

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2017

Bc. Tomáš Malina

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Cytotoxicita uhlíkových kvantových teček a
jejich distribuce v mezenchymálních
kmenových buňkách**

Diplomová práce

Bc. Tomáš Malina

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: Mgr. Markéta Havrdová

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Markéty Havrdové za použití literárních zdrojů, které jsem uvedl.

V Olomouci dne.....

.....
Bc. Tomáš Malina

Poděkování:

Rád bych poděkoval především vedoucí práce Mgr. Markétě Havrdové za odborné vedení, strávený čas a celkovou pomoc při vypracování diplomové práce, Mgr. Kateřině Polákové, Ph.D., za spolupráci a cenné rady, Mgr. Josefovi Skopalíkovi za konzultace, personálu Ústavu lékařské biofyziky, Lékařské fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci za ochotu a pomoc, a také personálu Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů za přátelské pracovní prostředí.

V neposlední řadě děkuji také své rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu mého studia.

Souhrn

Tato diplomová práce je zaměřená na cytotoxicitu uhlíkových kvantových teček (CQDs) a jejich distribuci v lidských mezenchymálních kmenových buňkách (hMSC). V teoretické části jsou představeny kvantové tečky na bázi těžkých kovů (QDs) a uhlíku (CQDs) a jejich cytotoxicita i účinky na zvířecích modelech. Předmětem experimentální části je cytotoxicita CQDs, které mají k uhlíkovému jádru navázaný kvartérní chlorid amonný. Tato povrchová modifikace zajistila kladný povrchový náboj, který do jisté míry ovlivnil biokompatibilní chování vzorku. Byla provedena série testů cytotoxicity (test viability, analýza buněčného cyklu, měření množství ROS), test genotoxicity, analýza koncentrační a časové závislosti internalizace CQDs do buněk, analýza exocytózy CQDs a detekce specifických povrchových CD markerů u hMSC značených CQDs. Vnitrobuněčná distribuce uhlíkových teček byla potvrzena fluorescenční a konfokální mikroskopií.

Buňky byly inkubovány s různými koncentracemi CQDs (maximum 400 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 24 hod, během které docházelo k jejich maximální saturaci částicemi. Fluorescenční mikroskopie ukázala, že dokonce i při minimální použité koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ byly CQDs pozorovány uvnitř hMSC jako červené fluorescenční klastry. Ve většině měření byla kritická koncentrace CQDs 200 $\mu\text{g/ml}$. Při této dávce bylo pozorováno poškození DNA, zvýšení hladiny ROS a snížení buněčné proliferace, aniž by došlo k výraznému poklesu viability.

Tyto kladně nabitě CQDs tak představují vhodnou fluorescenční sondu pro značení kmenových buněk v regenerační terapii, avšak při použití koncentrace menší než 200 $\mu\text{g/ml}$.

Summary

In this thesis, the carbon dots with quaternary ammonium attached on the carbon core through amide linker have been used. Mentioned surface modification gives CQDs positive charge, which could dramatically influence viability of cells. We performed a series of cytotoxicity assays (viability assay, cell cycle measurement, reactive oxygen species assay) and other tests (comet assay, concentration and time dependent uptake of CQDs, analysis of exocytosis, detection of specific surface CD markers, fluorescent and confocal microscopy) to reveal an influence of positive charged CQDs on human mesenchymal stem cells (hMSC).

Cells were treated with various concentrations of CQDs up to 400 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 24 hours, when a maximum amount of CQDs was uptaken by hMSC. Fluorescent microscopy imaging confirmed intracellular presence of CQDs even at minimum dose 50 $\mu\text{g/ml}$. The CQDs were visible as a red fluorescent clusters inside hMSC. Critical concentration in all measurements was 200 $\mu\text{g/ml}$, where DNA damage and oxidative stress occurred. Cell cycle analysis also showed a decrease in cell growth and proliferation, although no significant viability loss was detected.

These positively charged CQDs could be suitable as a fluorescent probe for stem cell labeling in regenerative therapy, but only at concentration less than 200 $\mu\text{g/ml}$.

Obsah

Cíle práce.....	7
Úvod	8
Literární přehled	10
1. Kvantové tečky (QDs)	11
1.1. Uhlíkové kvantové tečky (CQDs)	11
1.2. Cytotoxicita uhlíkových teček.....	14
1.3. Biologické aplikace uhlíkových teček.....	14
2. Kmenové buňky	17
2.1. Mezenchymální kmenové buňky	17
2.2. Značení kmenových buněk kvantovými tečkami.....	18
2.3. Cytotoxicita QDs a CQDs a jejich distribuce v mezenchymálních kmenových buňkách.....	20
Experimentální část	23
3. Materiály a metody	24
3.1. Materiály	24
3.2. Metody	29
4. Výsledky	33
4.1. Měření oxidačního stresu – vznik reaktivních kyslíkových radikálů (ROS)	33
4.2. Analýza průtokovou cytometrií.....	35
4.3. Comet assay – měření genotoxického účinku CQDs na hMSC.....	41
4.4. Mikroskopické zobrazení CQDs uvnitř hMSC	43
5. Diskuze	52
Závěr	56
Literatura	58
Seznam použitých zkratk	67

Cíle práce

Teoretická část

- 1) Literární rešerše na téma kvantové tečky a mezenchymální kmenové buňky

Experimentální část

- 1) Měření viability a oxidačního stresu v hMSC po inkubaci s CQDs
- 2) Analýza interakce CQDs s hMSC průtokovou cytometrií
- 3) Stanovení poškození DNA hMSC po inkubaci s CQDs
- 4) Mikroskopické zobrazení CQDs uvnitř hMSC

Úvod

Nanotechnologie a biomedicínské aplikace využívající kmenové buňky jsou jedním z nejnovějších spojení v biotechnologickém výzkumu. Nanomateriály totiž představují výborné platformy, které mohou být užitečné při manipulaci s kmenovými buňkami (Ferreira *et al.*, 2008). Jedná se především o magnetické nanočástice a kvantové tečky, které se používají pro kontrastování kmenových buněk a jejich sledování v organismu pomocí MRI nebo Xtreme (Bruker) pro optické *in vivo* zobrazení (Kaur *et al.*, 2012).

Kmenové buňky zastupují základní buněčnou linii, která je v těle prekurzorem k dalším buněčným typům. Tyto buňky mají schopnost se samy dělit, proliferovat a diferenciovat se do specializovaných buněk (Beltrami *et al.*, 2003). Existují ve dvou hlavních typech: embryonální kmenové buňky (ESC) a neembryonální kmenové buňky (non-ESC), které jsou známé také jako dospělé kmenové buňky. ESC jsou získávány z vnitřní masy blastocysty, která se vytváří několik dní po oplození vajíčka, a mají schopnost pluripotence, čili mohou vytvořit všechny buněčné typy v těle (Thomson *et al.*, 1998). Dospělé kmenové buňky jsou odebírány z několika dospělých tkání, ze kterých se nejvíce využívá kostní dřev a tuková tkáň. Buňky jsou již částečně diferenciovány, a tak už mohou díky multipotentní schopnosti vytvářet pouze specifické buněčné linie (Ding *et al.*, 2011). Mezenchymální kmenové buňky představují nejvyužívanější typ dospělých kmenových buněk, jelikož mají schopnost se diferenciovat do široké škály buněčných typů, do které patří například chondrocyty, adipocyty, osteocyty, osteoblasty, myocyty, kardiomyocyty a dokonce i neurony (Oishi *et al.*, 2009). Z těchto důvodů mají nejvyšší využití v regeneračních a transplantačních medicínských aplikacích.

Kvantové tečky (QDs) patří mezi polovodičové nanokrystaly, které se stále více využívají na místo obvyklých organických fluorescenčních sond, jelikož mají několik zřetelných předností. Mezi tyto přednosti patří především vysoká fluorescence, rezistence k vybělování, vysoká fotostabilita, široká fluorescenční spektra a další, které dělají z kvantových teček výhodné materiály pro biologické aplikace ve formě fluorescenčních sond (Michalet *et al.*, 2005). Spolu s mnoha výhodami však kvantové tečky mají také několik nedostatků, z nichž nejzávažnější je jejich vysoká cytotoxicita. Ve většině případů se jedná o nanomateriály syntetizovaných z těžkých kovů, které s sebou nesou poměrně výrazná potencionální zdravotní a environmentální rizika (Derfus *et al.*, 2004). Stále tak probíhá výzkum zaměřený na zmírnění či odstranění tohoto problému, a proto se v poslední době

uplatňuje nový druh kvantových teček na bázi uhlíku (Uhlíkové kvantové tečky (CQDs)). Uhlíkové tečky totiž vykazují velmi podobnou fluorescenční aktivitu jako polovodičové kvantové tečky, a navíc ve svém jádře obsahují biogenní prvek uhlík, který je biokompatibilní. Jedná se tedy o velmi výhodný materiál pro mnoho biologických aplikací (Tuerhong *et al.*, 2017).

Tato diplomová práce je zaměřená na cytotoxicitu uhlíkových kvantových teček (CQDs) a jejich distribuci v mezenchymálních kmenových buňkách (hMSC). První kapitola literární části se věnuje uhlíkovým kvantovým tečkám, jejich cytotoxickému účinku, distribuci v buněčném prostředí a využití v biologických aplikacích. Ve druhé kapitole jsou popsány mezenchymální kmenové buňky, jejich charakterizace, diferenciační schopnost a možné využití v regenerační a transplantační medicíně.

V experimentální části jsou uvedeny výsledky několika testů, které dokumentují vliv specifických uhlíkových teček s pozitivním nábojem na viabilitu, morfologii a celkově na chování mezenchymálních kmenových buněk a snímky z fluorescenčního a konfokálního mikroskopu, které popisují distribuci částic uvnitř buněk.

Literární přehled

1. Kvantové tečky (QDs)

Kvantové tečky obecně představují polovodičové nanokrystaly velmi malých velikostí, u kterých dochází k tzv. kvantovému jevu (Alivisatos, 1996). Proto mají tyto nanomateriály velice specifické optické a elektronické vlastnosti, mezi které patří především výrazná fluorescence a s ní spojená široká absorpční spektra, vysoká fotostabilita, velký extinkční koeficient a laditelné emisní vlnové délky. Jedná se tedy o velmi výhodné materiály pro biologické aplikace ve formě fluorescenčních sond (Michalet *et al.*, 2005).

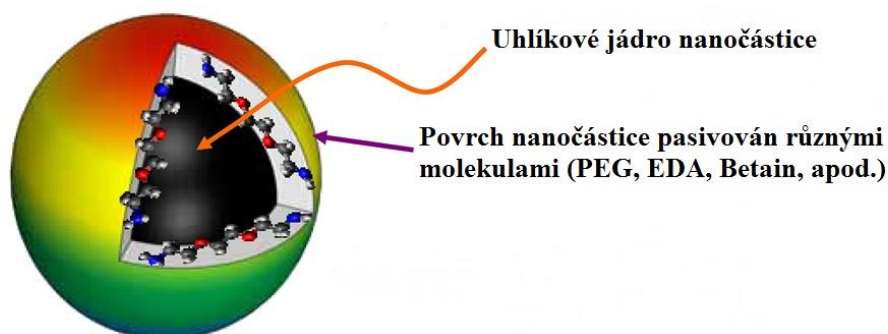
Použití kvantových teček pro biologické a biomedicínské aplikace se již v literatuře vyskytuje v hojné míře a v porovnání s klasickými organickými barvivy (fluorescenční sondy) jsou vyzdvihovány jejich unikátní optické vlastnosti. (Resch-Genger *et al.*, 2008). Kvantové tečky (QDs) jsou však i přes všechny výhody zdrojem cytotoxicity. Zmíněné polovodičové QDs totiž obsahují větší množství těžkých kovů (nejčastěji kadmia Cd) nesoucích zdravotní a environmentální rizika, ke kterým dochází především z důvodu uvolňování toxických iontů (Cd^{2+} apod.) (Derfus *et al.*, 2004; Lovric *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012). Existují studie kvantových teček na bázi kadmia indikující toxický účinek na systém obratlovců již při velmi nízkých koncentracích (144 pmol) (Geys *et al.*, 2008), a také další studie, které popisují riziko akumulace toxického Cd v orgánech a tkáních (Satarug *et Moore*, 2004). Z toho důvodu docházelo a stále dochází k hledání alternativních materiálů, které by vykazovaly obdobné fotoluminiscenční vlastnosti jako kvantové tečky.

Mezi nadějně kandidáty patří křemíkové Si a potenciálně také germaniové Ge nanočástice (Zaitseva *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2011), které představují více biokompatibilní materiál, avšak v optických vlastnostech se částicím na bázi kadmia vyrovnat nedokáží. Zajímavostí je, že uhlík (C), který se v periodické tabulce prvků nachází ve stejné skupině jako Si, představuje mnohem vhodnější materiál pro vývoj velmi jasných fluorescenčních uhlíkových kvantových teček (CQDs), často označovaných pouze jako uhlíkové tečky (Sun *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009b).

1.1. Uhlíkové kvantové tečky (CQDs)

Termín uhlíkové kvantové tečky obecně popisuje velmi malé uhlíkové nanomateriály (< 10 nm) ve vodných či jiných roztocích. Informace o fotoluminiscenční aktivitě uhlíkových částic byla zjištěna při pozorování povrchových defektů u jedностěnných (SWCNT – Single-Walled Carbon Nanotubes) a víceštěnných (MWCNT – Multi-Walled Carbon Nanotubes)

uhlíkových nanotrubic, které, při specifických podmínkách, začaly emitovat jasné záření (Riggs *et al.*, 2000). Fluorescence byla ještě více zvýrazněna, pokud byl povrch nanotrubic funkcionalizován různými typy molekul. Pasivace povrchu tedy vedla k velmi jasné a zářivé emisi fluorescence a objevu uhlíkových teček CQDs (viz Obrázek č. 1) (Sun *et al.*, 2006).

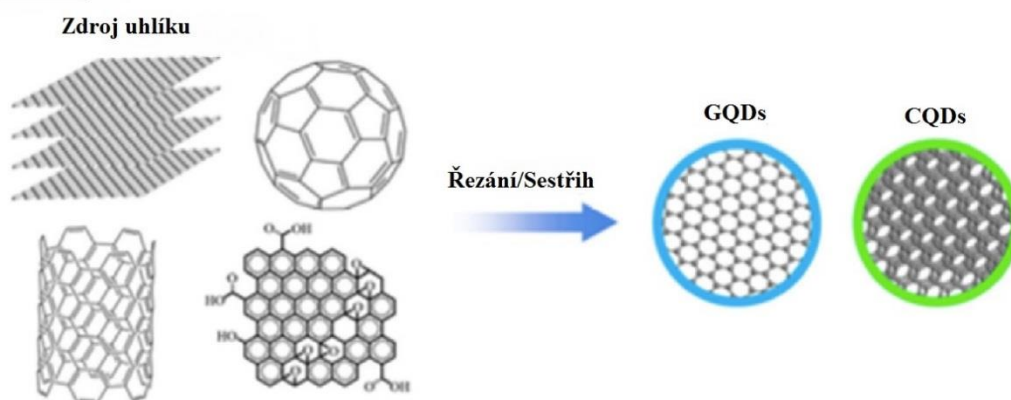


Obrázek č. 1 – Ilustrační schéma uhlíkové tečky skládající se z uhlíkového jádra, ke kterému je silně adsorbována molekula povrchové pasivace. Převzato z (Liu *et al.*, 2015b).

Efektivní pasivace povrchu uhlíkových nanočástic tak pravděpodobně představuje nezbytný krok k jejich výrazným fluorescenčním vlastnostem, ačkoliv existují i studie, které dokazují barevné fluorescenční emise také u nepasivovaných (tzv. „nahých“) uhlíkových nanočástic, avšak s velmi nízkými kvantovými výtěžky (Ray *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011b; Shen *et al.*, 2012). Konceptně tedy není nutné od sebe odlišovat uhlíkové tečky „s“ a „bez“ povrchové funkcionalizace (nebo s jinou formou efektivní povrchové pasivace), jelikož povrchová pasivace pouze ovlivňuje (i když v některých případech velmi výrazně) fluorescenční vlastnosti teček.

V současnosti se vyvíjí několik různých syntetických metod, které se snaží o jednoduchou, nízko nákladovou syntézu uhlíkových teček vysoké kvality s kontrolovatelnou velikostí. S ohledem na vztah mezi zdroji a produkty syntézy je možné shrnout současné syntetické metody do dvou tříd top-down a bottom-up (viz. Obrázek č. 2) (Wang *et al.*, 2014).

Top-down



Bottom-up



Obrázek č. 2 – Ilustrační schéma přípravy uhlíkových kvantových teček (CQDs), grafenových kvantových teček (GQDs) a polymerních teček (PDs) top-down a bottom-up syntézou. Převzato z (Namdari *et al.*, 2017).

Pro třídu top-down metod jsou CQDs syntetizovány za pomoci chemických a fyzikálních procesů z relativně makroskopických struktur uhlíku, mezi které patří uhlíkové nanotrubičky, sloupce grafitu, grafen, aktivní uhlík a rozpustný uhlíkový prášek. Většina těchto procesů je neselektivních a mezi hlavní patří elektrochemie, chemická oxidace a laserové ozařování (Hu *et al.*, 2009; Qiao *et al.*, 2010; Shinde *et al.*, 2012).

Třída bottom-up zahrnuje metody, kde dochází k syntéze z organických prekurzorů, ze kterých následně za specifických podmínek vznikají CQDs. Mikrovlnné, tepelné a ultrazvukové vlny představují primární přístupy využívány pro energetickou agregaci a transformaci molekulární struktury. Díky přítomnosti prekurzorů se jedná o třídu, která vykazuje nižší nároky na uhlíkové zdroje, které tak mohou být velmi různorodé, jako například sacharóza, kyselina citrónová, aminokyseliny nebo dokonce i prošlé potraviny (Li *et al.*, 2011a; Zhai *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2015; Edison *et al.*, 2016).

1.2. Cytotoxicita uhlíkových teček

Největší výhodou uhlíkových teček představuje nepochybně jejich výborná biokompatibilita a nízký toxický účinek, jelikož neobsahují žádný prvek těžkých kovů. Za jeden z hlavních mechanismů toxického účinku polovodičových kvantových teček se považuje postupné uvolňování toxických iontů těžkých kovů (Derfus *et al.*, 2004; Kirchner *et al.*, 2005). Uhlík však patří do skupiny biogenních prvků, které se přirozeně vyskytují v živých organismech a tkáních a nepředstavuje tedy primárně toxický materiál.

Pokud se otestují toxické účinky různých polovodičových kvantových teček, ať už se jedná o změnu morfologie, oxidační stres, genotoxicitu nebo jiné mechanismy cytotoxicity, je patrné, že k výraznějšímu poškození buněk dochází již při nízkých koncentracích (20 $\mu\text{g/ml}$; 20 nM) (Kauffer *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015a; Manshian *et al.*, 2015). V poslední době tedy dochází k intenzivnímu výzkumu, který by toxické účinky kvantových teček snížil, a to buď pomocí biokompatibilní vrstvy na povrchu QDs nebo použitím méně toxických zdrojů nanomateriálu (např. Zinek, Zn) (Mirnajafizadeh *et al.*, 2016; Ratnesh *et al.*, 2017). Uhlíkové kvantové tečky však stále vykazují lepší biokompatibilitu i bez jakýchkoliv přidaných biokompatibilních vrstev. První výraznější toxické účinky se u uhlíkových teček začínají projevovat ve většině případů od koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$ a výše, což zpravidla několikanásobně převyšuje koncentraci potřebnou pro potenciální biologické aplikace (Zhao *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009b; Chandra *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2017).

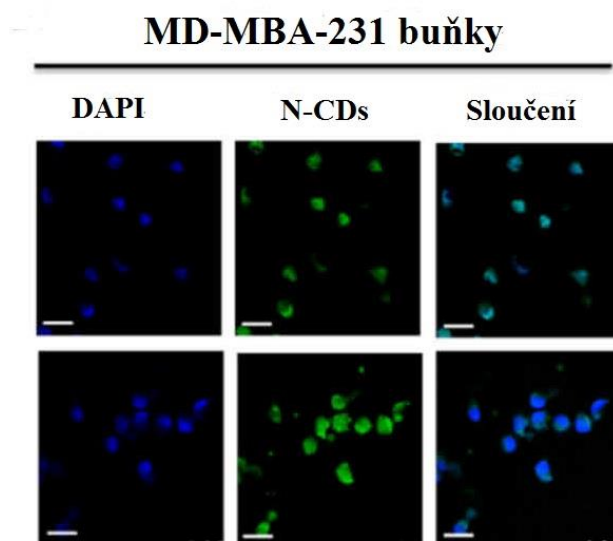
Další studie dokonce naznačují, že uhlíkové tečky vykazují nižší nebo podobné toxické účinky jako specifické oligomerní nebo polymerní látky, které se využívají jako činidla pro jejich povrchovou pasivaci (PEG, PEI, apod.) (Yang *et al.*, 2009b; Tao *et al.*, 2012).

1.3. Biologické aplikace uhlíkových teček

Jednou z nejvíce nadějných a velmi často zmiňovaných aplikací uhlíkových teček je biologické zobrazování v medicíně. Tento fluorescenční materiál nabízí užitečnou platformu především pro zkoumání v oblasti nanomedicíny, zejména v diagnostice a léčbě rakoviny (Chapman *et al.*, 2013). Jak již bylo prokázáno, uhlíkové tečky splňují dvě základní kritéria pro klinický výzkum: mohou být rychle vyloučeny z těla a vykazují nízkou cytotoxicitu, přičemž stále produkují spolehlivý optický signál (Huang *et al.*, 2013). Uhlíkové tečky

představují tedy výborný materiál pro široké spektrum biologických a biomedicínských aplikací jako je například biologické zobrazování (*in vitro/in vivo*), biosenzory, sondy pro cílené dodávání léčiv/genů a další.

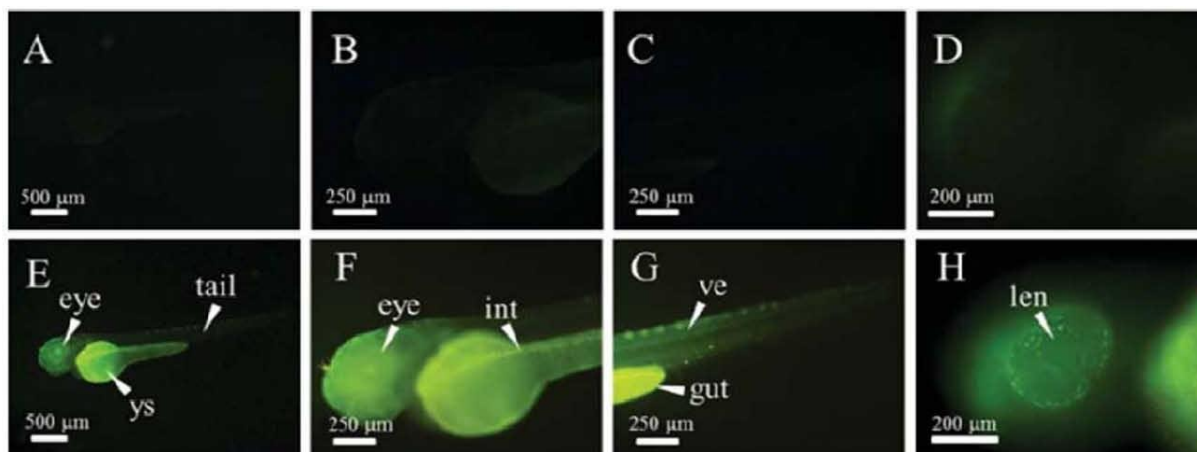
V současnosti nejvýznamnější aplikaci CQDs zastupuje biologické zobrazování, kde se využívá jejich excitačních a emisních vlnových délek ve viditelném spektru, intenzity fluorescence na úrovni jednotlivých teček, nízké cytotoxicity, excelentní rozpustnosti ve vodě a výborné fotostability. Pro *in vitro* studie byly CQDs úspěšně použity v mnoha zobrazení označených buněk, jako jsou buněčné linie HeLa (Choi *et al.*, 2014), lidské neurální kmenové buňky (Shang *et al.*, 2014), NIH-3T3 (Zhang *et al.*, 2012b), A549 (Vedamalai *et al.*, 2014), HepG-2 (Xu *et al.*, 2013) MD-MBA-231 (Kang *et al.*, 2015a) a další (viz Obrázek č.3). Ve většině případů byly CQDs pohlceny endocytózou a hromadily se v cytoplazmě, pouze v několika případech se vyskytovaly i v jádře (Ray *et al.*, 2009).



