná technika poskytující informaci o jednotlivých buňkách v celé populaci,⁷³ takže představuje vhodnou alternativu pro *in vitro* testování viability buněk. Na druhou stranu, již bylo zjištěno, že NMs mohou interferovat dokonce i s vyhodnocením pomocí této metody.⁷⁴ Proto se nabízí otázka, zda CNMs mohou také interferovat s metodou průtokové cytometrie, a co je důležitější, jestli existuje způsob, jak interferenci překonat a získat tak spolehlivé výsledky akutní toxicity CNMs.

V naší studii byli vybráni tři zástupci nových CNMs s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi: grafenová kyselina (GA), exfoliovaný grafitický nitrid uhlíku (g-C₃N₄) a uhlíkové

tečky (CDs), u kterých byla následně studována interference jak s klasickým testem viability MTT, tak s metodou LIVE/DEAD průtokové cytometrie.⁷⁵

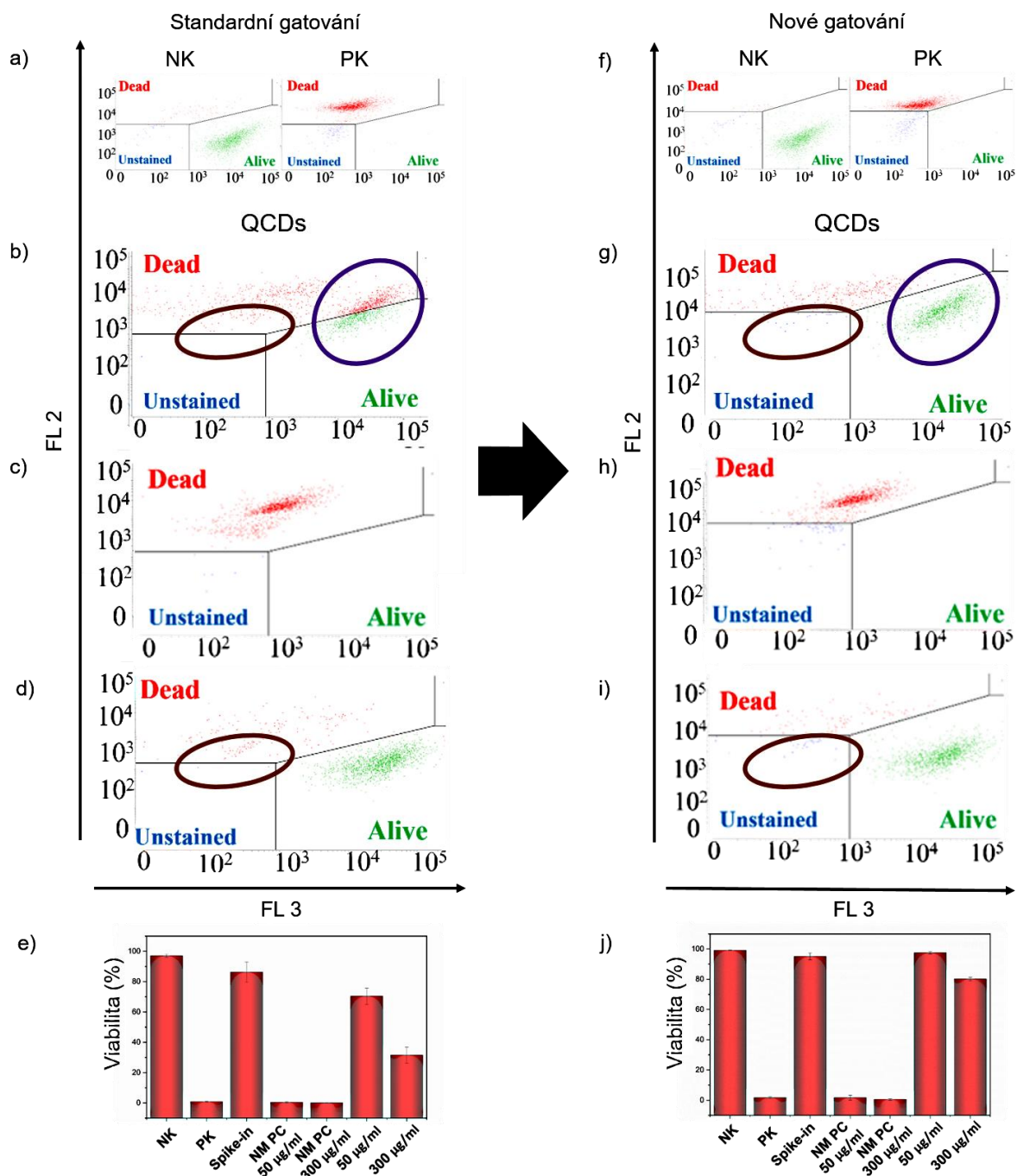
Mikroskopická analýza ukázala, že hlavní rozdíl mezi testovanými vzorky byl především ten, že zatímco vzorky CDs a g-C₃N₄ vytvářely v médiu velké agglomeráty nanomateriálů, vzorek GA tak velké shluky materiálů nezpůsobil.⁷⁵ Jelikož však všechny vybrané materiály interagovaly s buňkami, existoval předpoklad, že budou interferovat s vyhodnocením viability. To bylo potvrzeno výsledky standardního testu MTT především pro vzorky g-C₃N₄ a GA, u kterých byl pozorován pokles MTT viability,⁷⁵ i když obrázky ze světelné mikroskopie neukázaly skoro žádné mrtvé nebo poškozené buňky.⁷⁵ Pro vzorek CDs jsme nebyli schopni určit, zda způsobil interferenci, jelikož MTT hodnoty viability byly srovnatelné s kontrolním vzorkem.⁷⁵ Následně jsme provedli analýzu vlivu CNMs na viabilitu buněk podle LIVE/DEAD metody průtokové cytometrie. Nejprve byly naměřené hodnoty vyhodnoceny podle klasického postupu zahrnujícího pouze negativní a pozitivní kontrolu, abychom ukázali, jak mohou rozdílné typy interference vybraných CNMs negativně ovlivnit výsledky LIVE/DEAD analýzy provedené dle standardního protokolu. Následně byly stejné data vyhodnoceny podle našeho nového postupu zahrnujícího dodatečné kontroly (spike-in kontrola a nanomateriálová pozitivní kontrola (NM PCs)),⁷⁵ který umožňoval vybrat správné gatování, díky kterému je možné překonat interferenci CNMs a získat spolehlivé výsledky v LIVE/DEAD analýze průtokové cytometrie.

4.1.2.1. CDs a LIVE/DEAD analýza BJ buněk – překonání interference fluorescenčních vlastností

V metodě využívající standardní gatování byly detekovány dva typy interference CDs s LIVE/DEAD analýzou (Obrázek č. 4a-e). První a mnohem výraznější typ představovala interference skrze fluorescenční vlastnosti CDs.⁶³ Body interferující tímto typem interference jsou na obrázku č. 13b zvýrazněny fialovým oválem a můžeme vidět, že interakce CDs

s buňkami způsobila posun fluorescenční intenzity bodů reprezentující buňky značené CDs v červeném detektoru (FL – 2) (Obrázek č. 4b). Nárůst intenzity byl natolik výrazný, že způsobil posun určitého procenta bodů reprezentujících buňky z gatů pro živé buňky (*alive*) do gatů pro mrtvé buňky (*dead*) (Obrázek č. 4b). Druhým typem interference byla přítomnost volných aglomerátů CDs. Ačkoliv byl tento typ interference méně výrazný, jelikož jsme se snažili pro vyhodnocení LIVE/DEAD analýzy gatovat pouze populaci buněk,⁷⁵ způsobil pokles viability spike-in kontroly na 86 % (Obrázek č. 4d a 4e). Body představující volné aglomeráty jsou na obrázku č. 13 zvýrazněné hnědým oválem (Obrázek č. 4d). I když byl pokles viability u spike-in kontroly mírný, indikoval, že vzorek CDs může způsobovat další typ interference, jelikož spike-in kontrola by měla mít porovnatelnou viabilitu s negativní kontrolou, tedy přes 90 %. Bylo tedy prokázáno, že výsledná viabilita vzorků značených 50 a 300 µg/ml CDs (70 a 32 %, resp.) vyhodnocená podle standardního postupu nebyla spolehlivá, jelikož byla ovlivněna dvěma typy interference CDs.

Abychom ukázali, jak překonat interferenci CDs v LIVE/DEAD analýze průtokové cytometrie, vyhodnotili jsme stejnou datovou sadu podle nového protokolu gatování využívajícího dodatečné kontroly (Obrázek č. 4f-j). S využitím těchto gatů zůstala nejprve celá populace živých buněk obsahujících CDs v gatů pro živé buňky (*alive*) i přes zvýšenou intenzitu fluorescence (fialový ovál v Obrázku č. 4g). Současně se také body reprezentující volné aglomeráty CDs přesunuly do gatů pro neoznačené buňky (*unstained*) a nebyly tak zahrnuty do vyhodnocení viability, díky čemuž měla spike-in kontrola viabilitu přes 90 % (hnědý ovál v Obrázku č. 4i a Obrázek č. 4j). Podle nového protokolu tak značení BJ buněk po 24 h koncentracemi 50 a 300 µg/ml CDs vyústilo ve výslednou viabilitu 98 a 80 %, resp. (Obrázek č. 4j).

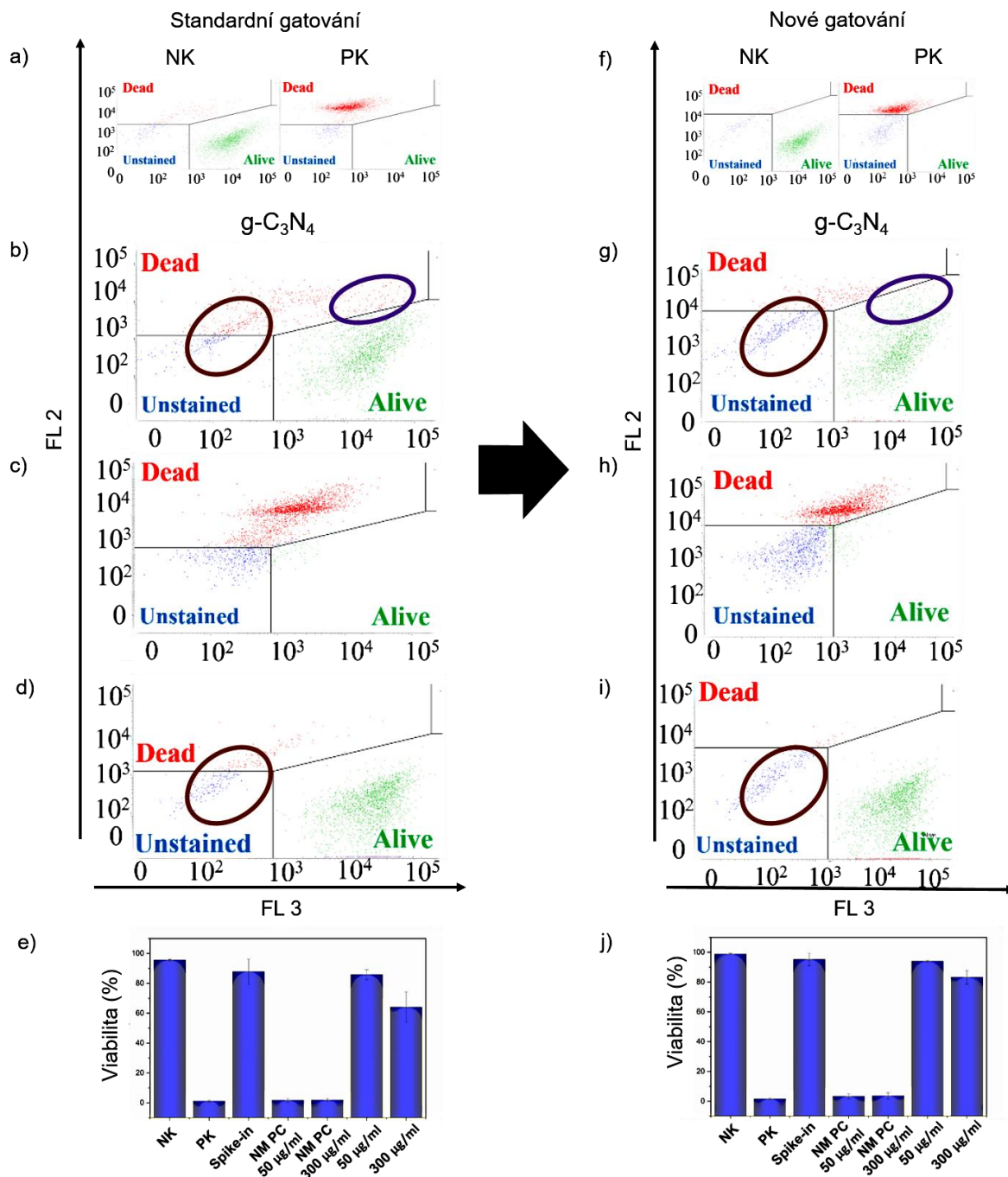


Obrázek č. 4. Dot ploty LIVE/DEAD analýzy: (a, f) negativní a pozitivní kontroly BJ buněk a (b - d, g - i) BJ buněk značených vzorkem CDs a vyhodnoceny podle (a - d) standardního gatování a (f - i) nového protokolu gatování. b, g) vzorky značené 300 µg/ml CDs po 24 h. c, h) NM PC 300 µg/ml pro vzorek CDs. d, i) Spike-in kontroly pro vzorek CDs. e, j) Vyhodnocení viability BJ buněk značených po 24 h CDs a dodatečných kontrol (n = 3). Body v gatú *alive* (živé) jsou označeny zeleně, body v gatú *dead* (mrtvé) červeně a body v gatú *unstained* (neoznačené) jsou uvedeny modře. Body interferujících volných aglomerátů jsou zvýrazněny hnědým oválem a body interferujících buněk s fluorescenčními CDs uvnitř nebo na membráně fialovým oválem. Převzato z ⁷⁵ a upraveno.

4.1.2.2. g-C₃N₄ a LIVE/DEAD analýza BJ buněk – překonání interference volných aglomerátů

Pro vzorek g-C₃N₄ byly podle standardního postupu detekovány stejné typy interference jako u vzorku CDs, avšak jejich vliv na vyhodnocení se výrazně lišil. Posun ve fluorescenční intenzitě bodů buněk obsahující g-C₃N₄ nebyl ani zdaleka natolik výrazný jako v případě CDs, jelikož způsobil posun pouze zlomku bodů (fialový ovál v Obrázku č. 5b). Intenzivnější interferenci představovala přítomnost volných aglomerátů ve vzorcích, které se překrývaly s body reprezentující populaci buněk, a proto je při prvotním gatování nešlo odlišit a musely být do vyhodnocení zahrnuty, aby nedošlo ke ztrátě informace o populaci buněk.⁷⁵ Tyto body se při použití standardního gatování nacházely v gatě pro mrtvé buňky (dead) jak ve vzorku značeném 300 µg/ml g-C₃N₄ (hnědý ovál v Obrázku č.5b), tak ve spike-in kontrole, kde byly zodpovědné za její pokles na 88 % živých buněk (hnědý ovál v Obrázku č. 14d a Obrázek č. 5e). Pokles viability u vzorku značených 24 h 50 a 300 µg/ml g-C₃N₄ na 86 a 63 %, resp. tak nebyl způsoben působením materiálu, ale interferencí jeho volných aglomerátů (Obrázek č. 5e).

Využitím nového protokolu s dodatečnými kontrolami jsme byli schopni překonat tuto interferenci, jelikož výběrem specifických gatů byla vyhodnocována pouze populace buněk a body reprezentující volné aglomeráty byly přesunuty do gatě pro neoznačené buňky (*unstained*) (hnědé ovály v Obrázku č. 5g a 5i). Současně také body buněk obsahující g-C₃N₄ se zvýšenou intenzitou se nyní nacházely v gatě pro živé buňky (*alive*) (modrý ovál v Obrázku č. 5g). Výsledná viabilita BJ buněk značených 24 h 50 a 300 µg/ml g-C₃N₄ tak byla 94 a 83 %, resp. (Obrázek č. 5j).