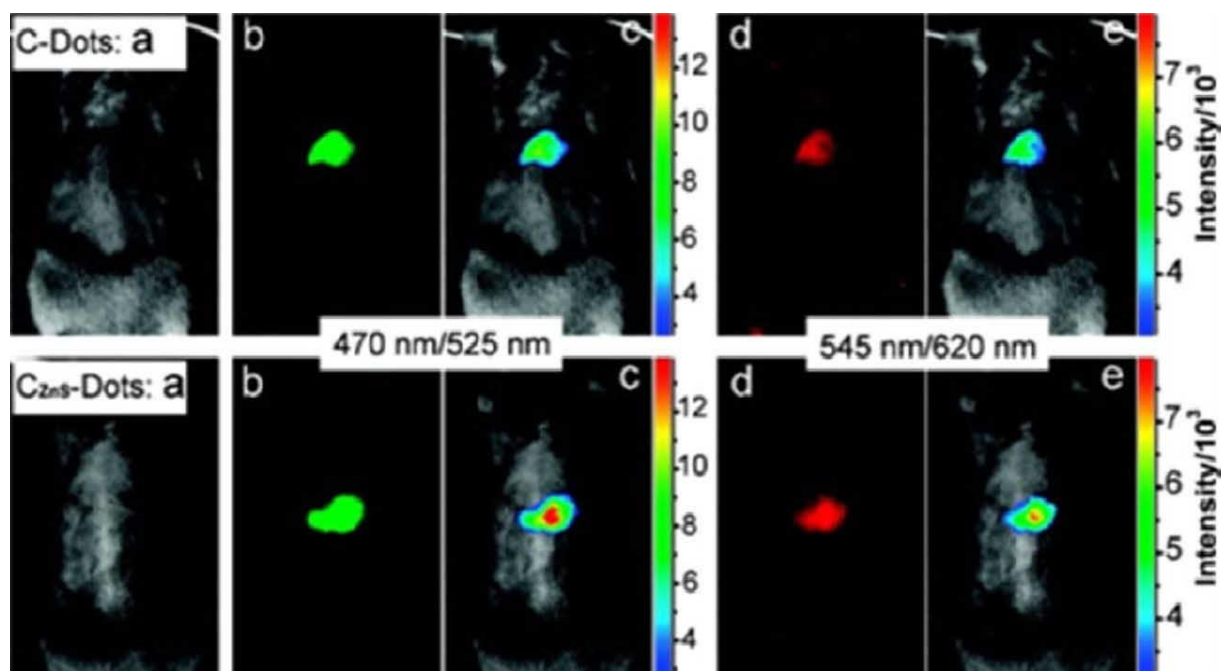
Obrázek č. 3 – Fluorescenční obrázky MD-MBA-231 buněk značených CQDs. Převzato z (Kang *et al.*, 2015a).

Při *in vivo* zkoumání vývojových mechanismů různých onemocnění se využívá modelový organismus *Danio* pruhované, protože má velmi dobře definovaná vývojová stádia a je přístupný pro optické zobrazení (Lieschke *et Currie*, 2007). Akumulace CQDs byla zjištěna v oku, žloutkovém váčku a ve střevě (viz Obrázek č. 4) (Xu *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2015b). Avšak standardním modelem pro *in vivo* pozorování jsou laboratorní myši. I v těchto studiích byly získány fluorescenční obrázky CQDs a nebyla potvrzena žádná výrazná toxicita

orgánů ani tkání (Yang *et al.*, 2009a). Fluorescence CQDs byla po intravenózním podání pozorována v žaludku a po 1 hodině došlo k akumulaci v močovém měchýři (viz Obrázek č. 5). Po 4 hodinách od injekce došlo k poklesu fluorescence v močovém měchýři a nárůstu fluorescence v ledvinách, což značilo vyloučení teček močí. V další studii byla zjištěna přítomnost uhlíkových teček dokonce v mozku myši (Li *et al.*, 2012).



Obrázek č. 4 – Fluorescenční obrázky Dánia pruhovaného inkubovaného CQDs. Převzato z (Xu *et al.*, 2014).



Obrázek č. 5 – Fluorescenční obrázky myši, do které byly injekčně vpraveny CQDs. Převzato z (Yang *et al.*, 2009a).

2. Kmenové buňky

Kmenové buňky reprezentují biologické buňky, které mají dvě významné vlastnosti, a to schopnost diferenciovat se do různých buněčných linií a schopnost samo-obnovení. Kmenové buňky jsou rozděleny na dva hlavní typy: embryonální kmenové buňky (ESC) a dospělé kmenové buňky (Ding *et al.*, 2011). ESC se získávají z vnitřní buněčné masy blastocysty a mají schopnost pluripotence, čili schopnosti se diferenciovat v kteroukoliv buňku v těle, avšak jejich využití musí zohledňovat právní a etické aspekty (Wu *et al.*, 2007). U dospělých kmenových buněk, také známých jako somatické kmenové buňky, nejsou tyto problémy tak závažné, jelikož se mohou získávat jak z juvenilní, tak z tkáně dospělé. Navíc tyto buňky mají schopnost multipotence, která jim umožňuje diferenciovat se do specifických buněčných linií. Právě tyto vlastnosti dělají ze somatických kmenových buněk výborné kandidáty pro klinickou aplikaci především v regenerativní medicíně (Ding *et al.*, 2011).

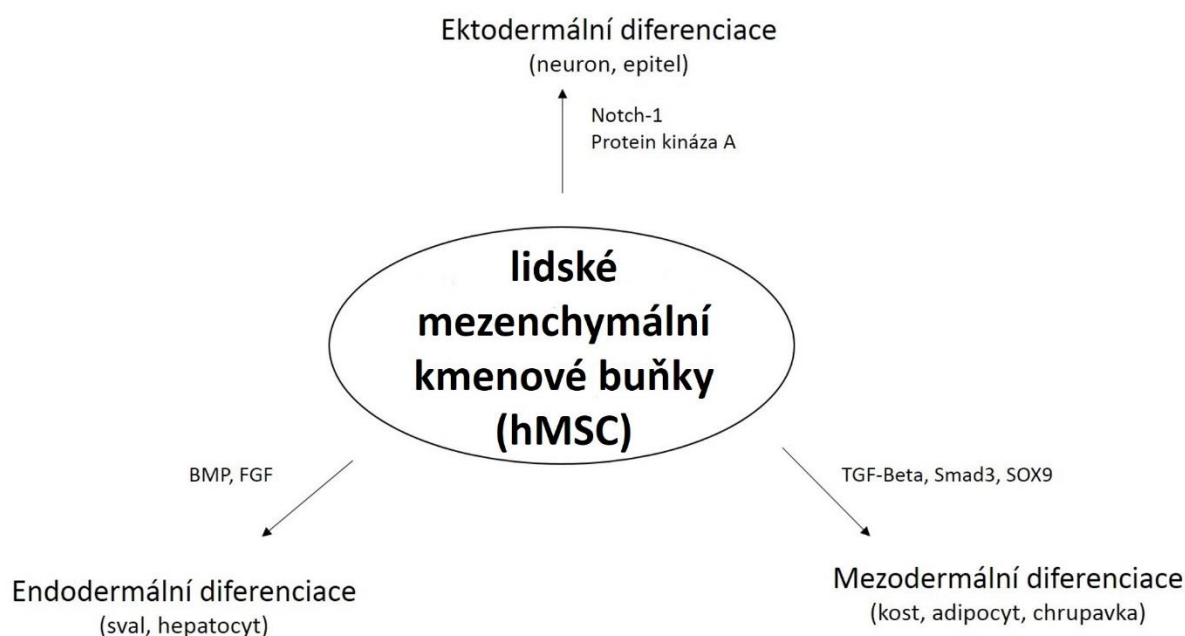
2.1. Mezenchymální kmenové buňky

Mezenchymální kmenové buňky (hMSC) představují typ somatických kmenových buněk se schopností samoobnovení a obnovování mezenchymální a křevetvorné tkáně. hMSC také projevují multipotentní schopnost se diferenciovat do široké škály buněčných typů (chondrocytů, adipocytů, osteocytů, osteoblastů, myocytů, kardiomyocytů, neuronů či inzulin produkujících buněk) (Oishi *et al.*, 2009). Jejich izolace probíhá nejčastěji z kostní dřeně nebo tukové tkáně, ale také byly nalezeny v téměř všech postnatálních orgánech a tkáních včetně pupeční šňůry, děložní sliznice, okostici, svalech, synoviální tekutině. (Si *et al.*, 2011). Jejich relativně snadná izolace přispívá k stále častějšímu využívání v transplantačních a regenerativních aplikacích.

Ačkoliv bylo provedeno několik intenzivních průzkumů imunitních fenotypů hMSC, nedostatek unikátních specifických markerů stále představuje problém pro přesnou charakterizaci hMSC. Přestože bylo identifikováno několik fenotypových markerů, které vykazují expresi na povrchu hMSC, neexistuje zatím žádný unikátní marker, který by mohl být použit k zjištění úplné homogenity populace hMSC. Z tohoto důvodu Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii (ISCT) přišla s minimální sadou standardních kritérií pro charakterizaci hMSC: 1) za standardních kultivačních podmínek jsou buňky schopné přilnout k plastickému povrchu a vytvářet kolonie; 2) vykazují expresi markerů CD73, CD90 a CD105 a zároveň postrádají expresi markerů CD14, CD19, CD31, CD34 a CD45; 3)

patříčnými stimuly je možné navodit diferenciaci na osteoblasty, adipocyty a chondrocyty a 4) vykazují imunomodulační vlastnosti (Dominici *et al.*, 2006).

Diferenční potenciál mezenchymálních kmenových buněk přitahoval velkou pozornost a naději v léčbě různých doposud těžko léčitelných nemocí. Zvyšující se počet experimentálních dat demonstroval schopnost hMSC diferenciovat se do mezodermální linie jako osteocyt, chondrocyt, adipocyt a pojivová buňka stromatu (viz Obrázek č. 6) (Pittenger *et al.*, 1999). Kromě toho byla zjištěna schopnost hMSC diferenciovat se nejen do ektodermální linie jako neuron a epitel, ale také do endodermální jako myocyt a hepatocyt (viz Obrázek č. 6). I když většina těchto výsledků byla zjištěna z pokusů *in vitro*, poskytují velmi zajímavé důkazy pro rozpoznání diferenciaci hMSC *in vivo* (Lee *et al.*, 2004; Tomita *et al.*, 2007).



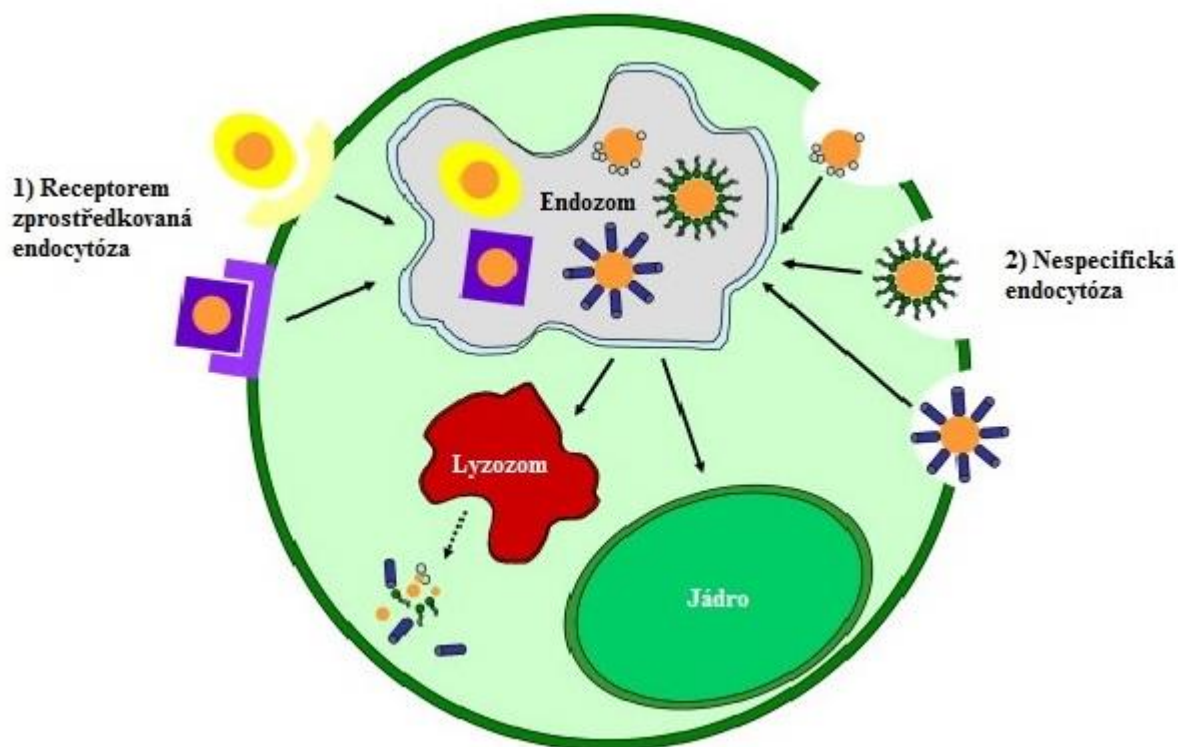
Obrázek č. 6 – Ilustrační schéma účinků různých cytokinů a signálních drah na diferenciaci schopnost mezenchymálních kmenových buněk. Převzato z (Ding *et al.*, 2011).

2.2. Značení kmenových buněk kvantovými tečkami

Vzhledem k významné potenciální klinické aplikaci hMSC v regenerační a transplantační medicíně, je monitorování životnosti, funkce a distribuce buněk v hostitelském organizmu po transplantaci nesmírně důležitá. Z tohoto důvodu bylo vyvinuto několik metod efektivního značení kmenových buněk. Mezi hlavní patří magnetická rezonance (MRI), radionukleotidové zobrazování a optické zobrazování (Srinivas *et al.*, 2010;

Terrovitis *et al.*, 2010). Ačkoli MRI dokáže odhalit 3-D anatomii ve výborných detailech, její nízká senzitivita představuje problém při detekci malého množství buněk v živém organismu (Nohroudi *et al.*, 2010). Radionukleotidové zobrazování, které zahrnuje několik metod (např. jedno fotonová emisní tomografie (SPECT)), je také schopno poskytnout 3-D informaci v relativně vysokém rozlišení, avšak vyžaduje vystavení živého organismu vysokým dávkám radiačního záření (Aicher *et al.*, 2003). V porovnání s těmito metodami vykazuje optické zobrazování, které zahrnuje bioluminiscenci a fluorescenci, mnohem vyšší senzitivitu a detekci na úrovni jednotlivých buněk, i když je stále částečně limitováno s ohledem na 3-D informaci (Nishimura *et al.*, 2008).

Vzhledem k velkým výhodám kvantových teček oproti tradičním organickým fluorescenčním sondám (FITC, Rhodamine, GFP apod.) mnoho úsilí bylo zaměřeno na značení kmenových buněk kvantovými tečkami. QDs se do buněk obvykle dostávají různým typem endocytózy (viz Obrázek č. 7) (Yukawa *et al.*, 2010). Účinnosti internalizace QDs však také záleží na různých způsobech modifikace nebo stimulů. Například internalizace pomocí fyzikálních stimulů, mezi které patří ultrazvuk (Slotkin *et al.*, 2007), elektroporace (Delehanty *et al.*, 2009) a mikroinjekce (Dubertret *et al.*, 2002), může vykazovat velmi nízkou efektivnost. Oproti tomu přirozená internalizace QDs do buněk různými typy endocytózy nebo pomocí chemické modifikace (tzv. transfekční činidla jako např. kationické lipozomy, peptidy pronikající buňkou nebo polymerní micely) vykazovaly mnohem vyšší úspěšnost (Yukawa *et al.*, 2010; Higuchi *et al.*, 2011; Ranjbarvaziri *et al.*, 2011), protože se tyto transfekční molekuly používají pro transdukcí DNA nebo proteinů do buněk (viz Obrázek č. 7). Všechny metody se však potýkají s největším problémem značení kmenových buněk kvantovými tečkami a ten představuje jejich poměrně vysoká cytotoxicita.



Obrázek č. 7 – Ilustrační schéma internalizace QDs do cytosolu kmenové buňky. 1) Receptorem zprostředkovaná endocytóza; 2) Nespecifická endocytóza. V obou případech jsou nanomateriály zachyceny endozomy a následně uvolněny do cytoplazmy nebo transportovány do lyzozomů, kde jsou v kyselém prostředí degradovány. Poté mohou být nanomateriály uvolněny do cytoplazmy a následně transportovány do jádra buňky. Převzato z (Ferreira *et al.*, 2008).

2.3. Cytotoxicita QDs a CQDs a jejich distribuce v mezenchymálních kmenových buňkách

Cytotoxicita kvantových teček se považuje za obecně známý problém, v případě kmenových buněk je však situace ještě o něco složitější. Vzhledem k potenciálnímu využití v regeneračních a transplantačních terapiích je tedy základem, aby QDs nezpůsobily úmrtí buněk, ani nepůsobily negativně na morfologii, fenotyp, proliferaci a diferenciaci kmenových buněk (Ferreira *et al.*, 2008).

Bylo provedeno mnoho studií zabývajících se na účinkem kvantových teček na kmenové buňky s velice rozporupnými výsledky. Několik studií uvádí pozitivní výsledky, kdy kvantové tečky neměly žádný negativní vliv na viabilitu, proliferaci ani morfologii, a také neinterferovaly s diferenciačním programem kmenových buněk (Chakraborty *et al.*, 2007; Lin

et al., 2007; Shah *et al.*, 2007; Yukawa *et al.*, 2010). Najdou se však také studie, ve kterých kvantové tečky narušují nebo pozměňují diferenciační potenciál kmenových buněk, i přestože viabilita, morfologie a průběh buněčného cyklu zůstává nezměněn (Dubertret *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 2006a; Hsieh *et al.*, 2006b). Takto rozporuplné výsledky jsou pravděpodobně způsobeny rozdílem v chemickém složení, ve velikosti a v povrchové úpravě teček (Derfus *et al.*, 2004).

Biokompatibilita/cytotoxicita teček je úzce spojena s prekurzorem, ze kterého se kvantové tečky syntetizují. Ke značení kmenových buněk je tedy vhodné použít kvantové tečky na bázi uhlíku (CQDs) nebo grafenové kvantové tečky (GQDs) vykazující velice podobné fluorescenční vlastnosti a lepší biokompatibilitu než QDs na bázi těžkých kovů (viz. podkapitola Cytotoxicita uhlíkových teček). Studie, ve kterých byly používány různé typy uhlíkových kvantových teček, prezentovaly kladné výsledky, jelikož nedocházelo k žádným změnám ve viabilitě, morfologii a diferenciaci kmenových buněk (Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012a; Shang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016a; Qiu *et al.*, 2016). Ve všech studiích byly navíc použity maximální koncentrace pohybující se okolo 200 $\mu\text{g/ml}$, které až několikanásobně převyšují koncentrace obvykle používané pro studie kvantových teček na bázi těžkých kovů.

Distribuce CQDs i QDs těžkých kovů v kmenových buňkách závisí především na jejich povrchové úpravě a s ní spojeném povrchovém náboji (Chang *et al.*, 2006). Kvantové tečky se do buněk obvykle dostávají buněčnou endocytózou do endozomů, ze kterých se následně mohou uvolnit do cytoplazmy nebo se v endozomech dostat do dalších různých buněčných částí (viz Obrázek č. 7) (Shah *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012a). Nanomateriály, které buňka nemůže využít, jsou transportovány do kyselého a oxidačního prostředí lyzozomů a peroxizomů, kde dochází k jejich degradaci. Akumulace QDs v jádře kmenových buněk byla také dokumentována, ale dochází k ní jen velice zřídka, jelikož vyžaduje velmi specifické vlastnosti QDs (velikost, povrchová vrstva). Výskyt kvantových teček v jádře byl zaznamenán u kvantových teček na bázi kadmia a selenu Cd/Se QDs s peptidovým povrchem (Narayanan *et al.*, 2013). Přítomnost nanomateriálu v jádře kmenových buněk byla popsána také u uhlíkových nanotrubic (SWCNT) a CQDs po funkcionalizaci částic gadoliniem (Mooney *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2016a). Výskyt nepasivovaných CQDs v jádře kmenových buněk doposud žádná studie nezmiňuje, byl však popsán průnik nepasivovaných CQDs do jádra myších fibroblastů (buněčná linie NIH3T3)

(Datta *et al.*, 2014). Dalším typem uhlíkových částic pozorovaných v jádře kmenových buněk byly grafenové tečky (Shang *et al.*, 2014)

Experimentální část

3. Materiály a metody

3.1. Materiály

3.1.1. Přístrojové vybavení

Světelný mikroskop s fluorescenčním módem Olympus IX 70, CO₂ inkubátor (N – Biotek), multidetekční reader Tecan infinite M200 pro (Schoeller Instruments), digitální suchá lázeň (Major Science), digitální vodní lázeň (BIOER), centrifuga (Eppendorf), biohazard flow box (Bio-Ban), průtokový cytometr BD FACSVerse™ (BD Biosciences), přístroj na ultra čistou vodu (Mirae ST), vakuový systém na odsávání média (Mediset)

3.1.2. Chemikálie a použité kity

Deionizovaná voda, 0,25 % roztok Trypsin – EDTA (Sigma), Penicilin – Streptomycin (Thermo Fisher Scientific), 1× koncentrovaný PBS roztok, indikátor intracelulárního oxidačního stresu CM-H₂DCFDA (Life Technologies), LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Thermo Fisher scientific), BD Cycletest™ Plus DNA Kit (BD Biosciences), 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI), fluorescenční značka ActinGreen™ 488

3.1.3. Seznam a příprava použitých médií

DMEM (1X) + GlutaMAX™

Bylo připraveno Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) obsahující 1 g/l D-glukózy, pyruvát, 10 % FBS a 1 % PEN/STR; pozn.: FBS – fetální bovinní sérum – zdroj bílkovin, PEN/STR – penicilín (10 000 U/ml) a streptomycin (10 000 µg/ml) – prevence před infekcí.

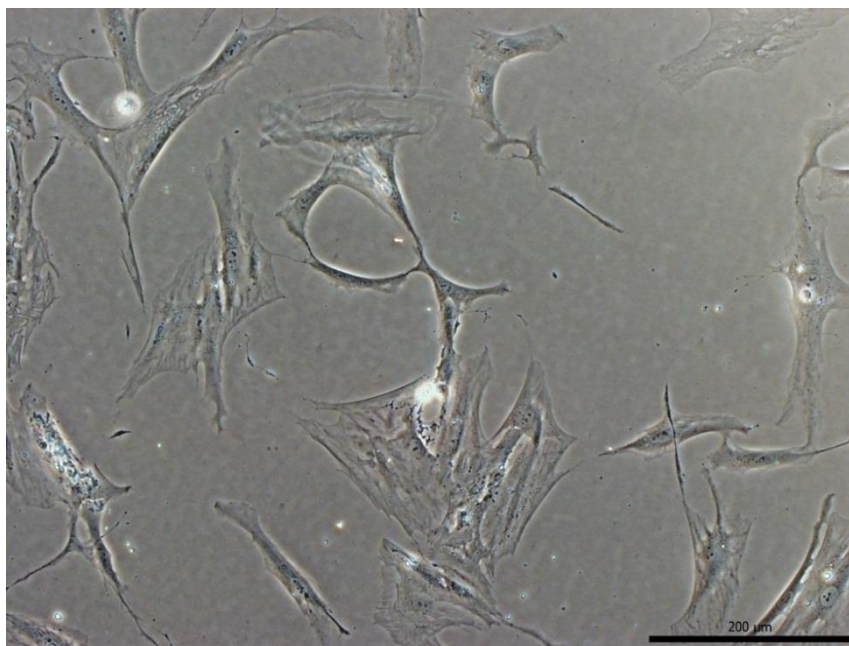
3.1.4. Seznam a příprava použitých roztoků

1× PBS

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ a 0,24 g KH₂PO₃ bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Následně bylo pomocí HCl upraveno pH na hodnotu 7,4 a objem byl doplněn opět destilovanou vodou na 1000 ml. Láhev s roztokem PBS byla následně autoklávována a připravena na použití.

3.1.5. Biologický materiál

Biologický materiál použitý v diplomové práci představovala buněčná linie lidských mesenchymálních kmenových buněk (human Mesenchymal Stem Cells – hMSC) (Obrázek č. 8). Kmenové buňky byly izolovány Mgr. Josefem Skopalíkem na Lékařské fakultě Masarykovy Univerzity v Brně z tukové tkáně pacientů podle příslušného protokolu.



Obrázek č. 8 – Lidské mezenchymální kmenové buňky. Měřítko je 200 μm.

3.1.5.1. Kultivace a pasážování

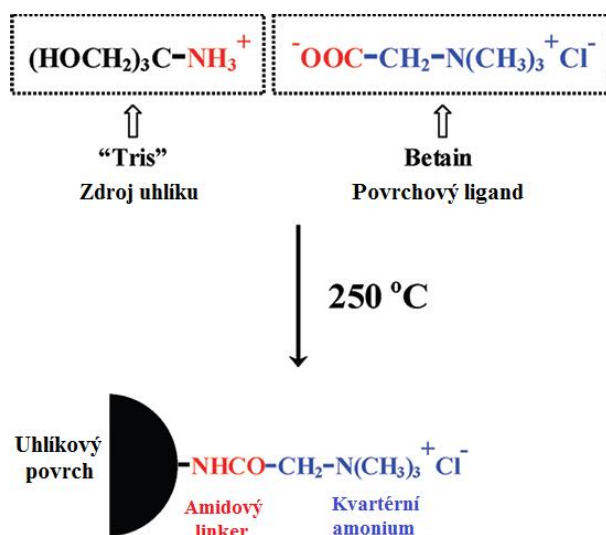
Všechny experimenty byly prováděny *in vitro*, čili s kmenovými buňkami se pracovalo v prostředí mimo organismus. Kultivace buněk tedy probíhala v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % atmosféře CO₂, aby byly navozeny podmínky podobné prostředí v živém organismu. Buňky byly kultivovány v plastové kultivační láhvi o objemu 10 ml v kultivačním médiu (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Sigma-Aldrich) a veškerá interakce s buněčnou linií a médiem probíhala ve sterilních podmínkách v laminárním boxu.

hMSC byly pravidelně pasážovány, aby nedošlo ke kontaktní inhibici, která by vedla k buněčné smrti. Po mikroskopické kontrole buněk bylo odstraněno růstové médium, které se nahradilo roztokem PBS (37 °C). Tímto krokem se buňky promyly od fetálního bovinního séra, které by potlačilo enzymatické působení trypsinu přidaného v následujícím kroku (1 ml trypsinu na střední kultivační láhev). Působení trypsinu (5 min v CO₂ inkubátoru) zajistilo odloučení buněk ode dna kultivační láhve. Účinek trypsinu byl zastaven přidáním

kultivačního média obsahující FBS. Následně byly buňky spočítány a naředěny podle potřeby počtu buněk na cm² vybraného kultivačního plastu.

3.1.6. Fyzikální materiál (Uhlíkové kvantové tečky - CQDs)

Uhlíkové kvantové tečky (CQDs) použity v diplomové práci byly syntetizovány vědeckým týmem v laboratoři fyzikálního oddělení Univerzity Ioannina v Řecku (Bourlinos *et al.*, 2012). Pro syntézu těchto CQDs byl použit nový postup přípravy, který zahrnoval tepelnou oxidaci nového prekurzoru soli vyrobeného z acidobazické kombinace tris(hydroxymethyl)aminomethanu (Tris) a hydrochloridu betainu, na odpovídající amonný karboxylový komplex. Tenhle systém tedy využívá Tris jako zdroj uhlíku a betain jako povrchový modifikátor (viz Obrázek č. 9).



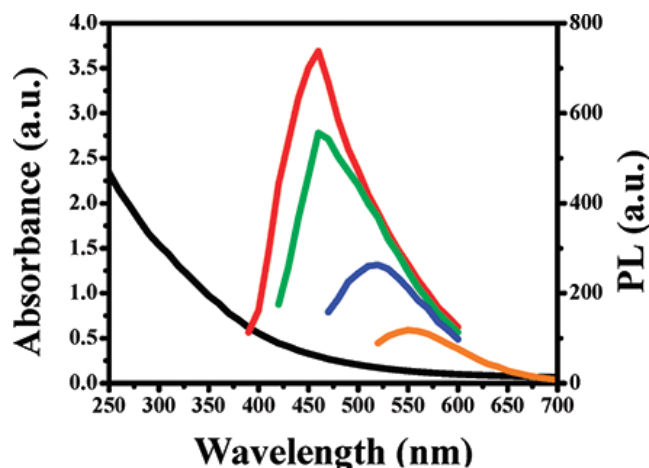
Obrázek č. 9 – Syntéza a struktura uhlíkových kvantových teček (CQDs) (Bourlinos *et al.*, 2012).

Velká výhoda v použití zmíněného nového prekurzoru soli spočívá ve tvorbě vysoce uniformních kvantových teček z hlediska jejich velikosti a povrchového náboje. Iontový charakter betainového ligandu dále uděluje částicím výbornou disperzibilitu ve vodě, anexovou kapacitu, dlouhodobou fluorescenci ve viditelném spektru a koloidní stabilitou ve vodě i po vystavení podmínkám o vysoké teplotě a tlaku.

Povrchový náboj CQDs je pozitivní, čehož je dosaženo hlavně díky přítomnosti kvartérního chloridu amonného na povrchu teček. Především jeho vlivem jsou CQDs vysoce disperzní ve vodě a vytvářejí stabilní koloidy s hodnotou zeta potenciálu + 43 mV. Takto

pozitivně nabitě částice flokulují s objemnými anionty (př. ferrokyanidy, jodidy) a dobře reagují se substráty nesoucí záporný náboj (jíly, zeolity, biomolekuly nebo barviva).

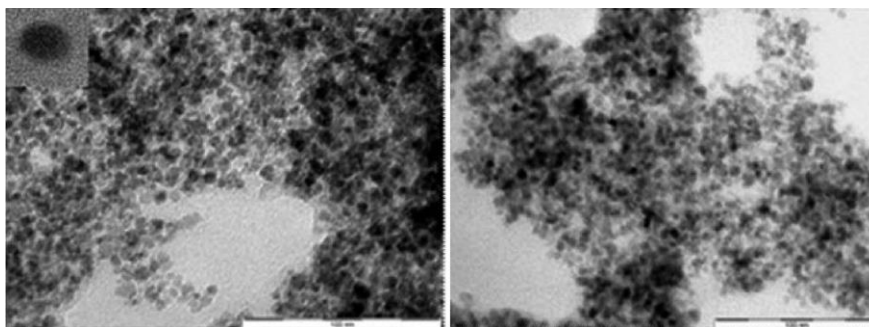
Hlavní výhodou CQDs a v podstatě důvodem, proč byla tahle studie pro potvrzení jejich biokompatibility provedena, jsou jejich výborné a dlouhodobě stabilní fluorescenční vlastnosti. Excitačně a emisní spektrum CQDs je uvedeno na obrázku č. 10. S ohledem na fluorescenční spektra, pokud je vlnová délka excitace mezi 375 a 400 nm, emisní vlnová délka zůstává stabilní, což znamená, že jeden druh fluorescence v této oblasti emise teček dominuje (Mao *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010). Pokud se však excitační vlnová délka lišila od 400 do 500 nm, fluorescenční spektrum se posunulo směrem k červené oblasti a intenzita fluorescence postupně klesla. Takové fluorescenční chování naznačuje přítomnost různých typů fluoroforů, které mají různý stupeň konjugace dvojně vazby a tím i různé emisní vlnové délky (Mao *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010). Kvantový výtěžek CQDs byl vypočítán na 4 %.



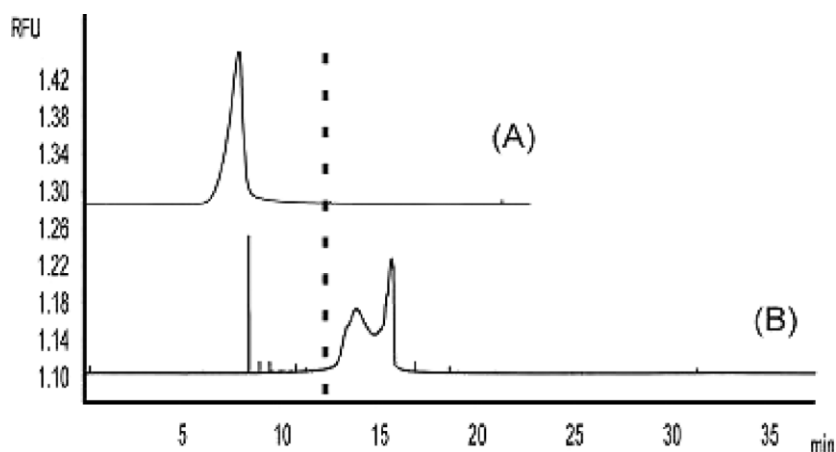
Obrázek č. 10 – Absorpční (černá čára) a na vlnové délce závislá emisní (barevné křivky) spektra CQDs ve vodě. Emise pro excitaci při 375 a 400 nm se objevuje při 460 nm (červená a zelená křivka), zatímco emise pro excitace při 450 a 500 nm se objevuje při 520 (modrá křivka) a 550 nm (oranžová křivka). Převzato z (Bourlinos *et al.*, 2012).

Pro potvrzení těchto specifických vlastností CQDs bylo použito několik metod. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) odhalila velmi uniformní, skoro až sférické nanočástice s průměrnou velikostí 7 nm (Obrázek č. 11). Dále byla pro potvrzení uniformity ve velikosti a povrchové chemii CQDs použita kapilární elektroforéza (CE), která představuje velmi citlivou analytickou techniku pro charakterizaci nanočástic v různých elektrolytech (Carrillo-Carrion *et al.*, 2011). CE byla použita pro porovnání CQDs s uhlíkovými tečkami, které byly syntetizované pomocí citrátové metody (Bourlinos *et al.*, 2008a; Bourlinos *et al.*, 2008b) (Obrázek č. 12). CQDs vykazaly více symetrický a užší pík, který naznačuje větší

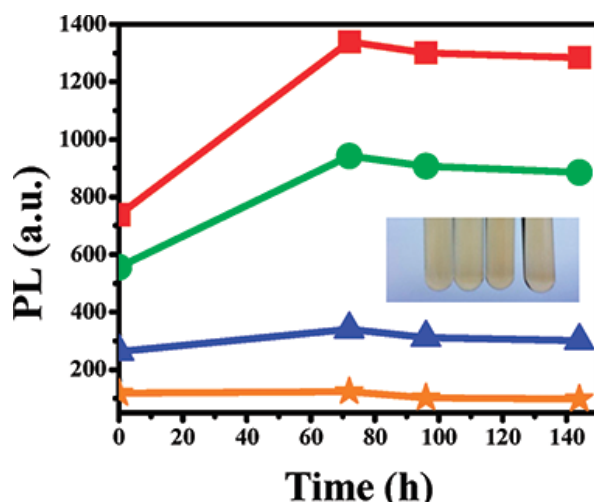
uniformitu z hlediska velikosti a náboje teček. Intenzita fluorescence vodního roztoku CQDs byla sledována po dobu 72, 96 a 144 h (Obrázek č. 13). Bylo pozorováno, že intenzita fluorescence nejprve vzrostla a následně zůstala stabilní, což indikuje dlouhodobou fluorescenční stabilitu. Kromě toho nebyla pozorována žádná precipitace CQDs, což naznačuje také dlouhodobou koloidní stabilitu.



Obrázek č. 11 – Obrázky CQDs z transmisního elektronového mikroskopu (TEM). Detail v levém horním rohu představuje jednu nanočástici. Měřítka je 100 nm (Bourlinos *et al.*, 2012).



Obrázek č. 12 – CE charakterizace CQDs (A) a uhlíkových teček syntetizovaných pomocí citrátové metody (B) v octanovém elektrolytu. Podmínky: 35 mM elektrolyt octanu sodného, pH 4,5, +20 kV, 25 °C (Bourlinos *et al.*, 2012).



Obrázek č. 13 – Intenzita fluorescence vodní disperze CQDs v závislosti na době expozice podmínkám o vysoké teplotě/tlaku za použití různých vlnových délek excitace (excitace při 375 nm červená křivka, při 400 nm zelená křivka, při 450 nm modrá křivka a při 500 nm oranžová křivka). Vložený detail ukazuje sadu vodních disperzí použitých v experimentu bez známek precipitace (Bourlinos *et al.*, 2012).

3.2. Metody

3.2.1. Měření produkce ROS (reaktivních kyslíkových radikálů)

Měření generace reaktivních kyslíkových radikálů a s tím spojený vznik oxidačního stresu v buňkách byl detekován dvěma metodami. U obou metod byla použita stejná sonda pro detekci generace ROS uvnitř buněk (CM-H2DCFDA). V první metodě byl testován vliv CQDs na generaci radikálů v kmenových buňkách po 24 hod inkubaci. V první řadě bylo vyseto 5000 hMSC na jamku v 96 – jamkové destičce, buňky se nechaly adherovat a následující den se naznačily různými koncentracemi CQDs. Po 24 hod inkubaci bylo do každé jamky (obsahující buňky s CQDs) přidáno 2 μ l fluorescenční ROS próby, která byla předem rozpuštěná v roztoku dimethylsulfoxidu (DMSO). V posledním kroku byl změřen fluorescenční signál pomocí multidetekčního readeru Tecan infinite M200 při excitační/emisní vlnové délce 505/529 nm.

Druhou metodou byla testována kinetika generace ROS a oxidačního stresu. Kmenové buňky byly opět vysety a naznačeny různými koncentracemi CQDs stejně jako v první metodě, avšak 2 μ l fluorescenční ROS próby byly přidány ihned po značení. V posledním kroku byla po 30 min inkubaci měřena generace ROS po době 180 min v 10 min intervalech. Pro stanovení chybové úsečky byla obě měření provedena v triplicátech.

3.2.2. Průtoková cytometrie

Pro stanovení efektu CQDs na viabilitu a změnu v buněčném cyklu kmenových buněk byla použita metoda průtokové cytometrie (BD FACSVersé viz Obrázek č. 14), která umožňuje analyzovat jednotlivé buňky. Pro stanovení celkové viability buněk po 24 hod inkubaci s různými koncentracemi CQDs byl použit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit. Příprava kmenových buněk probíhala stejně jako u měření generace ROS avšak v 24 jamkové kultivační destičce z důvodu potřeby většího počtu buněk. Po 24 hod inkubaci byl postup stejný jako u pasážování buněk. Z jamek se značenými buňkami se odsálo kultivační médium, promyly se roztokem PBS a následně bylo přidáno takové množství trypsinu, aby bylo pokryto dno jamky. Po získání buněčné suspenze byly přidány jednotlivé komponenty kitu - 2 μ l roztoku ethidium bromidu (koncentrace 2 mM) a 2 μ l roztoku calcein-AM (koncentrace 50 μ M), který byl předem naředěn DMSO. Červený fluorescenční signál ethidium bromidu vykazovaly buňky, které ztratily membránovou integritu a byly označeny za mrtvé. Zeleným fluorescenčním signálem calceinu svítily živé buňky, které měly aktivní intracelulární esterázy a katalyzovaly přeměnu nefluorescenčního calceinu-AM na vysoce zeleně fluorescenční calcein. Fluorescenční signál byl měřen na průtokovém cytometru při příslušných excitačních/emisních vlnových délkách (červený signál - 488/700 nm, zelený signál - 488/527). Takto bylo možné snadno rozlišit populaci živých buněk od populace mrtvých buněk, a určit tak celkovou viabilitu hMSC po inkubaci s CQDs.

Pro stanovení vlivu CQDs na změnu buněčného cyklus hMSC byl využit BD Cycletest™ Plus DNA Kit. Tento kit obsahuje 3 roztoky (A, B, C). Složení roztoku A je trypsin v detergentním pufru tetrahydrochloridu sperminu, v roztoku B je ve sperminovém pufru RNáza A a inhibitor trypsinu a obsahem roztoku C je propidium jodid (PI) a sperminový roztok. Pro analýzu byly opět použity kmenové buňky ve 24 - jamkové destičce, které byly 24 hod inkubovány s různými koncentracemi CQDs. Po inkubaci bylo opět odsáto kultivační médium, jamky byly promyty roztokem PBS a následně se postupovalo podle přiloženého návodu (125 μ l roztoku A 10 min, 100 μ l roztoku B 10 min, 100 μ l vychlazeného roztoku C 10 min ve tmě). Poté byl analyzován buněčný cyklus kmenových buněk průtokovým cytometrem při příslušné ex/em vlnové délce (488/586 pro detekci PI). Jednotlivé fáze buněčného cyklus byly odlišeny díky rozdílné intenzitě fluorescenčního signálu, kdy bylo možné určit populace buněk, které byly v G₀/G₁, S a G₂/M fázi.

Doplňující měření na průtokovém cytometru zahrnovala analýzu specifických markerů hMSC po kultivaci s kvantovými tečkami a měření potvrzující koncentrační a časovou

internalizaci CQDs a analýzu exocytózy částic z buněk. Pro analýzu specifických markerů byly vybrány markery CD73, CD90 a CD105, které tyto buňky na svém povrchu exprimují. Jako negativní kontrola byl použit marker CD34, který se na povrchu hMSC nevyskytuje (Maleki *et al.*, 2014; Sullivan *et al.*, 2015). Při měření byly buňky po 24 hod inkubaci hMSC s CQDs (c200 $\mu\text{g/ml}$) trypsinizovány, po získání suspenze buněk byla provedena centrifugace (5 min, 1000 rpm), byl odsán supernatant, přidalo se 100 μl PBS ve kterém byl pelet rozmíchán, přidalo se 1 μl fluorescenčně značených protilátek vůči markerům a byla změřena intenzita fluorescence na průtokovém cytometru. V případě analýzy koncentrační závislosti internalizace CQDs do hMSC byl opět po 24 hod inkubaci hMSC s různými koncentracemi CQDs (50 - 1000 $\mu\text{g/ml}$) postup stejný jako při pasážování buněk a po získání buněčné suspenze byla na průtokovém cytometru změřena intenzita fluorescence. Stejný postup byl použit také při analýze časové závislosti internalizace CQDs do hMSC pouze s tím rozdílem, že inkubace hMSC s CQDs (c200 $\mu\text{g/ml}$) probíhala 4, 12, 24, 48 a 72 hod. Při měření exocytózy částic z buněk byla změřena intenzita fluorescence buněk při jejich maximální saturaci částicemi, následně bylo v dalších jamkách odsáto kultivační médium, jamky byly promyty roztokem PBS a nakonec bylo přidáno opět kultivační médium. Po uplynutí časového úseku inkubace (48, 72 hod) byla získána buněčná suspenze a opět změřena intenzita fluorescence buněk. Pro stanovení chybové úsečky byla měření viability a buněčného cyklu hMSC provedena v triplicátech.



Obrázek č. 14 – Průtokový cytometr BD FACSVerse od firmy BD Biosciences

3.2.3. Comet assay - měření genotoxicity

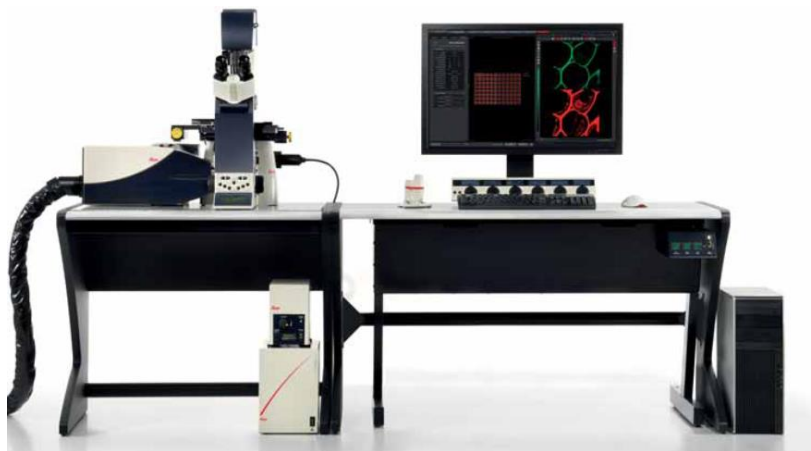
Pro analýzu poškození DNA kmenových buněk byla použita comet assay. Buňky byly připraveny i naznačeny stejně jako v ostatních experimentech, ale jelikož se na institutu, kde byla práce provedena, nenachází potřebné vybavení k provedení comet assay, byly naznačené buňky po 24 hod inkubaci zaslány na Lékařskou fakultu Univerzity Palackého v Olomouci,

kde byla comet assay Doc. Ing. Kateřinou Tománkovou, PhD. provedena. Následně byly zpět zaslány výsledky, které tak mohly být vyhodnoceny. Pro stanovení chybové úsečky bylo měření provedeno dvakrát.

3.2.4. Fluorescenční a konfokální mikroskopie

Pro získání snímků z mikroskopu s fluorescenčním módem byly buňky připraveny stejně jako v ostatních experimentech (24 - jamková destička), naznačeny různými koncentracemi CQDs a inkubovány 24 hod. Po inkubaci bylo odstraněno kultivační médium, jamky byly promyty v PBS a ponechány v 500 μ l. Takto připravené buňky byly následně pozorovány.

Pro detailnější informaci o distribuci CQDs v hMSC byla provedena také analýza na konfokálním mikroskopu (Obrázek č. 15). Jelikož se však na institutu, na kterém byla diplomová práce prováděna, konfokální mikroskop nenachází, byla analýza distribuce CQDs v hMSC pomocí konfokální mikroskopie provedena Mgr. Josefem Skopalíkem na Lékařské fakultě Masarykovy Univerzity v Brně. Kmenové buňky s CQDs byly převezeny do Brna, kde byla změřena distribuce nanomateriálu uvnitř buněk.