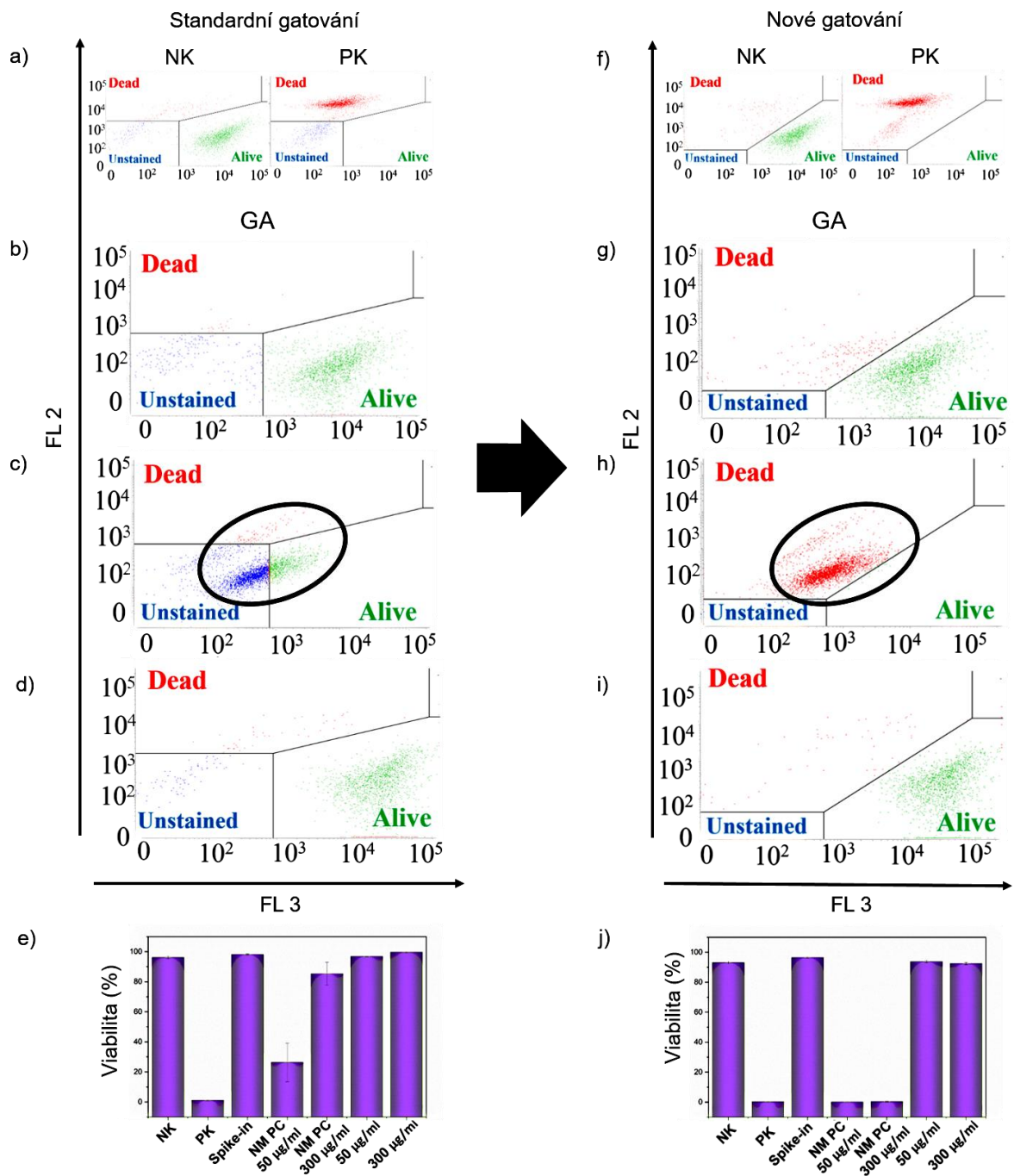


Obrázek č. 5. Dot ploty LIVE/DEAD analýzy: (a, f) negativní a pozitivní kontroly BJ buněk a (b - d, g - i) BJ buněk značených vzorkem g-C₃N₄ a vyhodnoceny podle (a - d) standardního gatování a (f - i) nového protokolu gatování. b, g) vzorky značené 300 µg/ml g-C₃N₄ po 24 h. c, h) NM PC 300 µg/ml pro vzorek g-C₃N₄. d, i) Spike-in kontroly pro vzorek g-C₃N₄. e, j) Vyhodnocení viability BJ buněk značených po 24 h g-C₃N₄ a dodatečných kontrol (n = 3). Body v gatú *alive* (živé) jsou označeny zeleně, body v gatú *dead* (mrtvé) červeně a body v gatú *unstained* (neoznačené) jsou uvedeny modře. Body interferujících volných aglomerátů jsou zvýrazněny hnědým oválem a body interferujících buněk s fluorescenčními g-C₃N₄ uvnitř nebo na membráně fialovým oválem. Převzato z ⁷⁵ a upraveno.

4.1.2.3. GA a LIVE/DEAD analýza BJ buněk – překonání interference zhášení fluorescence PI

Vzorek GA nevytvářel v médiu velké aglomeráty, na druhou stranu mikroskopie ukázala, že buňky značené GA měly velké množství materiálů buď v intracelulárním prostoru, nebo na své membráně.⁷⁵ LIVE/DEAD analýza provedena podle standardního gatování odhalila, že GA způsobuje kompletně jiný typ interference než zbylé dva CNMs (Obrázek č. 6a-e). Ačkoliv spike-in kontrola nebyla ovlivněna (viabilita přes 90 %), vzorek GA způsoboval zhášecí efekt, který měl za následek výrazný pokles intenzity fluorescence PI a tedy bodů představující mrtvé buňky. Jelikož v obou kontrolách (PK a NM PC 300 µg/ml) byly teplem umrtvené buňky a jediný rozdíl byla přítomnost GA ve vzorku NM PC 300 µg/ml, je jasné, že interference byla způsobena právě interakcí GA s fluorescenční značkou PI (černý ovál v Obrázku č. 6c). Zhášecí efekt GA měl za následek posun bodů reprezentující buňky z gatů pro mrtvé (*dead*) buňky do gatů pro živé (*alive*) nebo neoznačené (*unstained*) buňky. Tato interference tak vedla k falešnému zvýšení viability vzorků NM PC 50 µg/ml a NM PC 300 µg/ml na 26 % a 85 %, resp., i když v obou vzorcích byly pouze umrtvené buňky (Obrázek č. 6e). Proto ačkoliv vzorky značené 50 a 300 µg/ml GA měly viabilitu přes 96 %, vyhodnocení nebylo kvůli interferenci GA spolehlivé, jelikož by mrtvé buňky mohly být chybně zahrnuty v gatů pro živé buňky (*alive*).

Prostřednictvím nového protokolu podle dodatečných kontrol byla interference překonána selekcí vhodných gatů, které vedly k viabilitě v NM PCs vzorcích menší než 10 % (černý ovál v Obrázku č. 6h a Obrázek č. 6j). Měli jsme tak jistotu, že i přes zhášecí efekt GA budou případné mrtvé buňky ve vzorcích značených 50 a 300 µg/ml GA ve správném gatů pro mrtvé buňky (*dead*). Výsledná viabilita BJ buněk značených 24 h 50 a 300 µg/ml GA tak byla 94 a 92 %, resp. (Obrázek č. 6j).



Obrázek č. 6. Dot ploty LIVE/DEAD analýzy: (a, f) negativní a pozitivní kontroly BJ buněk a (b - d, g - i) BJ buněk značených vzorkem GA a vyhodnoceny podle (a - d) standardního gatování a (f - i) nového protokolu gatování. b, g) vzorky značené 300 µg/ml GA po 24 h. c, h) NM PC 300 µg/ml pro vzorek GA. d, i) Spike-in kontroly pro vzorek GA. e, j) Vyhodnocení viability BJ buněk značených po 24 h GA a dodatečných kontrol (n = 3). Body v gatě *alive* (živé) jsou označeny zeleně, body v gatě *dead* (mrtvé) červeně a body v gatě *unstained* (neoznačené) jsou uvedeny modře. Body interferujících buněk s GA uvnitř nebo na membráně, který zhašuje fluorescenci PI, jsou zvýrazněny černým oválem. Převzato z ⁷⁵ a upraveno.

4.2. Interakce uhlíkových nanomateriálů s organismy ve vodním prostředí – environmentální toxicita

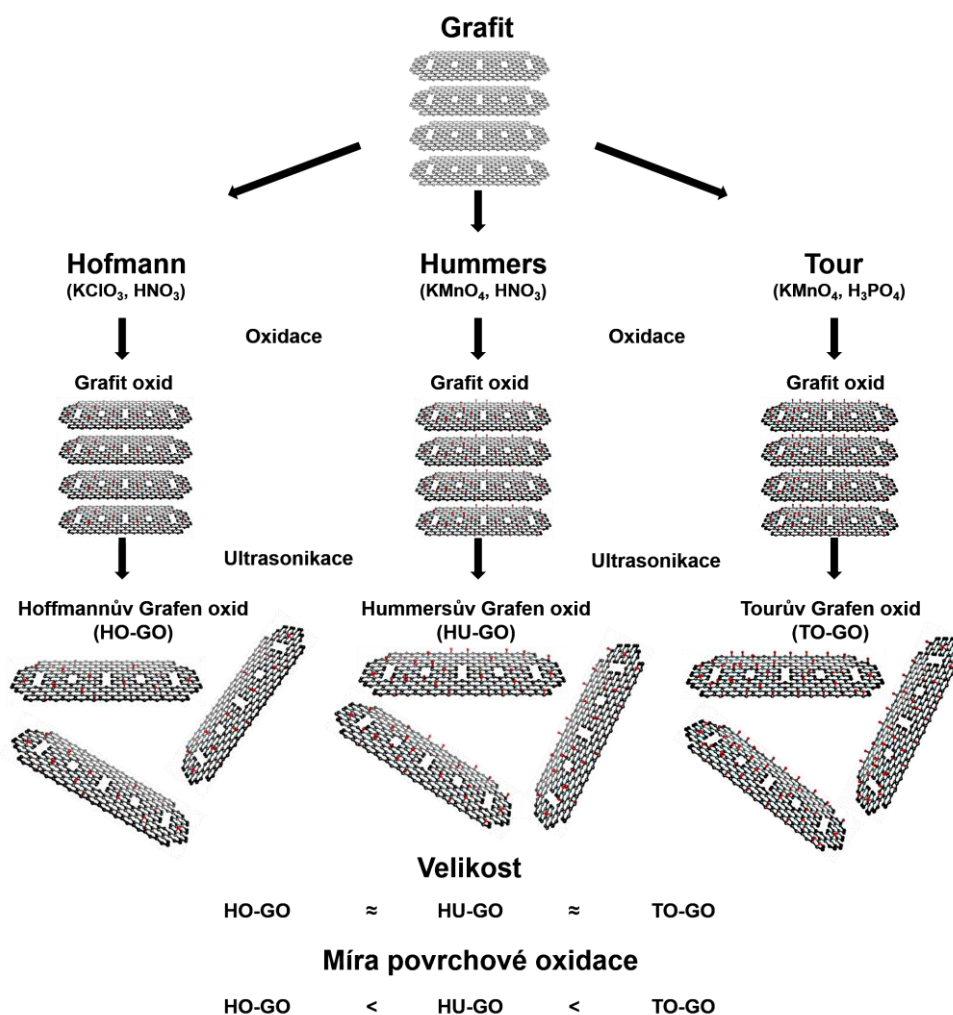
Jak již bylo zmíněno v literárním přehledu práce, díky svým vlastnostem je grafen oxid (GO) jedním z nejvyužívanějších CNMs v aplikacích v životním prostředí. Uplatnění nachází především v technologiích zabývajících se sanací vody. Vzhledem k zájmu o výzkum GO v této specifické oblasti a rozmachu jeho výroby, který zaznamenal v posledních letech je nevyhnutelné, že nakonec dojde k úniku nebo jeho uvolnění do životního prostředí, zejména vodních ekosystémů.⁷⁶ V takovém případě tak mimořádné vlastnosti jako hydrofilní chování, mobilita ve vodě a vysoká reaktivita povrchu, které z GO dělají žádaný materiál v mnoha aplikacích, mohou GO rychle proměnit v ekologický problém pro organismy v životním prostředí. Z dlouhodobého hlediska by také mohla představovat problém stabilita GO, jelikož by uvolňující GO mohl být distribuován na velmi širokém území a přetrvávat po značnou dobu.⁷⁷ Proto je naprosto nezbytné pochopit interakci GO s vodními organismy a identifikovat potenciální toxický mechanismus, kterým by je mohl poškozovat.

4.2.1. Grafen oxidy s rozdílným stupněm povrchové oxidace

V předložené disertační práci jsme pracovali se třemi GO systémy, které byly připraveny podle třech rozdílných syntéz, využívající rozdílné oxidační činidla. Syntéza podle Hoffmanova protokolu vedla k vytvoření Hoffmanova grafen oxidu (HO-GO, chlorečnan draselný a kyselina dusičná),⁷⁸ příprava sledující Hummersův postup k Hummersově grafen oxidu (HU-GO, manganistan draselný a kyselina dusičná)⁷⁹ a poslední byla syntéza podle Tourova procesu, která vyústila v Tourův grafen oxid (TO-GO, manganistan draselný a kyselina fosforečná).⁸⁰ Detaily ohledně jednotlivých syntéz jsou uvedeny v publikaci Chng et al.⁸¹ Tyto tři různé procedury tedy měly poskytnout vzorky GO s podobnou velikostí a výškou (jednovrstevné), ale

s kompletně různou povrchovou oxidací a distribucí kyslík-obsahujících funkčních skupin (Obrázek č. 7).

Z charakterizace systémů GO vyplynulo, že velikost listů byla průměrně $2 \times 4 \mu\text{m}$ a výška listů fluktovala mezi 0,8 a 1,2 nm.⁸² TO-GO měl pak nejvíce oxidovaný povrch ze třech vzorků, zatímco HO-GO nejméně.⁸² Jelikož měl HO-GO nejnižší stupeň oxidace, obsahoval také nejméně karboxylových skupiny, které se obvykle nacházejí na hranách GO. Tento jev se vzhledem k ekotoxicitě GO ukázal jako klíčový a bude detailněji popsán dále. Současné doplňující analýzy potvrdily, že ve vzorcích GO nezůstávají žádná anorganická rezidua ze syntézy a jakýkoliv pozorovaný efekt je tedy definitivně způsoben vlivem materiálů.⁸²



Obrázek č. 7. Ilustrační schéma přípravy grafenu oxidu z grafitu podle Hoffmanova, Hummersova a Tourova protokolu. Použití různých oxidantů vedlo k přípravě třech různých grafen oxidových systémů s podobnou velikostí, ale rozdílnou mírou povrchové oxidace. Převzato z⁸³ a upraveno.

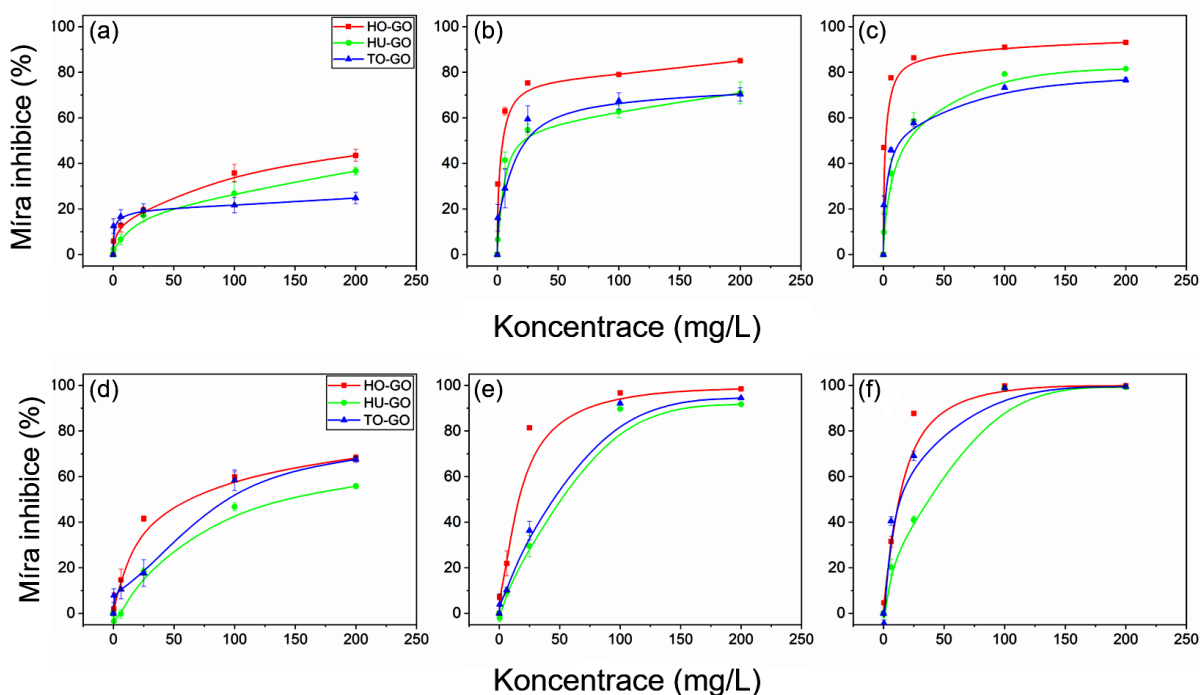
4.2.2. Interakce GOs s řasami a sinicemi

První studie se zabývala interakcí GOs se zástupci jednobuněčných organismů: zelených řas (*Raphidocelis subcapitata*) a sinic (*Synechococcus elongatus*). Řasy a sinice jsou fotoautotrofní organismy, které hrají ve vodním prostředí podobnou roli s tím rozdílem, že sinice jsou prokaryota, zatímco zelené řasy eukaryota. Jako primární producenti organických sloučenin reprezentují klíčovou složku vodních ekosystémů a budou vystaveny jakémukoliv materiálu nebo částicím uvolněných do vodního prostředí (včetně GO). Pro studium mechanismu interakce třech GO s různou mírou povrchové oxidace s řasami a sinicemi byla vybrána koncentrační řada 0,39, 6,25, 25, 100 a 200 mg/L.

4.2.2.1. Inhibice růstu řas a sinic po značení GO materiály

Test inhibice růstu GOs vůči zelené řase *Raphidocelis subcapitata* a sinici *Synechococcus elongatus* po 24, 48 a 72 h ukázal tři velice zajímavé jevy. Za prvé, buňky sinice *Synechococcus* byly mnohem citlivější vůči vzorkům GOs než buňky zelené řasy *Raphidocelis*, což bylo patrné především pro výsledky po 24 h, kdy všechny GOs inhibovaly růst sinice o 50 % nebo výše u vyšších koncentrací, zatímco u řasy nedosáhl žádný GO inhibičního efektu 50 % ani u nejvyšší použité koncentrace 200 mg/L (Obrázek č. 8a a 8d, EC 50 hodnoty jsou uvedeny v ⁸²). Vyšší citlivost sinice byla pravděpodobně způsobena jednodušší prokaryotickou buněčnou strukturou (v porovnání s eukaryotickou buňkou řasy) a také dobře známými antibakteriálními vlastnostmi GO.⁸⁴ Výsledky inhibice jsou v souladu s již publikovanými studiemi o toxických účincích materiálů na bázi grafenu, včetně GO, na řasy.⁸⁵⁻⁸⁸ Za druhé, byla pozorována silnější inhibice v případě nejméně oxidovaného vzorku HO-GO, než více oxidovaných HU-GO a TO-GO, což naznačuje, že GO působí určitým mechanismem, který silně závisí na jeho povrchovém složení. Tento jev se projevil hlavně u řas, kde byl pozorován u všech koncentrací, zatímco u sinic byl detekován pouze pro nižší koncentrace GO. Třetím pozorovaným jevem byla rozdílná velikost účinků růstové inhibice během časových bodů pro nižší koncentrace GOs (pod 100 mg/L).

Zatímco u výsledků po 24 a 48 h došlo k výraznému nárůstu míry inhibice růstu, rozdíl nárůstu mezi 48 a 72 h již nebyl tolik významný (Obrázek č. 8). Tento rozdíl byl navíc mnohem více markantní pro buňky řas než buňky sinic. Takové chování naznačovalo aktivaci určitých obranných mechanismů, které by organismům umožnily přítomnost GO v kultivačním médiu tolerovat.



Obrázek č. 8. Test růstové inhibice (a-c) zelené řasy *Raphidocelis subcapitata* a (d-f) sinice *Synechococcus elongatus* po značení různými koncentracemi třech systémů GO po (a,d) 24 h, (b, e) 48 h a (c, f) 72 h. Data byla normalizována definováním 100 % růstu pro kontrolní nezařazené buňky a rozdíl od 100 % byl stanoven jako míra inhibice (např. vzorek s 60% růstem ve srovnání s kontrolním vzorkem měl míru inhibice 40 %). Převzato z ⁸² a upraveno.

4.2.2.2. Analýza mechanismu interakce mezi GOs a buňky řas pomocí průtokové cytometrie

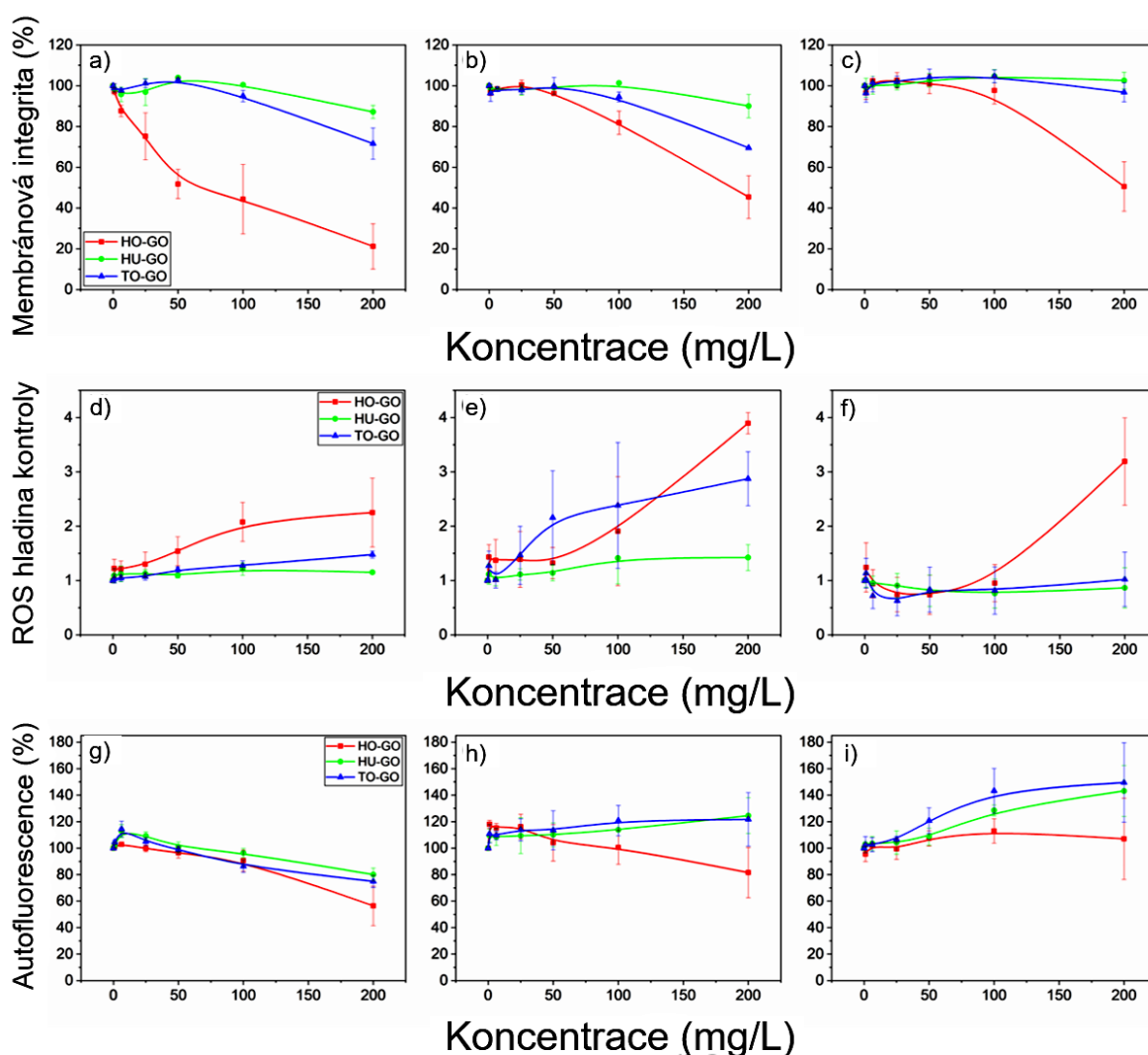
Pro objasnění mechanismu interakce mezi GOs a buňkami řas v závislosti na povrchové oxidaci GO byla studována integrita membrány buněk, generace ROS a obsah pigmentových

barviv Chlorofylu a a b zelené řasy *R. subcapitata* po inkubaci s různými koncentracemi GOs po 2, 24 a 48 h. Výsledky jsou představeny na obrázku č. 9.

Nejzávažnější ztráta integrity membrány buněk řas byla pozorována po prvních 2 h inkubace se vzorky GOs (Obrázek č. 9a). HO-GO způsobil nejvýraznější poškození (ztráta až 50 % integrity již při 50 mg/L), zatímco HU-GO a TO-GO systémy byly výrazně méně škodlivé (ztráty integrity pouze u nejvyšší testované koncentrace 200 mg/L, 13 a 29 % pro HU-GO a TO-GO, resp.). Vzorek HO-GO byl také jako jediný zodpovědný za nejvyšší nárůst ROS po 2 h (Obrázek č. 9d), což bylo pochopitelně způsobeno reakcí buněk na poškození membrány. Výsledky analýzy integrity membrány řasových buněk po 24 a 48 h silně naznačují určitou formu regenerace membrány a aktivaci obranného mechanismu proti působení GOs (Obrázek č. 9b a 9c). Jediné výrazné poškození membrány bylo totiž pozorováno pro nejvyšší koncentrace, a to pouze HO-GO (po 24 a 48 h) a TO-GO (pouze po 24 h) vzorku. Tuto skutečnost podporují také výsledky tvorby ROS, jelikož významné hladiny ROS byly detekovány pouze u nejvyšších koncentrací HO-GO a TO-GO vzorků (Obrázek č. 9e a 9f). Měření obsahu pigmentových barviv dobře korelovalo s pozorovanými změnami membránové integrity a oxidačního stresu. Hodnoty totiž prudce poklesly po prvních dvou hodinách expozice, především pro nejvyšší koncentrace GOs, zatímco po 24 a 48 h došlo k nárůstu hladiny chlorofylu u všech vzorků v souladu s regeneračními procesy a aktivací obranného mechanismu, které vedou ke zvýšené metabolické aktivitě (Obrázek č. 9h).⁸²

Tyto výsledky naznačují, že mechanismus interakce GO s řasami vysoce závisí na počtu oxidovaných funkčních skupin na jeho povrchu. Nejméně oxidovaný systém HO-GO přímou interakcí s buňkami řas způsobil mechanické poškození membrány a následný oxidační stres. Na druhou stranu, nejvíce oxidovaný materiál TO-GO neinteragoval s buňkami řas přímo, ale skrze své hojně zastoupené funkční skupiny na povrchu, čímž způsobil nárůst ROS, ale nepoškodil přitom membránu buněk. HU-GO jako středně oxidovaný systém GO měl

pravděpodobně dostatek povrchových funkčních skupin k interakci bez přímého poškození membrány, ale ne tolik, aby způsobil oxidační stres. Nejvyšší toxický účinek GOs byl pozorován po krátkodobé expozici, zatímco po delší inkubaci došlo ke zmírnění toxicity GO. Za zmírnění jsou pravděpodobně zodpovědné regenerační procesy a aktivace obranných mechanismů po expozici GO, které buňkám odebírají energii, což způsobuje jejich pomalejší růst v porovnání s neznačenými kontrolními buňkami (Obrázek č. 8).



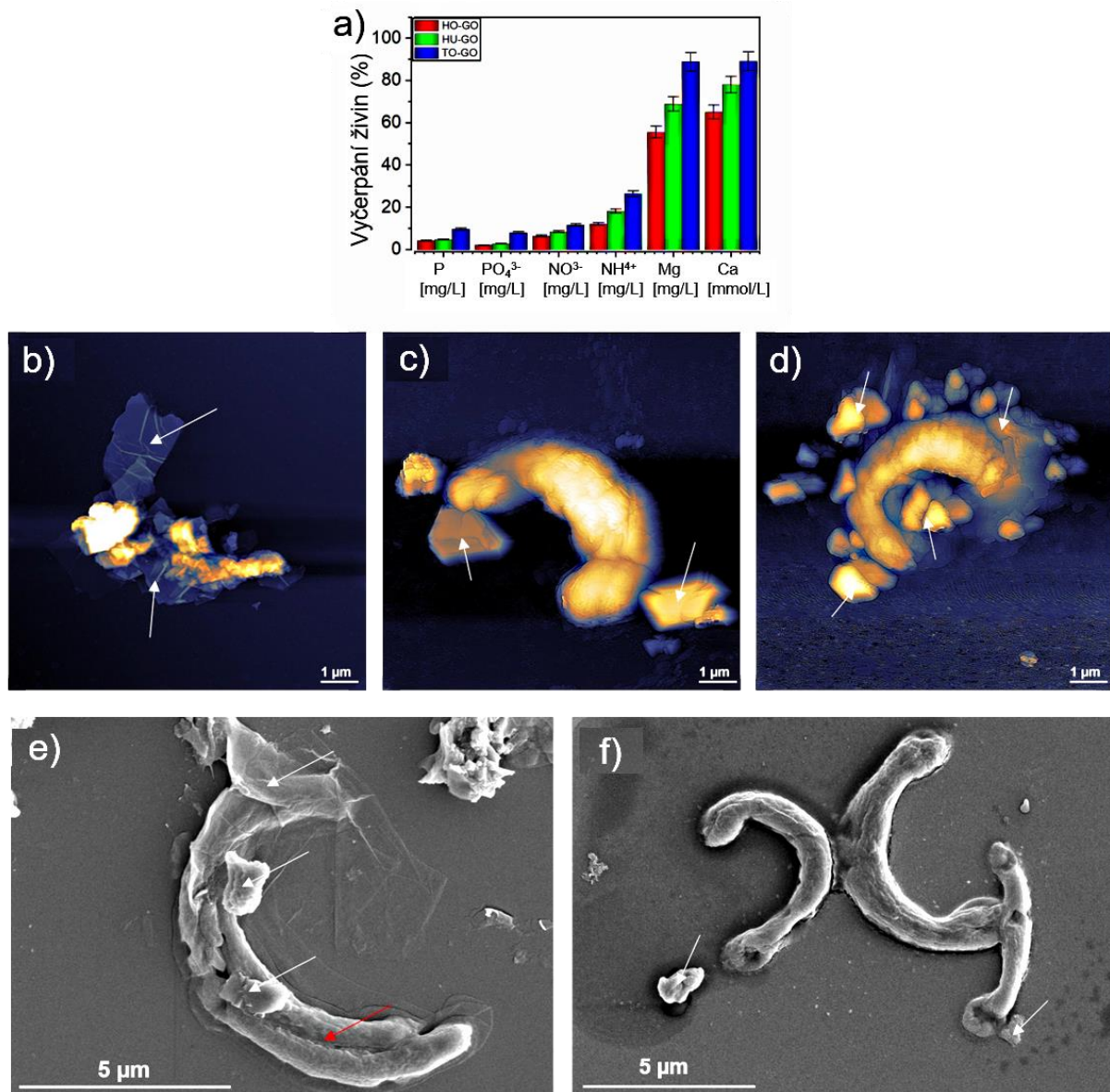
Obrázek č. 9. Analýza řasových buněk po inkubaci s různými koncentracemi GOs pomocí průtokové cytometrie. a-c) Analýza ztráty membránové integrity po a) 2 h, b) 24 h a c) 48 h. d-f) Nárůst ROS po d) 2 h, e) 24 h a f) 48 h. g-i) Hladiny chlorofylu a a b po g) 2 h, h) 24 h a i) 48 h. Data byla normalizována definováním 100 % membránové integrity, hladinou ROS 1 a obsahu chlorofylu 100 % jako odpovídající hodnoty pozorované v neznačených kontrolních vzorcích. Převzato z ⁸² a upraveno.

4.2.2.3. Vyčerpání živin z kultivačního média vlivem GOs a detailní mikroskopické hodnocení interakce řas a GOs

Za toxicitu GO mohou být zodpovědné také nepřímé toxické efekty. V našem případě byly všechny systémy GOs schopny z kultivačního média odčerpat živiny (především Ca a Mg, viz Obrázek č.10a) a současně pozorování pomocí optické mikroskopie prokázalo pro naše materiály efekt stínění uhlíkových nanomateriálů.⁸⁹ Byly ta definovány dva nepřímé efekty, které mohly výrazně přispět k celkové ekotoxicitě systémů GO vůči řasám a sinicím, ve kterých povrchová oxidace nehraje výraznou roli.