Obrázek č. 15 – Konfokální mikroskop Leica TCS SP8 X od firmy Leica Microsystems

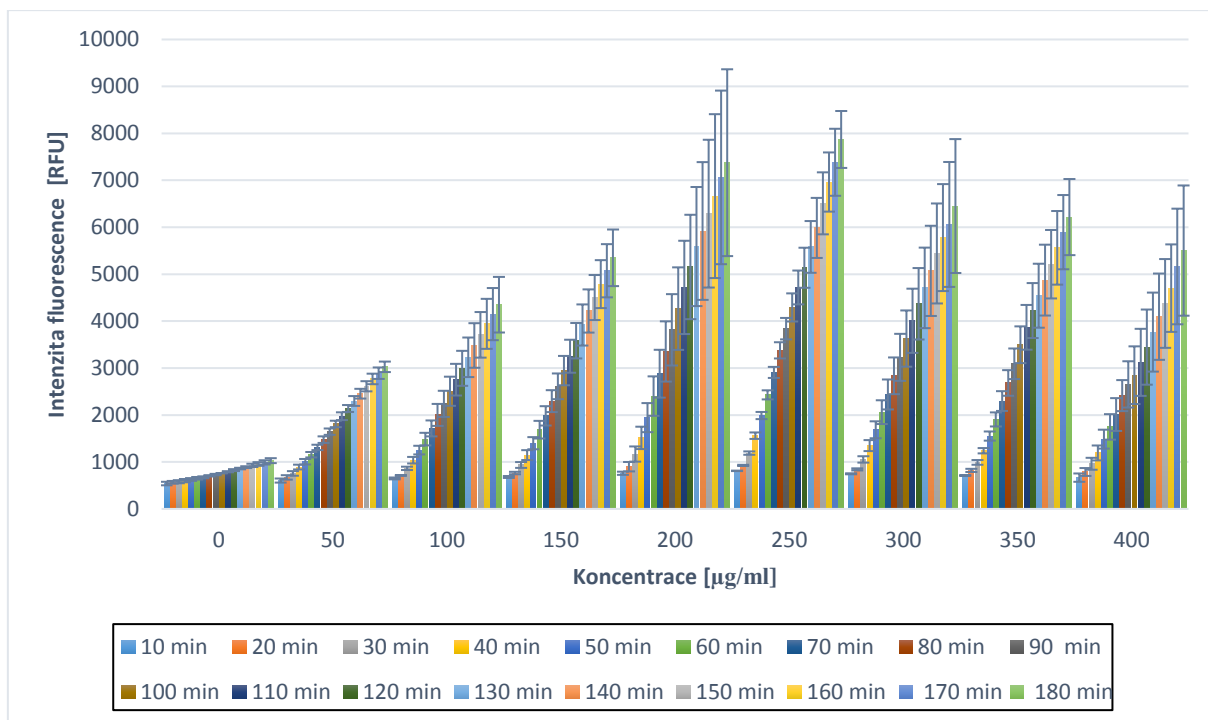
4. Výsledky

4.1. Měření oxidačního stresu – vznik reaktivních kyslíkových radikálů (ROS)

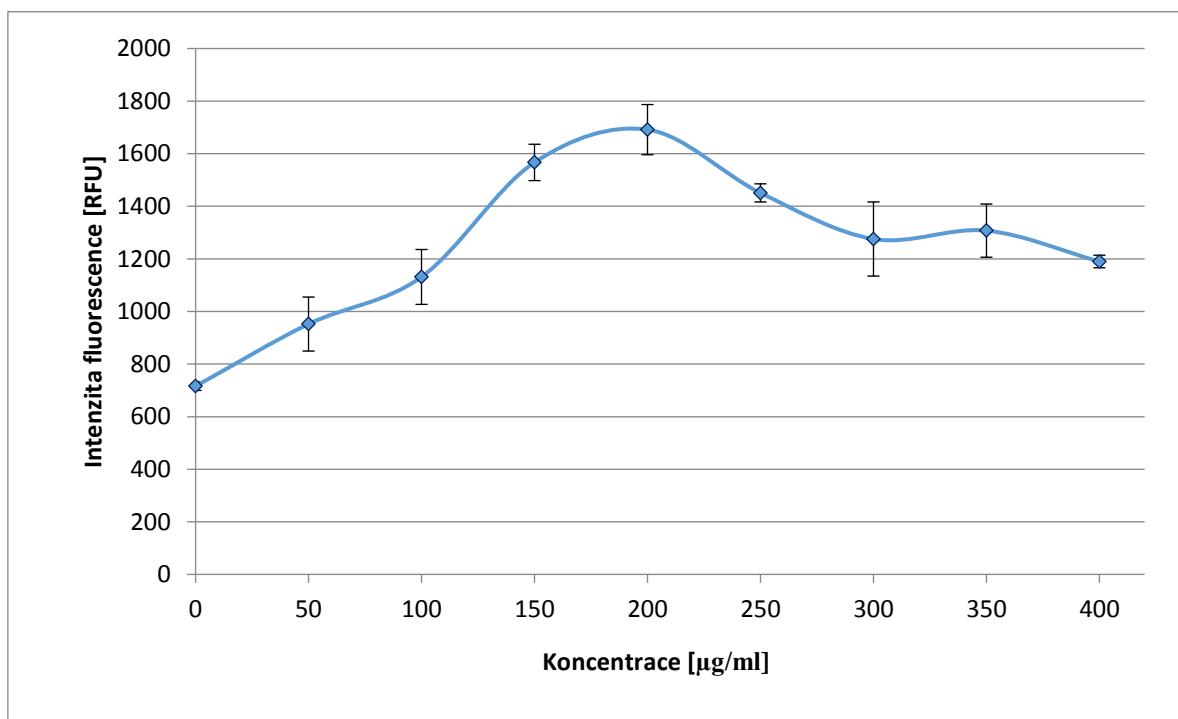
Tvorba reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a s nimi následně spojený oxidativní stres představuje hlavní mechanismus toxického působení uhlíkových nanomateriálů na buněčné linie (Garza *et al.*, 2008). Jelikož buněčné linie interagují s nanomateriálem okamžitě po přidání materiálu do kultivačního média, byly provedeny 2 typy analýzy generace ROS. Pro obě měření byla použita sonda CM-H₂DCFDA, která interaguje s různými typy ROS zahrnující především peroxid vodíku (H₂O₂), dále pak hydroxylový radikál (OH·) a peroxynitrit (ONOO⁻) (Oparka *et al.*, 2016).

Nejprve byl změřen vznik ROS po 24 hod inkubaci s CQDs a následně i oxidační stres, který vznikl okamžitě po označení mezenchymálních kmenových buněk koncentracemi CQDs 50–400 µg/ml. Intenzita fluorescence použité próby určené k detekci ROS byla snímána každých 10 min během 3 hod od aplikace CQDs k buňkám. Souhrn hodnot ROS pro jednotlivé koncentrace CQDs je ukázán v grafu č. 1.

Druhé měření hodnot ROS bylo provedeno po 24 hod inkubaci CQDs v hMSC. V tomto měření byla analyzována generace ROS v hMSC po internalizaci různých koncentrací CQDs (50 až 400 µg/ml). Souhrn hodnot pro jednotlivé koncentrace CQDs je uveden v grafu č. 2.



Graf č. 1 – Kinetika generace ROS v prvních 180 min inkubace CQDs s hMSC.



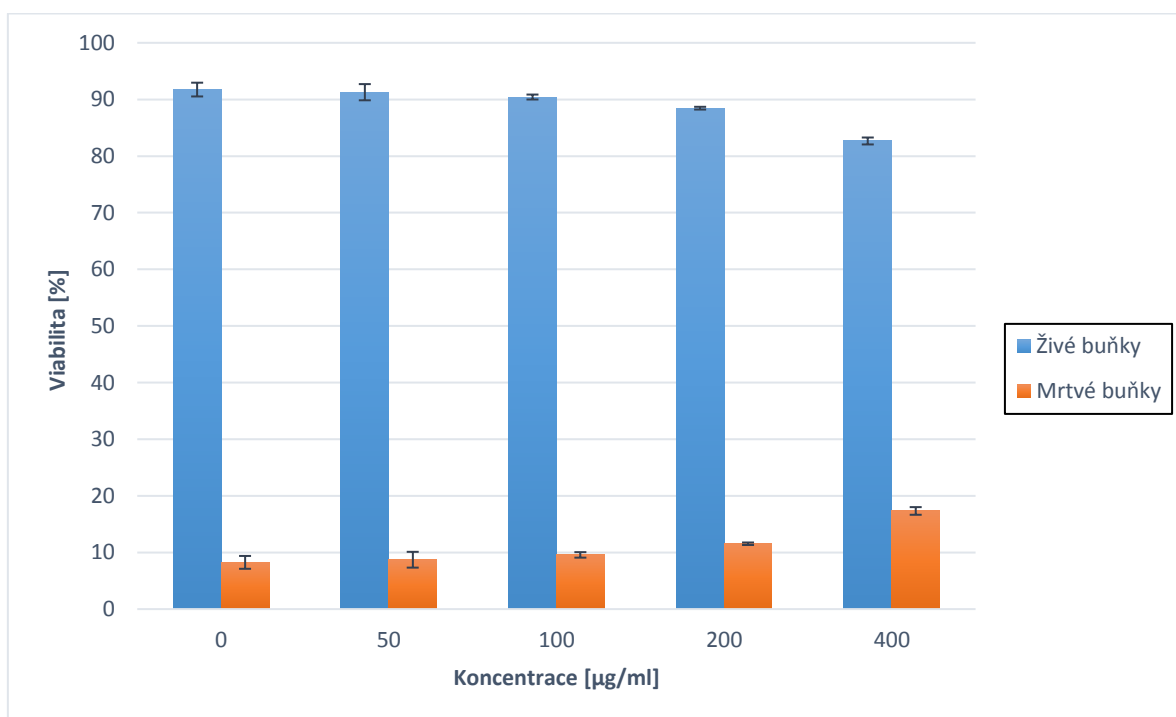
Graf č. 2 – Generace ROS v hMSC po 24 hod inkubaci s různými koncentracemi CQDs.

Z výsledků obou měření vyplývá, že je velmi podobná koncentrační závislost při vývoji ROS během prvních třech hodin i po 24 hod. Nejvyšší nárůst ROS nenastal u nejvyšší koncentrace, ale u koncentrací skoro o polovinu nižší (250 µg/ml u kinetiky ROS (viz Graf č. 1) a 200 µg/ml u ROS po 24 hod (viz Graf č. 2)).

4.2. Analýza průtokovou cytometrií

4.2.1. Cytotoxicita CQDs – měření viability hMSC

Jelikož klasická metoda stanovení viability buněk MTT (test metabolické aktivity buněk pomocí tetrazoliových solí) není doporučována pro analýzu uhlíkových nanomateriálů, jelikož může docházet k interakci mezi nanomateriálem a barvivem používaným pro stanovení viability buněk (tetrazoliové soli MTT - (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid)), což způsobuje falešně pozitivní nebo negativní výsledky (Worle-Knirsch *et al.*, 2006; Belyanskaya *et al.*, 2007; Casey *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2011), byla pro stanovení cytotoxického účinku CQDs vůči hMSC použita metoda průtokové cytometrie. Měření zahrnovalo stanovení cytotoxického účinku koncentrací CQDs 50, 100, 200 a 400 $\mu\text{g/ml}$ po 24 hod inkubaci s hMSC. Výsledná viabilita hMSC je zobrazena v grafu č. 3.

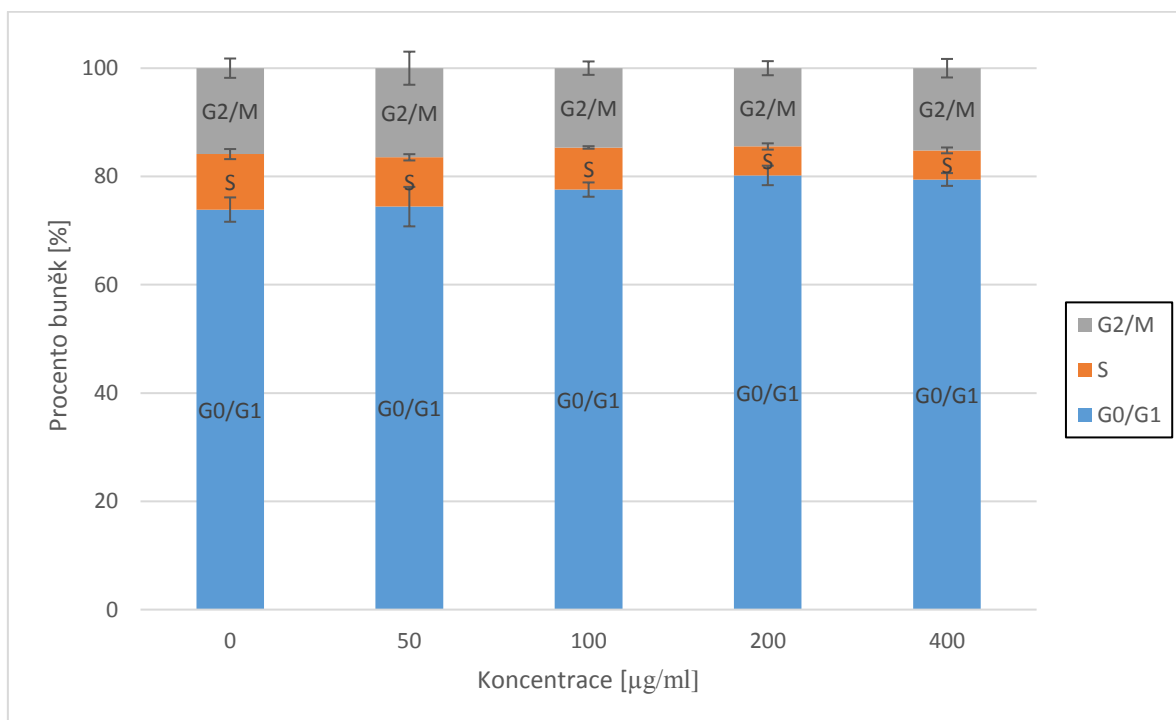


Graf č. 3 – Výsledek analýzy viability hMSC po 24 hod inkubaci s 50, 100, 200 a 400 $\mu\text{g/ml}$ CQDs.

Z výsledků LIVE/DEAD testu viability je patrné, že dokonce i u nejvyšší použité koncentrace CQDs (400 $\mu\text{g/ml}$) zůstalo po 24 hod inkubaci 82,67 % živých buněk, které vykazovaly vnitrobuněčnou aktivitu esteráz a zachovaly si membránovou integritu.

4.2.2. Vliv CQDs na průběh buněčného cyklu hMSC

Měření vlivu CQDs na změnu buněčného cyklu hMSC po 24 hod inkubaci probíhalo se stejnými koncentracemi jako analýza viability. Detekce buněčného profilu napomáhá odhalit, jak nanočástice ovlivňují buněčný růst, dělení i celkovou proliferaci. Výsledek analýzy je vyobrazen na grafu č. 4.



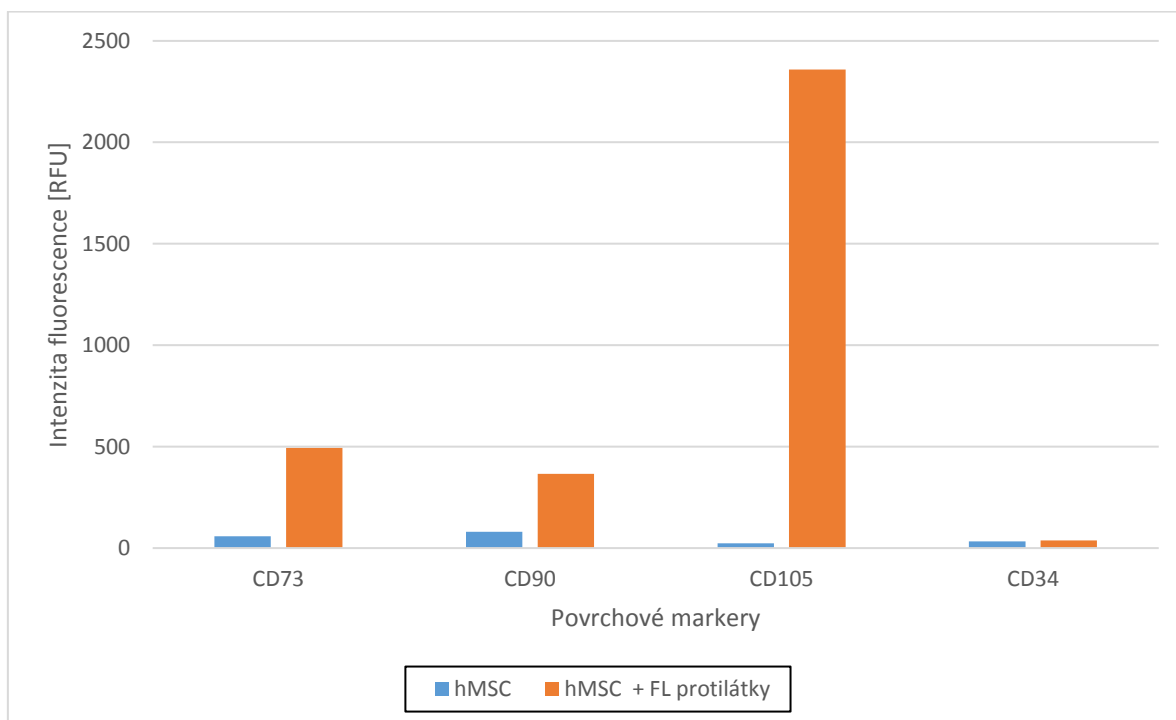
Graf č. 4 – Výsledek analýzy průběhu buněčného cyklu hMSC po 24 hod inkubaci s 50, 100, 200 a 400 µg/ml CQDs

Z výsledků analýzy buněčného cyklu hMSC lze usoudit, že k první vážnější změně v procentuálním vyjádření jednotlivých fází dochází u koncentrace 200 µg/ml CQDs, kdy klesá S fáze asi o polovinu (5,34 % oproti 10,25 % u kontrolního vzorku) a to především na úkor G₀/G₁ fáze (nárůst na 80,19 % oproti 73,88 % u kontrolního vzorku). Velmi podobný výsledek byl získán také u nejvyšší použité koncentrace CQDs 400 µg/ml, kde bylo procentuální vyjádření S fáze 5,37 % a G₀/G₁ fáze 79,44 %.

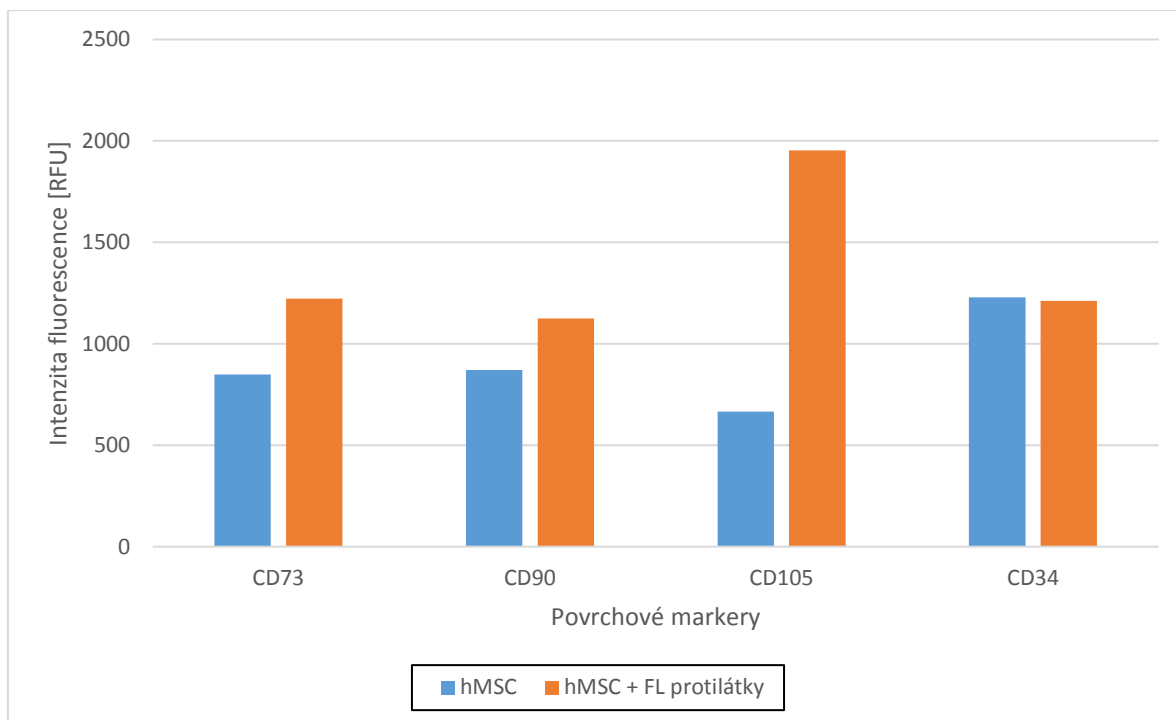
4.2.3. Vliv CQDs na expresi specifických CD markerů hMSC

Měření vlivu CQDs na expresi specifických CD markerů hMSC je důležité z hlediska zachování přirozené morfologie a charakterizace kmenových buněk po jejich 24 hod inkubaci se vzorkem. Porovnání CD markerů bylo provedeno mezi vzorkem kmenových buněk značených 200 µg/ml CQDs a vzorkem kontrolním. Jednalo se pouze o kvalitativní analýzu,

kteřá měla ověřit přítomnost membránových markerů CD73, CD90 a CD105 pomocí fluorescenčně značených protilátek u hMSC po 24 hod inkubaci s CQDs. Jako negativní kontrola byla použita fluorescenčně značená protilátka proti markeru CD34, jehož přítomnost na povrchu hMSC měla být vyvrácena. Výsledky obou vzorků jsou uvedeny na grafu č. 5 respektive grafu č. 6.



Graf č. 5 – Výsledek kvalitativní analýzy exprese pozitivních markerů CD73, CD90, CD105 a negativního markeru CD34 hMSC u kontrolního vzorku hMSC.