Pro získání informace o interakci mezi GOs a buňkami řas byly využity různé druhy mikroskopie. Nejprve obrázky fixovaných buněk získané optickou mikroskopií odhalily, že buňky řas byly v mnohem intenzivnější interakci či kontaktu se vzorkem HO-GO, než se zbylými GOs.⁸² Obrázky z AFM následně potvrdily přímý kontakt mezi buňkou řasy a systémem HO-GO, jelikož byla buňka obklopena listy HO-GO a navíc vykazovala známky výrazného poškození (Obrázek č. 10b). Naopak buňky inkubované s HU-GO a TO-GO sice byly taktéž obklopeny listy GO, ale jejich morfologie zůstala nezměněna (Obrázek č. 10c a 10d). Zejména však u vzorku TO-GO bylo pozorováno velké množství materiálů okolo buňky řasy, které pravděpodobně interagovaly skrze funkční skupiny, co by vysvětlovalo nárůst oxidačního stresu pozorovaný u tohoto vzorku (Obrázek č.9e). Obrázky z elektronové mikroskopie (SEM) tyto závěry potvrdily. I když oba materiály (HO-GO a TO-GO) opět viditelně interagovaly s buňkou řasy, na buňce značené materiálem HO-GO byla pozorována výrazná poškození ve formě řezné rány a také HO-GO listy pronikající do buňky (Obrázek č. 10e). Na druhou stranu, u vzorku TO-GO byly listy GO pozorovány pouze v těsné blízkosti buňky a především buňky řasy nevykazovaly jakékoliv známky poškození (Obrázek č. 10f). Bylo tak prokázáno, že listy GO mohou působit jako „nano-žiletky“ a způsobovat mechanické poškození buněk řas. Tento jev je však vysoce citlivý na povrchovou funkcionalizaci GO,

jelikož byl pozorován pouze u nejméně oxidovaného vzorku HO-GO. Relativní nedostatek karboxylových skupin na hranách HO-GO se tak jeví jako klíčový pro jeho schopnost mechanicky „řezat“ řasové membrány.

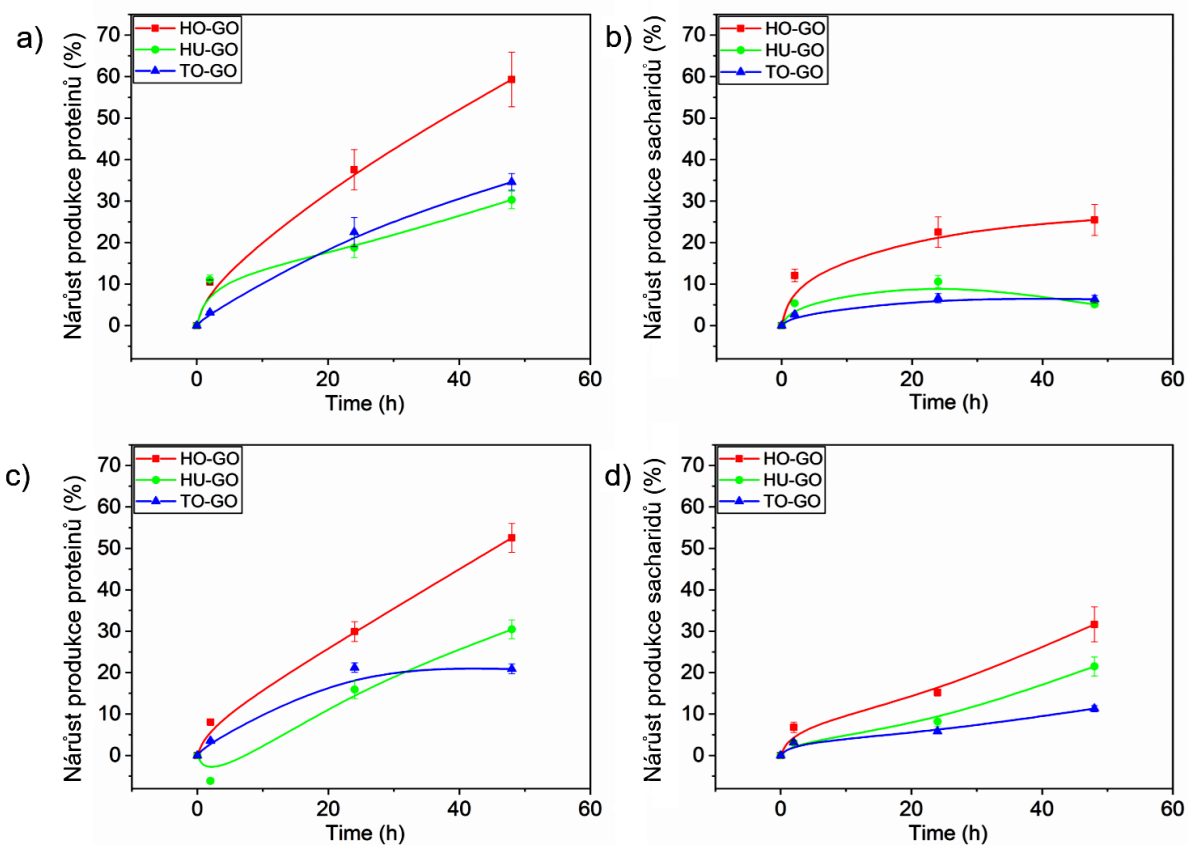


Obrázek č. 10. a) Množství vyčerpaných živin z 50% růstového média ZBB po 24 h inkubace 100 mg/L GOs. Míra vyčerpání každé živiny je vyjádřena v procentech a udává se jako poměr koncentrace živin v médiu obsahujícím GO ku koncentraci v kontrolním médiu. b-d) Obrázky z AFM buněk řasy po 24 hodinách inkubace s 200 mg/L b) HO-GO, c) HU-GO a d) TO-GO. e, f) Obrázky ze SEMu buněk řasy po 24 hodinách inkubace s 200 mg/L e) HO-GO a f) TO-GO. Bíle šipky v panelech označují jednotlivé listy GO a červená šipka v panelu e) znázorňuje řeznou ránu na povrchu řasové buňky. Převzato z ⁸² a upraveno.

4.2.2.4. Obranná reakce organismů na přítomnost GOs – stanovení extracelulárních proteinů a sacharidů

Jelikož dosavadní výsledky indikovaly určitý obranný mechanismus organismů vůči přítomnosti GOs, provedli jsme experiment na stanovení extracelulárních proteinů a sacharidů (EPCs – extracellular proteins and carbohydrates) po 2, 24 a 48 h inkubace s GOs. Naše výsledky ukázaly, že oba studované organismy začaly produkovat EPCs již po nejkratší 2 h inkubaci s GOs (Obrázek č. 11). Produkce EPCs navíc prudce vzrostla s délkou inkubace: zatímco po 2 h inkubace byla míra produkce EPCs pouze mírně vyšší než v kontrolním vzorku, inkubace po 24 a 48 h vedla k výraznému nárůstu v produkci EPCs (Obrázek č. 11). U obou organismů byl zaznamenán stejný trend, kdy nejvyšší nárůst proteinů způsobil vzorek HO-GO (59 % pro řasy a 53 % pro sinice), zatímco více oxidované vzorky indukovaly menší, ale stále dost významné zvýšení produkce (Obrázek č. 11a a 11c). Produkce sacharidů byla u obou organismů méně výrazná, než v případě proteinů, avšak stále se stejným trendem, kdy HO-GO indukoval nejvýraznější nárůst (Obrázek č. 11b a 11d). Tyto výsledky potvrzují zjištění získané z analýzy průtokovou cytometrií, jelikož vzorek HO-GO, který mechanicky poškozoval buňky řas, vyvolal nejsilnější obrannou reakci a regenerační aktivitu, zatímco méně toxické vzorky HU-GO a TO-GO indukovaly slabší odezvu.

Navzdory obavám ohledně potenciální ecotoxicity GO, které byly vyjádřeny v literatuře, naše výsledky naznačují, že GO opravdu dokáže způsobit poškození populací řas a sinic, ale pouze v krátkodobém měřítku. Po delší expozici již totiž začnou tyto mikroorganismy produkovat EPCs, kterými jsou schopni se chránit proti dlouhodobým nepříznivým účinkům systémů GO, mezi které patří především schopnost mechanicky poškozovat membránu („nano-žiletky“) systémů GO s nízkým stupněm povrchové oxidace.



Obrázek č. 11. Změny v produkci (a, c) proteinů a (b, d) sacharidů ve srovnání s produkcí v kontrolních neznačených buňkách organismu (a, b) *R. subcapitata* a (c, d) *S. elongatus* po 2, 24 a 48 h inkubace s materiály HO-GO, HU-GO a TO-HO vyjádřené v proteinech. Převzato z ⁸² a upraveno.

4.2.3. Interakce GOs s vodními korýši

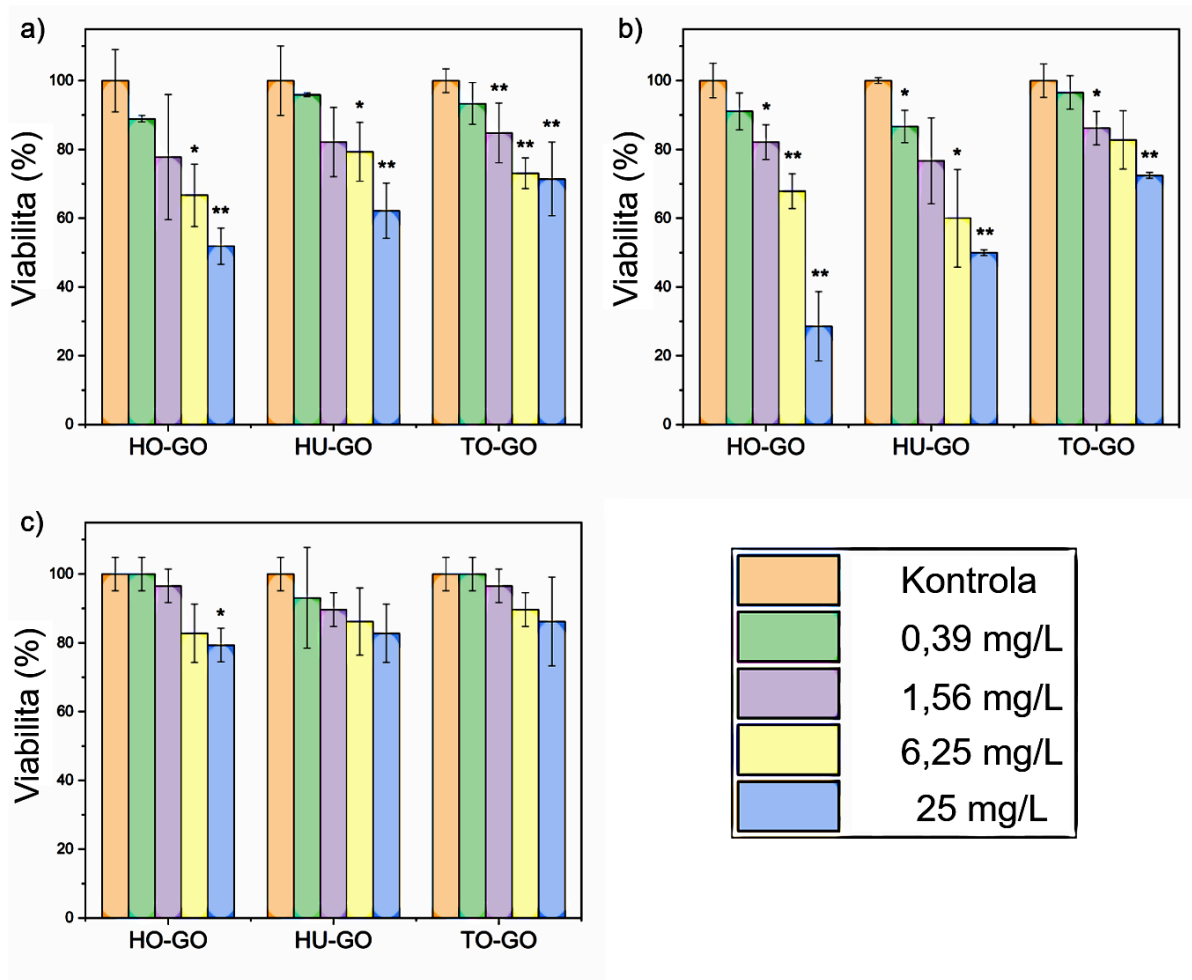
Ve studiu environmentálního osudu GO ve vodním prostředí a jeho potenciální toxicity v závislosti na povrchové oxidaci jsme pokračovali sledováním interakce mezi třemi GOs a zástupci planktonních a bentických korýšů.⁸³ Vodní korýši byli vybráni ze dvou hlavních důvodů: za prvé hrají důležitou roli jako primární konzumenti v potravinovém řetězci sladkovodních rybníků a jezer; a za druhé se v poslední době staly také modelovými druhy pro studium potenciálních škodlivých účinků nově vyvinutých materiálů.⁹⁰ Z důvodu jejich velikosti může GO interagovat jak s vnějšími částmi těla, tak s vnitřním prostředím po pohlcení GO organismy. Důležitou roli v případné ekotoxicitě GO tak může hrát také rozdílná strategie získávání potravy zmíněných organismů. Jako zástupci planktonních korýšů byli vybráni *Daphnia magna* (nejčastěji používaný korýš při testování ekotoxicity látek)^{91, 92} a *Thamnocephalus platyurus* (korýš vysoce citlivý vůči environmentálním toxikantům)^{93, 94}, zatímco *Heterocypris incongruens* (hojně rozšířený sladkovodní korýš používaný při monitorování půdy a sedimentů)^{95, 96} zastupoval bentické korýše. Interakce tří systémů GO vůči zmíněným organismům byla pozorována pro koncentrace 0,39, 1,56, 6,25 a 25 mg/L.

4.2.3.1. Akutní toxicita GOs vůči vodním korýšům dle příslušných standardů

První experimenty jsme provedli dle standardů pro akutní toxicitu příslušných organismů. Viabilita *D. magna* a *T. platyurus* byla vyhodnocena po 48 h, zatímco *H. incongruens* po 6 dnech inkubace. Výsledky akutní toxicity GOs uvedené na obrázku č. 12 ukázaly, že *H. incongruens* byl nejodolnějším organismem, jelikož vykazoval životnost přes 79 % i pro nejvyšší koncentrace GOs (Obrázek č. 12c). Na druhou stranu oba planktonní organismy měly viabilitu pod 73 % pro nejvyšší koncentraci (25 mg/L) všech tří GOs (Obrázek č. 12a a 12b, EC 50 hodnoty jsou uvedeny v⁸³). Ramanova měření prokázala přítomnost všech tří GOs uvnitř

obou organismů,⁸³ což prokázalo, že všechny tři systémy GO interagovaly jak s vnějšími částmi těla, tak s trávicím systémem planktonních a bentických korýšů.

Výsledky akutní toxicity vodních korýšů dle příslušných standardů tak odhalily, že GO je více toxický vůči organismům, kteří získávají potravu filtrací, než vůči těm, kteří si potravu selektivně vybírají ze sedimentu. Současně byl pozorován také výrazný efekt povrchové oxidace GO, jelikož nejvyšší úmrtnost všech organismů způsobil nejméně oxidovaný vzorek HO-GO. S malým počtem funkčních skupin na hranách listů GO a nejvyšší hydrofobicitou HO-GO mohl interagovat přímo s organismy, zejména s filtračním aparátem planktonních korýšů, a způsobovat mechanické poškození, které ve výsledku vedlo k vyššímu úhynu organismů.⁸²



Obrázek č. 12. Viabilita planktonních korýšů a) *Daphnia magna* a b) *Thamnocephalus platyurus* po 48 h inkubace s různými koncentracemi HO-GO, HU-GO a TO-GO. Viabilita bentického korýše c) *Heterocypris incongruens* po 6 denní inkubaci s různými koncentracemi HO-GO, HU-

GO a TO-GO. Výsledky byly normalizovány definováním 100% viability pro kontrolní neznačený vzorek. *p < 0.05; **p < 0.01. Převzato z ⁸³ a upraveno.