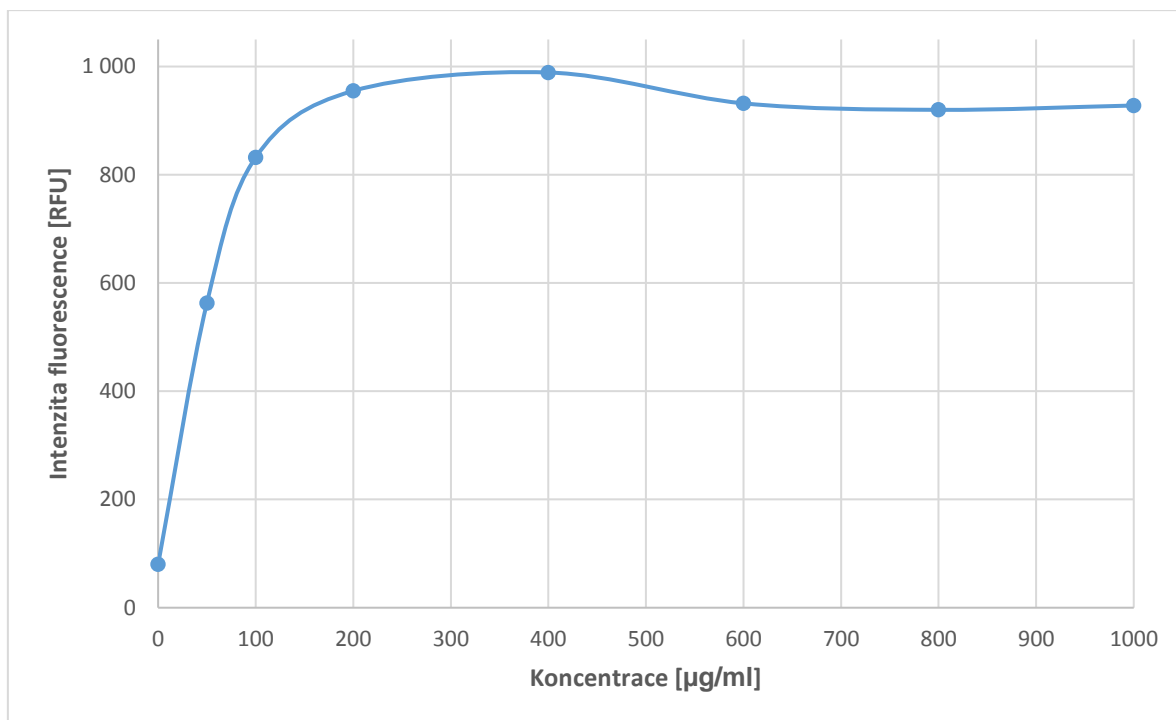


Graf č. 6 – Výsledek kvalitativní analýzy exprese pozitivních markerů CD73, CD90, CD105 a negativního markeru CD34 hMSC po 24 hod inkubaci s koncentrací CQDs 200 $\mu\text{g/ml}$.

Z výsledků kvalitativní analýzy exprese specifických CD markerů na povrchu hMSC u kontrolního vzorku je možné určit, že se markery CD73, CD90, CD105 na povrchu hMSC nacházejí, zatímco marker CD34 se na povrchu nevyskytuje. Stejný výsledek byl naměřen také u hMSC, které byly 24 hod inkubovány s koncentrací CQDs 200 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.4. Stanovení koncentrační a časové závislosti internalizace CQDs do hMSC

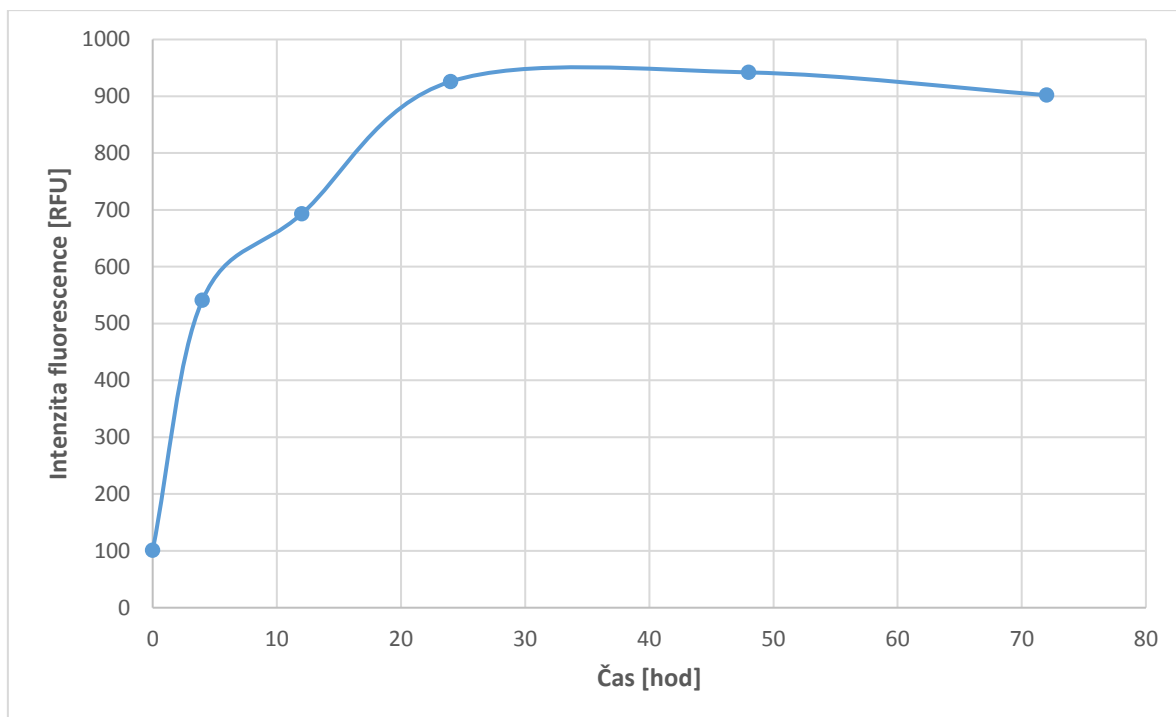
Koncentrační závislost internalizace CQDs do hMSC byla měřena při koncentracích 50, 100, 200, 400, 600, 800 a 1000 $\mu\text{g/ml}$. Po 24 hod inkubaci buněk se vzorkem byla změřena intenzita fluorescence, jejíž hodnoty jsou uvedeny v grafu 7.



Graf č. 7 – Koncentrační závislost internalizace CQDs do hMSC.

Z výsledné křivky koncentrační závislosti lze vyvodit, že maximální intenzita byla naměřena při koncentraci 400 µg/ml (989 RFU) a se zvyšující se koncentrací již zůstává poměrně stabilní.

Časová závislost byla měřena při koncentraci CQDs 200 µg/ml, se kterou byly buňky inkubovány 4, 12, 24, 48 a 72 hod. Následně byla změřena intenzita fluorescence buněk, jejíž výsledek je uveden na grafu č. 8.

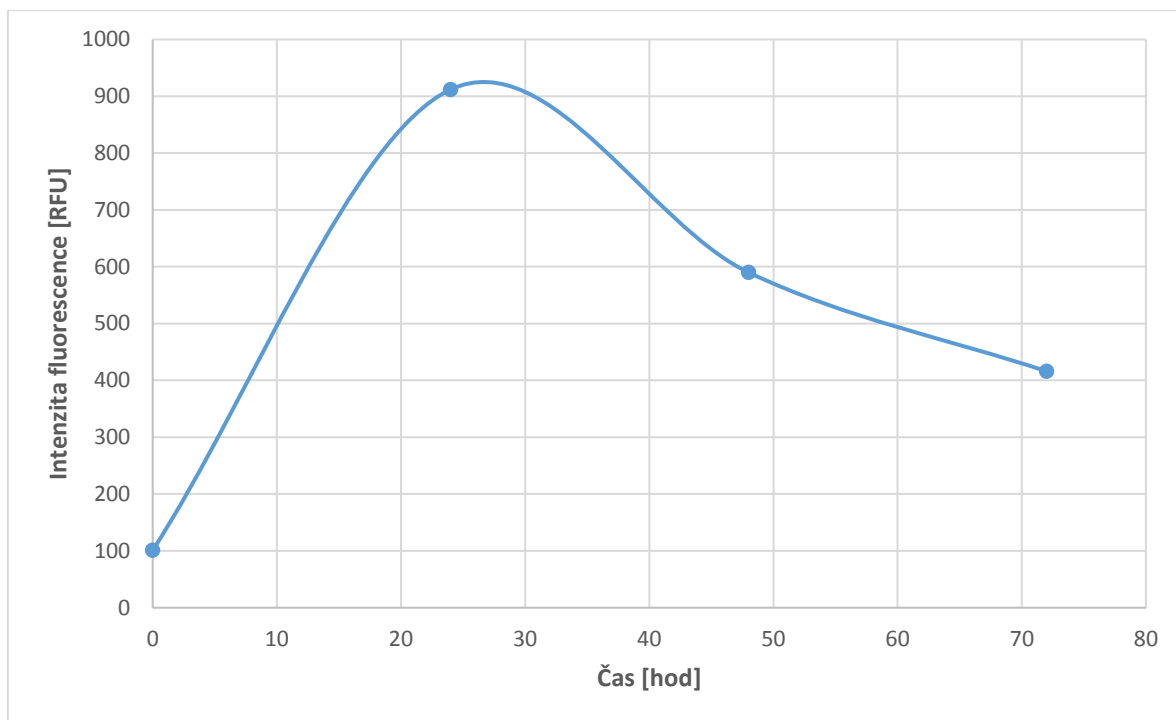


Graf č. 8 – Časová závislost internalizace CQDs do hMSC.

Z grafu č. 8 vyplývá, že k maximální saturaci buněk dochází po 24 hod inkubaci (926 RFU). Při delší inkubaci se vzorkem (48 hod a 72 hod) již intenzita zůstává na poměrně stabilní hodnotě (942 RFU a 902 RFU).

4.2.5. Analýza exocytózy CQDs z hMSC

Pro analýzu exocytózy částic z buněk byla použita koncentrace CQDs 200 $\mu\text{g/ml}$. Jelikož z výsledků závislosti internalizace částic na čase je patrné, že k maximální saturaci buněk nanočásticemi dochází po 24 hod, bylo po této době z jamek odstraněno kultivační médium. Následně byly jamky promyty roztokem PBS a opětovně naplněny novým kultivačním médiem. Po 48 a 72 hod byla naměřena intenzita fluorescence buněk. Výsledek měření je uveden na grafu č. 9.

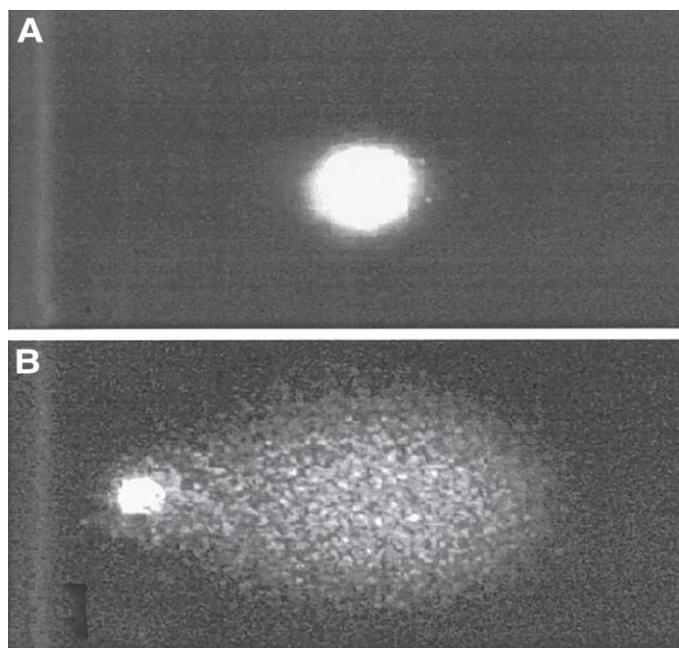


Graf č. 9 – Analýza exocytózy CQDs z hMSC; Pozn. Po 24 hod inkubace bylo vyměněno kultivační médium obsahující CQDs za nové bez nanočástic.

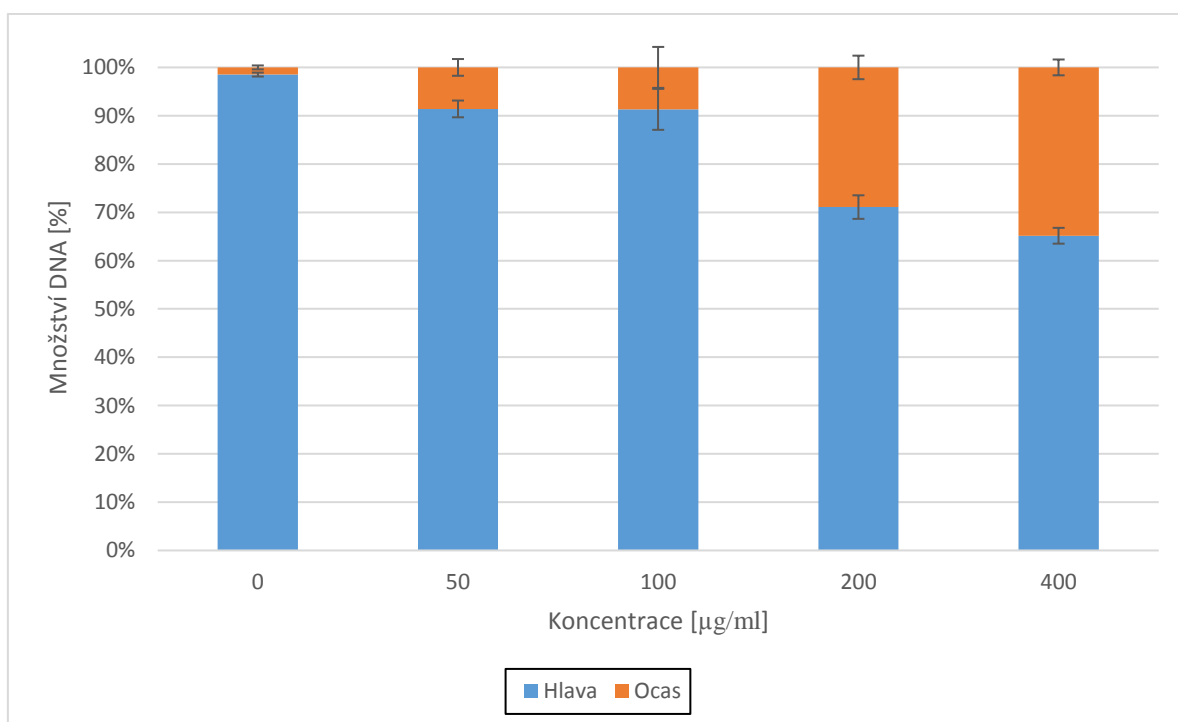
Z výsledku analýzy exocytózy je možné vyčíst, že k exocytóze částic dochází již po 48 hod inkubace, kdy dochází k poklesu intenzity o 322 RFU. Po 72 hod inkubace dochází ještě k dalšímu poklesu o 172 RFU.

4.3. Comet assay – měření genotoxického účinku CQDs na hMSC

Jak již bylo zmíněno, poškození DNA hMSC po 24 hod inkubaci s koncentracemi CQDs 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ bylo určeno pomocí comet assay na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci Doc. Ing. Kateřinou Tománkovou, Ph.D. Jedná se o metodu elektroforézy v mikrogelu, která umožňuje detekovat poškození DNA v jednotlivých eukaryotických buňkách, především díky její schopnosti měřit jednovláknové DNA zlomy, dvouvláknové DNA zlomy, poškození bází apod. Každá buňka představuje tzv. kometu, ve které je měřeno množství DNA, které se nachází v „hlavě“ komety a je nepoškozeno a množství DNA nacházející se v „ocas“ komety, které je poškozeno (viz Obrázek č. 16) (Speit *et Hartmann*, 2006; Collins *et al.*, 2008). Výsledek genotoxické studie CQDs na hMSC je uveden v grafu č. 10.



Obrázek č. 16 – Fotografie lidských lymfocytů během comet assay. A – Kontrolní buňka. B – Buňka vykazující zvýšené poškození DNA (Speit *et* Hartmann, 2006).



Graf č. 10 – Výsledek poškození DNA hMSC po 24 hod inkubaci s 50, 100, 200 a 400 µg/ml CQDs.

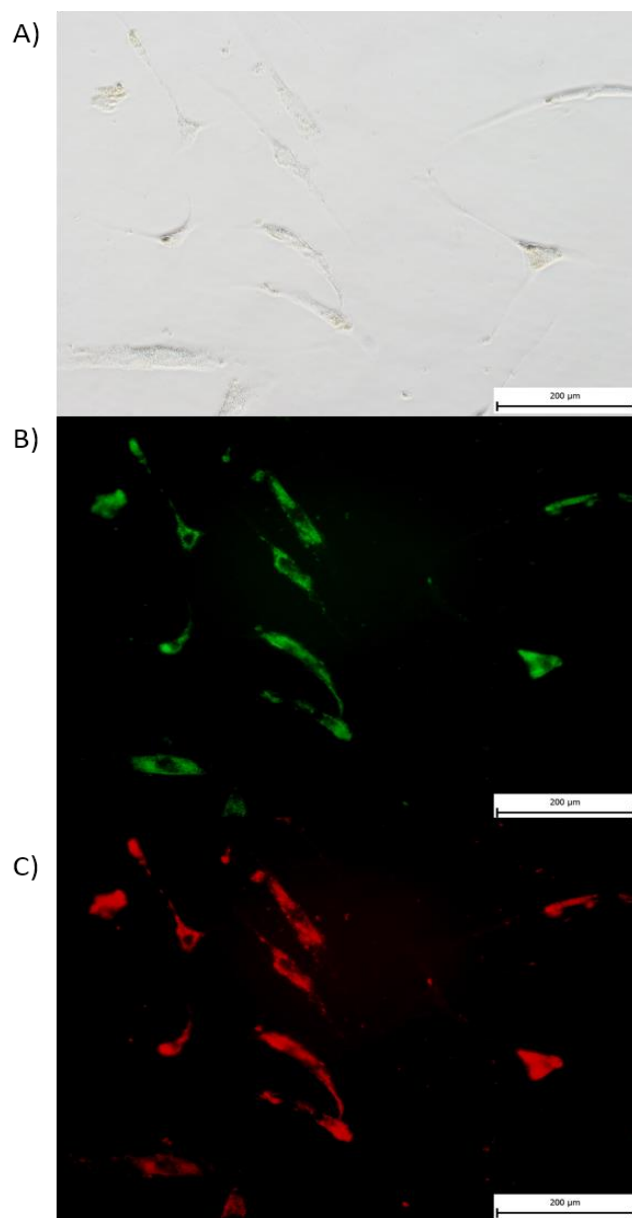
Z výsledku genotoxické studie CQDs na hMSC vyplývá, že k prvnějšímu výraznějšímu poškození DNA dochází až při koncentraci 200 µg/ml, kdy dochází k poškození 28,91 %

DNA. U maximální použité koncentrace CQDs 400 $\mu\text{g/ml}$ dochází ještě k procentuálnímu navýšení poškozené DNA na 34,85 %.

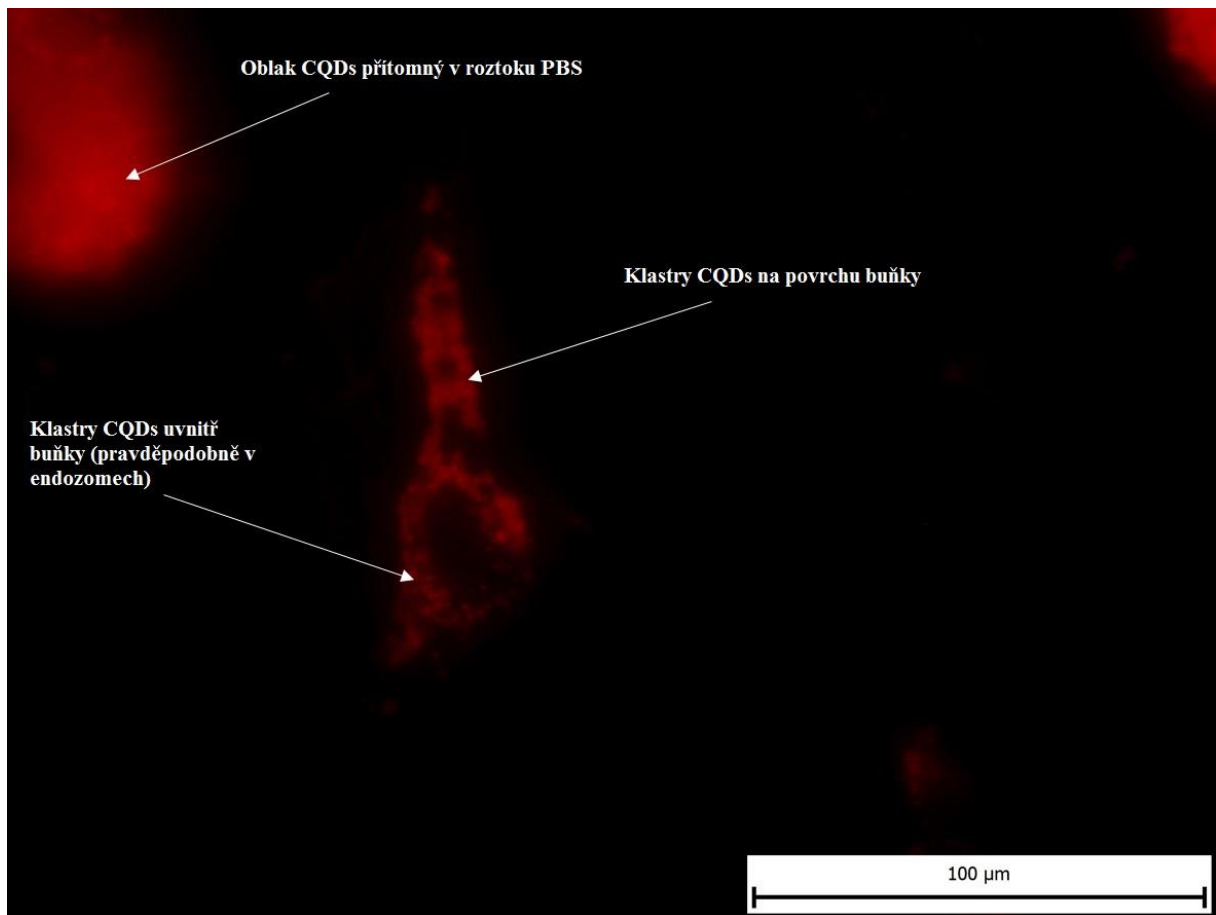
4.4. Mikroskopické zobrazení CQDs uvnitř hMSC

4.4.1. Fluorescenční mikroskopie

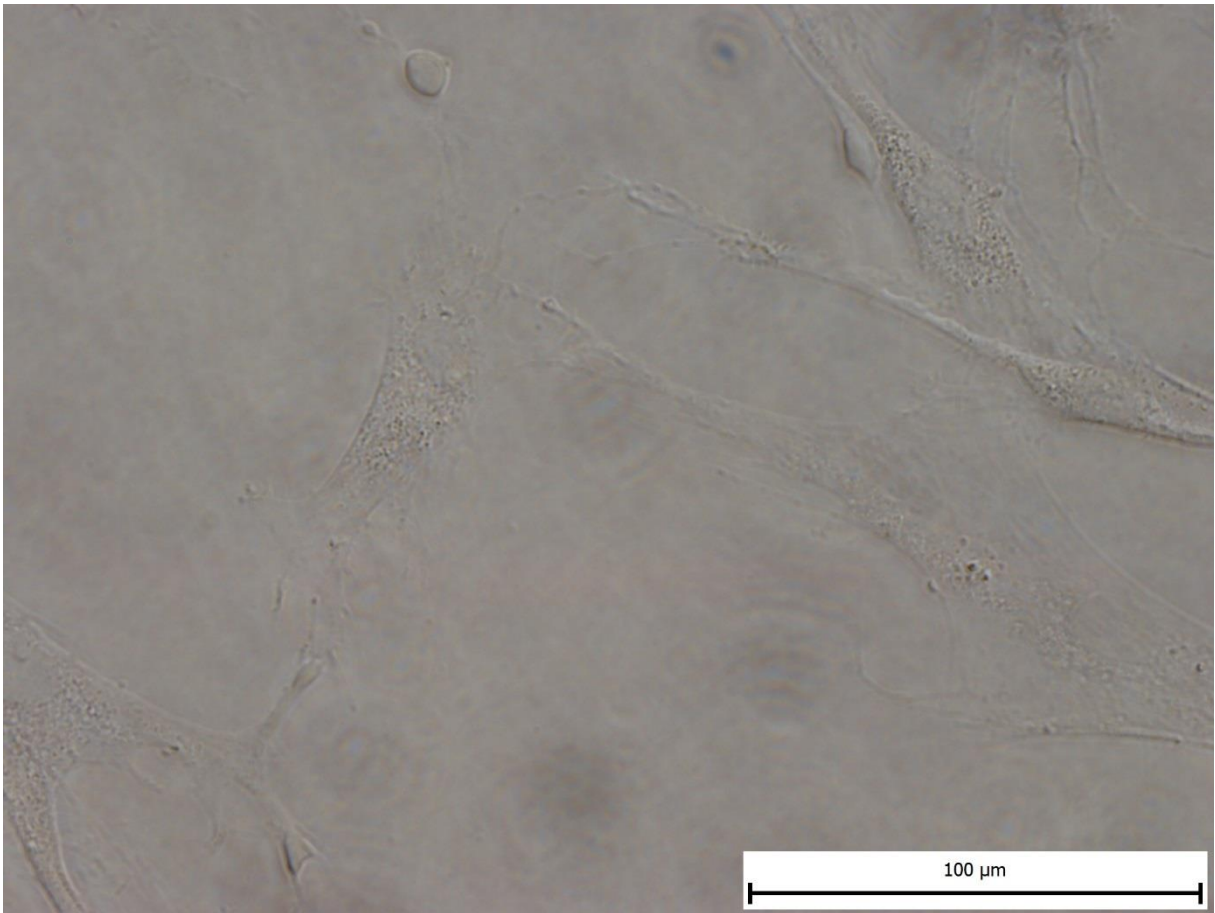
Díky fázovému kontrastu, kterým je světelný mikroskop *Olympus IX70* vybaven, je možné sledovat bezbarvé buněčné struktury (hMSC). Pro zobrazení a prokázání přítomnosti fluorescenčních CQDs v hMSC však samotný světelný mikroskop nestačí, a proto je třeba měřit s fluorescenčním zdrojem, se kterým je možné částice CQDs pozorovat. Díky specifickým fluorescenčním vlastnostem CQDs, které vykazují fluorescenci při různých excitačních a emisních vlnových délkách je možné tyto částice pozorovat pomocí dvou různých filtrů (U-MWB2 – excitace 460 – 490 nm/emise 520 nm – IF; U-MWG2 – excitace 510-550 nm/emise >590 nm) (viz Obrázek č. 17). Výskyt nanočástic v buňce lze rozpoznat z ostrosti fluorescenčního signálu a relativní pravidelnosti uspořádání CQDs. K internalizaci klastrů CQDs dochází pravděpodobně endocytózou, a proto se částice nachází v endozomech, navázány na povrchu membrány buněk nebo ve formě shluků v roztoku PBS (viz Obrázek č. 18). Intracelulární distribuce CQDs byla pozorována u hMSC značených koncentracemi 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$. Po 24 hod inkubaci byly vzorky porovnány s neznačenými kontrolními buňkami (viz Obrázek č. 19, 20 a 21). Buněčná jádra byla kontrastována fluorescenčním barvivem DAPI, aby se potvrdilo, že se CQDs nevyskytují uvnitř jader (viz Obrázek č. 22).



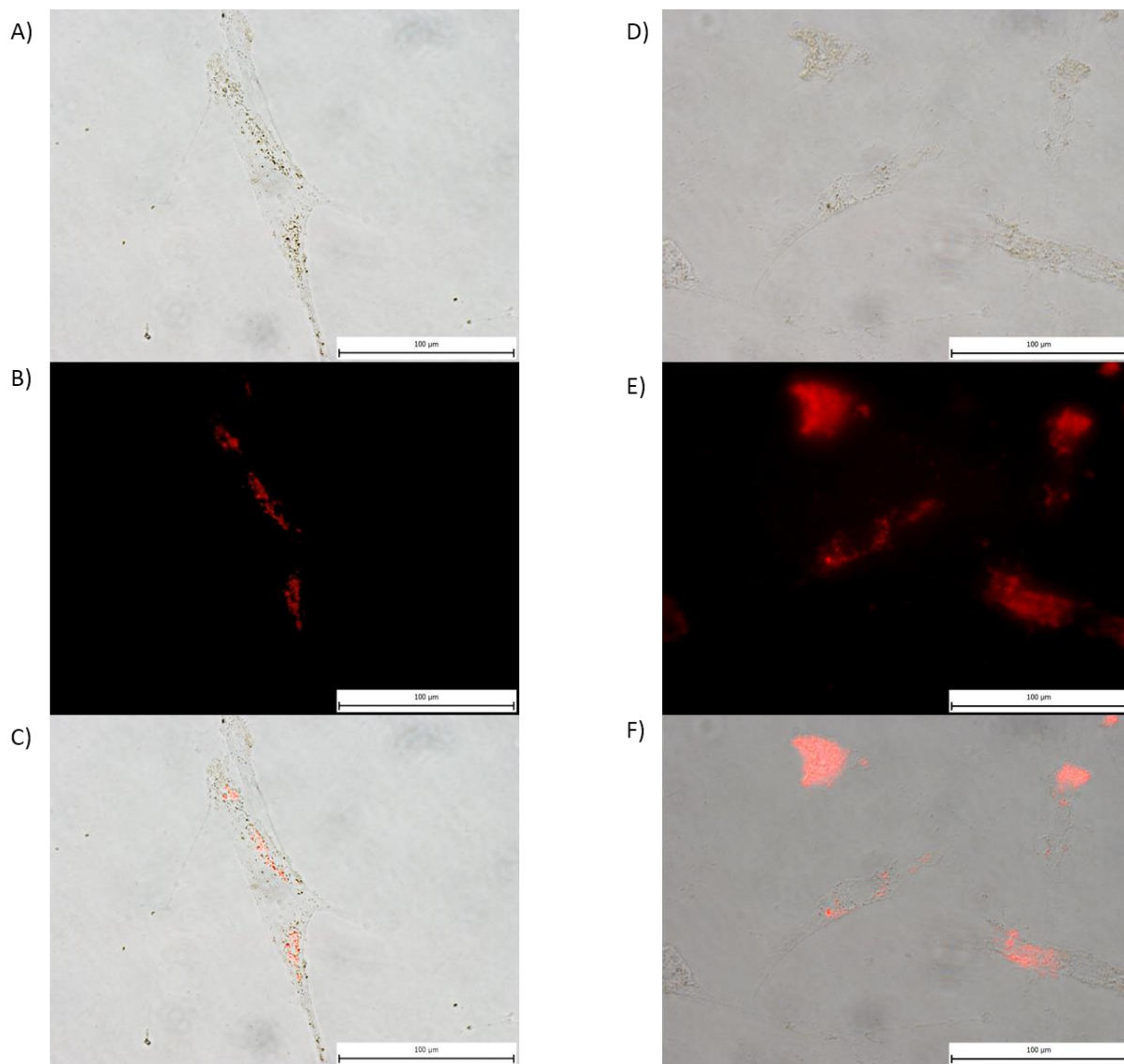
Obrázek č. 17: Fázový kontrast a fluorescenční snímky hMSC značených CQDs (200 µg/ml, 24 hod inkubace). A) hMSC + CQDs zobrazeny fázovým kontrastem, B) hMSC + CQDs zobrazeny ve fluorescenčním módu pod filtrem excitace U-MWB2 (exc.460-490 nm/em. 520 nm – IF), C) hMSC + CQDs zobrazeny ve fluorescenčním módu pod filtrem U-MWG2 (exc. 510-550 nm/em. >590 nm). Měřítka je 200 µm.



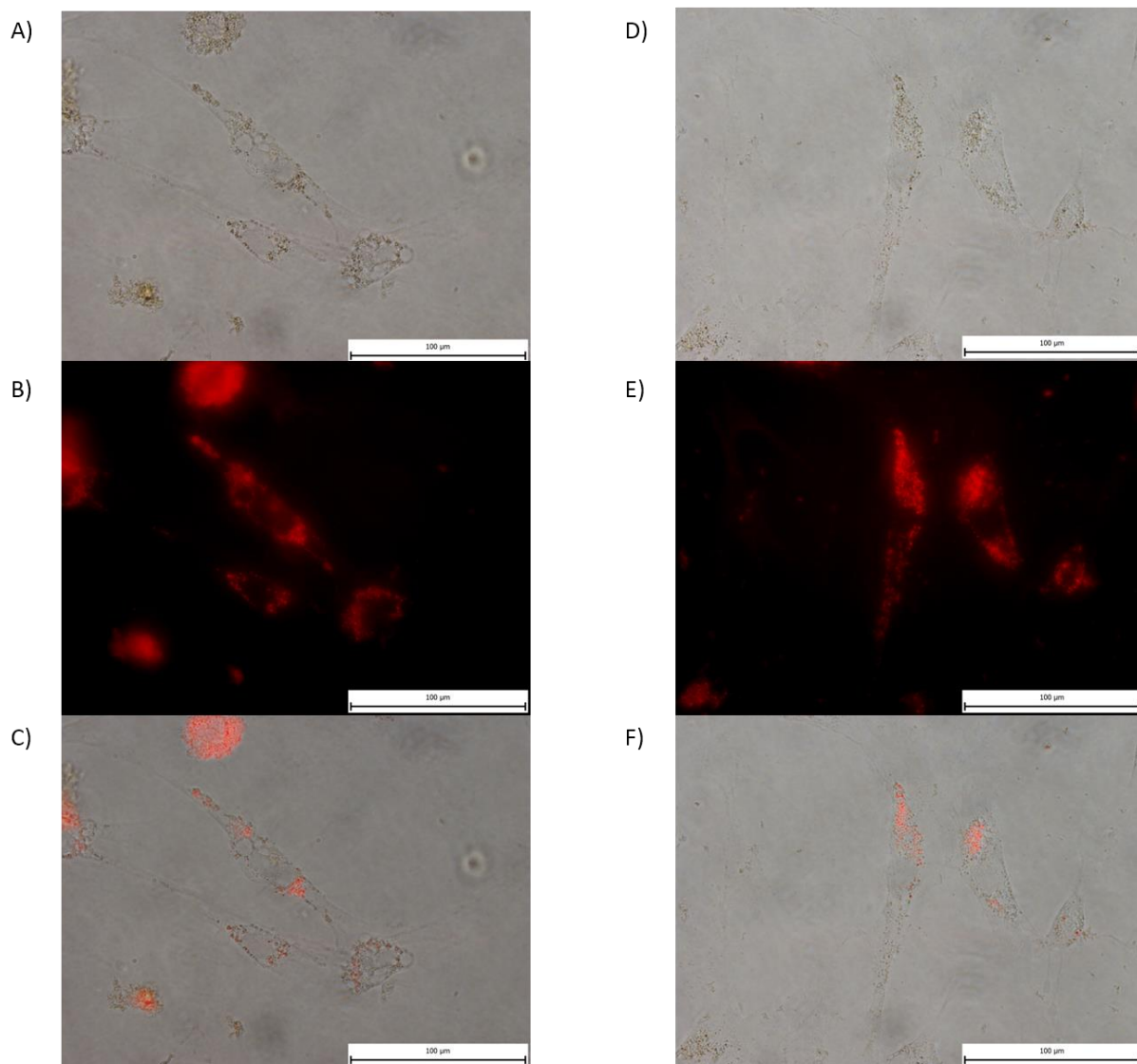
Obrázek č. 18 – Výskyt nanočástic CQDs (znázorněny bílými šipkami) v lidské mezenchymální kmenové buňce. Měřítka je 100 µm.



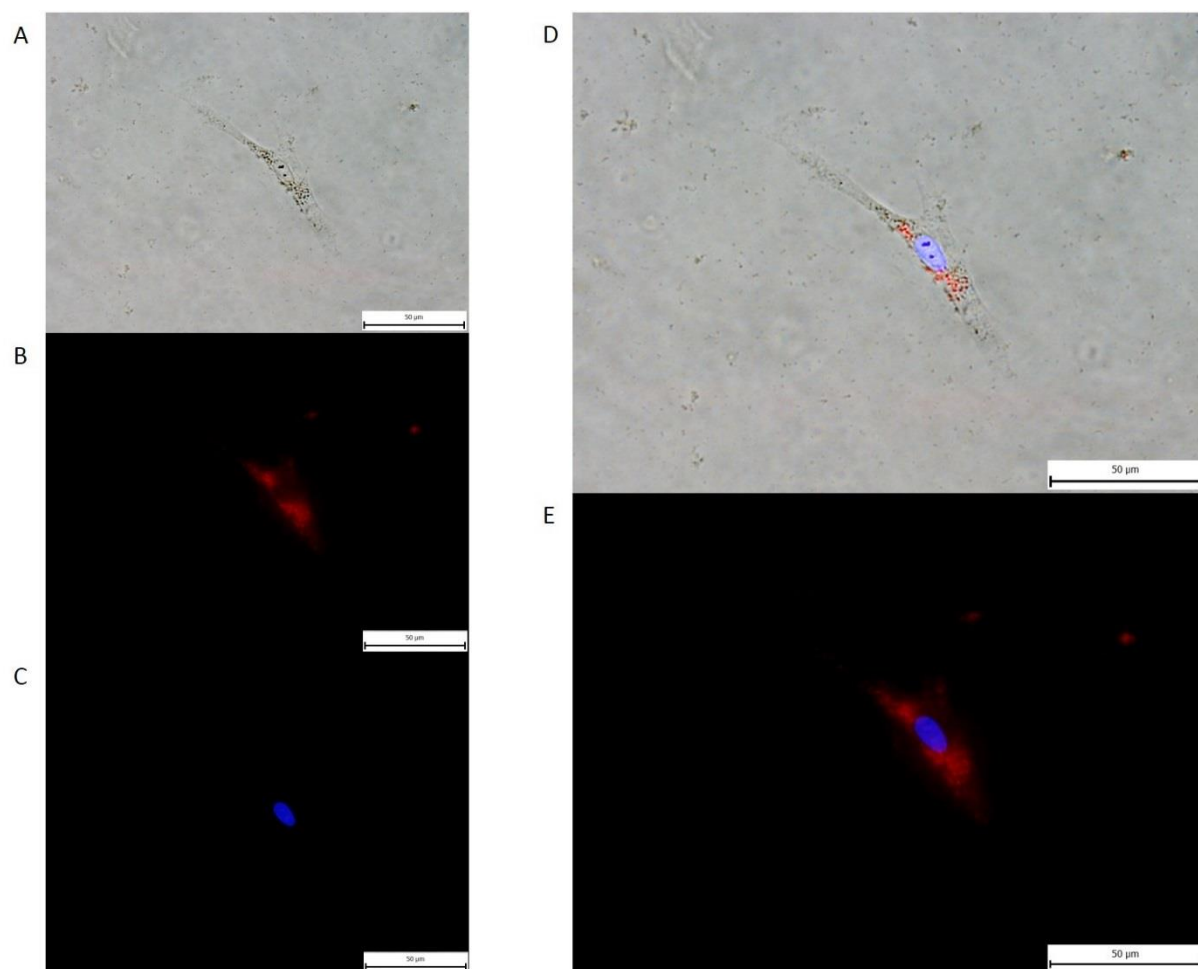
Obrázek č. 19 – Kontrolní vzorek hMSC bez CQDs zobrazeny fázovým kontrastem. Měřítka je 100 μm.



Obrázek č. 20 – Fázový kontrast a fluorescenční snímky hMSC značených CQDs koncentrace 50 µg/ml (A – C) a 100 µg/ml (D – F). Snímky A) a D) – hMSC + CQDs zobrazeny fázovým kontrastem; B) a E) – hMSC + CQDs zobrazeny ve fluorescenčním módu pod filtrem U-MWG2 (exc. 510-550 nm/em. > 590 nm); C) a F) – Složené snímky. Měřítko je 100 µm.



Obrázek č. 21 - Fázový kontrast a fluorescenční snímky hMSC značených CQDs koncentrace 200 µg/ml (A – C) a 400 µg/ml (D – F). Snímky A) a D) – hMSC + CQDs zobrazeny fázovým kontrastem; B) a E) – hMSC + CQDs zobrazeny ve fluorescenčním módu pod filtrem U-MWG2 (exc. 510-550 nm/em. > 590 nm); C) a F) – Složené snímky. Měřítka je 100 µm.



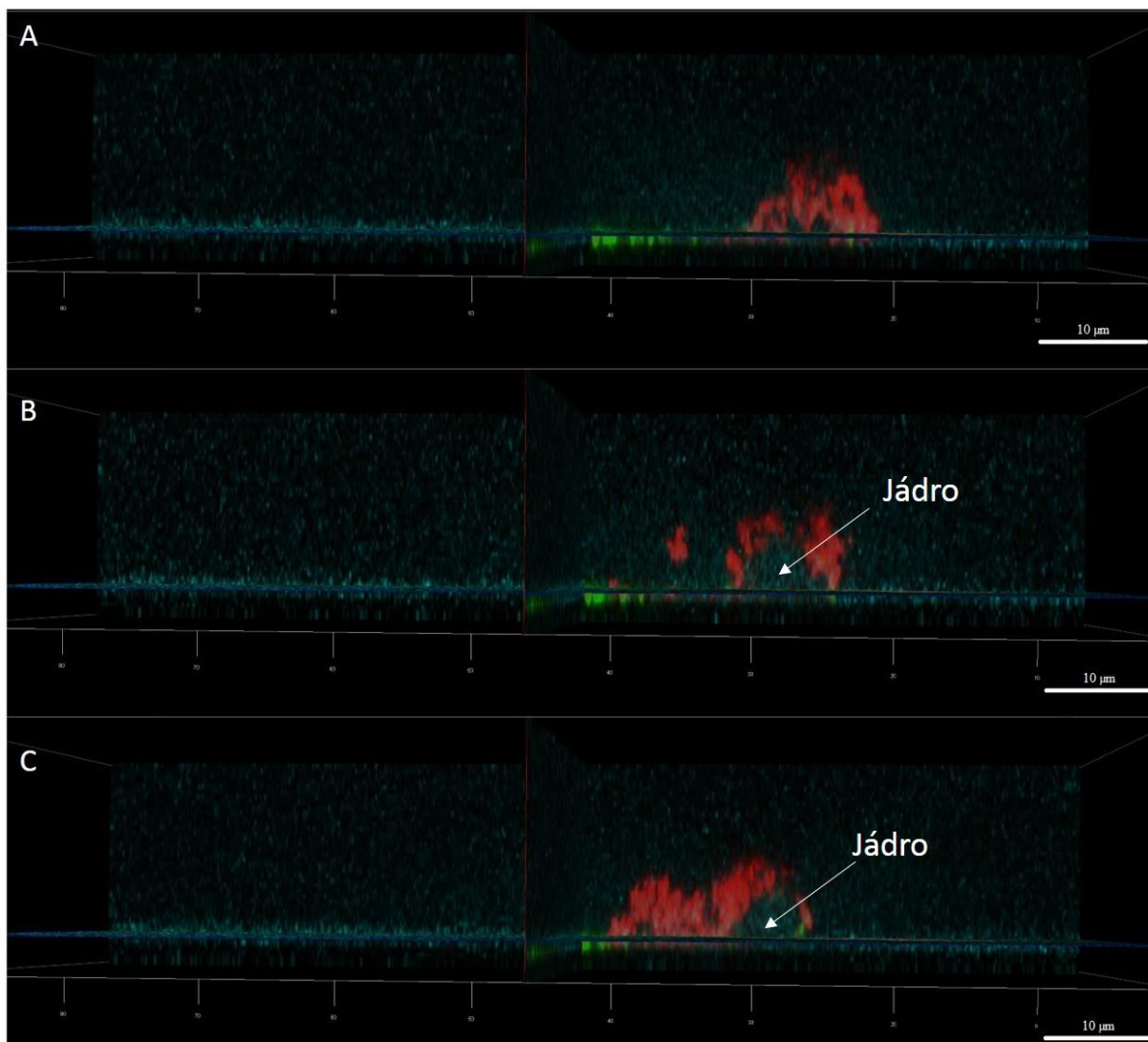
Obrázek č. 22 – Fázový kontrast a fluorescenční snímky hMSC značených CQDs 400 µg/ml + barvivem DAPI. A) Snímek zobrazen fázovým kontrastem, B) Snímek zobrazen filtrem U-MWG2 exc. 510-550 nm/em. > 590 nm C) Snímek zobrazen filtrem U-MNUA2 (exc. - 360-370 nm/em. – 420 - 460 nm), D) a E) Složené snímky. U všech snímků je měřítko 50 µm.

Z výsledků fluorescenční mikroskopie je patrné, že CQDs jsou schopny velmi dobře označit kmenové buňky ve všech použitých koncentracích, jelikož již při koncentraci CQDs 50 µg/ml je možné po 24 hod inkubaci s hMSC vidět částice uvnitř buněk v pravidelných agregátech v endozomech nebo lyzozomech (viz Obrázek č. 20). Ze snímků hMSC s CQDs koncentrací 400 µg/ml a barvivem DAPI je zřejmé, že ani při nejvyšší použité koncentraci nedochází k průniku částic do jádra buněk.