4.2.3.2. Analýza oxidačního stresu *Daphnia magna* po inkubaci s GOs dle standardního protokolu

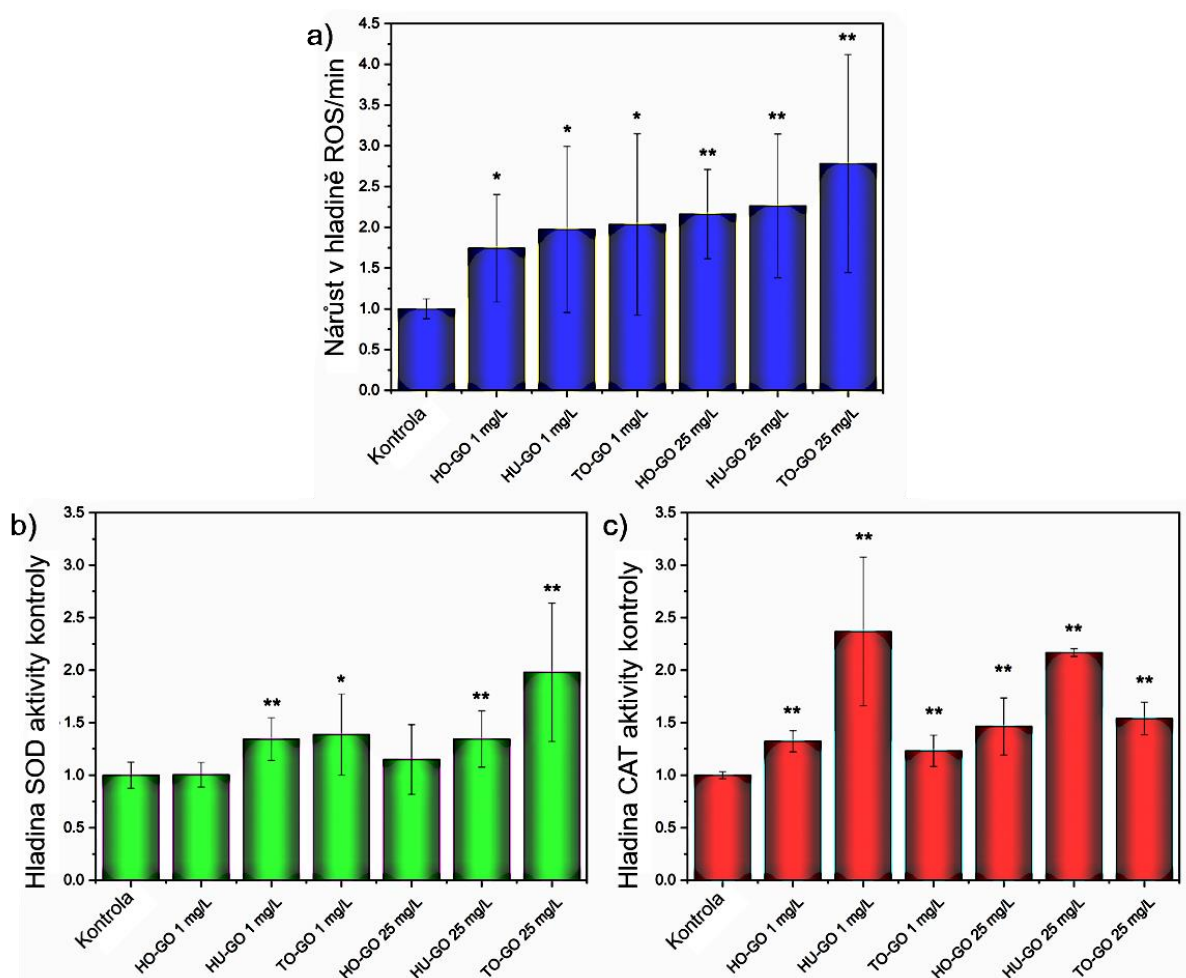
Oxidační stres dafnií po inkubaci s GOs byl sledován po 48 h pro koncentrace 1 a 25 mg/L GOs pomocí třech různých biomarkerů podle standardního protokolu: i) nárůst kyslíkových radikálů (ROS) za minutu, ii) antioxidační enzym superoxid dismutáza (SOD) a iii) antioxidační enzym kataláza (CAT).

Zjistili jsme, že obě koncentrace všech tří systémů GO způsobily výraznou generaci ROS, jelikož byly zaznamenány hodnoty přesahující 1,7 hladiny ROS/min kontrolního vzorku (Obrázek č. 13a). Opět byl pozorován určitý efekt povrchové oxidace, jelikož více oxidované vzorky HU-GO a především TO-GO generovaly více radikálů (2,3 a 2,8 zvýšení hladiny ROS/min pro HU-GO a TO-GO 25 mg/L) než nejméně oxidovaný HO-GO (2,2 zvýšení hladiny ROS/min pro 25 mg/L). V literatuře již byl popsán vliv stupně oxidace CNMs a zejména GO na jeho schopnost produkovat ROS,^{97, 98} což se shoduje s naměřenými výsledky. Jednalo se však o překvapivý výsledek, jelikož oxidační stres byl v literatuře naznačen jako hlavní mechanismus ecotoxicity GO vůči dafniím.⁹⁹ Podle našich výsledků však byla u vzorku HO-GO, způsobujícího nejnižší nárůst hladiny ROS, pozorována nejvyšší úmrtnost (Obrázek č. 12a).

Proto jsme následně studovali obrannou odpověď dafnií proti GOs pomocí aktivity dvou dalších biomarkerů, a to aktivity hlavních antioxidačních enzymů: superoxid dismutázy (SOD) a katalázy (CAT). Zatímco aktivita superoxid dismutázy byla významně zvýšena pouze pro více oxidované HU-GO a TO-GO (Obrázek č. 13b), u katalázy došlo stejně jako u analýzy nárůstu ROS k významnému zvýšení aktivity pro obě koncentrace všech tří GOs ve srovnání

s kontrolním vzorkem. I zde však bylo zvýšení mnohem intenzivnější pro HU-GO a TO-GO ve srovnání s HO-GO vzorkem (Obrázek č. 13c). Více oxidované HU-GO a TO-GO vzorky však působily odlišně pro jednotlivé enzymy. Tento jev byl pravděpodobně způsoben rozdílným složením funkčních skupin, protože zatímco TO-GO měl ze vzorků celkově nejvíce kyslík obsahujících skupin, HU-GO obsahoval více karboxylových skupin.⁸²

Z uvedených výsledků vyplývá, že i když oxidační stres hraje důležitou roli v ekotoxicitě GO, nejedná se o hlavní mechanismus, protože dafnie se dokáží s nárůstem radikálů vypořádat skrze intenzivnější antioxidační reakci prostřednictvím hlavních antioxidačních enzymů.



Obrázek č. 13. Analýza oxidačního stresu *Daphnia magna* po 48 h inkubace s 1 a 25 mg/L HO-GO, HU-GO a TO-GO. a) Nárůst ROS/min, b) SOD aktivity a c) CAT aktivity úrovně kontrolního vzorku. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$. Převzato z⁸³ a upraveno.

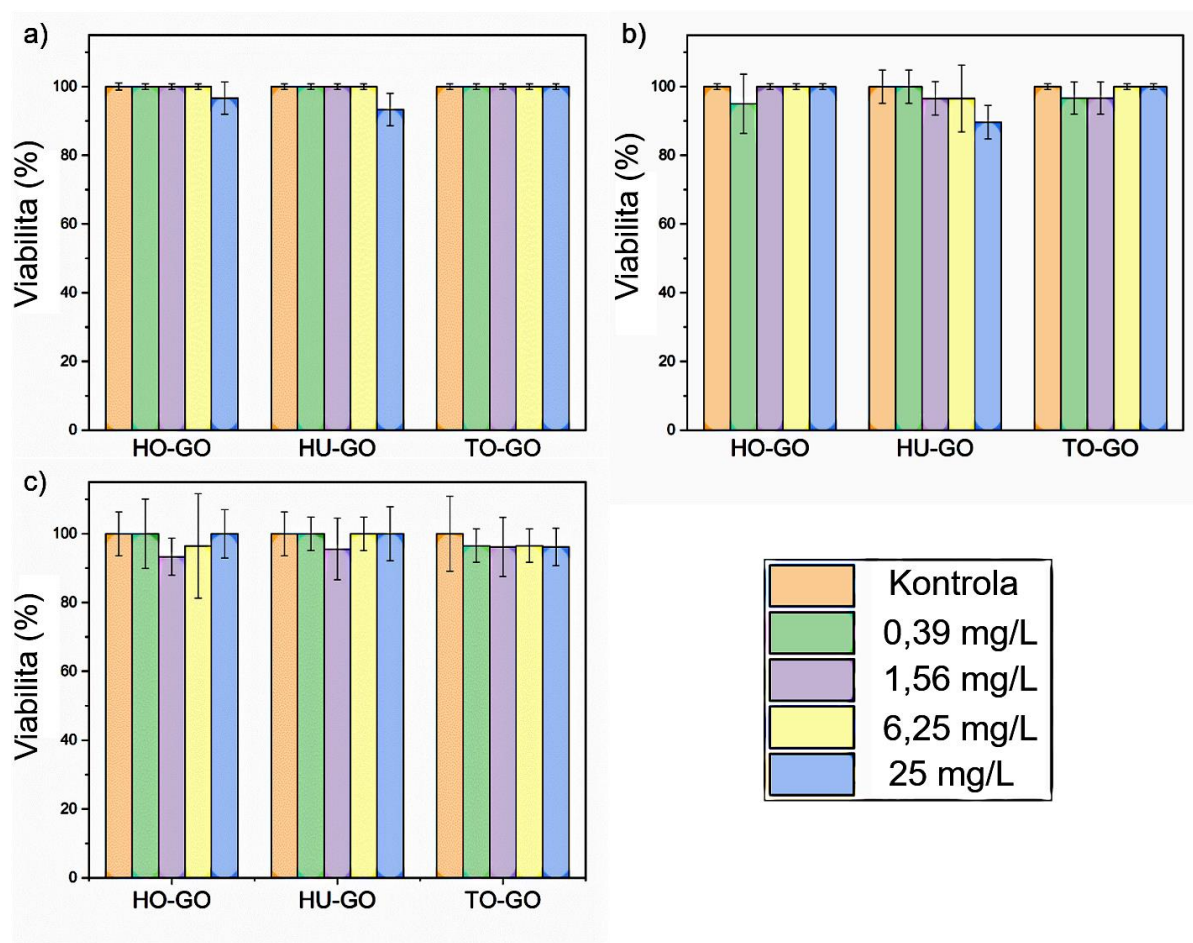
4.2.3.3. Akutní toxicita a analýza oxidačního stresu korýšů značených GOs s 24h předinkubací s řasami

V předchozí studii jsme poprvé popsali schopnost jednoduchých jednobuněčných zelených řas generovat obranou reakci proti GO prostřednictvím produkce bílkovin a sacharidů (Obrázek č. 11a a 11b).⁸² Abychom zjistili, zda tento jev může ovlivnit také akutní toxicity GOs vůči vodním korýšům, provedli jsme stejné testy znovu s modifikací, kterou představoval první krok, kdy byly GOs předinkubovány po 24 h se zelenou řasou *Chlorella kessleri*. Tato úprava současně lépe odrážela podmínky ve skutečných vodních ekosystémech, jelikož zelené řasy představují nejčastější druh potravy vodních korýšů. Bylo tak možné získat přesnější informace o osudu GO v životním prostředí.

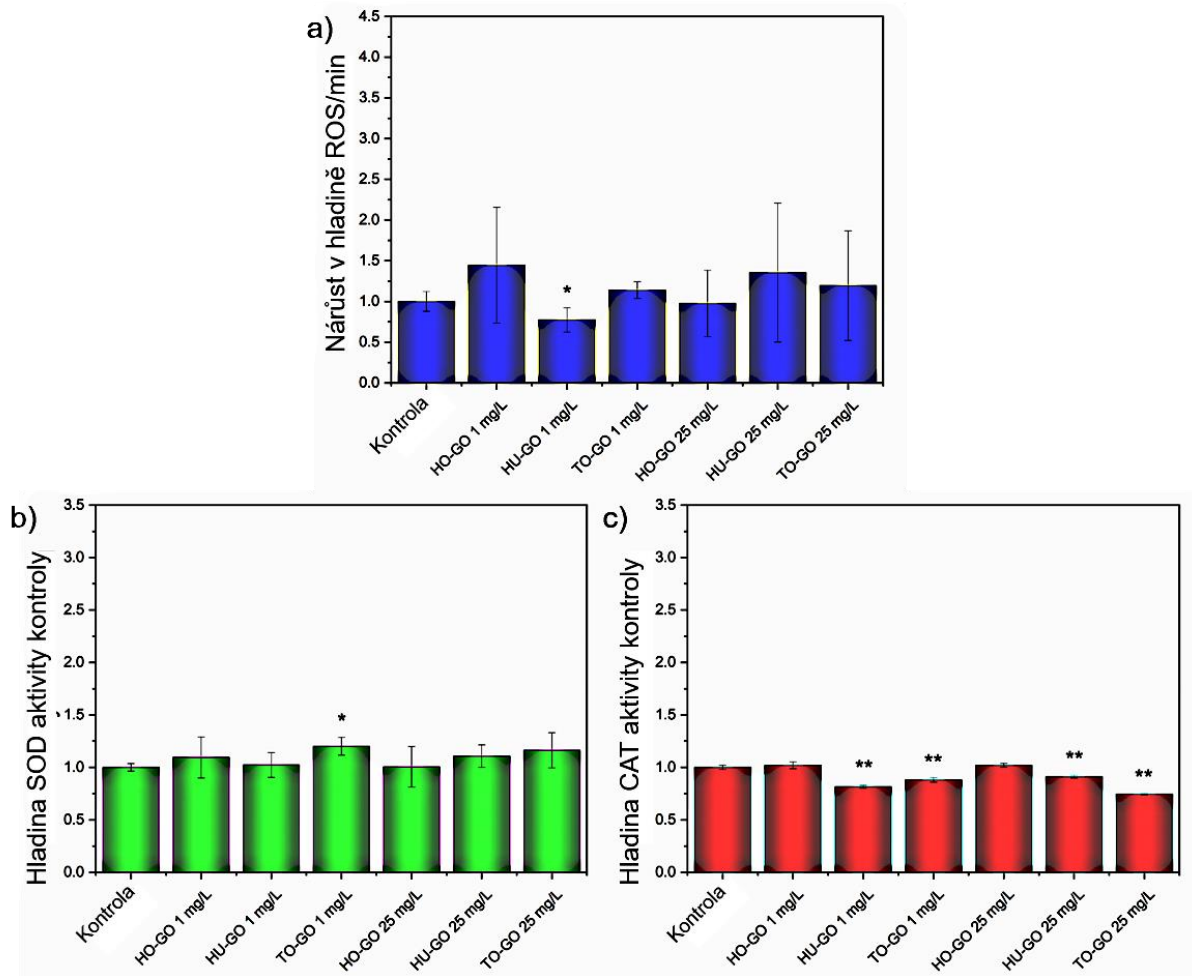
Výsledky na obrázku č. 14 jasně ukazují, že tato jednoduchá modifikace standardních testů dramaticky ovlivnila toxický účinek GO na vodní korýše. Obranná reakce jednobuněčných řas proti GOs se tak ukázala jako zásadní i pro mnohem složitější vodní organismy. Bylo pozorováno úplné potlačení akutní toxicity GOs pro planktonní a bentické korýše, jelikož životnost všech tří organismů neklesla pod 90 % ani při nejvyšší použité koncentraci všech tří GO (25 mg/L, Obrázek č. 14). Současně vnitřní a vnější expozice organismů GOs zůstala stejná i s touto modifikací, jelikož byly všechny systémy GO detekovány Ramanovým měřením uvnitř organismů.⁸³ Navíc se vliv obranné reakce řas projevil nejen ve viabilitě korýšů, ale také v analýze oxidačního stresu dafnií u všech tří pozorovaných biomarkerů (ROS, SOD a CAT) (Obrázek č. 15). Obě koncentrace všech tří systému GOs byly zodpovědné za takové exprese těchto biomarkerů, které byly na podobné úrovni jako neznačené kontrolní vzorky, došlo tak ke kompletní eradikaci oxidačního stresu způsobeného GOs při standardních testech.

Upravení podmínek laboratorních testů s využitím řas, které mnohem lépe reflektují podmínky ve skutečných vodních ekosystémech tak podle výsledků vytvořilo bezstresové

prostředí pro vodní korýše v přítomnosti GO i ve velmi vysokých koncentracích (25 mg/L). Fenomén potlačení ecotoxicity GO vlivem řas je o to pozoruhodnější, že byl pozorován pro velmi vysoké koncentrace (mg/L), které jsou milionkrát vyšší, než v současnosti očekávané koncentrace materiálů na bázi grafenu v životním prostředí.¹⁰⁰ Tyto výsledky tak naznačují, že i v případě masivního zvýšení koncentrace GO ve vodním prostředí v následujících letech, nebude GO představovat nebezpečný materiál pro vodní organismy.



Obrázek č. 14. Viabilita planktonních korýšů a) *Daphnia magna* a b) *Thamnocephalus platyurus* po 48 h inkubace s různými koncentracemi HO-GO, HU-GO a TO-GO s přidáním krokem 24 h předinkubace GOs s řasami. Viabilita bentického korýše c) *Heterocypris incongruens* po 6 denní inkubaci s různými koncentracemi HO-GO, HU-GO a TO-GO s přidáním krokem 24 h předinkubace GOs s řasami. Výsledky byly normalizovány definováním 100% viability pro kontrolní neznačený vzorek. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Převzato z⁸³ a upraveno.



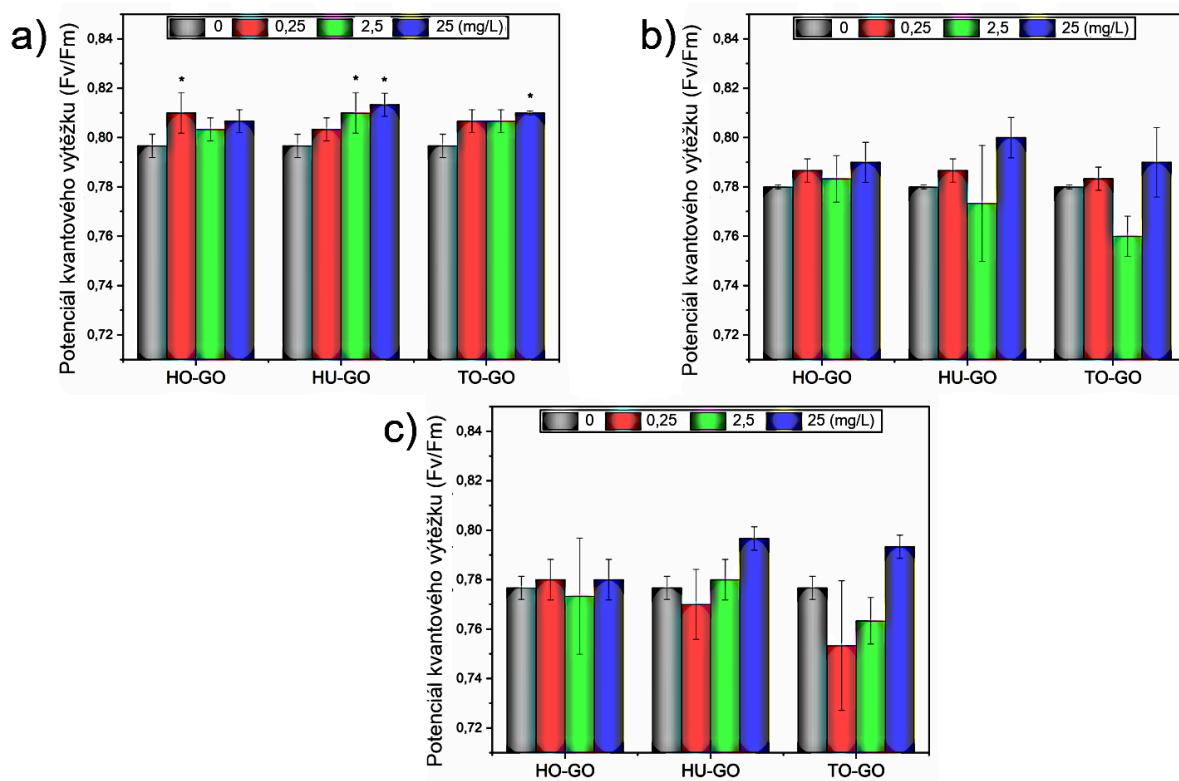
Obrázek č. 15. Analýza oxidačního stresu *Daphnia magna* po 48 h inkubace s 1 a 25 mg/L HO-GO, HU-GO a TO-GO s přidáním krokem 24 h předinkubace s řasami. a) Nárůst ROS/min, b) SOD aktivita a c) CAT aktivita úrovně kontrolního vzorku. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$. Převzato z⁸³ a upraveno.

4.2.4. Interakce GOs s vodními rostlinami

Poslední organismy, u kterých byla pozorována interakce se třemi systémy GO s rozdílnou povrchovou oxidací, byly vodní rostliny. Tyto organismy byly vybrány ze zjevného důvodu, jelikož v současnosti neexistují v literatuře téměř žádná toxikologická data o potenciálním škodlivém účinku GO na tyto organismy s výjimkou práce *Castra et al*, který však popisoval účinek GO na několik organismů z různých úrovní potravního řetězce.¹⁰¹ Dále pak existují už jen dvě studie, které se zabývaly problematikou, jak může GO ovlivnit stres vodních rostlin způsobený těžkými kovy.^{102, 103} Jelikož vodní rostliny představují organismy patřící k trofické úrovni producentů vodního ekosystému a jeho životně důležitou součástí, je nezbytné získat více údajů ohledně mechanismu potenciálního škodlivého účinku GO. Jako zástupce vodních rostlin byl vybrán okřehek *Lemna minor*, který patří mezi nejmenší volně plovoucí rostliny rostlinné říše.¹⁰⁴ Interakce mezi okřeškem a třemi systémy GOs byla pozorována pro koncentrace 0,25, 2,5 a 25 mg/L.

4.2.4.1. Fotosyntetická aktivita, počet lístků a hmotnost sušiny *Lemna minor* značených GOs

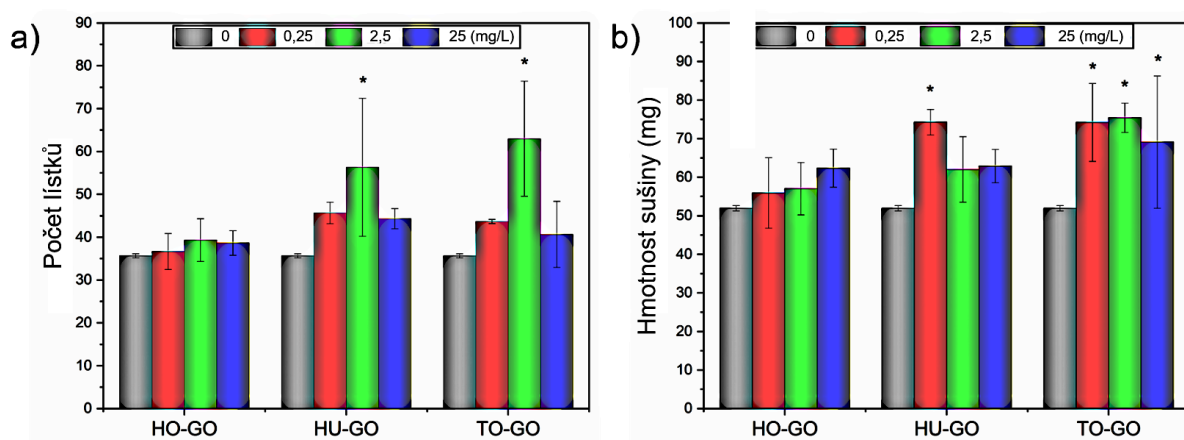
Nejprve jsme pozorovali, zda značení systémy GO může ovlivnit fotosyntetický potenciál okřešku. Hodnoty maximálního potenciálu kvantového výtěžku fotosystému II (Fv/Fm) *Lemna minor* pozorované po 3, 5 a 7 dní kultivace s materiály GOs se pohybovaly v rozmezí od 0,75 do 0,82 (Obrázek č. 16). Stejně jako u jiných druhů rostlin se optimální hodnoty potenciálu kvantového výtěžku fotosystému II okřešku pohybují mezi 0,7 a 0,83 a pouze účinek, který způsobí pokles hodnot pod 0,6 Fv/Fm je považován za stresující a ovlivňující fotosyntetický potenciál.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Proto jsme dle naměřených hodnot vyvodili závěr, že povrchová oxidace GO nemá vliv na stres rostlin, protože žádný ze tří systémů GO nezpůsobil inhibici fotosyntetického potenciálu *Lemna minor*.



Obrázek č. 16. Maximální potenciál kvantového výtěžku (Fv/Fm) fotosystému II *Lemna minor* značeného různými koncentracemi HO-GO, HU-GO a TO-GO po dobu a) 3 dní, b) 5 dní a c) 7 dní. * $p \leq 0.05$.

Analýza vlivu GOs na růst okřehku je uvedena na obrázku č. 17 a byla provedena pomocí dvou parametrů: počtu lístků a hmotnosti sušiny okřehku po 7 denní inkubaci s GOs. Počet lístků neznačeného kontrolního vzorku se za dobu inkubace ztrojnásobil, z původních 12 na 36 (Obrázek č. 17a). Dále z výsledků vyplývá, že žádný GO nezpůsobil inhibici růstu, jelikož všechny vzorky značené různými koncentracemi třech systémů GO po dobu 7 dní měly počet lístků vyšší než 36 (Obrázek č. 17a). Přestože jsme nezaznamenali žádnou výraznou koncentrační závislost, pozorovali jsme vliv míry povrchové oxidace GO. Jediný vzorkem, který nezpůsobil statisticky významný rozdíl v počtu lístků ve srovnání s kontrolou, byl totiž nejméně oxidovaný HO-GO, u nějž počet lístků nepřekročil 40 pro žádnou koncentraci (Obrázek č. 17a). Na druhou stranu ošetření okřehku více oxidovanými systémy HU-GO a TO-GO vedlo k překročení 40 lístků pro všechny koncentrace materiálů (Obrázek č. 17a).

Vážení sušiny okřehků po 7 dnech inkubace s GOs přineslo podobné výsledky (Obrázek č. 17b). Nejméně oxidovaný HO-GO opět způsobil nejslabší efekt, jelikož pouze značení nejvyšší koncentrací (25 mg/L), zatímco u vzorků HU-GO a TO-GO byl pozorován výraznější stimulační účinek podobně jako u počtu lístků. Dle naměřených výsledků tedy konstatujeme, že GOs neinhibovaly růst okřehku, naopak GOs s vyšším počtem funkčních skupin byly zodpovědné za pozitivní účinek a dokonce růst okřehku stimulovaly.

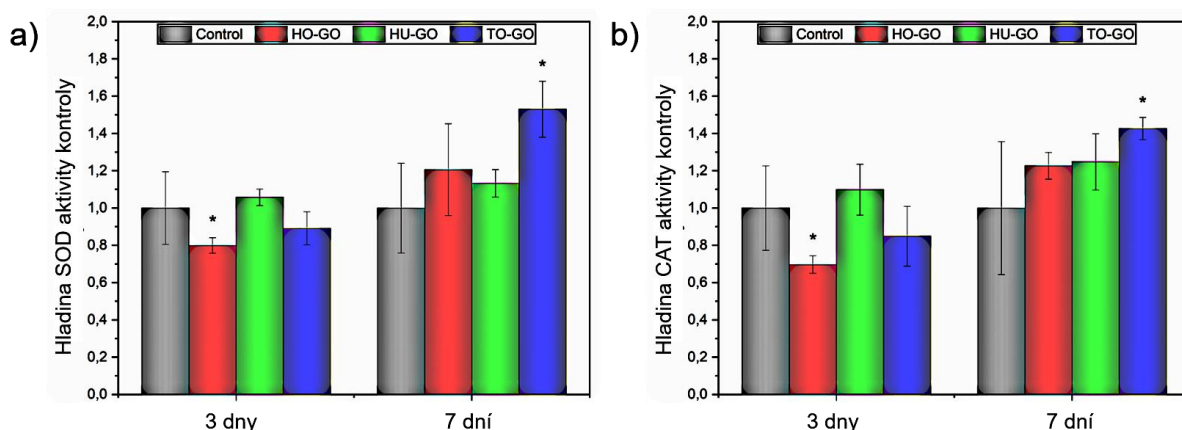


Obrázek č. 17. Analýza vlivu GOs na růst *Lemna minor*. a) Počet lístků a b) hmotnost sušiny *Lemna minor* inkubované 7 dní s různými koncentracemi HO-GO, HU-GO a TO-GO. * $p \leq 0.05$.

4.2.4.2. Aktivita antioxidantních enzymů *Lemna minor* po značení GOs

Pro získání dalších informací o mechanismu interakce GO s okřehkem byla stanovena aktivita dvou hlavních antioxidantních enzymů (superoxid dismutázy (SOD) a katalázy (CAT)) po 3 a 7 dnech inkubace s 25 mg/L vzorků GOs. I když po třech dnech inkubace došlo k mírnému poklesu aktivity obou enzymů u vzorků HO-GO i TO-GO, rozdíl byl statisticky významný pouze u vzorku HO-GO (0,8 a 0,7 pro CAT a SOD úrovně kontrolního vzorku, resp.) (Obrázek č. 18). 7 denní inkubace s materiály však vedla ke zvýšení aktivity obou enzymů, ačkoliv žádná hodnota nepřesáhla 1,6 úrovně kontrolního vzorku (Obrázek č. 18). Systém TO-GO pak způsobil nejvyšší zvýšení u obou enzymů (1,5 a 1,4 pro CAT a SOD úrovně kontrolního

vzorku, resp.), které bylo současně jako jediné statisticky významné ve srovnání s kontrolním vzorkem. Míra povrchové oxidace GO tedy dokáže ovlivnit interakci GO a okřehku, jelikož nejvíce oxidovaný TO-GO způsobil po 7 dnech nejvyšší nárůst v aktivitě obou enzymů. Na druhou stranu, pouze výrazné odchylky (pokles nebo nárůst) hladin SOD a CAT jsou považovány za indikátory vystavení rostlinného organismu poškozujícímu stresu.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Statisticky významné zvýšení obou enzymů po 7 dnech u vzorku TO-GO zase dobře koreluje s pozorovanou stimulací růstu (Obrázek č. 17), protože hodnoty aktivit nebyly natolik vysoké, aby způsobily stres vyvolávající toxicitu. Získané výsledky analýzy aktivity antioxidantních enzymů tedy prokázaly, že ani jeden ze zkoumaných systémů GO nevyvolal oxidační stres vedoucí k toxickému efektu.



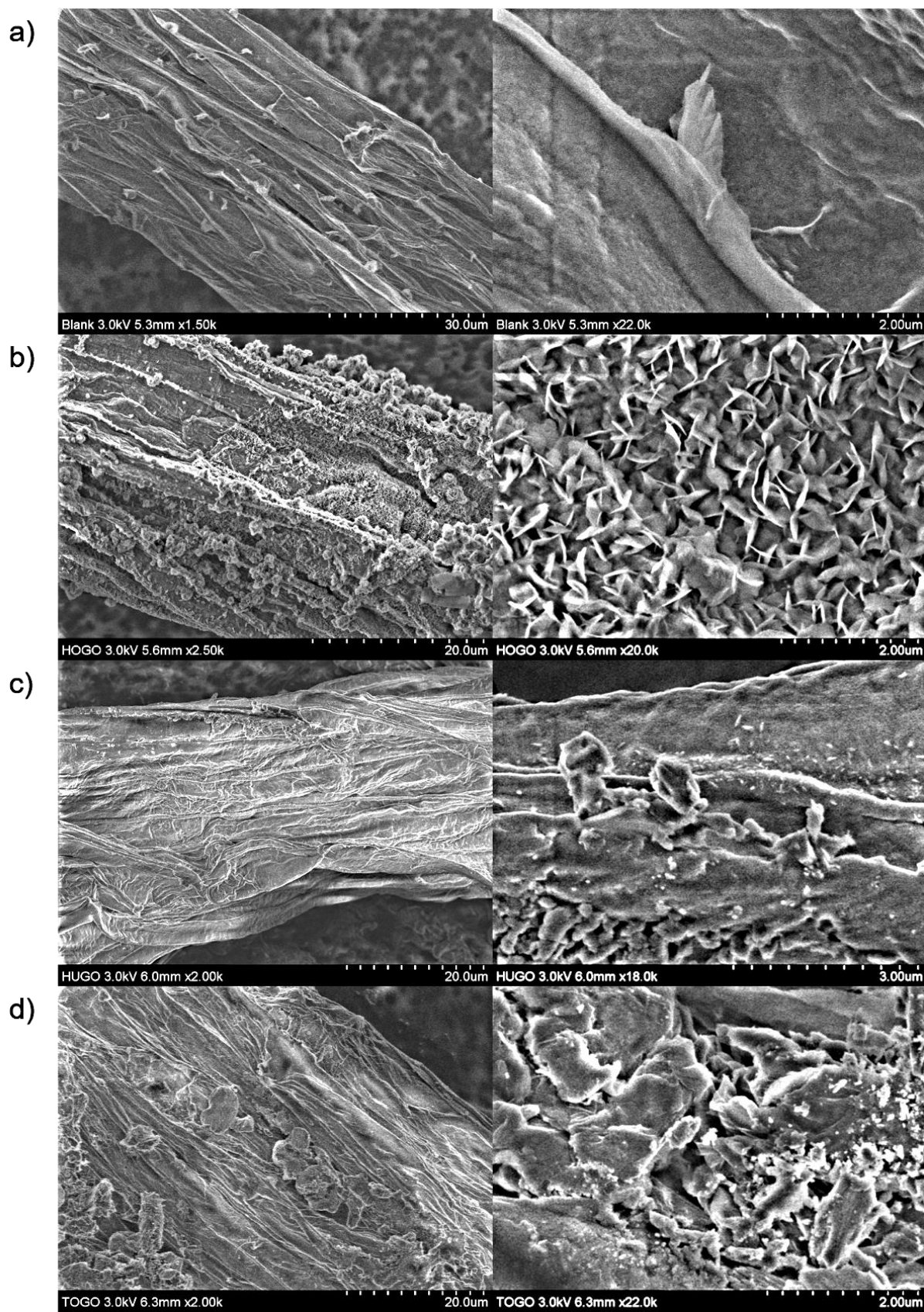
Obrázek č. 18. Aktivita a) Katalázy a b) Superoxid dismutázy *Lemna minor* po 3 a 7 dnech inkubace s 25 mg/L HO-GO, HU-GO a TO-GO. Data byla normalizována definováním aktivity 1 pro kontrolní neznačený vzorek. * $p \leq 0.05$.

4.2.4.3. Detailní pozorování interakce mezi GOs a kořenem *Lemna minor* pomocí SEM

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byly získány obrázky kořenů okřehku po 7 dnech inkubace se systémy GOs pro co nejpodrobnější popis mechanismu interakce GO v závislosti na jeho povrchovém složení. První závěr, vyvozený z přehledových snímků byl ten,

že množství materiálu, který je v přímém kontaktu s kořeny, bylo u vzorku HO-GO mnohem vyšší než u dalších dvou materiálů (Obrázek č. 19b vlevo). Současně byla z detailního pohledu skutečně patrná přímá interakce hydrofobního vzorku HO-GO, jelikož listy GO byly fyzicky zaseknuté do kořene okřehku (Obrázek č. 19b vpravo). Naopak vzorky HU-GO a TO-GO vykazovaly zcela odlišné chování. Jednak byly oba materiály na přehledových snímcích pozorovány spíše ve formě souvislé vrstvy na povrchu kořene okřehku, než ve formě jednotlivých listů GO (Obrázek č. 19c a 19d vlevo). Detailní snímky navíc odhalily, že listy HU-GO a TO-GO spíše leží na povrchu kořene díky svým hydrofilním vlastnostem a přednostní interakci prostřednictvím povrchových funkčních skupin (Obrázek č. 19c a 19d vpravo). Přímá interakce pozorovaná u systému HO-GO navíc také dobře vysvětluje, proč byl po 3 dnech inkubace pozorován pokles aktivity antioxidantních enzymů (Obrázek č. 18), jelikož rostlina potřebovala delší čas, aby se vypořádala se zaseklými listy HO-GO ve své struktuře.

Snímky z elektronové mikroskopie tak jasně prokázaly schopnost GO přímo interagovat s kořenem okřehku prostřednictvím jak jeho hran, tak také jeho bazální části s funkčními skupinami v závislosti na stupni povrchové oxidace GO. Mnohem zásadnější zjištění však bylo to, že tato přímá mechanická interakce nevyvolala žádnou významnou toxicitu, jelikož *Lemna minor* byla schopna obnovit svou antioxidantní aktivitu během delší inkubace. Tyto výsledky tak potvrdily, že ochranná vnější vrstva nebo bariéra vodních organismů hraje zásadní roli v ekotoxicitě GO, protože během interakce s jednobuněčnými fotoautotrofními organismy a vodními korýši byl HO-GO schopen přímým kontaktem způsobit mechanické poškození organismů prostřednictvím svých ostrých hran.^{82, 83} U vodních rostlin se však obranná bariéra ve formě kořene ukázala jako dostatečně pevná a silná, jelikož se přímá fyzická interakce materiálů s kořenem neprojevila žádným škodlivým účinkem studovaných GO (Obrázek č. 16, č. 17 a č. 18).



Obrázek č. 19. Obrázky ze SEMu a) neznačeného kořenu *Lemna minor* a kořenů *Lemna minor* značených po 7 dní 25 mg/L b) HO-GO, c) HU-GO, d) TO-GO. Uvedeny jsou přehledové snímky (vlevo) a detailní snímky (vpravo) kořenů.

5. Závěr

V rámci předložené disertační práce byla diskutována humánní a environmentální toxicita uhlíkových nanomateriálů skrze interakci s buněčnými liniemi a organismy ve vodním prostředí. Část humánní toxicity se zaměřila na spolehlivé *in vitro* testování akutní toxicity, které umožňuje nejen vybrat vhodnou koncentraci CNMs pro jejich budoucí biomedicínskou aplikaci, ale také překonat interferenci materiálů a zabránit tak publikování falešných výsledků cytotoxicity těchto materiálů. V environmentální části práce pak bylo nejprve prokázáno, že mechanismus interakce grafen oxidu s vodními organismy vysoce závisí na jeho povrchovém složení. Dále bylo také ukázáno, že laboratorní testy vždy nedávají kompletní informaci o osudu GO ve vodním prostředí a detailní pohled na jeho interakci s různými organismy více reflektující podmínky reálné expozice může výrazně snižovat potenciální rizika GO v životním prostředí, což je klíčové pro aplikace, které vlastností GO využívají.

6. Reference

1. Kroto, H.; Heath, J.; O'Brien, S.; Curl, R.; Smalley, R., C-60 - Buckminsterfullerene. *Nature* 1985, 318, 162-163.
2. Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 1991, 354, 56-58.
3. Novoselov, K.; Geim, A.; Morozov, S.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S.; Grigorieva, I.; Firsov, A., Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* 2004, 306, 666-669.
4. Hong, G.; Diao, S.; Antaris, A.; Dai, H., Carbon Nanomaterials for Biological Imaging and Nanomedicinal Therapy. *Chem Rev* 2015, 115, 10816-10906.
5. Jariwala, D.; Sangwan, V.; Lauhon, L.; Marks, T.; Hersam, M., Carbon nanomaterials for electronics, optoelectronics, photovoltaics, and sensing. *Chem Soc Rev* 2013, 42, 2824-2860.
6. Georgakilas, V.; Tiwari, J.; Kemp, K.; Perman, J.; Bourlinos, A.; Kim, K.; Zboril, R., Noncovalent Functionalization of Graphene and Graphene Oxide for Energy Materials, Biosensing, Catalytic, and Biomedical Applications. *Chem Rev* 2016, 116, 5464-5519.
7. Zhu, C.; Dan, D.; Lin, Y., Graphene and graphene-like 2D materials for optical biosensing and bioimaging: a review. *2D Mater* 2015, 2, 032004.
8. Devi, P.; Saini, S.; Kim, K. H., The advanced role of carbon quantum dots in nanomedical applications. *Biosens Bioelectron* 2019, 141, 111158.
9. Zhou, K. G.; Vasu, K. S.; Cherian, C. T.; Neek-Amal, M.; Zhang, J. C.; Ghorbanfekr-Kalashami, H.; Huang, K.; Marshall, O. P.; Kravets, V. G.; Abraham, J.; Su, Y.; Grigorenko, A. N.; Pratt, A.; Geim, A. K.; Peeters, F. M.; Novoselov, K. S.; Nair, R. R., Electrically controlled water permeation through graphene oxide membranes. *Nature* 2018, 559, 236-240.
10. Abraham, J.; Vasu, K. S.; Williams, C. D.; Gopinadhan, K.; Su, Y.; Cherian, C. T.; Dix, J.; Prestat, E.; Haigh, S. J.; Grigorieva, I. V.; Carbone, P.; Geim, A. K.; Nair, R. R., Tunable sieving of ions using graphene oxide membranes. *Nat Nanotechnol* 2017, 12, 546-550.
11. De Marchi, L.; Pretti, C.; Gabriel, B.; Marques, P. A. A. P.; Freitas, R.; Neto, V., An overview of graphene materials: Properties, applications and toxicity on aquatic environments. *Sci Total Environ* 2018, 631-632, 1440-1456.
12. Han, M.; Zhu, S.; Lu, S.; Song, Y.; Feng, T.; Tao, S.; Liu, J.; Yang, B., Recent progress on the photocatalysis of carbon dots: Classification, mechanism and applications. *Nano Today* 2018, 19, 201-218.
13. Hao, Q.; Jia, G.; Wei, W.; Vinu, A.; Wang, Y.; Arandiyani, H.; Ni, B., Graphitic carbon nitride with different dimensionalities for energy and environmental applications. *Nano Res* 2020, 13, 18-37.
14. Hola, K.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Giannelis, E.; Zboril, R.; Rogach, A., Carbon dots-Emerging light emitters for bioimaging, cancer therapy and optoelectronics. *Nano Today* 2014, 9, 590-603.
15. Liao, G.; He, F.; Li, Q.; Zhong, L.; Zhao, R.; Che, H.; Gao, H.; Fang, B., Emerging graphitic carbon nitride-based materials for biomedical applications. *Prog Mater Sci* 2020, 112, 100666.
16. Compton, O.; Nguyen, S., Graphene Oxide, Highly Reduced Graphene Oxide, and Graphene: Versatile Building Blocks for Carbon-Based Materials. *Small* 2010, 6, 711-723.
17. Bakandritsos, A.; Pykal, M.; Błoński, P.; Jakubec, P.; Chronopoulos, D. D.; Poláková, K.; Georgakilas, V.; Čépe, K.; Tomanec, O.; Ranc, V.; Bourlinos, A. B.; Zbořil, R.; Otyepka, M., Cyanographene and Graphene Acid: Emerging Derivatives Enabling High-Yield and Selective Functionalization of Graphene. *ACS Nano* 2017, 11, 2982-2991.
18. Drasler, B.; Sayre, P.; Steinhäuser, K.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B., In vitro approaches to assess the hazard of nanomaterials. *Nanoimpact* 2017, 8, 99-116.

19. Freixa, A.; Acuña, V.; Sanchís, J.; Farré, M.; Barceló, D.; Sabater, S., Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms. *Sci Total Environ* 2018, 619-620, 328-337.
20. Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Georgakilas, V.; Giannelis, E. P., Photoluminescent carbogenic dots. *Chem Mater* 2008, 20, 4539-4541.
21. Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Karakassides, M.; Giannelis, E. P., Surface functionalized carbogenic quantum dots. *Small* 2008, 4, 455-458.
22. Ruoff, R., Graphene: calling all chemists. *Nat Nanotechnol* 2008, 3, 10-11.
23. Gupta, A.; Sakthivel, T.; Seal, S., Recent development in 2D materials beyond graphene. *Prog Mater Sci* 2015, 73, 44-126.
24. Cheng, L.; Wang, X.; Gong, F.; Liu, T.; Liu, Z., 2D Nanomaterials for Cancer Theranostic Applications. *Adv Mater* 2019, 32, 1902333.
25. Baker, S.; Baker, G., Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights. *Angew Chem Int Ed* 2010, 49, 6726-6744.
26. Song, Y.; Zhu, S.; Yang, B., Bioimaging based on fluorescent carbon dots. *RSC Adv* 2014, 4, 27184-27200.
27. Zheng, X.; Ananthanarayanan, A.; Luo, K.; Chen, P., Glowing Graphene Quantum Dots and Carbon Dots: Properties, Syntheses, and Biological Applications. *Small* 2015, 11, 1620-1636.
28. Li, H.; Yan, X.; Kong, D.; Jin, R.; Sun, C.; Du, D.; Lin, Y.; Lu, G., Recent advances in carbon dots for bioimaging applications. *Nanoscale Horiz* 2020, 5, 218-234.
29. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 2000, 65, 271-284.
30. Chen, B.; Liu, M.; Huang, C., Recent advances of carbon dots in imaging-guided theranostics. *Trends Anal Chem* 2021, 134, 116116.
31. Jia, Q.; Ge, J.; Liu, W.; Zheng, X.; Chen, S.; Wen, Y.; Zhang, H.; Wang, P., A Magnetofluorescent Carbon Dot Assembly as an Acidic H₂O₂-Driven Oxygenerator to Regulate Tumor Hypoxia for Simultaneous Bimodal Imaging and Enhanced Photodynamic Therapy. *Adv Mater* 2018, 30, 1706090.
32. Ge, J.; Jia, Q.; Liu, W.; Lan, M.; Zhou, B.; Guo, L.; Zhou, H.; Zhang, H.; Wang, Y.; Gu, Y.; Meng, X.; Wang, P., Carbon Dots with Intrinsic Theranostic Properties for Bioimaging, Red-Light-Triggered Photodynamic/Photothermal Simultaneous Therapy In Vitro and In Vivo. *Adv Healthc Mater* 2016, 5, 665-675.
33. Zheng, D.; Li, B.; Li, C.; Fan, J.; Lei, Q.; Li, C.; Xu, Z.; Zhang, X., Carbon-Dot-Decorated Carbon Nitride Nanoparticles for Enhanced Photodynamic Therapy against Hypoxic Tumor via Water Splitting. *ACS Nano* 2016, 10, 8715-8722.
34. Bao, X.; Yuan, Y.; Chen, J.; Zhang, B.; Li, D.; Zhou, D.; Jing, P.; Xu, G.; Wang, Y.; Hala, K.; Shen, D.; Wu, C.; Song, L.; Liu, C.; Zboril, R.; Qu, S., In vivo theranostics with near-infrared-emitting carbon dots-highly efficient photothermal therapy based on passive targeting after intravenous administration. *Light Sci Appl* 2018, 7, 91.
35. Ding, H.; Zhou, X.; Wei, J.; Li, X.; Qin, B.; Chen, X.; Xiong, H., Carbon dots with red/near-infrared emissions and their intrinsic merits for biomedical applications. *Carbon* 2020, 167, 322-344.
36. Zuchowska, A.; Chudy, M.; Dybko, A.; Brzozka, Z., Graphene as a new material in anticancer therapy-in vitro studies. *Sens Actuators B Chem* 2017, 243, 152-165.
37. Han, Z.; Huang, L.; Qu, H.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Rong, Q.; Sang, Z.; Wang, Y.; Kipper, M.; Tang, J., A review of performance improvement strategies for graphene oxide-based and graphene-based membranes in water treatment. *J Mater Sci* 2021, 56, 9545-9574.
38. Zhao, G.; Li, J.; Ren, X.; Chen, C.; Wang, X., Few-Layered Graphene Oxide Nanosheets As Superior Sorbents for Heavy Metal Ion Pollution Management. *Environ Sci Technol* 2011, 45, 10454-10462.

39. Liu, L.; Liu, S.; Zhang, Q.; Li, C.; Bao, C.; Liu, X.; Xiao, P., Adsorption of Au(III), Pd(II), and Pt(IV) from Aqueous Solution onto Graphene Oxide. *J Chem Eng Data* 2013, 58, 209-216.
40. Zhao, G.; Ren, X.; Gao, X.; Tan, X.; Li, J.; Chen, C.; Huang, Y.; Wang, X., Removal of Pb(II) ions from aqueous solutions on few-layered graphene oxide nanosheets. *Dalton Trans* 2011, 40, 10945-10952.
41. Zhang, C.; Wu, L.; Cai, D.; Zhang, C.; Wang, N.; Zhang, J.; Wu, Z., Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Fluoranthene and Anthracenemethanol) by Functional Graphene Oxide and Removal by pH and Temperature-Sensitive Coagulation. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013, 5, 4783-4790.
42. Konicki, W.; Aleksandrak, M.; Moszynski, D.; Mijowska, E., Adsorption of anionic azo-dyes from aqueous solutions onto graphene oxide: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *J Colloid Interface Sci* 2017, 496, 188-200.
43. Coello-Fiallos, D.; Cazzanelli, E.; Tavolaro, A.; Tavolaro, P.; Arias, M.; Caputi, L., Cresyl Violet Adsorption on Sonicated Graphite Oxide. *J Nanosci Nanotechnol* 2018, 18, 3006-3011.
44. Hu, X.; Xu, W.; Zhou, L.; Tan, Y.; Wang, Y.; Zhu, S.; Zhu, J., Tailoring Graphene Oxide-Based Aerogels for Efficient Solar Steam Generation under One Sun. *Adv Mater* 2017, 29, 1604031.
45. Finnerty, C.; Zhang, L.; Sedlak, D.; Nelson, K.; Mi, B., Synthetic Graphene Oxide Leaf for Solar Desalination with Zero Liquid Discharge. *Environ Sci Technol* 2017, 51, 11701-11709.
46. Li, Y.; Gao, T.; Yang, Z.; Chen, C.; Kuang, Y.; Song, J.; Jia, C.; Hitz, E.; Yang, B.; Hu, L., Graphene oxide-based evaporator with one-dimensional water transport enabling high-efficiency solar desalination. *Nano Energy* 2017, 41, 201-209.
47. Li, Y.; Gao, T.; Yang, Z.; Chen, C.; Luo, W.; Song, J.; Hitz, E.; Jia, C.; Zhou, Y.; Liu, B.; Yang, B.; Hu, L., 3D-Printed, All-in-One Evaporator for High-Efficiency Solar Steam Generation under 1 Sun Illumination. *Adv Mater* 2017, 29, 1700981.
48. Li, X.; Lin, R.; Ni, G.; Xu, N.; Hu, X.; Zhu, B.; Lv, G.; Li, J.; Zhu, S.; Zhu, J., Three-dimensional artificial transpiration for efficient solar waste-water treatment. *Natl Sci Rev* 2018, 5, 70-77.
49. Joshi, R.; Carbone, P.; Wang, F.; Kravets, V.; Su, Y.; Grigorieva, I.; Wu, H.; Geim, A.; Nair, R., Precise and Ultrafast Molecular Sieving Through Graphene Oxide Membranes. *Science* 2014, 343, 752-754.
50. Mi, B., Graphene Oxide Membranes for Ionic and Molecular Sieving. *Science* 2014, 343, 740-742.
51. Huang, H.; Song, Z.; Wei, N.; Shi, L.; Mao, Y.; Ying, Y.; Sun, L.; Xu, Z.; Peng, X., Ultrafast viscous water flow through nanostrand-channelled graphene oxide membranes. *Nat Commun* 2013, 4, 2979.
52. Chen, L.; Shi, G.; Shen, J.; Peng, B.; Zhang, B.; Wang, Y.; Bian, F.; Wang, J.; Li, D.; Qian, Z.; Xu, G.; Liu, G.; Zeng, J.; Zhang, L.; Yang, Y.; Zhou, G.; Wu, M.; Jin, W.; Li, J.; Fang, H., Ion sieving in graphene oxide membranes via cationic control of interlayer spacing. *Nature* 2017, 550, 415-418.
53. Morelos-Gomez, A.; Cruz-Silva, R.; Muramatsu, H.; Ortiz-Medina, J.; Araki, T.; Fukuyo, T.; Tejima, S.; Takeuchi, K.; Hayashi, T.; Terrones, M.; Endo, M., Effective NaCl and dye rejection of hybrid graphene oxide/graphene layered membranes. *Nat Nanotechnol* 2017, 12, 1083-1088.
54. Yuan, Y.; Gao, X.; Wei, Y.; Wang, X.; Wang, J.; Zhang, Y.; Gao, C., Enhanced desalination performance of carboxyl functionalized graphene oxide nanofiltration membranes. *Desalination* 2017, 405, 29-39.
55. Li, X.; Zhu, B.; Zhu, J., Graphene oxide based materials for desalination. *Carbon* 2019, 146, 320-328.

56. Krewski, D.; Acosta, D.; Andersen, M.; Anderson, H.; Bailar, J.; Boekelheide, K.; Brent, R.; Charnley, G.; Cheung, V.; Green, S.; Kelsey, K.; Kerkvliet, N.; Li, A.; McCray, L.; Meyer, O.; Patterson, R.; Pennie, W.; Scala, R.; Solomon, G.; Stephens, M.; Yager, J.; Zeise, L.; Assess, S. C. T. T.; Assess, S. C. T. T., Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2010, 13, 51-138.
57. Andersen, M.; Krewski, D., Toxicity Testing in the 21st Century: Bringing the Vision to Life. *Toxicol Sci* 2009, 107, 324-330.
58. Kumar, S.; Geiger, H., HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. *Trends Mol Med* 2017, 23, 799-819.
59. Vining, K. H.; Mooney, D. J., Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017, 18, 728-742.
60. Kircher, M. F.; Gambhir, S. S.; Grimm, J., Noninvasive cell-tracking methods. *Nat Rev Clin Oncol* 2011, 8, 677-688.
61. Yang, S. T.; Wang, X.; Wang, H.; Lu, F.; Luo, P. G.; Cao, L.; Meziari, M. J.; Liu, J. H.; Liu, Y.; Chen, M.; Huang, Y.; Sun, Y. P., Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents. *J Phys Chem C* 2009, 113, 18110-18114.
62. Chen, N.; He, Y.; Su, Y.; Li, X.; Huang, Q.; Wang, H.; Zhang, X.; Tai, R.; Fan, C., The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials* 2012, 33, 1238-1244.
63. Malina, T.; Polakova, K.; Skopalik, J.; Milotova, V.; Hola, K.; Havrdova, M.; Tomankova, K.; Cmiel, V.; Sefc, L.; Zboril, R., Carbon dots for in vivo fluorescence imaging of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Carbon* 2019, 152, 434-443.
64. Romeo, D.; Salieri, B.; Hischer, R.; Nowack, B.; Wick, P., An integrated pathway based on in vitro data for the human hazard assessment of nanomaterials. *Environ Int* 2020, 137, 105505.
65. Guadagnini, R.; Halamoda Kenzaoui, B.; Walker, L.; Pojana, G.; Magdolenova, Z.; Bilanicova, D.; Saunders, M.; Juillerat-Jeanerret, L.; Marcomini, A.; Huk, A.; Dusinska, M.; Fjellsbø, L. M.; Marano, F.; Boland, S., Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology* 2015, 9, 13-24.
66. Ong, K.; MacCormack, T.; Clark, R.; Ede, J.; Ortega, V.; Felix, L.; Dang, M.; Ma, G.; Fenniri, H.; Veinot, J.; Goss, G., Widespread Nanoparticle-Assay Interference: Implications for Nanotoxicity Testing. *PloS One* 2014, 9, e90650.
67. Wright, P.; Qin, H.; Choi, M.; Chiu, N.; Jia, Z., Carbon nanodots interference with lactate dehydrogenase assay in human monocyte THP-1 cells. *Springerplus* 2014, 3, 615.
68. Casey, A.; Herzog, E.; Davoren, M.; Lyng, F. M.; Byrne, H. J.; Chambers, G., Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon* 2007, 45, 1425-1432.
69. Monteiro-Riviere, N.; Inman, A., Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. *Carbon* 2006, 44, 1070-1078.
70. Worle-Knirsch, J. M.; Pulskamp, K.; Krug, H. F., Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett* 2006, 6, 1261-1268.
71. Holder, A.; Goth-Goldstein, R.; Lucas, D.; Koshland, C., Particle-Induced Artifacts in the MTT and LDH Viability Assays. *Chem Res Toxicol* 2012, 25, 1885-1892.
72. Belyanskaya, L.; Manser, P.; Spohn, P.; Bruinink, A.; Wick, P., The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction. *Carbon* 2007, 45, 2643-2648.
73. Bakke, A., The principles of flow cytometry. *Lab Med* 2001, 32, 207-211.
74. Bohmer, N.; Rippl, A.; May, S.; Walter, A.; Heo, M.; Kwak, M.; Roesslein, M.; Song, N.; Wick, P.; Hirsch, C., Interference of engineered nanomaterials in flow cytometry: A case study. *Colloids Surf B* 2018, 172, 635-645.

75. Malina, T.; Poláková, K.; Hirsch, C.; Svoboda, L.; Zbořil, R., Toxicity of Carbon Nanomaterials—Towards Reliable Viability Assessment via New Approach in Flow Cytometry. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 7750.
76. Zhu, Y.; Ji, H.; Cheng, H.-M.; Ruoff, R. S., Mass production and industrial applications of graphene materials. *Natl Sci Rev* 2018, 5, 90-101.
77. Lanphere, J.; Rogers, B.; Luth, C.; Bolster, C.; Walker, S., Stability and Transport of Graphene Oxide Nanoparticles in Groundwater and Surface Water. *Environ Eng Sci* 2014, 31, 350-359.
78. Hofmann, U.; König, E., Untersuchungen über Graphitoxyd. *Z Anorg Allg Chem* 1937, 234, 311-336.
79. Hummers, W.; Offeman, R., Preparation of graphitic oxide. *J Am Chem Soc* 1958, 80, 1339-1339.
80. Marcano, D.; Kosynkin, D.; Berlin, J.; Sinitskii, A.; Sun, Z.; Slesarev, A.; Alemany, L.; Lu, W.; Tour, J., Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano* 2010, 4, 4806-4814.
81. Chng, E.; Pumera, M., The Toxicity of Graphene Oxides: Dependence on the Oxidative Methods Used. *Chem Eur J* 2013, 19, 8227-8235.
82. Malina, T.; Maršálková, E.; Holá, K.; Tuček, J.; Scheibe, M.; Zbořil, R.; Maršálek, B., Toxicity of graphene oxide against algae and cyanobacteria: Nanoblade-morphology-induced mechanical injury and self-protection mechanism. *Carbon* 2019, 155, 386-396.
83. Malina, T.; Marsalkova, E.; Hola, K.; Zboril, R.; Marsalek, B., The environmental fate of graphene oxide in aquatic environment-Complete mitigation of its acute toxicity to planktonic and benthic crustaceans by algae. *J Hazard Mater* 2020, 399.
84. Liu, S.; Zeng, T. H.; Hofmann, M.; Burcombe, E.; Wei, J.; Jiang, R.; Kong, J.; Chen, Y., Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress. *ACS Nano* 2011, 5, 6971-6980.
85. Nogueira, P. F.; Nakabayashi, D.; Zucolotto, V., The effects of graphene oxide on green algae *Raphidocelis subcapitata*. *Aquat Toxicol* 2015, 166, 29-35.
86. Zhao, J.; Cao, X.; Wang, Z.; Dai, Y.; Xing, B., Mechanistic understanding toward the toxicity of graphene-family materials to freshwater algae. *Water Res* 2017, 111, 18-27.
87. Hu, X.; Ouyang, S.; Mu, L.; An, J.; Zhou, Q., Effects of Graphene Oxide and Oxidized Carbon Nanotubes on the Cellular Division, Microstructure, Uptake, Oxidative Stress, and Metabolic Profiles. *Environ Sci Technol* 2015, 49, 10825-10833.
88. Hu, X.; Lu, K.; Mu, L.; Kang, J.; Zhou, Q., Interactions between graphene oxide and plant cells: Regulation of cell morphology, uptake, organelle damage, oxidative effects and metabolic disorders. *Carbon* 2014, 80, 665-676.
89. Schwab, F.; Bucheli, T. D.; Lukhele, L. P.; Magrez, A.; Nowack, B.; Sigg, L.; Knauer, K., Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? *Environ Sci Technol* 2011, 45, 6136-6144.
90. Ebert, D., *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology: 2005.
91. Adema, D., *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia* 1978, 59, 125-134.
92. Liu, S.; Cui, M.; Li, X.; Thuyet, D. Q.; Fan, W., Effects of hydrophobicity of titanium dioxide nanoparticles and exposure scenarios on copper uptake and toxicity in *Daphnia magna*. *Water Res* 2019, 154, 162-170.
93. Blinova, I.; Lukjanova, A.; Muna, M.; Vija, H.; Kahru, A., Evaluation of the potential hazard of lanthanides to freshwater microcrustaceans. *Sci Total Environ* 2018, 642, 1100-1107.
94. Tarczynska, M.; Nalecz-Jawecki, G.; Romanowska-Duda, Z.; Sawicki, J.; Beattie, K.; Codd, G.; Zalewski, M., Tests for the toxicity assessment of cyanobacterial bloom samples. *Environ Toxicol* 2001, 16, 383-390.

95. Hamdi, H.; Manusadzianas, L.; Aoyama, I.; Jedidi, N., Effects of anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene spiking and sewage sludge compost amendment on soil ecotoxicity during a bioremediation process. *Chemosphere* 2006, 65, 1153-1162.
96. Manzo, S.; De Nicola, F.; De Luca Picione, F.; Maisto, G.; Alfani, A., Assessment of the effects of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests. *Chemosphere* 2008, 71, 1937-1944.
97. Kong, L.; Zepp, R. G., Production and consumption of reactive oxygen species by fullerenes. *Environ Toxicol Chem* 2012, 31 (1), 136-43.
98. Zhao, F. F.; Wang, S. C.; Zhu, Z. L.; Wang, S. G.; Liu, F. F.; Liu, G. Z., Effects of oxidation degree on photo-transformation and the resulting toxicity of graphene oxide in aqueous environment. *Environ Pollut* 2019, 249, 1106-1114.
99. Lv, X.; Yang, Y.; Tao, Y.; Jiang, Y.; Chen, B.; Zhu, X.; Cai, Z.; Li, B., A mechanism study on toxicity of graphene oxide to *Daphnia magna*: Direct link between bioaccumulation and oxidative stress. *Environ Pollut* 2018, 234, 953-959.
100. Goodwin, D.; Adeleye, A.; Sung, L.; Ho, K.; Burgess, R.; Petersen, E., Detection and Quantification of Graphene-Family Nanomaterials in the Environment. *Environmental Science & Technology* 2018, 52 (8), 4491-4513.
101. Castro, V. L.; Clemente, Z.; Jonsson, C.; Silva, M.; Vallim, J. H.; de Medeiros, A. M. Z.; Martinez, D. S. T., Nanoecotoxicity assessment of graphene oxide and its relationship with humic acid. *Environ Toxicol Chem* 2018, 37, 1998-2012.
102. Hu, C.; Liu, L.; Li, X.; Xu, Y.; Ge, Z.; Zhao, Y., Effect of graphene oxide on copper stress in *Lemna minor* L.: evaluating growth, biochemical responses, and nutrient uptake. *J Hazard Mater* 2018, 341, 168-176.
103. Yang, L.; Chen, Y.; Shi, L.; Yu, J.; Yao, J.; Sun, J.; Zhao, L.; Sun, J., Enhanced Cd accumulation by Graphene oxide (GO) under Cd stress in duckweed. *Aquat Toxicol* 2020, 229, 105579.
104. Gupta, C.; Prakash, D., Duckweed: an effective tool for phyto-remediation. *Toxicol Environ Chem* 2013, 95, 1256-1266.
105. Kitajima, M.; Butler, W., Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim Biophys Acta* 1975, 376, 105-115.
106. Maxwell, K.; Johnson, G., Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot* 2000, 51, 659-668.
107. Ritchie, G., Chlorophyll fluorescence: What is it and what do the numbers mean? *National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations* 2005 2006, 43, 34-43.
108. Cui, Y.; Zhao, N., Oxidative stress and change in plant metabolism of maize (*Zea mays* L.) growing in contaminated soil with elemental sulfur and toxic effect of zinc. *Plant Soil Environ* 2011, 57, 34-39.
109. Kachout, S.; Ben Mansoura, A.; Leclerc, J.; Mechergui, R.; Rejeb, M.; Ouerghi, Z., Effects of heavy metals on antioxidant activities of *Atriplex hortensis* and *A. rosea*. *J Food Agric Environ* 2009, 7, 938-945.
110. Xue, Y.; Wang, J.; Huang, J.; Li, F.; Wang, M., The Response of Duckweed (*Lemna minor* L.) Roots to Cd and Its Chemical Forms. *J Chem* 2018, 2018, 7274020.