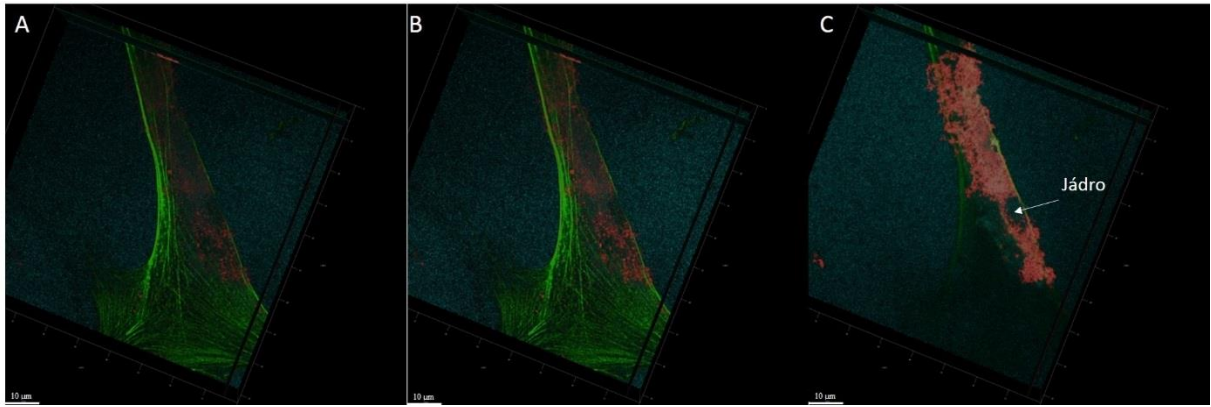
4.4.2. Konfokální mikroskopie

Analýza distribuce CQDs v hMSC pomocí konfokální mikroskopie byla provedena hlavně proto, že konfokální mikroskopie umožňuje díky přidané ose Z částečnou 3D analýzu obrazu a je možné tak potvrdit či vyvrátit výskyt částic uvnitř buňky. Analýza konfokální

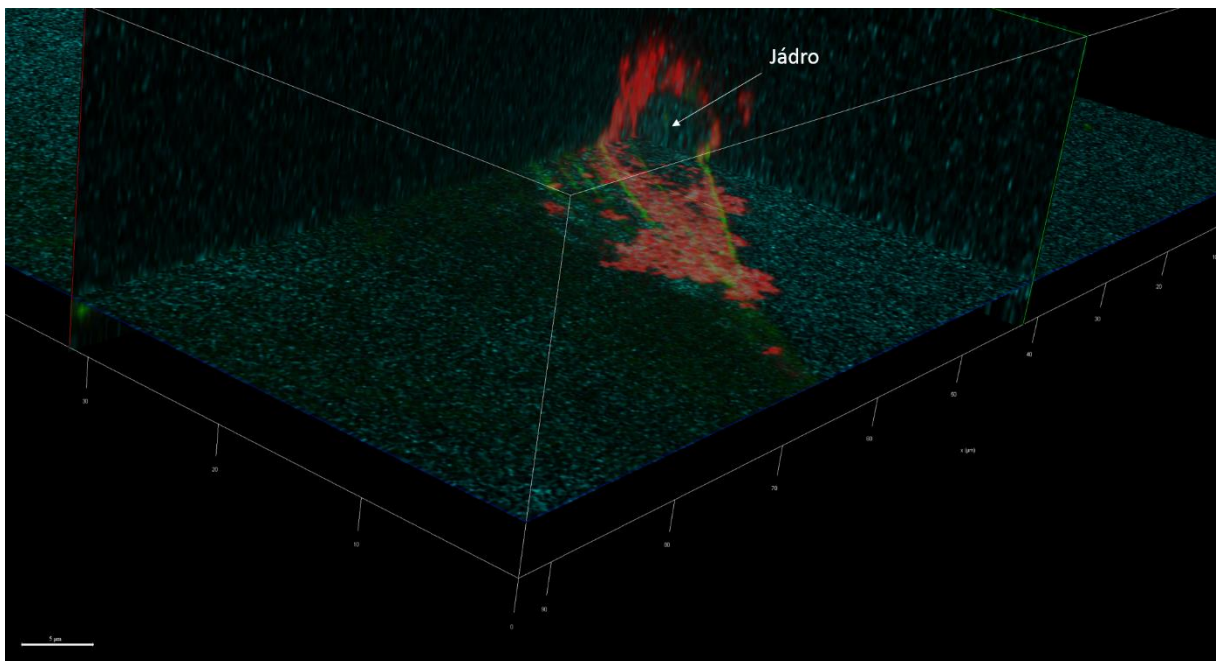
mikroskopií byla provedena v Brně Mgr. Josefem Skopalíkem. Pro lepší rozeznání byly buňky označeny zeleným barvivem ActinGreen™ 488, který zeleně obarví aktin buněk. Pro zobrazení aktinu buněk byly použity vlnové délky exc. – 490 nm/em. – 500 - 525 nm, zatímco pro zobrazení CQDs vlnové délky exc. – 490/em. 600 - 650 nm. Snímky z konfokální mikroskopie jsou zobrazeny na obrázku 23 – 25.



Obrázek č. 23 – Snímek bočního pohledu na hMSC značenou 200 µg/ml CQDs pořízený konfokální mikroskopií. A – C) 3 vertikální řezy lidskou mezenchymální kmenovou buňkou. Měřítka je 10 µm.



Obrázek č. 24 – Snímek horního pohledu na hMSC značenou 200 µg/ml CQDs pořízený konfokální mikroskopií. A – C) 3 horizontální řezy lidskou mezenchymální kmenovou buňkou. Měřítka je 10 µm.



Obrázek č. 25 – Snímek předního pohledu na hMSC značenou 200 µg/ml CQDs pořízený konfokální mikroskopií. Měřítka je 5 µm.

Výsledky z konfokální mikroskopie potvrdily výskyt CQDs o koncentraci 200 µg/ml uvnitř hMSC (viz Obrázek č. 23 – 25). Snímky z bočního a předního pohledu navíc ukázaly, že k průniku částic do jader buněk opravdu nedochází (viz Obrázek č 23 a 25).

5. Diskuze

Pro stanovení optimální doby inkubace s maximální koncentrací pro všechny provedené testy byla provedena analýza koncentrační a časové závislosti internalizace CQDs do hMSC. Výsledek koncentrační závislosti internalizace CQDs do hMSC ukázal, že maximální intenzita fluorescence byla naměřena při koncentraci 400 $\mu\text{g/ml}$ (989 RFU) (viz Graf č. 7). Následně je možné si všimnout, že se mezi koncentracemi CQDs 100, 200 a 400 $\mu\text{g/ml}$ výrazně snižuje rozdíl mezi naměřenou intenzitou fluorescence. Zatímco mezi koncentracemi 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ je rozdíl 269 RFU, tak u koncentrací 100 a 200 $\mu\text{g/ml}$ se tato hodnota snižuje na 123 RFU a mezi koncentracemi 200 a 400 $\mu\text{g/ml}$ je tato hodnota dokonce jen 34 RFU. Dále se již intenzita se zvyšující koncentrací nezvyšuje a zůstává na poměrně stabilní hodnotě. Byla tedy potvrzena koncentrační závislost na internalizaci CQDs do hMSC, avšak se zvyšující se koncentrací nedochází k přímo úměrnému zvýšení intenzity fluorescence. Tento jev je pravděpodobně způsoben agregací většího množství CQDs v kultivačním médiu nebo obrannou reakcí hMSC proti internalizaci příliš velkého množství CQDs (Buford *et al.*, 2007). Z výsledku časové závislosti internalizace CQDs do hMSC je možné vidět, že k maximální saturaci buněk dochází po 24 hod inkubací s částicemi (926 RFU) a po delší inkubaci (48 a 72 hod) již intenzita fluorescence zůstává poměrně stabilní (942 RFU a 902 RFU) (viz Graf č. 8). Závislost mezi internalizací nanočástic a délkou jejich inkubace byla tedy potvrzena pouze do délky inkubace 24 hod, kdy již docházelo k úplné saturaci buněk. Při obou měřeních je nutné brát v potaz, že na průtokovém cytometru není možné odlišit CQDs, které se nacházejí na povrchu buněk od těch CQDs které se vyskytují v buňkách.

Z analýzy koncentrační a časové závislosti internalizace CQDs do hMSC byla tedy stanovena optimální doba inkubace na 24 hod a maximální použitá koncentrace CQDs na 400 $\mu\text{g/ml}$, jelikož při těchto hodnotách dochází k maximální internalizaci částic do buněk.

Výsledek měření oxidačního stresu přinesl křivky s velice specifickým trendem, jelikož u obou měření byla nejvyšší hodnota ROS u nižších koncentrací (250 $\mu\text{g/ml}$ u kinetiky ROS (viz Graf č. 1) a 200 $\mu\text{g/ml}$ u ROS po 24 hod (viz Graf č. 2)). Tento jev je u nanomateriálů vzácný, jelikož obvykle nejvyšší koncentrace částic a s ní spojen nejvyšší toxický účinek způsobuje nejvyšší produkci ROS (Chang *et al.*, 2011; Ahamed *et al.*, 2016). Nebo může být nižší produkce ROS u buněk inkubovaných s vyšší koncentrací částic přisuzována vysokému úmrtí buněk, které již nejsou schopné ROS produkovat (Song *et al.*,

2014; Chen *et al.*, 2016b). V tomhle případě se však o úmrtí buněk nejedná, což potvrzují snímky z fluorescenčního mikroskopu (viz Obrázek č. 20 a 21). Dochází k tomu pravděpodobně z důvodu maximální internalizace CQDs již při nižších koncentracích. Tato domněnka byla potvrzena sledováním internalizace CQDs pomocí průtokové cytometrie (viz podkapitola Stanovení koncentrační a časové závislosti internalizace CQDs do hMSC) Výsledky ukázaly, že k téměř maximální internalizaci CQDs do hMSC docházelo již při koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$ a v případě dvojnásobné koncentrace 400 $\mu\text{g/ml}$ buňky nebyly schopny internalizovat tak velké množství (viz Graf č. 7) Podobné výsledky potvrdila také studie (Kaur *et al.*, 2013).

Stanovení cytotoxického účinku CQDs na viabilitu hMSC ukázalo, že dokonce i u maximální použité koncentrace CQDs (400 $\mu\text{g/ml}$) zůstalo po 24 hod inkubaci až 82,67 % živých buněk (viz Graf č. 3). Navíc je třeba si uvědomit, že hMSC je adherentní buněčná linie, která při analýze viability průtokovou cytometrií musí být v buněčné suspenzi. Během procesu trypsinizace však může docházet k poškození buněčné membrány, a k proniknutí fluorescenční značky (ethidium bromidu) do buněk. Tyto buňky jsou poté považovány za mrtvé, čemuž odpovídá 8,25 % buněk u kontrolního vzorku. Je možné tedy předpokládat, že by bez procesu trypsinizace byla viabilita buněk i u nejvyšší použité koncentrace CQDs ještě vyšší a mohla by potenciálně dosáhnout až 90,92 %. Po porovnání cytotoxického účinku CQDs s jinými CDs (Zhao *et al.*, 2008; Sahu *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2014; Edison *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017) je možné potvrdit jejich velmi dobrou biokompatibilitu, jelikož ani při koncentraci 400 $\mu\text{g/ml}$ výrazně nesnižují viabilitu kmenových buněk.

Analýzou vlivu CQDs na buněčný cyklus hMSC bylo zjištěno, že k výraznější změně v procentuálním vyjádření jednotlivých fází cyklu dochází pouze u koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$ CQDs, kdy klesá S fáze (5,34 % oproti 10,25 % u kontrolního vzorku) především na úkor G_0/G_1 fáze (nárůst na 80,19 % oproti 73,88 % u kontrolního vzorku) a u koncentrace 400 $\mu\text{g/ml}$, kde bylo procentuální vyjádření S fáze 5,37 % a G_0/G_1 fáze 79,44 % (viz Graf č. 4). Tyto výsledky mohou naznačovat sníženou schopnost buněčného růstu, protože buňky déle zůstávají v G_0/G_1 fázi, jelikož buňky v G_0 fázi nerostou a pouze čekají na návrat do buněčného cyklu, zatímco v G_1 fázi dochází ke zdvojování organel a růstu buňky (Foster *et al.*, 2010). Tuto možnost potvrzují také fotky z fluorescenčního mikroskopu, ze kterých je patrné, že kmenové buňky kontrolního vzorku jsou větší než kmenové buňky nacházející se ve vzorcích s koncentrací CQDs 200 a 400 $\mu\text{g/ml}$ (viz Obrázek č. 19 - 21), z čehož vyplývá, že se buňky nacházejí především v G_0 fázi. Druhou možností, která by takové chování buněk

mohla vysvětlovat, je G_1 „arrest“, nebo-li zastavení buněk v kontrolním bodě na konci G_1 fáze, ke kterému dochází z důvodu poškození buňky, především DNA nebo vzniku buněk nesoucích mutace (Elledge, 1996). Tuto teorii potvrzují data získaná z testu genotoxicity CQDs (viz Graf č. 10), kde se genotoxický účinek začíná projevovat od koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$. Po G_1 arrestu však může docházet ke spuštění specifických kaskád, které mohou vést až k apoptóze (Ye *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016), nicméně výsledky viability hMSC v této práci (viz Graf č. 3) toto tvrzení vyvrací, jelikož k úmrtí buněk nedocházelo.

Analýza exprese specifických CD markerů na povrchu hMSC u kontrolního vzorku a u vzorku hMSC, které byly 24 hod inkubovány s CQDs koncentrací 200 $\mu\text{g/ml}$ přinesla pozitivní výsledek, jelikož je zřejmé, že se pozitivní markery CD73, CD90, CD105 na povrchu hMSC nacházejí, zatímco negativní marker CD34 ne (viz Graf č. 5 a 6). Rozdíl mezi intenzitami fluorescence u vzorků s a bez protilátek však není tak výrazný, jako u kontrolního vzorku hMSC. Tenhle úkaz se děje z toho důvodu, že fluorescenční značky použité pro označení protilátek vůči markerům (fluorochromy PE, FITC, APC a PerCP-Cy5.5) svými excitačními a emisními vlnovými délkami zasahují do fluorescenčního spektra CQDs (viz Obrázek č. 10). Z tohoto důvodu byla poměrně vysoká intenzita také u vzorku s buňkami, kde nebyly přítomny protilátky, ale byly přítomny CQDs, ať už na povrchu nebo uvnitř buněk a dávaly tedy fluorescenční signál. I přes menší rozdíl mezi intenzitami fluorescence ve vzorcích s a bez protilátek lze stále jasně určit, že se i po 24 hod inkubaci s koncentrací CQDs 200 $\mu\text{g/ml}$ markery CD73, CD90, CD105 na povrchu hMSC nacházejí, zatímco marker CD34 se na povrchu nenachází a je tak potvrzeno, že CQDs nemají vliv na přirozenou morfologii a charakterizaci hMSC.

Výsledek exocytózy částic ukázal, že k částečné exocytóze dochází již po 48 hod inkubace, jelikož dochází k poklesu intenzity fluorescence o 322 RFU (viz Graf č. 9). Po 72 hod inkubace dochází ještě k dalšímu poklesu intenzity o 172 RFU. Je možné tedy potvrdit, že k částečné exocytóze dochází již po 48 hod inkubace, ale určité množství CQDs zůstává v buňkách i po 72 hod inkubace. Stejně jako v případě závislosti internalizace na koncentraci a čase je nutné zohlednit fakt, že není možné jednoznačně odlišit částice na povrchu od částic uvnitř buněk.

Z analýzy genotoxického poškození hMSC po 24 hod inkubaci s CQDs je zřejmé, že k výraznému poškození DNA dochází pouze u koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$ (28,91 % DNA) a 400 $\mu\text{g/ml}$ (34,85 %), viz. Graf č. 10. Oproti kontrolnímu vzorku (1,48 % poškozené DNA)

a vzorkům s koncentrací CQDs 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ (oba vzorky kolem 8,5 % poškozené DNA) se jedná o výrazné navýšení a je možné konstatovat, že ke genotoxickému účinku CQDs vůči hMSC dochází od koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$. Jelikož snímky z fluorescenčního a konfokálního mikroskopu neukazují přítomnost CQDs v jádře (viz Obrázek č. 20 - 25), lze předpokládat, že ke genotoxickému účinku CQDs dochází nepřímo pravděpodobně působením oxidačního stresu, který je způsoben nárůstem ROS (viz Graf č. 2) (Manshian *et al.*, 2013; Alarifi *et al.*, 2015; Rubio *et al.*, 2016). V případě koncentrace CQDs 400 $\mu\text{g/ml}$ byl však naměřen vyšší genotoxický účinek současně s nižší generací ROS než u koncentrace CQDs 200 $\mu\text{g/ml}$, takže je vysoce pravděpodobné, že poškození DNA je způsobeno odlišným mechanismem, například může DNA interagovat s částicemi během mitózy, kdy dochází k rozpadu jaderné membrány (Singh *et al.*, 2009).

Snímky z fluorescenční mikroskopie ukázaly, že oproti kontrolnímu vzorku jsou u všech použitých koncentracích velmi dobře vidět agregáty CQDs v endozomech nebo lyzozomech uvnitř hMSC (viz Obrázek č. 19 - 21). Dále je možné si všimnout, že zvyšující se koncentrace CQDs neznamena vyšší množství částic, které se nacházejí na buněčné membráně nebo v buňkách, což potvrzuje analýzu koncentrační závislosti internalizace (viz Graf č. 7). Při porovnání vzorků hMSC s koncentracemi CQDs a kontrolního vzorku hMSC bez částic je také možné rozeznat rozdíl ve velikosti buněk v prospěch kontrolního vzorku, který obsahuje větší kmenové buňky, což odpovídá výsledkům analýzy buněčného cyklu (viz Graf č. 4). Snímky hMSC s koncentrací CQDs 400 $\mu\text{g/ml}$ a barvivem DAPI prokázaly, že ani při nejvyšší použité koncentraci nedochází k průniku částic do jádra buněk (viz Obrázek č. 22). Tyto výsledky byly potvrzeny také konfokální mikroskopií, jelikož byly CQDs při koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$ velmi dobře vidět v agregátech uvnitř hMSC jak při horizontálních, tak i při vertikálních řezech buňkou (viz Obrázek č. 23 a 24). Snímek z předního pohledu na buňku také vyloučil výskyt CQDs uvnitř jádra kmenových buněk (Obrázek č. 25).

Závěr

Uhlíkové kvantové tečky (CQDs) obecně představují nanomateriál vhodný ke značení lidských mezenchymálních kmenových buněk (hMSC) pro sledování a lokalizaci kmenových buněk při regenerační a transplantační medicíně. CQDs použity v této práci byly povrchově modifikovány betainem, čímž díky přítomnosti kvartérního chloridu amonného získaly pozitivní náboj. Mezenchymální kmenové buňky byly odebrány z tukové tkáně dospělých pacientů a vliv CQDs na chování hMSC byl analyzován pomocí několika *in vitro* testů. Distribuce částic v buňkách byla zkoumána použitím fluorescenční a konfokální mikroskopie.

Z výsledku *in vitro* testů vyplývá, že koncentrační řada s maximální koncentrací 400 $\mu\text{g/ml}$ byla sestavena správně, jelikož k maximální internalizaci částic došlo mezi koncentracemi 200 a 400 $\mu\text{g/ml}$. Použití vyšších koncentrací by tedy bylo zbytečné, jelikož by se pouze zvyšovalo množství částic v kultivačním médiu, a ne v samotných buňkách. Dále byla potvrzena vynikající biokompatibilita CQDs, jelikož ani při maximální koncentraci nedocházelo k výraznému poklesu viability či abnormalitám při mitóze. Průběh buněčného cyklu se téměř nelišil od kontrolních buněk, pouze od koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$ došlo ke snížení S fáze na úkor G_0/G_1 fáze, pravděpodobně z důvodu snížené proliferace buněk. CQDs měly vliv na zvýšenou tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů v kmenových buňkách a s nimi spojeného oxidačního stresu, který pravděpodobně způsobil genotoxický účinek částic od koncentrace CQDs 200 $\mu\text{g/ml}$. Účinek však nebyl natolik markantní, aby způsobil buněčnou smrt. Nezměněný charakter mezenchymálních kmenových buněk byl po inkubaci s částicemi potvrzen expresí specifických povrchových markerů.

Fluorescenční a konfokální mikroskopie potvrdila přítomnost částic uvnitř kmenových buněk již od nejmenší použité koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$. Částice se nacházely v cytosolu buňky v endozomech a/nebo lyzozomech, avšak nevstupovaly do jádra. Série *in vitro* testů tedy potvrdila vynikající biokompatibilní a fluorescenční vlastnosti CQDs, které do koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$ nevykazovaly vůbec žádný negativní vliv na chování hMSC. Koncentrace 200 a 400 $\mu\text{g/ml}$ měly částečný vliv na tvorbu ROS, průběh buněčného cyklu a poškození DNA, avšak životnost buněk zůstala stále velmi vysoká.

Pro potvrzení potenciální aplikace CQDs v regenerační nebo transplantační medicíně je třeba ještě provést test diferenciální schopnosti hMSC po inkubaci s částicemi a postupně

začít provádět testy *in vivo*. Všechny zmíněné testy jsou naplánovány a očekává se, že budou v blízké budoucnosti provedeny.

V následujících vědeckých letech bych rád pokračoval s problematikou interakce nanomateriálů a buněčných systémů, a to především nanomateriálů na bázi uhlíku, které zahrnují především uhlíkové kvantové tečky a různé modifikace grafenu.

Literatura

- Ahamed, M., Akhtar, M.J., Khan, M.A., Alhadlaq, H.A., and Alshamsan, A. (2016). Cobalt iron oxide nanoparticles induce cytotoxicity and regulate the apoptotic genes through ROS in human liver cells (HepG2). *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 148, 665-673.
- Aicher, A., Brenner, W., Zuhayra, M., Badorff, C., Massoudi, S., Assmus, B., Eckey, T., Henze, E., Zeiher, A., and Dimmeler, S. (2003). Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* 107, 2134-2139.
- Alarifi, S., and Ali, D. (2015). Mechanisms of Multi-walled Carbon Nanotubes-Induced Oxidative Stress and Genotoxicity in Mouse Fibroblast Cells. *International journal of toxicology* 34, 258-265.
- Alivisatos, A. (1996). Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* 271, 933-937.
- Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., and Anversa, P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763-776.
- Belyanskaya, L., Manser, P., Spohn, P., Bruinink, A., and Wick, P. (2007). The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction. *Carbon* 45, 2643-2648.
- Bourlinos, A.B., Stassinopoulos, A., Anglos, D., Zboril, R., Georgakilas, V., and Giannelis, E.P. (2008a). Photoluminescent carbogenic dots. *Chemistry of Materials* 20, 4539-4541.
- Bourlinos, A.B., Stassinopoulos, A., Anglos, D., Zboril, R., Karakassides, M., and Giannelis, E.P. (2008b). Surface functionalized carbogenic quantum dots. *Small* 4, 455-458.
- Bourlinos, A.B., Zbořil, R., Petr, J., Bakandritsos, A., Krysmann, M., and Giannelis, E.P. (2012). Luminescent Surface Quaternized Carbon Dots. *Chemistry of Materials* 24, 6-8.
- Buford, M.C., Hamilton, R.F., Jr., and Holian, A. (2007). A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. *Particle and fibre toxicology* 4, 6.
- Cao, L., Wang, X., Mezziani, M., Lu, F., Wang, H., Luo, P., Lin, Y., Harruff, B., Veca, L., Murray, D., Xie, S., and Sun, Y. (2007). Carbon dots for multiphoton bioimaging. *Journal of the American Chemical Society* 129, 11318-+.
- Carrillo-Carrion, C., Moliner-Martinez, Y., Simonet, B.M., and Valcarcel, M. (2011). Capillary electrophoresis method for the characterization and separation of CdSe quantum dots. *Analytical chemistry* 83, 2807-2813.
- Casey, A., Herzog, E., Davoren, M., Lyng, F.M., Byrne, H.J., and Chambers, G. (2007). Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon* 45, 1425-1432.
- Chakraborty, S., Fitzpatrick, J., Phillippi, J., Andreko, S., Waggoner, A., Bruchez, M., and Ballou, B. (2007). Cholera toxin B conjugated quantum dots for live cell Labeling. *Nano Letters* 7, 2618-2626.
- Chandra, S., Das, P., Bag, S., Laha, D., and Pramanik, P. (2011). Synthesis, functionalization and bioimaging applications of highly fluorescent carbon nanoparticles. *Nanoscale* 3, 1533-1540.

- Chang, E., Thekkek, N., Yu, W.W., Colvin, V.L., and Drezek, R. (2006). Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake. *Small* 2, 1412-1417.
- Chang, Y., Yang, S.T., Liu, J.H., Dong, E., Wang, Y., Cao, A., Liu, Y., and Wang, H. (2011). In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicology letters* 200, 201-210.
- Chapman, S., Dobrovolskai, M., Farahani, K., Goodwin, A., Joshi, A., Lee, H., Meade, T., Pomper, M., Ptak, K., Rao, J., Singh, R., Sridhar, S., Stern, S., Wang, A., Weaver, J., Woloschak, G., and Yang, L. (2013). Nanoparticles for cancer imaging: The good, the bad, and the promise. *Nano Today* 8, 454-460.
- Chen, H., Wang, L., Fu, H., Wang, Z., Xie, Y., Zhang, Z., and Tang, Y. (2016a). Gadolinium functionalized carbon dots for fluorescence/magnetic resonance dual-modality imaging of mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Chemistry B* 4, 7472-7480.
- Chen, N., He, Y., Su, Y., Li, X., Huang, Q., Wang, H., Zhang, X., Tai, R., and Fan, C. (2012). The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials* 33, 1238-1244.
- Chen, N., Song, Z.M., Tang, H., Xi, W.S., Cao, A., Liu, Y., and Wang, H. (2016b). Toxicological Effects of Caco-2 Cells Following Short-Term and Long-Term Exposure to Ag Nanoparticles. *International journal of molecular sciences* 17.
- Choi, Y., Kim, S., Choi, M., Ryoo, S., Park, J., Min, D., and Kim, B. (2014). Highly Biocompatible Carbon Nanodots for Simultaneous Bioimaging and Targeted Photodynamic Therapy In Vitro and In Vivo. *Advanced Functional Materials* 24, 5781-5789.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., and Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143-151.
- Datta, K., Kozak, O., Ranc, V., Havrdova, M., Bourlinos, A., Safarova, K., Hola, K., Tomankova, K., Zoppellaro, G., Otyepka, M., and Zboril, R. (2014). Quaternized carbon dot-modified graphene oxide for selective cell labelling - controlled nucleus and cytoplasm imaging. *Chemical Communications* 50, 10782-10785.
- Delehanty, J., Mattoussi, H., and Medintz, I. (2009). Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 1091-1105.
- Derfus, A., Chan, W., and Bhatia, S. (2004). Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters* 4, 11-18.
- Ding, D., Shyu, W., and Lin, S. (2011). Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation* 20, 5-14.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Du, F., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, M., Gong, A., Tan, Y., Miao, J., Gong, Y., Sun, M., Ju, H., Wu, C., and Zou, S. (2017). Engineered gadolinium-doped carbon dots for magnetic resonance imaging-guided radiotherapy of tumors. *Biomaterials* 121, 109-120.
- Dubertret, B., Skourides, P., Norris, D., Noireaux, V., Brivanlou, A., and Libchaber, A. (2002). In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 298, 1759-1762.

- Edison, T., Atchudan, R., Sethuraman, M.G., Shim, J.J., and Lee, Y.R. (2016). Microwave assisted green synthesis of fluorescent N-doped carbon dots: Cytotoxicity and bio-imaging applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 161, 154-161.
- Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672.
- Ferreira, L., Karp, J., Nobre, L., and Langer, R. (2008). New opportunities: The use of Nanotechnologies to manipulate and track stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 136-146.
- Foster, D.A., Yellen, P., Xu, L., and Saqcena, M. (2010). Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). *Genes & cancer* 1, 1124-1131.
- Garza, K.M., Soto, K.F., and Murr, L.E. (2008). Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. *International journal of nanomedicine* 3, 83-94.
- Geys, J., Nemmar, A., Verbeken, E., Smolders, E., Ratoi, M., Hoylaerts, M., Nemery, B., and Hoet, P. (2008). Acute Toxicity and Prothrombotic Effects of Quantum Dots: Impact of Surface Charge. *Environmental Health Perspectives* 116, 1607-1613.
- Higuchi, Y., Wu, C., Chang, K., Irie, K., Kawakami, S., Yamashita, F., and Hashida, M. (2011). Polyamidoamine dendrimer-conjugated quantum dots for efficient labeling of primary cultured mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 32, 6676-6682.
- Hsieh, S., Wang, F., Hung, S., Chen, Y., and Wang, Y. (2006a). The internalized CdSe/ZnS quantum dots impair the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* 79B, 95-101.
- Hsieh, S., Wang, F., Lin, C., Chen, Y., Hung, S., and Wang, Y. (2006b). The inhibition of osteogenesis with human bone marrow mesenchymal stem cells by CdSe/ZnS quantum dot labels. *Biomaterials* 27, 1656-1664.
- Hu, S., Niu, K., Sun, J., Yang, J., Zhao, N., and Du, X. (2009). One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles by laser irradiation. *Journal of Materials Chemistry* 19, 484-488.
- Huang, X., Zhang, F., Zhu, L., Choi, K., Guo, N., Guo, J., Tackett, K., Anilkumar, P., Liu, G., Quan, Q., Choi, H., Niu, G., Sun, Y., Lee, S., and Chen, X. (2013). Effect of Injection Routes on the Biodistribution, Clearance, and Tumor Uptake of Carbon Dots. *Acs Nano* 7, 5684-5693.
- Kang, Y., Fang, Y., Li, Y., Li, W., and Yin, X. (2015a). Nucleus-staining with biomolecule-mimicking nitrogen-doped carbon dots prepared by a fast neutralization heat strategy. *Chemical Communications* 51, 16956-16959.
- Kang, Y., Li, Y., Fang, Y., Xu, Y., Wei, X., and Yin, X. (2015b). Carbon Quantum Dots for Zebrafish Fluorescence Imaging. *Scientific Reports* 5.
- Kang, Z., Liu, Y., and Lee, S. (2011). Small-sized silicon nanoparticles: new nanolights and nanocatalysts. *Nanoscale* 3, 777-791.
- Kauffer, F., Merlin, C., Balan, L., and Schneider, R. (2014). Incidence of the core composition on the stability, the ROS production and the toxicity of CdSe quantum dots. *Journal of Hazardous Materials* 268, 246-255.
- Kaur, J., and Tikoo, K. (2013). Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology* 51, 1-14.

- Kaur, S., and Singhal, B. (2012). When nano meets stem: the impact of nanotechnology in stem cell biology. *J Biosci Bioeng* 113, 1-4.
- Kirchner, C., Liedl, T., Kudera, S., Pellegrino, T., Muñoz Javier, A., Gaub, H.E., Stölzle, S., Fertig, N., and Parak, W.J. (2005). Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett* 5, 331-338.
- Lee, O., Kuo, T., Chen, W., Lee, K., Hsieh, S., and Chen, T. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103, 1669-1675.
- Li, H., He, X., Liu, Y., Huang, H., Lian, S., Lee, S., and Kang, Z. (2011a). One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties. *Carbon* 49, 605-609.
- Li, N., Liang, X., Wang, L., Li, Z., Li, P., Zhu, Y., and Song, J. (2012). Biodistribution study of carbogenic dots in cells and in vivo for optical imaging. *Journal of Nanoparticle Research* 14.
- Li, X., Wang, H., Shimizu, Y., Pyatenko, A., Kawaguchi, K., and Koshizaki, N. (2011b). Preparation of carbon quantum dots with tunable photoluminescence by rapid laser passivation in ordinary organic solvents. *Chemical Communications* 47, 932-934.
- Liao, K.H., Lin, Y.S., Macosko, C.W., and Haynes, C.L. (2011). Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS applied materials & interfaces* 3, 2607-2615.
- Lieschke, G., and Currie, P. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics* 8, 353-367.
- Lin, S., Xie, X., Patel, M., Yang, Y., Li, Z., Cao, F., Gheysens, O., Zhang, Y., Gambhir, S., Rao, J., and Wu, J. (2007). Quantum dot imaging for embryonic stem cells. *Bmc Biotechnology* 7.
- Liu, J., Hu, R., Liu, J., Zhang, B., Wang, Y., Liu, X., Law, W., Liu, L., Ye, L., and Yong, K. (2015a). Cytotoxicity assessment of functionalized CdSe, CdTe and InP quantum dots in two human cancer cell models. *Materials Science & Engineering C-Materials For Biological Applications* 57, 222-231.
- Liu, J.H., Cao, L., LeCroy, G.E., Wang, P., Meziani, M.J., Dong, Y., Liu, Y., Luo, P.G., and Sun, Y.P. (2015b). Carbon "Quantum" Dots for Fluorescence Labeling of Cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 7, 19439-19445.
- Lovric, J., Bazzi, H., Cuie, Y., Fortin, G., Winnik, F., and Maysinger, D. (2005). Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 83, 377-385.
- Maleki, M., Ghanbarvand, F., Reza Behvarz, M., Ejtemaei, M., and Ghadirkhomi, E. (2014). Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *International journal of stem cells* 7, 118-126.
- Manshian, B., Soenen, S., Al-Ali, A., Brown, A., Hondow, N., Wills, J., Jenkins, G., and Doak, S. (2015). Cell Type-Dependent Changes in CdSe/ZnS Quantum Dot Uptake and Toxic Endpoints. *Toxicological Sciences* 144, 246-258.
- Manshian, B.B., Jenkins, G.J., Williams, P.M., Wright, C., Barron, A.R., Brown, A.P., Hondow, N., Dunstan, P.R., Rickman, R., Brady, K., and Doak, S.H. (2013). Single-walled carbon nanotubes: differential genotoxic potential associated with physico-chemical properties. *Nanotoxicology* 7, 144-156.

- Mao, X.J., Zheng, H.Z., Long, Y.J., Du, J., Hao, J.Y., Wang, L.L., and Zhou, D.B. (2010). Study on the fluorescence characteristics of carbon dots. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 75, 553-557.
- Michalet, X., Pinaud, F., Bentolila, L., Tsay, J., Doose, S., Li, J., Sundaresan, G., Wu, A., Gambhir, S., and Weiss, S. (2005). Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* 307, 538-544.
- Mirnajafizadeh, F., Ramsey, D., McAlpine, S., Wang, F., Reece, P., and Stride, J. (2016). Hydrothermal synthesis of highly luminescent blue-emitting ZnSe(S) quantum dots exhibiting low toxicity. *Materials Science & Engineering C-Materials For Biological Applications* 64, 167-172.
- Mooney, E., Dockery, P., Greiser, U., Murphy, M., and Barron, V. (2008). Carbon nanotubes and mesenchymal stem cells: Biocompatibility, proliferation and differentiation. *Nano Letters* 8, 2137-2143.
- Namdari, P., Negahdari, B., and Eatemadi, A. (2017). Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review. *Biomed Pharmacother* 87, 209-222.
- Narayanan, K., Yen, S., Dou, Q., Padmanabhan, P., Sudhakaran, T., Ahmed, S., Ying, J., and Selvan, S. (2013). Mimicking cellular transport mechanism in stem cells through endosomal escape of new peptide-coated quantum dots. *Scientific Reports* 3.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Seo, K., Yamashita, H., Hosoya, Y., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., and Sugiura, S. (2008). In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 118, 710-721.
- Nohroudi, K., Arnhold, S., Berhorn, T., Addicks, K., Hoehn, M., and Himmelreich, U. (2010). In Vivo MRI Stem Cell Tracking Requires Balancing of Detection Limit and Cell Viability. *Cell Transplantation* 19, 431-441.
- Oishi, K., Noguchi, H., Yukawa, H., and Hayashi, S. (2009). Differential Ability of Somatic Stem Cells. *Cell Transplantation* 18, 581-589.
- Oparka, M., Walczak, J., Malinska, D., van Oppen, L.M., Szczepanowska, J., Koopman, W.J., and Wieckowski, M.R. (2016). Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. *Methods* 109, 3-11.
- Pittenger, M., Mackay, A., Beck, S., Jaiswal, R., Douglas, R., Mosca, J., Moorman, M., Simonetti, D., Craig, S., and Marshak, D. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Qiao, Z., Wang, Y., Gao, Y., Li, H., Dai, T., Liu, Y., and Huo, Q. (2010). Commercially activated carbon as the source for producing multicolor photoluminescent carbon dots by chemical oxidation. *Chemical Communications* 46, 8812-8814.
- Qiu, J., Li, D., Mou, X., Li, J., Guo, W., Wang, S., Yu, X., Ma, B., Zhang, S., Tang, W., Sang, Y., Gil, P., and Liu, H. (2016). Effects of Graphene Quantum Dots on the Self-Renewal and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Advanced Healthcare Materials* 5, 702-710.
- Ranjbarvaziri, S., Kiani, S., Akhlaghi, A., Vosough, A., Baharvand, H., and Aghdami, N. (2011). Quantum dot labeling using positive charged peptides in human hematopoietic and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 32, 5195-5205.

- Ratnesh, R.K., and Mehata, M.S. (2017). Investigation of biocompatible and protein sensitive highly luminescent quantum dots/nanocrystals of CdSe, CdSe/ZnS and CdSe/CdS. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* *179*, 201-210.
- Ray, S., Saha, A., Jana, N., and Sarkar, R. (2009). Fluorescent Carbon Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Bioimaging Application. *Journal of Physical Chemistry C* *113*, 18546-18551.
- Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R., and Nann, T. (2008). Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods* *5*, 763-775.
- Riggs, J., Guo, Z., Carroll, D., and Sun, Y. (2000). Strong luminescence of solubilized carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* *122*, 5879-5880.
- Rubio, L., El Yamani, N., Kazimirova, A., Dusinska, M., and Marcos, R. (2016). Multi-walled carbon nanotubes (NM401) induce ROS-mediated HPRT mutations in Chinese hamster lung fibroblasts. *Environmental research* *146*, 185-190.
- Sahu, S., Behera, B., Maiti, T.K., and Mohapatra, S. (2012). Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents. *Chemical Communications* *48*, 8835-8837.
- Satarug, S., and Moore, M. (2004). Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environmental Health Perspectives* *112*, 1099-1103.
- Shah, L., Clark, P., Moioli, E., Stroschio, M., and Mao, J. (2007). Labeling of mesenchymal stem cells by bioconjugated quantum dots. *Nano Letters* *7*, 3071-3079.
- Shang, W., Zhang, X., Zhang, M., Fan, Z., Sun, Y., Han, M., and Fan, L. (2014). The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells. *Nanoscale* *6*, 5799-5806.
- Shen, R., Song, K., Liu, H., Li, Y., and Liu, H. (2012). Dramatic Fluorescence Enhancement of Bare Carbon Dots through Facile Reduction Chemistry. *Chemphyschem* *13*, 3549-3555.
- Shinde, D., and Pillai, V. (2012). Electrochemical Preparation of Luminescent Graphene Quantum Dots from Multiwalled Carbon Nanotubes. *Chemistry-a European Journal* *18*, 12522-12528.
- Si, Y.L., Zhao, Y.L., Hao, H.J., Fu, X.B., and Han, W.D. (2011). MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Res Rev* *10*, 93-103.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G., Wright, C.J., and Doak, S.H. (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* *30*, 3891-3914.
- Slotkin, J.R., Chakrabarti, L., Dai, H.N., Carney, R.S., Hirata, T., Bregman, B.S., Gallicano, G.I., Corbin, J.G., and Haydar, T.F. (2007). In vivo quantum dot labeling of mammalian stem and progenitor cells. *Dev Dyn* *236*, 3393-3401.
- Song, Y., Guan, R., Lyu, F., Kang, T., Wu, Y., and Chen, X. (2014). In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles and zinc oxide nanoparticles to human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Mutat Res* *769*, 113-118.
- Speit, G., and Hartmann, A. (2006). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in molecular biology* *314*, 275-286.

- Srinivas, M., Aarntzen, E., Bulte, J., Oyen, W., Heerschap, A., de Vries, I., and Figdor, C. (2010). Imaging of cellular therapies. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 1080-1093.
- Sullivan, M.O., Gordon-Evans, W.J., Fredericks, L.P., Kiefer, K., Conzemius, M.G., and Griffon, D.J. (2015). Comparison of Mesenchymal Stem Cell Surface Markers from Bone Marrow Aspirates and Adipose Stromal Vascular Fraction Sites. *Frontiers in veterinary science* 2, 82.
- Sun, W., Du, Y.X., and Wang, Y.Q. (2010). Study on fluorescence properties of carbogenic nanoparticles and their application for the determination of ferrous succinate. *J Lumin* 130, 1463-1469.
- 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., and Xie, S. (2006). Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *Journal of the American Chemical Society* 128, 7756-7757.
- Tao, H., Yang, K., Ma, Z., Wan, J., Zhang, Y., Kang, Z., and Liu, Z. (2012). In Vivo NIR Fluorescence Imaging, Biodistribution, and Toxicology of Photoluminescent Carbon Dots Produced from Carbon Nanotubes and Graphite. *Small* 8, 281-290.
- Terrovitis, J., Smith, R., and Marban, E. (2010). Assessment and Optimization of Cell Engraftment After Transplantation Into the Heart. *Circulation Research* 106, 479-494.
- Thomson, J., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S., Waknitz, M., Swiergiel, J., Marshall, V., and Jones, J. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Tomita, Y., Makino, S., Hakuno, D., Hattan, N., Kimura, K., Miyoshi, S., Murata, M., Ieda, M., and Fukuda, K. (2007). Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: current status and problems to be solved. *Medical & Biological Engineering & Computing* 45, 209-220.
- Tuerhong, M., Xu, Y., and Yin, X. (2017). Review on Carbon Dots and Their Applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 45, 139-149.
- Vedamalai, M., Periasamy, A.P., Wang, C.W., Tseng, Y.T., Ho, L.C., Shih, C.C., and Chang, H.T. (2014). Carbon nanodots prepared from o-phenylenediamine for sensing of Cu(2+) ions in cells. *Nanoscale* 6, 13119-13125.
- Wang, C., Ma, X., Ye, S., Cheng, L., Yang, K., Guo, L., Li, C., Li, Y., and Liu, Z. (2012). Protamine Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes for Stem Cell Labeling and In Vivo Raman/Magnetic Resonance/Photoacoustic Triple-Modal Imaging. *Advanced Functional Materials* 22, 2363-2375.
- Wang, Y., and Hu, A. (2014). Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications. *Journal of Materials Chemistry C* 2, 6921-6939.
- Worle-Knirsch, J.M., Pulskamp, K., and Krug, H.F. (2006). Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano letters* 6, 1261-1268.
- Wu, D., Boyd, A., and Wood, K. (2007). Embryonic stem cell transplantation: potential applicability in cell replacement therapy and regenerative medicine. *Frontiers in Bioscience* 12, 4525-4535.
- Wu, X., Sun, S., Wang, Y., Zhu, J., Jiang, K., Leng, Y., Shu, Q., and Lin, H. (2017). A fluorescent carbon-dots-based mitochondria-targetable nanoprobe for peroxynitrite sensing in living cells. *Biosens Bioelectron* 90, 501-507.

- Xu, W., Wang, B., Yang, M., Zhang, Y., Xu, Z., Yang, Y., Cao, H., and Tao, L. (2016). Tebufenozide induces G1/S cell cycle arrest and apoptosis in human cells. *Environmental toxicology and pharmacology* 49, 89-96.
- Xu, Y., Li, Y.H., Wang, Y., Cui, J.L., Yin, X.B., He, X.W., and Zhang, Y.K. (2014). 13C-engineered carbon quantum dots for in vivo magnetic resonance and fluorescence dual-response. *Analyst* 139, 5134-5139.
- Xu, Y., Wu, M., Liu, Y., Feng, X.Z., Yin, X.B., He, X.W., and Zhang, Y.K. (2013). Nitrogen-doped carbon dots: a facile and general preparation method, photoluminescence investigation, and imaging applications. *Chemistry* 19, 2276-2283.
- Yang, S.T., Cao, L., Luo, P.G., Lu, F., Wang, X., Wang, H., Meziani, M.J., Liu, Y., Qi, G., and Sun, Y.P. (2009a). Carbon dots for optical imaging in vivo. *J Am Chem Soc* 131, 11308-11309.
- Yang, S.T., Wang, X., Wang, H., Lu, F., Luo, P.G., Cao, L., Meziani, M.J., Liu, J.H., Liu, Y., Chen, M., Huang, Y., and Sun, Y.P. (2009b). Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* 113, 18110-18114.
- Yang, Y., Cui, J., Zheng, M., Hu, C., Tan, S., Xiao, Y., Yang, Q., and Liu, Y. (2012). One-step synthesis of amino-functionalized fluorescent carbon nanoparticles by hydrothermal carbonization of chitosan. *Chemical Communications* 48, 380-382.
- Ye, Y., Wang, H., Chu, J.H., Chou, G.X., Chen, S.B., Mo, H., Fong, W.F., and Yu, Z.L. (2011). Atractylenolide II induces G1 cell-cycle arrest and apoptosis in B16 melanoma cells. *Journal of ethnopharmacology* 136, 279-282.
- Yu, C., Xuan, T., Chen, Y., Zhao, Z., Sun, Z., and Li, H. (2015). A facile, green synthesis of highly fluorescent carbon nanoparticles from oatmeal for cell imaging. *Journal of Materials Chemistry C* 3, 9514-9518.
- Yuan, X.C., Liu, Z.M., Guo, Z.Y., Ji, Y.H., Jin, M., and Wang, X.P. (2014). Cellular distribution and cytotoxicity of graphene quantum dots with different functional groups. *Nanoscale Research Letters* 9, 9.
- Yukawa, H., Kagami, Y., Watanabe, M., Oishi, K., Miyamoto, Y., Okamoto, Y., Tokeshi, M., Kaji, N., Noguchi, H., Ono, K., Sawada, M., Baba, Y., Hamajima, N., and Hayashi, S. (2010). Quantum dots labeling using octa-arginine peptides for imaging of adipose tissue-derived stem cells. *Biomaterials* 31, 4094-4103.
- Zaitseva, N., Dai, Z., Grant, C., Harper, J., and Saw, C. (2007). Germanium nanocrystals synthesized in high-boiling-point organic solvents. *Chemistry of Materials* 19, 5174-5178.
- Zhai, X., Zhang, P., Liu, C., Bai, T., Li, W., Dai, L., and Liu, W. (2012). Highly luminescent carbon nanodots by microwave-assisted pyrolysis. *Chemical Communications* 48, 7955-7957.
- Zhang, M., Bai, L., Shang, W., Xie, W., Ma, H., Fu, Y., Fang, D., Sun, H., Fan, L., Han, M., Liu, C., and Yang, S. (2012a). Facile synthesis of water-soluble, highly fluorescent graphene quantum dots as a robust biological label for stem cells. *Journal of Materials Chemistry* 22, 7461-7467.
- Zhang, X., Wang, S., Xu, L., Feng, L., Ji, Y., Tao, L., Li, S., and Wei, Y. (2012b). Biocompatible polydopamine fluorescent organic nanoparticles: facile preparation and cell imaging. *Nanoscale* 4, 5581-5584.

Zhao, Q.L., Zhang, Z.L., Huang, B.H., Peng, J., Zhang, M., and Pang, D.W. (2008). Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite. *Chemical Communications*, 5116-5118.

Seznam použitých zkratek

A549	buňky lidského plicního karcinomu
APC	fluorofor allofykocyanin
BMP	kostní morfogenetický protein
CE	kapilární elektroforéza
CQDs	uhlíkové kvantové tečky
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDA	2,2' – (etylendioxy)bis(etylenamin)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESC	embryonální kmenové buňky
FBS	fetální bovinní sérum
FGF	fibroblastový růstový faktor
FITC	fluorofor fluorescein-5-isothiokyanát
GFP	zelený fluorescenční protein
GQDs	grafenové kvantové tečky
HeLa	buňky lidského cervikálního karcinomu
HepG2	buňky lidského karcinomu jater
hMSC	lidské mezenchymální kmenové buňky
In vitro	pokusy ve zkumavkách
In vivo	pokusy na zvířecích modelech
ISCT	mezinárodní společnost pro buněčnou terapii
MDA-MB-231	buňky lidského karcinomu prsu

MRI	magnetická rezonance
MTT	tetrazoliová sůl 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 difenyltetrazolium bromid
MWCNT	vícestěnné uhlíkové nanotrubicce
NIH-3T3	buňky myších fibroblastů
PBS	fosfátový pufr
PDs	polymerní tečky
PE	fluorofor fykoerytrin
PEG	polyethylenglykol
PEI	polyethylenimin
PEN	penicilín
PerCP-Cy5.5	složený fluorofor z peridinin chlorofylového proteinu a kyaninu5.5
PI	propidium jodid
QDs	kvantové tečky
RFU	relativní fluorescenční jednotky
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
SPECT	jedno fotonová emisní tomografie
STR	streptomycin
SWCNT	jednostěnné uhlíkové nanotrubicce
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TGF – Beta	transformující růstový faktor beta
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethanu