



PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

KATEDRA
EXPERIMENTÁLNÍ FYZIKY

Dizertační práce

Interakce nanomateriálů
s buněčnými kulturami

Autor	Mgr. Markéta Havrdová
Vedoucí práce	doc. RNDr. Libor Machala, Ph.D.
Studijní obor	Aplikovaná fyzika
Forma studia	Prezenční
Rok	2017

Jméno a příjmení autora	Mgr. Markéta Havrdová
Název práce	Interakce nanomateriálů s buněčnými kulturami
Typ práce	dizertační
Pracoviště	Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů Katedra experimentální fyziky
Vedoucí práce	doc. RNDr. Libor Machala, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Počet stran	81
Počet příloh	4
Jazyk	český
Abstrakt	Toxicita makroskopických materiálů je dobře prozkoumána, avšak s vývojem nových nanomateriálů pro biologické a medicínské aplikace vznikají i nová rizika jejich biokompatibility. Tato disertační práce se zabývá širokým tématem interakce nanomateriálů s buněčnými kulturami a představuje výsledky, které byly publikovány v impaktovaných odborných vědeckých časopisech. První studie je zaměřená na elektronovou mikroskopii magneticky značených mezenchymálních kmenových buněk (MSCs), ve které byl použit nový materiál na zobrazování buněk obsahujících magnetické nanočástice pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Díky této metodě byla zobrazena intracelulární distribuce superparamagnetických nanočástic oxidů železa (SPIO nanočástic) a zachycen počátek jejich endocytózy vč. primárních endosomů naplněných nanočásticemi. Tyto výsledky jsou obvykle získávány transmisní elektronovou mikroskopií (TEM), která vyžaduje vzorek ve formě tenkých řezů (< 100 nm). Druhá studie je zaměřená na cytotoxicitu MSCs a SPIO nanočástic v porovnání s komerčními nanočásticemi Resovist. Vzorky byly vzájemně porovnány za účelem aplikace pro MRI. Předmětem třetí a čtvrté studie jsou uhlíkové nanomateriály a jejich interakce s myšními fibroblasty (NIH/3T3). Třetí práce tedy popisuje selektivní interakci kladně nabitých (kvartérních) uhlíkových teček QCDs a hybridního materiálu složeného z QCDs a záporně nabitého grafen oxidu (QCDs-GO). V roce 2014 byla tato práce jako první, která zaznamenala přítomnost povrchově neupravených CDs v buněčném jádře a selektivní značení buněk založené na pouhé koncentraci GO ve vzorku. Čtvrtá studie je zaměřená na CDs s různým povrchovým nábojem a jejich cytotoxicitu (viabilitu, buněčnou morfologii, oxidační stres a buněčný cyklus) vyvolanou kladným, záporným a neutrálním povrchovým nábojem těchto nanomateriálů. Kladný a neutrální náboj CDs byl získán vyvázáním polymerů na jejich povrch – polyethyleniminem (PEI) kladný náboj a polyethylenglycolem (PEG) neutrální, samotné CDs byly negativní.

Author's first name and surname	Mgr. Markéta Havrdová
Title	Interaction of nanomaterials with cell cultures
Type of thesis	Dissertation thesis
Department	Regional Centre of Advanced Technologies and Materials Department of Experimental Physics
Supervisor	doc. RNDr. Libor Machala, Ph.D.
Year of presentation	2017
Number of pages	81
Number of appendices	4
Language	czech
Abstract	Toxicity of macroscopic materials is very well known, however development of nanomaterials has brought a new limitation for bio applications and medicine. This thesis deals with a rich topic about interactions of nanomaterials with cell lines and introduces results which were published in the scientific articles. First study was focused on electron microscopy of magnetically labeled mesenchymal stem cells (MSCs) where a new conductive matrix has been used. Due to high stability of the biological sample was possible to measure material contrast, observe intracellular distribution of superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles and obtain images of endocytosis including primary endosomes full of nanoparticles. The most common technique employed for mapping nanoparticles inside cells is transmission electron microscopy (TEM), nevertheless, TEM requires cutting of the sample on thin sections (< 100 nm). We used field emission scanning electron microscope (FE-SEM), preserved the shape of cells and obtained detailed information about the occurrence of nanoparticles. Second study was about cytotoxicity of SPIO nanoparticles towards MSCs and their magnetic properties for magnetic resonance imaging (MRI). Magnetic contrast and biocompatibility of SPIO nanoparticles has been compared with commercial nanoparticles Resovist. Next two studies were focused on carbon nanomaterials. Thus, third article described selective interactions of positively charged quarternized carbon dots (QCDs) and hybrid nanomaterial (QCDs-GO) composed of QCDs and negatively charged graphene oxide (GO). In the year 2014, it was first study about CDs without surface functionalization which entered into the cell nucleus of mouse fibroblasts NIH/3T3. Moreover, concentration of GO in hybrid system provided selective labeling of cells – QCDs-GO with higher amount of GO labeled only cytoplasm. The Subject of the last study was focused on comprehensive cytotoxicity of CDs with positive (PEI-CDs), negative (pristine CDs) and neutral (PEG-CDs) surface charge. The effects of variously charged CDs on cell viability, morphology, cell oxidative stress and cell cycle were studied also on NIH/3T3.

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma Interakce nanomateriálů s buněčnými kulturami řešila samostatně a že řádně cituji použitou literaturu.

Dále prohlašuji, že mám většinový autorský přínos v publikacích [i, vi, x], které jsou uvedeny v přehledu publikací v kapitole 7. Přílohy.

V Olomouci dne

.....
Mgr. Markéta Havrdová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli *doc. RNDr. Liborovi Machalovi, Ph.D.*, za odborné vedení disertační práce a kolegyni *Mgr. Kateřině Polákové, Ph.D.* za konzultace během celého doktorského studia, úžasnou spolupráci a za připomínky nejen k této práci, ale i ke všem článkům. Také bych chtěla poděkovat *Mgr. Josefu Skopalíkovi* za měření vzorků na průtokovém cytometru, když nám ještě v laboratoři chyběl a veškeré diskuze tomu věnované. Dále bych chtěla poděkovat *Mgr. Kateřině Holé* a také řeckým i italským kolegům za naprosto skvělé vzorky a Kačce navíc za diskuze ohledně jejich složení a chemických vlastností a za spolupráci na druhém prvoautorském článku. Také bych chtěla poděkovat *doc. Jířimu Tučkovi, Ph.D.*, za charakterizaci vzorků a pomoc při stylistickém zpracování článků, *Mgr. Milanovi Vůjtkovi, Ph.D.*, za zpracování úvodních stran této práce v LaTeXu a kolegům *Mgr. Ondřeji Malinovi, Ph.D.*, a *Mgr. Martinovi Petrovi* za pohodovou atmosféru v kanceláři. Ráda bych také poděkovala *prof. Radkovi Zbořilovi, Ph.D.*, a *prof. Dr. Janezovi Štrancarovi* za umožnění zahraniční stáže v Lublani.

Samozřejmě bych chtěla poděkovat celé své rodině za občasné pochopení vědeckých povinností během celého doktorátu, svému manželovi za neskutečnou pomoc a pochopení během studia i zahraniční stáže a veškerou snahu při péči o našeho syna, kterou jsem získala prostor na psaní disertační práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému synovi, že mě nechal relativně často spát a občas i psát. Moc Vám všem děkuji, opravdu si toho vážím.

Seznam publikací, na nichž se autorka této disertační práce podílela jako hlavní autorka nebo spoluautorka v období 2012 – 2016 (seřazeno chronologicky)

- [i] **Svatakova (Havrdova) M.**, Polakova K., Skopalik J., Brezina V., Nebesarova J., Zboril R., Live In Vitro Monitoring of Stem Cell Labeling Process by SPIO Nanoparticles Using Advanced Microscopic Techniques, *NANOCON 2012, Conference Proceedings*, 558-563, 2012
- [ii] Skopalík J., Poláková K., Čmiel V., **Havrdová M.**; Nanočástice v současné biologii a medicíně; *Zpravodaj Československé biologické společnosti*, Ročník 23, číslo 2, 2013, ISSN 1805 – 9619
- [iii] Kolářová M., Poláková K., Tománková K., **Havrdová M.**, Marková Z., Zbořil R.: Rapid Cellular Uptake of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles by Using Low-Intensity Ultrasound. *NANOCON 2013, Conference Proceedings*, 578-583, 2014
- [iv] Skopalik J., Polakova K., **Havrdova M.**, Justan I., Magro M., Milde D., Knopfova L., Smarda J., Polakova H., Gabrielova E., Vianello F., Michalek J., Zboril R. Mesenchymal Stromal Cell Labeling by New Uncoated Superparamagnetic Maghemite Nanoparticles in Comparison with Commercial Resovist – an Initial In Vitro Study. *Int. J. of Nanomedicine* 9: 5355-5372, 2014
- [v] Hola K., Bourlinos A. B., Kozak O., Berka K., Siskova M. K., **Havrdova M.**, Tucek J., Safarova K., Otyepka M., Giannelis P. E., Zboril R. Photoluminescence Effects of Graphitic Core Size and Surface Functional Groups in Carbon Dots: COO– Induced Red-Shift Emission. *Carbon* 70: 279-286, 2014
- [vi] **Havrdova M.**, Polakova K., Skopalik J., Vujtek M., Mokdad A., Homolkova M., Tucek J., Nebesarova J., Zboril R. Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM) as an Approach of Nanoparticles Detection Inside Cells. *Micron* 67: 149-154, 2014
- [vii] Datta K. K. R., Kozak O., Ranc V., **Havrdova M.**, Bourlinos A. B., Safarova K., Hola K., Tomankova K., Zoppellaro G., Otyepka M., Zboril R. Quaternized Carbon Dots Modified Graphene Oxide for Selective Cell Labelling – Controlled Nucleus and Cytoplasm Imaging. *Chem. Commun.* 50: 10782-10785, 2014
- [viii] Tomankova K., Polakova K., Pizova K., Binder S., **Havrdova M.**, Kolarova M., Kriegova E., Zapletalova J., Malina L., Horakova J., Malohlava J., Kolokithas-Ntoukas A., Kolarova H., Zboril R. In Vitro Cytotoxicity Analysis of Doxorubicin-Loaded/Superparamagnetic Iron Oxide Colloidal Nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 Cell Lines. *Int. J. of Nanomedicine* 10: 949-961, 2015
- [ix] Panacek A., Smekalova M., Kilianova M., Pucek R., Bogdanova K., Vecerova R., Kolar M., **Havrdova M.** et al.: Strong and Nonspecific Synergistic Antibacterial Efficiency of Antibiotics Combined with Silver Nanoparticles at Very Low Concentrations Showing No Cytotoxic Effect. *Molecules* 21: 2016, doi:10.3390/molecules21010026
- [x] **Havrdova M.**, Hola K., Skopalik J., Tomankova K., Petr M., Cepe K., Polakova K., Tucek J., Bourlinos A. B., Zboril R. Toxicity of Carbon Dots – Effect of Surface Functionalization on The Cell Viability, Reactive Oxygen Species Generation and Cell Cycle. *Carbon* 99: 238-248, 2016
- [xi] Panacek A., Smekalova M., Vecerova R., Bogdanova K., Roderova M., Kolar M., Kilianova M., Hradilova S., Froning J. P., **Havrdova M.**, Pucek R., Zboril R., Kvitek L. Silver Nanoparticles Strongly Enhance and Restore Bactericidal Activity of Inactive Antibiotics Against Multiresistant Enterobacteriaceae. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 142: 392-399, 2016
- [xii] Tucek J., Sofer Z., Bousa D., Pumera M., Hola K., Mala A., Polakova K., **Havrdova M.**, Cepe K., Tomanec O., Zboril R. Air-Stable Superparamagnetic Metal Nanoparticles Entrapped in Graphene Oxide Matrix. *Nature Communications* 7, doi:10.1038/ncomms12879, 2016
- [xiii] Čmiel V., Skopalik J., Polakova K., Solar J., **Havrdova M.**, Milde D., Justan I., Magro M., Starcuk Z., Provaznik I, Rhodamine Bound Maghemite As a Long-Term Dual Imaging Nanoprobe of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *European Biophysics Journal*, doi:10.1007/s00249-016-1187-1

Tato disertační práce je založena na výsledcích publikací [iv, vi, vii, x].

Prezentace na konferencích

1. Ústní prezentace

Studentská vědecká soutěž O cenu děkana 2012: „*In vitro studie mezenchymálních kmenových buněk značených magnetickými nanočásticemi*“, celkové 3. místo

Seminář projektu FIBICH (firma Contipro) 26. 1. 2012, Dolní Dobrouč: „*In vitro studie mezenchymálních kmenových buněk značených superparamagnetickými nanočásticemi oxidů železa (SPIO)*“

Slezské dny preventivní medicíny, 5. – 7. 3. 2014, Darkov: „*Toxicita nanomateriálů na buněčné úrovni*“

4th Annual RCPTM Conference 13. – 14. 10. 2014, Sněžné Milovy: „*Interactions of Nanomaterials with Cells and Cytotoxicity Evaluation*“

4th International Conference on Safe Production and Use of Nanomaterials (Nanosafe 2014), 17. – 21. 11. 2014, Grenoble: „*Cytotoxicity Evaluations of Carbon Dots with Different Surface Charge*“

2. Posterová prezentace

4th International Conference Nanocon 2012, „*Live In Vitro Monitoring of Stem Cell Labeling Process by SPIO Nanoparticles Using Advanced Microscopic Techniques*“, Brno, Česká Republika

57th Annual Meeting of the Biophysical Society 2013, „*Real-Time Imaging of SPIO Modified Stem Cells*“, Philadelphia, USA; Získání 3. místa za mikroskopický snímek v soutěži The Art of Science Image

58th meeting of the Biophysical Society 2014, „*Antibody – Conjugated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Active Targeting of Adenosine Receptors*“, San Francisco, USA

6th International Conference Nanocon 2014, „*Cytotoxicity Evaluations of Carbon Dots with Different Surface Charge*“, Brno, Česká Republika

9th International Summer School on Nanosciences & Nanotechnologies, Organic Electronics & Nanomedicine 2015, „*Probing Cytotoxicity of Carbon Dots: The Effect of Surface Coating*“, Soluň, Řecko

OBSAH

1	ÚVOD	13
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	15
2.1	Nanotechnologie a nanomateriály	15
2.2	Nanočástice jako kontrastní činidla	15
2.2.1	Kvantové tečky (QDs)	16
2.2.2	Uhlíkové kvantové tečky (CDs)	18
2.2.3	Grafen a jeho deriváty.....	21
2.2.4	Superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPIO)	28
2.3	Vliv povrchového náboje na buněčný uptake a cytotoxicitu	30
2.3.1	Průnik nanočástic přes jadernou membránu.....	31
3	KOMENTÁŘE A DISKUZE JEDNOTLIVÝCH PUBLIKAČNÍCH VÝSTUPŮ.....	34
3.1	Interakce SPIO nanočástic s mesenchymálními kmenovými buňkami (MSCs)	34
3.1.1	Detekce nanočástic uvnitř buněk pomocí skenovacího elektronového mikroskopu s autoemisní tryskou.....	34
3.1.2	Značení mesenchymálních kmenových buněk novými povrchově nemodifikovanými superparamagnetickými maghemitovými nanočásticemi v porovnání s komerční kontrastní látkou Resovist – základní in vitro studie	38
3.2	Interakce uhlíkových nanostruktur s myšimi fibroblasty NIH/3T3.....	45
3.2.1	Grafen oxid modifikovaný kvarterními uhlíkovými tečkami pro selektivní zobrazování buněk – kontrolované značení jádra i cytoplazmy	45
3.2.2	Toxicita uhlíkových teček – Vliv povrchové funkcionalizace na buněčnou viabilitu, generaci kyslíkových radikálů a buněčný cyklus.....	48
4	SHRNUTÍ.....	58
5	SUMMARY.....	59
6	REFERENCE	60
7	PŘÍLOHY	81

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Označení nanočástic a vzorků

CDs – uhlíkové tečky

CDs-PEG – uhlíkové tečky s polyethylenglycolem na povrchu

CDs-PEI – uhlíkové tečky s polyethyleniminem na povrchu

CDs-Pri – uhlíkové tečky bez modifikace povrchu

CNT – uhlíkové nanotrubky

QCDs – uhlíkové tečky s kvartérní aminovou skupinou na povrchu

QDs – polovodičové kvantové tečky

GO-QCDs – hybridní nanomateriál složen z grafen oxidu (GO) a QCDs

GO250QCD500 – hybridní nanomateriál obsahující 250 $\mu\text{g/ml}$ GO a 500 $\mu\text{g/ml}$ QCDs

GO500QCD500 – hybridní nanomateriál obsahující 500 $\mu\text{g/ml}$ GO a 250 $\mu\text{g/ml}$ QCDs

GQDs – grafenové kvantové tečky

NPs – nanočástice

rGO – redukováná forma grafen oxidu

SAMN – pracovní název vzorku SPIO nanočástic

SPIO nanočástice – superparamagnetické nanočástice oxidu železa

Metody a techniky

FE-SEM – Field Emission SEM - skenovací elektronový mikroskop s autoemisní tryskou

HR-TEM – High Resolution TEM – transmisní elektronový mikroskop s vysokým rozlišením

MRI – zobrazení magnetickou rezonancí

SEM – Skenovací elektronový mikroskop

TEM – Transmisní elektronový mikroskop

Ostatní použité zkratky

ER – endoplazmatické retikulum

FTO – sklíčko potažené vrstvou cínu dopovanou fluorem

hMSCs – lidské mezenchymální kmenové buňky

MSCs – mezenchymální kmenové buňky

NIH/3T3 – název buněčné linie myších fibroblastů

NPK – nukleární pórový komplex

PAH – plicní arteriální hypertenze

rMSCs – potkaní mezenchymální kmenové buňky

ROS – Reactive Oxygen Species – reaktivní formy kyslíku

1 ÚVOD

Nanotechnologie je velmi atraktivním vědním oborem, který se zabývá vývojem nových nanomateriálů, jejichž vlastnosti jsou popsány kvantovou fyzikou. Zmenšení běžných materiálů (např. písku, uhlí, železa) na atomární úroveň promění nevodivé materiály na vodivé, nebo vzniknou nanomateriály se speciálními optickými, magnetickými, termálními či katalyckými vlastnostmi. Jedinečné fyzikálně chemické vlastnosti nanomateriálů jsou tedy podmíněné zmenšením alespoň jednoho rozměru materiálů pod 100 nm.

Toxicita makroskopických materiálů je dobře prozkoumána, avšak s vývojem nových nanomateriálů pro biologické a medicínské aplikace vznikají i nová rizika jejich biokompatibility. Toxicita nanomateriálů se zkoumá především na in vitro úrovni, což spočívá v inkubaci různých koncentrací vzorku s buněčnými liniemi kultivovanými ve speciálních podmínkách (37°C a o 5% CO₂ obohacená atmosféra). Standardní délka inkubace bývá 24 hod, po této době se provádí řada laboratorních testů, které odhalí cytotoxicitu nanomateriálů. V rámci testování viability (životaschopnosti) buněk by měla být stanovena toxická koncentrace nanomateriálu, tzv. IC 50 (inhibitory concentration 50 %), která vyvolá buněčnou smrt u poloviny testovaných buněk. Dalším ukazatelem cytotoxicity je oxidační stres, který vzniká při narušení vnitrobuněčné rovnováhy a je vyvolaný zvýšenou hladinou reaktivních forem kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS). Oxidační poškození membránových lipidů a dalších důležitých biomolekul včetně DNA může vést k buněčné smrti a proto se měření hladiny ROS považuje za důležitou informaci, která pomáhá pochopit příčiny toxicity. Velice detailní metodou, je analýza buněk pomocí průtokového cytometru. Během této metody prochází fluorescenčně značené buňky přes laserové paprsky přístroje a lze získat informace o jejich tvaru, viabilitě, buněčném cyklu, typu buněčné smrti, či detekovat specifické membránové markery a další informace na základě vybrané fluorescenční značky. Všechny zmiňované laboratorní metody jsou běžně používané při testování toxicity léčiv a různých xenobiotik, avšak nanomateriály jsou suspenze nebo koloidní roztoky, které mohou s danou próbou interagovat a ovlivnit tak výsledky. Proto je nezbytné pozorovat interakce nanomateriálů s plazmatickou membránou také mikroskopicky. Nanomateriály se totiž nejdříve na buněčnou membránu adsorbují a poté jsou inkorporovány do buňky. Změna morfologie buňky může tedy být první známkou toxicity nového nanomateriálu. K pozorování buněk a jejich vnitrobuněčných kompartmentů bývá používána

světelná, fluorescenční i elektronová mikroskopie, kterou lze zjistit distribuci nanomateriálů uvnitř buněk.

Tato práce byla sepsána na základě výsledků publikovaných v článcích [iv, vi, vii, x], jejichž obsah byl věnován zkoumání cytotoxicity vybraných nanomateriálů a mikroskopii značených buněk. Práce byla zaměřena na interakci uhlíkových teček (CDs), grafen oxidů (GO) a jejich hybridních systémů s myšími fibroblasty NIH/3T3 a na značení, mikroskopii a toxicitu superparamagnetických nanočástic oxidů železa (SPIO nanočástic) vůči mezenchymálním kmenovým buňkám (MSCs). Bylo využito všech zmíněných laboratorních metod a mikroskopických technik, aby byl získán kompletní náhled na toxicitu těchto nanomateriálů. U kmenových buněk značených SPIO nanočásticemi byla navíc použita magnetická rezonance, kterou byl porovnán magnetický kontrast nanočástic vůči okolní tkáni.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nanotechnologie a nanomateriály

Nanotechnologie je v současné době velice populárním vědeckým oborem a nanomateriály již nalézají uplatnění v mnoha odvětvích od průmyslu, přes environmentální a farmaceutické aplikace až po biomedicínu. Nanočástice pro biomedicínské aplikace jsou vyvíjeny hlavně jako nové typy kontrastních látek založených na jejich magnetických a optických vlastnostech, ale také jako teranostika pro diagnostiku a cílené doručení terapeutických látek. Nanomateriály mají, díky své velikosti pod sto nanometrů, řadu nových vlastností, které mohou ovlivnit interakce s biologickými systémy a následně vyvolat toxicitu. Mezi tyto vlastnosti se řadí: velikost, tvar, povrchová reaktivita, hydrofóbní a hydrofilní vlastnosti, povrchový náboj, chemické složení a koloidní vlastnosti. Všechny zmíněné vlastnosti mohou vyvolat toxický efekt, který však může být zmírněn podanou dávkou a inkubační dobou.

2.2 Nanočástice jako kontrastní činidla

Mezi anorganické nanočástice (NPs) vyvinuté jako kontrastní činidla pro biomedicínu se řadí polovodičové kvantové tečky (QDs), nanočástice oxidů železa a uhlíkové nanostruktury. Oproti běžně používaným kontrastním látkám mají nanočástice několik výhod: výborné optické nebo magnetické vlastnosti, které mohou být navrženy podle potřeby sledovaného objektu – materiál, struktura, velikost, tvar. Jejich povrch může být pokryt specifickými ligandy pro interakci s biomarkery typickými pro jednotlivá onemocnění [1]. Zobrazování molekul kontrastovaných NPs je nejen novým krokem v pozorování biologických dějů, ale také senzitivní metoda pro včasnou diagnózu řady onemocnění (rakoviny, kardiovaskulárního syndromu, PAH [2], nebo neurologických onemocnění) [3,4]. Povrchově modifikované NPs specificky interagují s antigeny či jinými selektivními proteiny, proti kterým byly nanočástice naznačené a zajišťují tak informaci o poškození molekul, tkání nebo abnormalit ve fyziologických dějích.

Doposud byla ke kontrastování používaná organická barviva a radioisotopy, což jsou malé molekuly konjugované s ligandy [4,5], anorganické NPs však svými vlastnostmi

umožňují vyšší kontrast a selektivitu, při které se využívá optických vlastností různě velkých kvantových teček (QDs) a jejich fotostability [6-8] především při značení rozdílných molekul na jedné buňce nebo tkáni. Lze také využít i tzv. duálního značení – kombinace magnetických vlastností NPs konjugovaných s fluorescenční značkou umožňuje pozorovat vzorek ve fluorescenčním/konfokálním mikroskopu a posléze i v magnetické rezonanci (např. při sledování „magneticky“ značených kmenových buněk během in vivo studie).

Vývoj různých typů funkcionalizovaných nanočástic je markantní a jejich in vitro a in vivo aplikace jsou limitovány toxicitou, kterou mohou vykazovat. Toxicita polovodičových [9-11] i uhlíkových QDs byla v řadě studií testována na in vivo úrovni, magnetické nanočástice již byly použity pro klinické testování [6,10-12].

2.2.1 Kvantové tečky (QDs)

Kvantové tečky (QDs) jsou polovodičové nanokrystaly s fluorescenčními vlastnostmi. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 10 až 100 atomů, což odpovídá 2 – 10 nm [13]. Na rozdíl od běžného polovodičového materiálu, nanometrový rozměr struktury zajišťuje diskrétní hodnoty energie elektronů a tím i variabilitu optických vlastností (úprava absorpce/emise v závislosti na velikosti, tvaru a materiálu, ze kterého byly QDs syntetizovány) [1,14,15]. V porovnání s organickými barvivy a fluorescenčními proteiny, QDs nabízí široký rozsah emisního spektra (v oblasti viditelného světla a blízkého infračerveného záření), větší absorpční koeficient a vyšší fotostabilitu [16]. Právě díky jejich fotostabilitě a vysokému kvantovému výtěžku (poměr emitovaných a absorbovaných fotonů [17]) jsou QDs používány jako nanomateriálové optické kontrastní činidla [13]. Kvantové tečky mohou být syntetizovány podle záměru jejich aplikace a optických vlastností z řady polovodičových materiálů skupiny II-IV: Cds, CdSe, CdTe; III-V: InP, InAs; IV-VI: PbSe [17]. Během posledních let byly testované biotechnologické aplikace QDs, ve kterých se využívalo jejich fluorescence. QDs byly využity pro imunofluorescenční značení fixovaných buněk a tkání, membránových proteinů [18-22], mikrotubulů [19], aktinu [19,23], jaderných antigenů [19] i DNA [24]. Fluorescence QDs je výraznější než u organických fluorescenčních značek a nedochází k jejich vysvícení, proto zajišťují kvalitní kontrast značených objektů a to i při nízkém počtu QDs [17]. Emisní záření QDs je možné ovlivnit velikostí nanokrystalů – emisní spektrum menších QDs je posunuté do modré oblasti, větších do červené oblasti. Této vlastnosti se využívá při fluorescenčním značení rozdílných biologických struktur („multiple-

color staining“) během jednoho zobrazování např. konfokální mikroskopií [25]. Značení buněk QDs je prováděno za účelem zviditelnit celou buňku nebo jednotlivé části (membránové proteiny, cytoplazmu nebo jádro). Buňky nanomateriál pohltí buď endocytózou, fagocytózou, pinocytózou nebo je jejich internalizace urychlena elektroporací [26, 27] či aplikována mikroinjekčně [28]. QDs mohou být povrchově modifikovány a funkcionalizovány specifickými protilátkami, ligandy, či jinými molekulami ke zvýšení: a) jejich průniku do buněk (např. díky molekule transferrinu) [29], b) biokompatibility, c) specifických interakcí a dlouhodobé stability ve vnitrobuněčném prostředí. Povrch QDs bývá funkcionalizován streptavidinem [19, 30,], biotinem (avidinem) [31], peptidy [32], primárními a sekundárními protilátkami [26, 32] a receptorovými ligandy jako jsou epidermální růstové faktory (EGF) [22, 33] nebo serotonin [34].

QDs jsou již komerčně dostupné a využívají se především pro fluorescenční, konfokální a jedno- nebo multi-fotonovou mikroskopii [9, 35-37]. Dále se mohou použít i jako kontrastní činidla pro fotoakustické zobrazování [38]. Všechny aplikace jsou znázorněny na Obr. 1. Stále se však pracuje na zlepšení jejich vlastností a zvýšení biokompatibility.

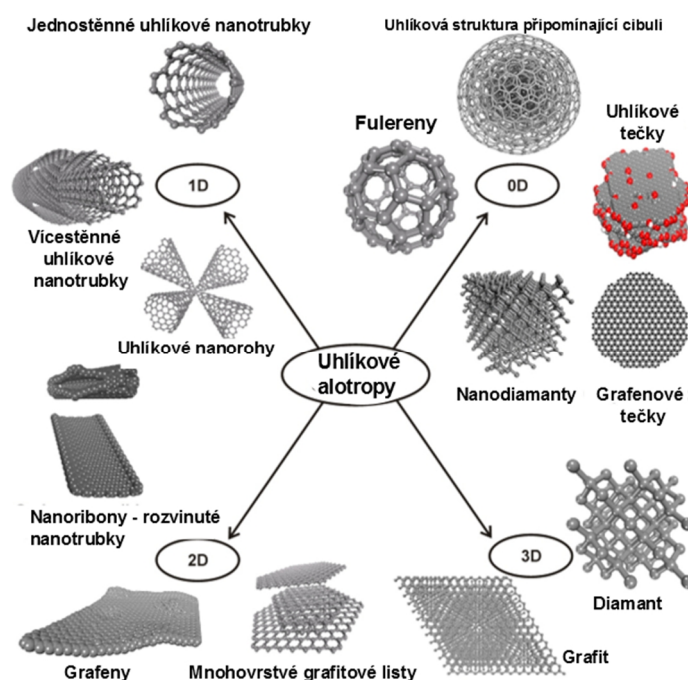
Cytotoxicita a potenciální interference QDs s buněčnými fyziologickými procesy jsou hlavním problémem při in vitro i in vivo aplikacích. Řada vědců se zaměřila na různé typy syntéz, stabilizaci a funkcionalizaci QDs, avšak i po pasivaci QDs dochází k uvolňování Cd^{2+} nebo Se^{2-} iontů, které způsobují toxicitu [33, 39]. Pro biologické aplikace je tedy vhodné používat doporučené maximální koncentrace, které jsou dostatečné pro fluorescenční značení a současně šetrné k buňkám.



Obr. 1. Aplikace QDs jako multimodálních kontrastních činidel při zobrazování biologických vzorků, překresleno podle [17].

2.2.2 Uhlíkové kvantové tečky (CDs)

Fluorescenční kontrastní látky, ať už organická barviva nebo nanomateriály, jsou v medicíně a pro biologické zobrazování nezbytné [40-41]. Organická barviva usnadňují diagnózu řady onemocnění a kvantové tečky jsou široce využívány při detailním zobrazování buněčných dynamických dějů, včetně těch, které vyžadují dlouhodobé ozařování vzorku. Běžné fluorescenční látky jsou fotosenzitivní, musí se uchovávat v nízkých teplotách a pořizovací cena je oproti nanomateriálům vysoká. Polovodičové kvantové tečky se zase vyznačují vysokou cytotoxicitou a proto je jejich in vivo aplikace velice omezená [33]. V posledních letech se však vědci zaměřili na uhlíkové nanomateriály, zejména na uhlíkové tečky, grafeny a grafenoxidy, grafenové kvantové tečky, uhlíkové nanotrúbky, nanodiamanty a nanovláčna, které mají podobně jako QDs výborné optické a/nebo elektrochemické vlastnosti [42-46]. Jejich struktury jsou vyobrazeny na Obr. 2. Tato práce je zaměřena pouze na cytotoxicitu vybraných nanomateriálů – uhlíkových teček (CDs), grafenů (G), grafenoxidů (GO) a jejich kompozitů (kombinace GO-CDs).



Obr. 2: Klasifikace uhlíkových alotropů podle dimenzionality, upraveno podle [46].

Uhlíkové kvantové tečky (Carbon Dots, CDs) jsou novou generací fluorescenčních nanomateriálů, které svými vlastnostmi konkurují polovodičovým kvantovým tečkám (QDs) [47-48]. Na rozdíl od kadmiových QDs a dalších kvantových teček vyrobených z těžkých

kovů, CDs nevykazují téměř žádnou toxicitu ani nezpůsobují vážné dopady na lidské zdraví nebo životní prostředí [45, 49-51]. Díky jejich kvalitní fluorescenci (avšak s nižším kvantovým výtěžkem (< 15 %) oproti QDs [52]), vysoké foto-stabilitě a dobré biokompatibilitě, jsou CDs nadějně jako fluorescenční nanopróby pro optické zobrazovací techniky [51,53-57] a slibné pro klinické využití [58].

Malá velikost CDs (< 10 nm) umožňuje nanomateriálu samovolně pronikat skrz buněčnou membránu a interagovat s vnitrobuněčným prostředím. Nicméně, modifikace povrchu CDs (stejně jako i jiných nanočástic) ovlivňuje buněčný „uptake“ a zvyšuje selektivitu interakcí s membránou nebo cytoplazmou [58]. Specifické interakce s organelami nejsou dosud popsány [59], vědci se však zaměřují na fluorescenční značení buněčných jader [60] a DNA [61]. Toxicita CDs byla testována na in vitro a in vivo úrovni v řadě studií. V in vitro testech se po inkubaci buněk s CDs zkoumala morfologie, viabilita (životaschopnost), proliferace a mortalita různých buněčných liniích (MCF-7 [62], HT-29 [61], HepG2 [63], větší přehled je uveden v tabulce (viz Tab. 1). Cytotoxicita je ovlivněna vlastnostmi nanomateriálu: velikostí, složením, syntézou, tvarem, povrchovou reaktivitou, povrchovým nábojem, hydrofilním či hydrofobním chováním a koloidními vlastnostmi), avšak také podanou koncentrací. Výsledky toxicity CDs, které jsou znázorněny v Tab. 1, ukazují, že pro dosažení IC 50 byly použité koncentrace vyšší, než je pro značení buněk potřeba. Účinná dávka pro fluorescenční značení buněk se pohybuje v rozmezí 10 – 100 µg/ml [63]. Uvedené CDs při těchto koncentracích cytotoxicitu nevykazovaly. Ze studií také vyplývá, že nepasivované (tzv. holé) CDs jsou více toxické než CDs konjugované s polyethylenglycolem (PEG) [44] nebo než samotný polymer [49]. Povrchová modifikace CDs může kladně ovlivnit jejich fluorescenci, ale také biologické chování při in vivo aplikacích [64].

Buněčná linie	Syntéza CDs	Povrchová modifikace	IC 50 [mg.mL ⁻¹]	Ref.
Lidské ledvinové buňky 293T	elektrooxidace grafitu	žádná	4	65
Lidské hepatocyty HepG2	oxidace uhlénohličného prachu v HNO ₃	žádná	1	63
Lidské primární buňky glioblastomu U87	hydrotermální syntéza z biol. materiálu	žádná	2	66
Lidské nádorové buňky prsu MCF-7	oxidace uhlénohličného prachu v HNO ₃	žádná	0,2	44
	oxidace uhlénohličného prachu v HNO ₃	PEG1500	0,2	44
	karbonizace polymerních NČ	PEG1500	0,2	49
	karbonizace polymerních NČ	PEI	0,015	49
	karbonizace polymerních NČ	PPE-EI	0,03*	49
	karbonizace polymerních NČ	PPEI-EI	0,08*#	67
	oxidace uhlénohličného prachu v HNO ₃	PPEI-EI	0,8	67
	Lidské b. kolorektálního adenokarcinomu HT-29	oxidace uhlénohličného prachu v HNO ₃	žádná	0,2
karbonizace polymerních NČ		PEG1500	0,2	44
karbonizace polymerních NČ		PEG1500	0,2	49
laserová ablace		PEG1500	0,05*	49
karbonizace polymerních NČ		PPE-EI	0,05	49
karbonizace polymerních NČ		PEI	0,015	49
oxidace uhlénohličného prachu v HNO ₃		PPEI-EI	0,8#	67

Tab. 1. Přehled cytotoxicity CDs podle typu syntézy a povrchové modifikace; Pozn. * vyšší dávka nebyla testována, # MTT test nefungoval

V in vivo studiích bylo zjištěno, že tělo myši je schopné močí vyloučit PEG-CDs s hydrodynamickým průměrem do 5 nm a neutrálním povrchovým nábojem. Autoři Huang et al. pozorovali distribuci fluorescenčně značených CDs, které byly myšim podány intravenózně, intramuskulárně a subkutánně. Jednu hodinu od aplikace do těla se většina CDs vyskytovala v ledvinách a nepatrné množství v játrech. Nejrychleji se do ledvin dostaly CDs podané intravenózně, následně intramuskulární cestou a nakonec CDs podané subkutánně, avšak po 24 hodinách došlo k vyloučení všech CDs bez ohledu na způsob jejich aplikace [57]. Neutrální povrchový náboj zamezuje nespecifické absorpci proteinů, imunologickým reakcím a hromadění v retikuloendoteliálním systému [68] (játrech, slezině, kostní dřeni). Avšak jiná studie zaměřená na distribuci CDs ve zvířecím modelu ukázala, že CDs se záporně nabitou – karboxylovou skupinou se hromadí v játrech, slezině a plicích [69]. Povrchový náboj tedy výrazně ovlivňuje cytotoxicitu a in vivo biodistribuci nanomateriálu, a proto jsem se na toto téma zaměřila ve své prvoautorské publikaci (viz Kapitola 3: Komentáře a diskuze jednotlivých publikačních výstupů).

2.2.3 Grafen a jeho deriváty

Grafen je dvoudimensionální atomový krystal složený z sp^2 hybridizovaných atomů uhlíku, které jsou uspořádány hexagonálně v jedné vrstvě (viz Obr. 3) [70]. Díky této struktuře se každý atom uhlíku vyskytuje na povrchu grafenového listu a z obou stran interaguje s okolním prostředím. Maximální plocha povrchu sp^2 hybridizovaných uhlíkových listů je přibližně $2600 \text{ m}^2/\text{g}$, což je minimálně o řád vyšší než je plocha povrchu jiných nanomateriálů určených pro biologické aplikace [71-72]. Laterální dimenze nemá vliv na plochu povrchu (m^2/g), ale určuje maximální dimenzi materiálu, který je vhodný pro buněčný „uptake“, renální „clearance“ (vyloučení), průnik skrz hematoencefalickou bariéru a další biologické mechanismy, které souvisí s pohlcováním a vylučováním různě velkých nanomateriálů. Při endo/fagocytóze 2D nanostruktur je ovlivněno různé množství membránových receptorů a mechanismus uptake není zcela známý. Distribuce nanomateriálu uvnitř buněk je omezena velikostí endo/lyzomů, do kterých je nanomateriál po pohlcení inkorporován. Někdy však k uptake nanomateriálu ani nedojde, jelikož velikost grafenových listů se pohybuje v rozmezí 10 nm až $> 20 \mu\text{m}$ (rozměr větší než samotná buňka). U buněčné linie THP-1 (b. monocytární leukémie) byl popsán uptake vícevrstvého grafenu s maximální laterální dimenzí $5 \mu\text{m}$, na větší grafeny ($25 \mu\text{m}$) se buňky adherovaly [73].

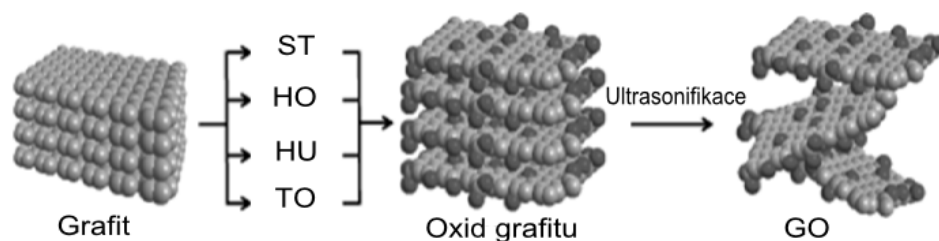
Grafenová 2D struktura je široce zkoumána v různých odvětvích (elektronika, optika i medicína), jelikož vykazuje výborné mechanické a optické (absorpční) vlastnosti a je elektricky i tepelně vodivá [74-76]. Grafen může být syntetizovaný do vícevrstevných nanostruktur (tzv. few graphene monolayers), odlišných tvarů (2D grafenových kvantových teček (GQDs)), anebo na jeho povrch může být vyvázaný kyslík za vzniku grafen oxidu (GO), či další funkční skupiny. Různou modifikací grafenových listů je tedy možné pozměnit jejich optoelektronické vlastnosti, elektrickou vodivost, mechanickou odolnost, chemickou reaktivitu a proto se grafen považuje za „stavební kámen“ i dalších uhlíkových nanoalotropů (0D fulerenů, 1D CNT a vícevrstevných 2D uhlíkových listů [46]). Velká plocha povrchu grafenových listů se v bioaplikacích využívá pro cílené doručování vícero léčiv na specifické místo, tzv. multi drug delivery. Pro zvýšení biokompatibility a odolnosti vůči imunitnímu systému při in vivo aplikaci se grafen modifikuje polymery [77]. V posledních letech bylo několik studií zaměřeno na cílené doručování protinádorových léčiv, genů a peptidů pomocí grafenových derivátů [78-84]. Hlavními deriváty grafenu je grafenoxid (GO), redukovaná

forma GO (rGO), grafan a fluorografen. GO se nejčastěji připravuje pomocí Hummerovy metody, která je založena na oxidaci grafitu pomocí manganistanu draselného a koncentrované kyseliny sírové. Touto metodou vznikne grafen, který je oboustranně pokrytý funkčními skupinami obsahujícími kyslík, kde hydroxylové a epoxidové skupiny jsou na bazální části grafenu, zatímco karboxylové a karbonylové skupiny, laktony a chinony se vyskytují na okraji nanomateriálu. Funkční skupiny obsahující kyslík mohou být odstraněny redukčními činidly jako je hydrazin za vzniku redukované formy grafenu, tzv. rGO [85]. Chemická modifikace grafenu na grafan vzniká přidáním jednoho atomu vodíku na každý uhlíkový atom grafenu, fluorografen pak vzniká obdobně, jen jsou místo atomů vodíků použité atomy fluoru [86-87].

Zmenšením grafenu pod 20 nm vznikají 0D kvantové grafenové tečky (GQDs), které mají fluorescenční vlastnosti závislé na jejich velikosti, avšak ponechávají si grafenovou nanostrukturu (viz Obr. 2). Tento nanomateriál má díky kombinaci vlastností grafenu i CDs velký potenciál v zobrazovacích metodách, avšak po ozáření (stejně jako u GO) dochází ke vzniku reaktivních forem kyslíku, které jsou zdrojem oxidačního stresu. Z těchto důvodů jsou GQDs zkoumány především jako nanomateriál vhodný pro protinádorovou terapii [70].

Toxicita grafenových nanostruktur

Uhlíkové nanomateriály jsou označovány za velice biokompatibilní, avšak grafenové nanostruktury toxicitu vykazují a organismus ho kompletně nevylučuje [88]. Oproti CDs mají grafenové nanostruktury tendenci agregovat, a proto je velice náročné zajistit jejich koloidní chování. Dalším zdrojem toxicity jsou prekursorzy a chemikálie použité při syntéze a modifikaci grafenových nanostruktur, která zahrnuje dopování kovy, oxidaci, redukcí nebo jinou funkcionalizaci [89]. Tyto kroky vnášejí do vzorků nečistoty v podobě toxických chemikálií, které následně ovlivňují interakce nanomateriálů s biologickým systémem [90]. Toxicita tedy závisí na typu syntézy [85]. GO se mohou připravit čtyřmi hlavními oxidačními metodami: Staudenmaierovou (ST), Hofmannovou (HO), Hummerovou (HU) a Tourou (TO) (Obr. 3). Tyto způsoby oxidací grafitu ovlivňují množství vyvázaného kyslíku a jeho distribuci na povrchu grafenu.



Obr. 3: Příprava GO pomocí oxidací grafitu; Metody oxidace: Staudenmaierova (ST), Hofmannova (HO), Hummerova (HU) a Tourova (TO); upraveno podle [91]

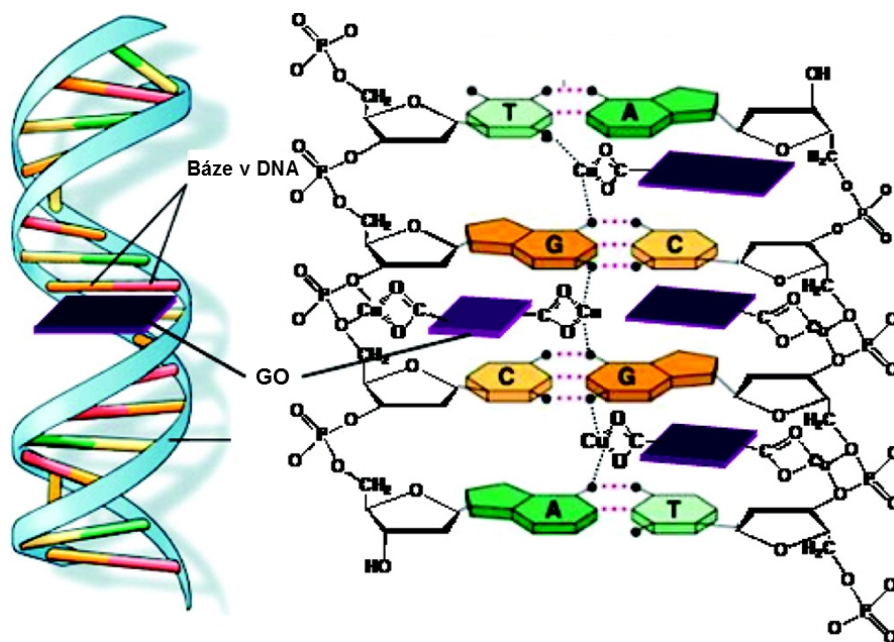
Použitím metody ST a HO vznikají převážně funkční skupiny s C-O vazbou (hydroxylové a epoxidové skupiny), metodou HU vznikají karbonylové skupiny a použitím metody TO pak karbonylové i karboxylové skupiny. Celkově se pak dají metody porovnat podle množství kyslíku v následujícím pořadí: $ST < HO < HU < TO$, kde ST metodou vzniká GO s nejnižším obsahem kyslíku a metodou TO vznikne GO s obsahem kyslíku nejvyšším. Po 24 hod inkubaci s takto syntetizovanými GO byla změřena toxicita nanomateriálu na buněčné linii A549 (plicní nádorové buňky). Z výsledků vyplývalo, že cytotoxicita se snižuje s přibývajícím množstvím kyslíku na povrchu GO a je koncentračně závislá (toxický efekt narůstal se zvyšující se koncentrací podaného GO). Výslednou toxicitu GO ovlivněnou typem syntézy lze tedy vyjádřit jako $ST > HO > HU > TO$, kde oxidace ST metodou způsobovala nejvyšší toxicitu a oxidace TO metodou toxicitu nejnižší [92]. Tyto výsledky jsou rozporuplné se zmiňovanou studií [85], ve které autoři redukovali množství kyslíku GO na rGO za účelem snížit toxicitu. Toto snížení toxicity bude však spjato i se snížením hydrofobních vlastností GO, jelikož redukovaná forma GO má hydrofilní vlastnosti, je ve vodě lépe dispergovatelná a tím šetrnější k buňkám [73].

Toxicita grafenů a jeho derivátů je zatím méně prozkoumaná ve srovnání s jinými uhlíkovými nanomateriály. Studie zkoumají toxicitu na bakteriích i savčích buňkách. U GO i rGO byl prokázán antibakteriální účinek proti gram negativní bakterii E. Coli a gram pozitivní bakterii S. Aureus, vyšší antibakteriální aktivitu tu měl v obou případech rGO [92]. GO i rGO narušují integritu bakteriální membrány [93], avšak příčinou hubení bakterií je pravděpodobně interkalace (vmezeření) Fe^{2+} iontů mezi grafenové listy, jelikož i v přírodě se vyskytují nanostruktury jílu s adsorbovanými Fe^{2+} ionty, které bakterie zabíjí. Fe^{2+} ionty interagují s membránovými regulačními proteiny, které zajistí jejich intracelulární transport. Uvnitř bakteriální buňky následně dochází k oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} a k tvorbě hydroxylových

radikálů, které letálně bakterie poškodí [94]. GO konjugované s kovovými ionty (Fe^{2+} , Cu^{2+}) by se tedy daly využít na zahubení bakterií rezistentních vůči antibiotikům [73]. Cytotoxicita grafenů a GO byla studována na různých buněčných liniích (epiteliálních buňkách, fibroblastech, neuronech [95-97], hMSCs [98-99], U251 [100], HepG2 [101], NIH3T3 [102], L929 [103], HeLa [104-106], T87 [107], avšak ne u všech testovaných linií došlo k pohlcení nanomateriálu. V tomto případě může sice toxický efekt nastat až při vyšších koncentracích (např. u lidských epitheliálních buněk plic při 50 $\mu\text{g/ml}$), ale také může vznikat extracelulární ROS [95]. Po internalizaci GO do lidských fibroblastů (HDF) nastala výrazná cytotoxicita při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Nanomateriál se vyskytoval především v lyzosomech, mitochondriích a endoplasmatickém retikulu, ojediněle v jádře [108-109]. Intracelulární GO může vyvolat zvýšenou toxicitu už při nižších koncentracích (10 – 20 $\mu\text{g/ml}$) a způsobit oxidační stres [96, 110-111]. GO ovlivňuje i adhezi buněk, jelikož snižuje expresi proteinů, jako jsou laminin, fibronectin, fokální adhezni kináza (FAK), důležitých pro uchycení buněk k povrchu kultivačních nádob [108]. Redukovaná forma GO nebo grafen s karboxylovými skupinami na povrchu vykazuje nižší toxicitu než GO nebo samotný negativně nabitý grafen [112]. GO je více biokompatibilní než grafen díky jeho lepší rozpustnosti a dispergovatelnosti. Tyto vlastnosti limitují poškození buněk i toxicitu vůči lidským buněčným liniím jako jsou kožní fibroblasty a červené krvinky, avšak i jejich baktericidní účinek je nižší [113]. Řada studií se zabývala modifikací grafenů a GO za účelem zvýšit jejich hydrofilní a kolloidní vlastnosti a stanovit jejich maximální přípustnou dávku ($\leq 10 \text{ mg/mL}$) při in vivo aplikaci [96, 114-117]. Farmaceutické bezpečnostní směrnice však požadují, aby byla aplikovaná dávka při preklinických testech netoxická i v koncentracích 10 – 100 krát vyšších, než jsou běžně na zvířecích modelech testované [118-121]. Maximální tolerantní dávka (MTD) byla stanovena u dextranem pasivovaného GO, který byl aplikován laboratorním potkanům v dávkách 1 až 500 mg/kg. MTD se pohybovala v intervalu: $50 \text{ mg/kg} \leq \text{MTD} \leq 125 \text{ mg/kg}$ a eliminační poločas nanomateriálu z krve byl $< 30 \text{ min}$. Během 24 hod byla většina GO vyloučena výkaly. Histopatologické změny byly nalezeny v srdci, játrech, plicích, slezině a v ledvinách při dávce $\geq 250 \text{ mg/kg}$. Naopak při dávkách pod 125 mg/kg nebyly zjištěny žádné histopatologické změny ve tkáni mozku, ani nebyly zpozorovány žádné změny v kardiovaskulárních parametrech či krevních elementech [122].

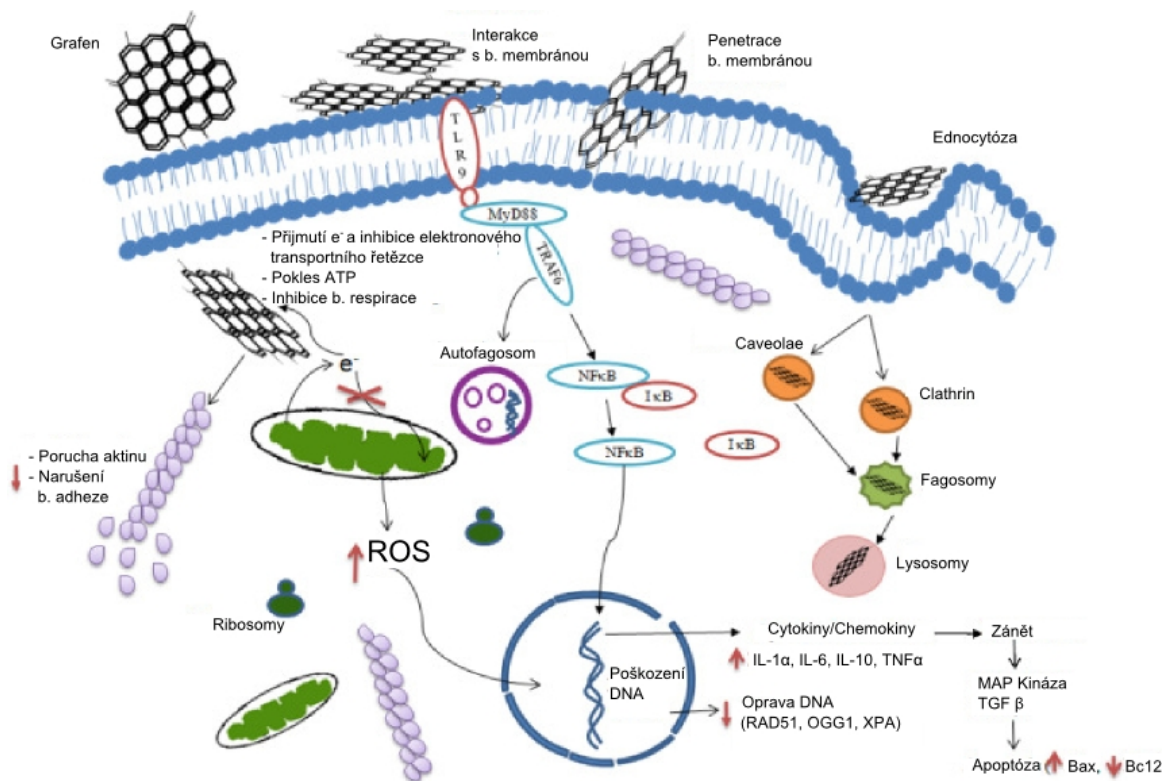
Genotoxicita (poškození DNA, chromozomální a DNA mutace [123]) grafenových nanostruktur byla zkoumána jen zřídka [124-126]. Poškození DNA se stanovuje pomocí Comet assay, což je metoda založená na gelové elektroforéze (SCGE) jednotlivých buněk.

Touto metodou lze odhalit jedno- i dvouřetězcové zlomy DNA, alkalicky labilní místa nebo kombinace těchto poškození. Výsledky elektroforézy pak vypadají jako komety – neporušené jádro vytváří tzv. hlavu komety, od které vede „ocas“ – poškozené řetězce DNA. Míra poškození DNA je úměrná délce této koncové části [125]. Mnohovrstvé GO a rGO ($> 1 \mu\text{m}$) nevykazovaly po tříhodinové inkubaci s b. linií FE1 žádné poškození DNA až do koncentrace $200 \mu\text{g/ml}$ [126]. Avšak $200\text{-}500 \text{ nm}$ velké GO způsobovaly genotoxicitu úměrnou podané koncentraci ($1\text{-}100 \mu\text{g/ml}$) [125]. Velké rGO ($3\mu\text{m}$) vykazovaly nižší cytotoxicitu než 11 nm rGO, které pronikly do jádra, kde indukovaly DNA fragmentaci a chromosomální aberaci i při nízkých koncentracích ($0,1 - 1 \mu\text{g/ml}$) [127]. Interakce GO s molekulami DNA byla zkoumána ve studii [131], která potvrdila, že GO listy jsou schopné narušit DNA a vmezeřit se do její struktury (viz Obr. 4). GO modifikované měděnými ionty (Cu^{2+}) mohou navíc rozštěpit DNA na fragmenty, což lze potenciálně využít v řadě aplikací [128].



Obr. 4: Interkalace GO do dvoušroubovice DNA a její fragmentace pomocí GO- Cu^{2+} ; převzato z [128].

Cytotoxický účinek nanomateriálů může být vyvolán navozením oxidačního stresu nebo přímým mechanickým poškozením. Nepasivované grafeny indukovaly ROS, který způsobil depolarizaci mitochondriální membrány, což vedlo ke ztrátě její integrity a k aktivaci proapoptických faktorů (*Bim* a *Bax*). Narušením permeability mitochondrií došlo k uvolnění těchto proteinů do cytosolu a k buněčné smrti (Obr. 5) [129-132]. Další cytotoxicita grafenů byla popsána ve studii [132], kde nanomateriál způsobil u makrofágů nárůst cytokinů (Th1, Th2, IL-1 α , IL-6, IL-10, TNF- α a GM-CSF) a chemokinů (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β a RANTES) [132] (Obr. 5). Mechanické poškození buněk nastalo u b. linie HepG2 po inkubaci s GO (< 50 nm) a karboxylem funkcionalizovaných grafenových listů (100 – 300 nm). Oxidační stres vznikal úměrně s podanou koncentrací i s dobou inkubace, avšak výrazný pokles viability nastal už při koncentraci 4 μ g/ml a byl způsoben poškozením buněčné membrány. Oba nanomateriály prostoupily skrz buněčnou membránu a hromadily se v cytosolu, kde interagovaly s organelami vč. mitochondrií a následně byly zapouzdřeny do vezikul (autofagosomů). Nelze bohužel objasnit, zda byl indukovaný nárůst hladiny ROS způsoben přímým kontaktem grafenových nanostruktur s mitochondriální membránou za vzniku mitochondriálního ROS, který postupně poškodil celou buňku, nebo zda byly mitochondrie poškozeny až následkem oxidačního stresu, který vznikl v celé buňce (Obr. 5) [132-133]. Avšak některé buněčné linie A549 [97] a FE1 (myší endoteliální b. plic s mutací) po inkubaci s GO a rGO nereagovaly na zvýšenou hladinu ROS poklesem viability. Pravděpodobně GO a rGO u těchto b. linií generují ROS, ale nezpůsobují cytotoxicitu [127]. Vědci měli ještě stejné poznatky u FE1 buněk inkubovaných s uhlíkovou černí, což poukazuje na to, že ROS asi není hlavní příčinou cytotoxicity u této b. linie [134-135].



Obr. 5: Interakce grafenových nanostruktur s buněčnou membránou a signální dráhy, které mohou být nanomateriály aktivovány [109].

Grafeny narušují elektronový transport v mitochondriích a tím se snižuje produkce ATP [136]. Následkem nedostatku ATP dochází k narušení F-aktinu, což způsobuje inhibici tvorby lamelpodií a tím i omezení pohybu buněk. Právě tyto vlastnosti propůjčují grafenům protinádorové účinky [109].

Bioaplikace GO a rGO

V bioaplikacích se GO i rGO využívá pro cílené doručování léčiv, jelikož GO je oproti grafenu lépe dispergovatelný a vykazuje lepší koloidní stabilitu. Obě tyto formy grafenu se také používají při fotoablacii jako fotosenzitizéry, které po ozáření generují teplo a lokálně zahubí např. nádorové buňky [88,137]. Účinnost GO je možné zvýšit jeho konjugací se samotným fotosenzitizérem jako je např. chlorin e6 (Ce6), který citlivost fotodynamické reakce ještě umocní [138-139]. Hydrofóbní protinádorová léčiva jako je doxorubicin a docetaxel mohou být na povrch grafenových nanostruktur vyvázané pomocí fyzisorpce přes π - π vazbu. Bylo potvrzeno, že takto vyvázaný doxorubicin lze z pegylovaného GO cíleně uvolnit pomocí GSH [79] nebo v prostředí s pH 5,3 [80]. Stejnou metodou je na GO možné

navázat i další chemoterapeutické léčiva jako je paclitaxel, methotraxat, které působí proti rakovině plic a prsu [84, 140]. Protinádorové účinky byly také potvrzeny na chitosanem modifikovaném GO, který byl konjugovaný s ibuprofenem [141].

2.2.4 Superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPIO)

Superparamagnetické nanočástice oxidů železa jsou široce zkoumány už řadu let, jelikož mají výborné magnetické vlastnosti, jsou biokompatibilní, biodegradabilní a jejich příprava je rychlá a nenákladná [142]. Skládají se z maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a/nebo magnetitu (Fe_3O_4), které jsou vzájemně izostrukturální fáze oxidů železa a liší se pouze výskytem vakancí ve struktuře a průměrným oxidačním stavem železa. Jejich spinelová struktura s ferimagnetickým uspořádáním magnetických momentů a nanometrová velikost zajišťuje nanočásticím jednodoméno¹ a superparamagnetismus² [143].

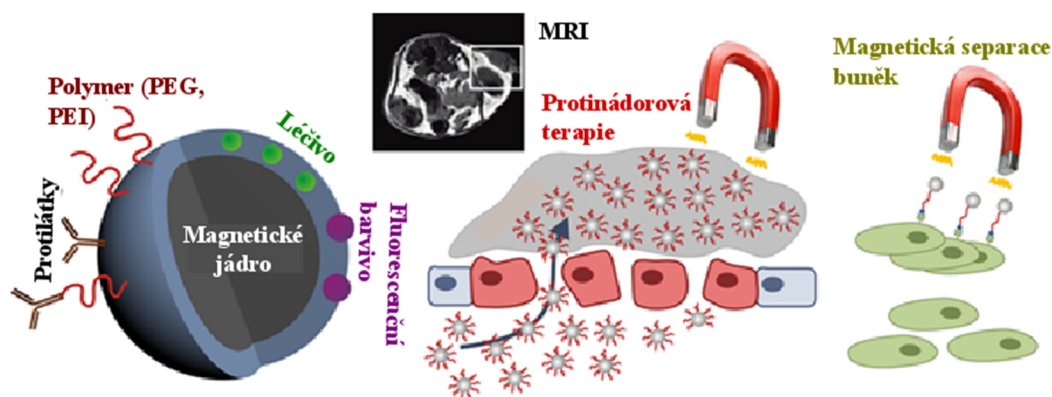
Jedná se tedy o nanočástice, které jsou vhodné pro magnetické kontrastování buněk a/nebo magnetickou separaci buněk, bílkovin a dalších elementů z roztoku, dále se využívají k protinádorové léčbě – hypertermii a jako nosiče při cíleném doručování léčiv s jejich následným uvolněním do postiženého místa, viz Obr. 6 [148-158]. Další aplikací SPIO nanočástic v medicíně je použití těchto nanočástic jako kontrastních látek pro magnetickou rezonanci (MR). Po intravenózním podání SPIO nanočástic se pomocí MRI zobrazí postižená tkáň, která je díky magnetickým nanočásticím zřetelně kontrastnější než tkáň okolní [159]. Magneticky značené kmenové buňky se využívají při regenerativní terapii, během které se sleduje biodistribuce nově transplantovaných buněk a regenerace tkáně. V MRI je pak patrné, zda kontrastované buňky aplikované intravenózně doputují k poškozené tkáni anebo nikoliv [160]. Transplantované buňky se mohou sledovat i jinými zobrazovacími technikami jako jsou počítačová tomografie (CT), pozitronová emisní tomografie (PET), jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT), avšak monitoring buněk magnetickou rezonancí (MRI)

¹ Jednodoméno¹: Zmenšením makroskopického magnetického materiálu, ve kterém jsou magnetické momenty uspořádány do Weissových domén kvůli zachování zákona minimální energie, dochází k ubývání těchto domén, které pod kritickou velikostí již nejsou energeticky výhodné a částice začne vykazovat jednodoméno¹ charakter [144-145].

² Superparamagnetismus: Jev spojený s konečným rozměrem nanočástic, který nastává pod určitou hraniční velikostí jednodoméno¹ magnetického materiálu. Jedná se o stav, kdy anizotropní energie „soutěží“ s teplotní fluktuací a dochází tak ke spontánnímu překlapaní magnetického momentu z jednoho snadného směru do druhého i bez přítomnosti vnějšího magnetického pole [146-147].

nevystavuje pacienta ionizujícímu záření a poskytuje anatomické a patologické informace o okolních tkáních (včetně edémů) [161].

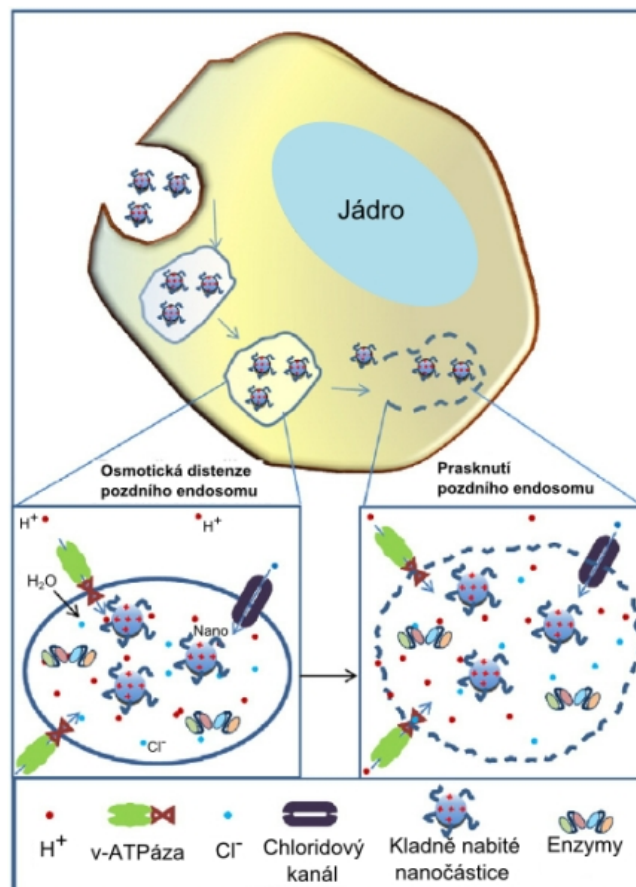
Buněčné terapie založené na monitoringu magneticky značených kmenových buněk (jejich migraci, proliferaci, diferenciaci a dosažení cílové tkáně) pomocí MRI má velice slibné výsledky, které pomáhají i při pochopení neurologických onemocnění (např. Parkinsonovy choroby) [162-164]. In vivo migraci transplantovaných embryonálních kmenových buněk a jejich diferenciaci v novou tkáň sledovali autoři Hoehn et al. 2002 [165], kteří studovali regeneraci potkaní mozkové tkáně odumřelé po mozkové příhodě. MRI je neinvazivní metoda, která v kombinaci s nanočásticemi nahrazuje patologické invazivní postupy ex vivo a navíc zajišťuje vysoké rozlišení v čase i v prostoru. Ve zmíněné studii byly použité komerční nanočástice oxidu železa s dextranem na povrchu (SINEREM) a díky tomu byla potvrzena i migrace kmenových buněk k ischemické lézi [165]. Dextran-SPIO jsou schválené FDA (US Food and Drug Administration) jako komerční kontrastní látka pro MRI [157, 166]. Intravenózně podané nanočástice oxidů železa (IONPs) jsou vychytány makrofágy v retikuloendoteliálních orgánech [167], buňkami metabolizovány a v těle vyvážány ve formě železa do molekul ferritinu nebo hemoglobinu [157, 166]. Autoři Bulte et al. používali kmenové buňky jako imunologické „pouzdro“, které chránilo tělo před nežádoucí imunologickou reakcí a nanočástice před předčasným rozložením či postupným vyloučením z těla [157]. Maximální zásoba Fe v lidském organismu je 4000 mg, vyšší dávka Fe v krevní plazmě by vyvolala přetížení kapacity transferinu i ferritinu a následně oxidační stres, který by vedl k poškození srdeční a jaterní tkáně [168]. Využití SPIO nanočástic v kombinaci s kmenovými buňkami je velice široké a bylo předmětem již řady studií [165, 169-178] a i přesto se stále vyvíjí nové nanočástice (s různým povrchem, tvarem a velikostí) a zkoumá se jejich chování na in vitro úrovni.



Obr. 6: Aplikace magnetických nanočástic; upraveno podle [179]

2.3 Vliv povrchového náboje na buněčný uptake a cytotoxicitu

Jak již bylo zmíněno, toxicita nanomateriálů je ovlivněna především jejich tvarem, velikostí, chemickým složením, povrchovou reaktivitou, hydrofilními a hydrofobními vlastnostmi, koloidními vlastnostmi a povrchovým nábojem [179]. Cytotoxicita nanomateriálů úzce souvisí s povrchovým nábojem dané nanostruktury, jelikož ovlivňuje míru interakce s buněčnou membránou, adsorbci biomolekul na jejich povrch (zamezení/způsobení agregace nanočástic) a následný průnik do vnitrobuněčného prostředí. Z těchto důvodů se nanomateriály pro biologické aplikace povrchově funkcionalizují [67, 180-181]. Modifikace povrchu nanočástic ovlivňuje interakci nanomateriálu s plasmatickou membránou [179], buněčný uptake a následně i vnitrobuněčné interakce [180]. Polyethylenglycol (PEG) je biokompatibilní a biodegradabilní polymer [44, 182-183], používaný především pro pasivaci nanomateriálů, kterým zajišťuje neutrální náboj. Nanomateriál s neutrálním povrchovým nábojem minimalizuje nespecifické interakce (absorbci proteinů), cytotoxické účinky i imunologické reakce [68]. Polyethylenimin (PEI) je kationtová makromolekula běžně používaná pro genovou terapii, protože vykazuje výborné transfekční vlastnosti [184]. Tento polymer interaguje se záporně nabitými proteiny, které jsou přítomné v cytoskeletu (aktin a beta-tubulin) [185] a mění membránovou integritu. PEI je tedy často používaný pro funkcionalizaci povrchů nanočástic, které pak díky kladnému náboji rychle prostupují přes buněčnou membránu. Nicméně, PEI-nanočástice jsou schopné narušit endosomální membránu, dostat se do cytosolu a následně i do jádra, kde se váží na DNA [186-187]. Tento jev se nazývá „proton sponge effect“ (Obr. 7) a je způsoben interakcí nenasycených amino skupin polymeru s protony, které jsou do endosomu/lyzozomu čerpány ATPázou [188]. Existují ale studie, které potvrzují, že PEI působí v lyzosomech jako pufr, který zde pH vyrovnává [189-193]. Další domněnkou je, že stabilizaci pH v lyzosomech obsahujících PEI zajišťuje samotná ATPázová pumpa. Příčiny narušení lyzozomu a následné uvolnění PEI do cytosolu, nejsou tedy ještě zcela objasněny [194].

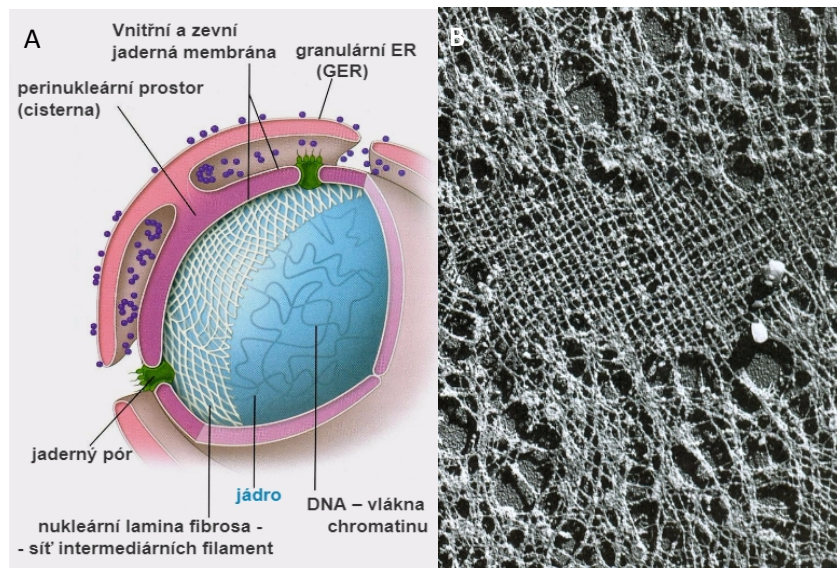


Obr. 7: Znárodnění endocytózy kladně nabitých nanočástic a následné poškození endosomů a vyplavení nanočástic do cytosolu – proton sponge effect; upraveno podle [195].

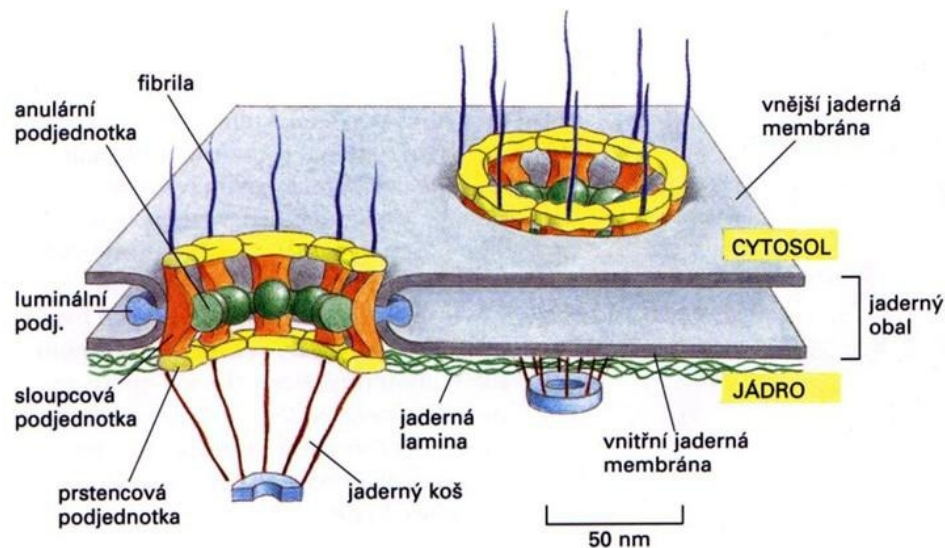
2.3.1 Průnik nanočástic přes jadernou membránu

Všechny fyziologicky důležité děje jsou v eukaryotických buňkách řízeny z buněčného jádra (nukleus), které je obaleno dvojitou fosfolipidovou membránou. Tato „obálka“ jádro chrání a odděluje od cytoplazmy (Obr. 8 A). V jaderné membráně (JM) jsou zanořené nukleární pórové komplexy (NPK), skrz které probíhá mezi jádrem a cytoplazmou difúze iontů, malých molekul a transport proteinů a RNA [196-197]. Vnější část JM je propojená s endoplazmatickým retikulem (ER) a mezimembránový (perinukleární) prostor je propojen s lumen ER. Pod vnitřní vrstvou JM se vyskytuje jaderná lamina – vláknitá síť z proteinů (laminů), která zajišťuje tvar a mechanickou odolnost celého jádra (Obr. 8 B). Laminy (60 – 80 kDa) jsou proteiny obsažené v intermediárních filamentech cytoskeletu [198], které vedou z periferie buňky, kde jsou ukotveny v místech mezibuněčných spojů až

k jádru (viz Obr. 9) [199]. Jaderná lamina na sebe váže chromatin, který je v jádře uspořádán do velkých smyček DNA (viz Obr. 8 A), jejichž části jsou navázané na JM [198].



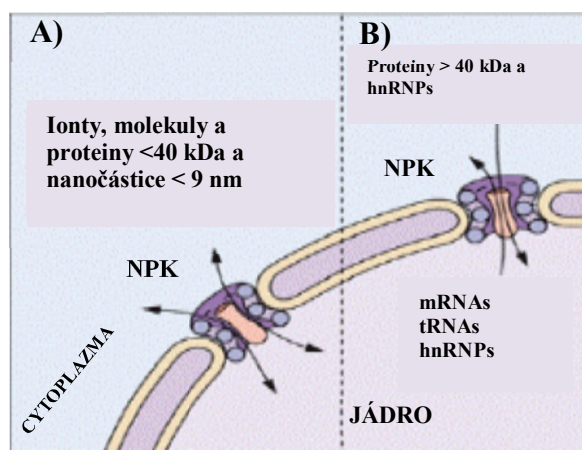
Obr. 8: A) Schématická struktura jádra, B) Mikroskopicky zobrazená struktura jaderné laminy nazývané také jako lamina fibrosa; převzato z [200].



Obr. 9: Struktura nukleárního pórového komplexu; převzato z [201].

Prostup nanočástic do jádra je omezen průměrem jaderných pórů, resp. nukleárního pórového komplexu (NPK). Jaderné póry jsou proteinové komplexy složené z nukleoporinů, které protínají jaderný obal a vytvářejí nukleární pórový komplex (viz Obr. 9). Velikost a struktura NPK může být rozdílná mezi jednotlivými typy eukaryotních buněk (od kvasinek až po vyšší eukaryota), ale i druhově mezi obratlovci a bezobratlými [196]. Experimentálně bylo ověřeno, že „funkční“ průměr centrálního póru oocytů Drápatky vodní je ~ 30 nm (v testu byly použité 26 nm velké nanočástice zlata). Tento rozměr se jen lehce liší

od udávaného “fyzikálního” průměru 40 nm [202]. Délka centrálního póru je ~ 90 nm a průměr v nejužším místě (ve střední části NPK) je 45 – 50 nm. V nejširší části (v jaderné periferii) je průměr ~ 70 nm [203-205]. Molekuly do jádra prostupují skrz NPK dvěma mechanismy podle jejich velikosti. Malé molekuly a některé proteiny s molekulovou hmotností menší než 50 kDa prostoupí skrz jadernou membránu oběma směry (z cytoplazmy do jádra, z jádra do cytoplazmy) pasivním způsobem (difúzí) skrz vodní kanály, které mají v NPK průměr ~ 9 nm [198, 206]. Tímto způsobem tedy do jádra neprojdou nanočástice větší než 9 nm [207]. Nádorové buňky HeLa mají tyto kanály užší a tím i průnik molekul omezenější – podle studie [208] difúzně projdou pouze proteiny do 2,5 nm, autoři v jiné studii [209] uvádí velikost difúzně transportovaných molekul 4,9 – 5,7 nm. Rozdílné výsledky mohou být ovlivněny mírou permeabilizace³ buněčné membrány a vybranými molekulami, které do jádra mají proniknout [209]. Avšak větší množství makromolekul (proteinů a RNA) nemůže přes otevřené kanály projít, a proto využívají druhého mechanismu, který je založen na aktivním transportu (Obr. 10). Dochází k tzv. selektivnímu transportu v jednom směru (z cytoplazmy do jádra nebo z jádra do cytoplazmy). Tyto signální kanály se mohou otevřít na víc jak 25 nm [198]. NPK je složen z nukleoporinů, které regulují penetraci pórů. Počet zanořených NPK do jaderné membrány jedné eukaryotické buňky člověka je 3000 – 4000 [211].



Obr. 10: Pasivní (A) a aktivní (B) transport molekul, proteinů a RNA jadernou membránou; pasivní transport – difúze; NPK – nukleární pórový komplex, hnRNPs – heterogenní nukleární ribonukleové proteiny, mRNA – messenger RNA, tRNA- transferová RNA; upraveno podle [212].

³ Permeabilizace buněčné membrány se provádí digitoninovou frakcionalizací. Digitonin je rostlinný glykosid, který v nízkých koncentracích rozpouští cholesterol v plazmatické membráně a tím se v ní vytvoří velké póry. Při vyšších koncentracích digitonin rozpouští i vnitrobuněčné membrány (endoplazmatického retikula nebo mitochondrií) [210].

3 KOMENTÁŘE A DISKUZE JEDNOTLIVÝCH PUBLIKAČNÍCH VÝSTUPŮ

Plazmatická membrána je z velké části záporně nabitá a jen malé mikrodomény (tzv. rafty) nesou kladný náboj. Obecně se tedy kladně nabitě nanočástice považují za více toxické, jelikož pronikají do buňky rychleji, kde interagují s jednotlivými organelami včetně jádra. Záporně nabitě nanočástice interagují s menšími částmi membrány a buňky se s jejich pohlcením lépe vyrovnávají. Nejšetrnější je však neutrální náboj nanomateriálu, který na sebe nevyvazuje okolní elementy z kultivačního média a nemění se tak jeho povrchové vlastnosti. Z tohoto důvodu se nanomateriály modifikují neutrálně nabitým polymerem PEG. Každá chemická úprava však může být potencionálním zdrojem toxických látek a proto jsme se zaměřili na kvalitně syntetizované nanomateriály (SPIO, CDs, grafen a jejich hybridní systémy) bez povrchových úprav a stanovili jejich toxicitu.

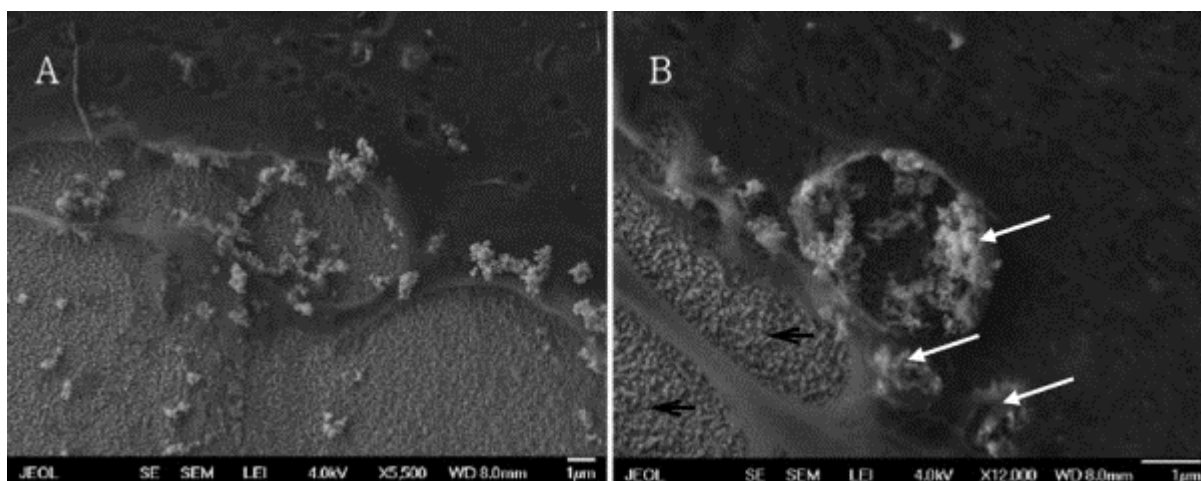
3.1 Interakce SPIO nanočástic s mesenchymálními kmenovými buňkami (MSCs)

3.1.1 Detekce nanočástic uvnitř buněk pomocí skenovacího elektronového mikroskopu s autoemisní tryskou

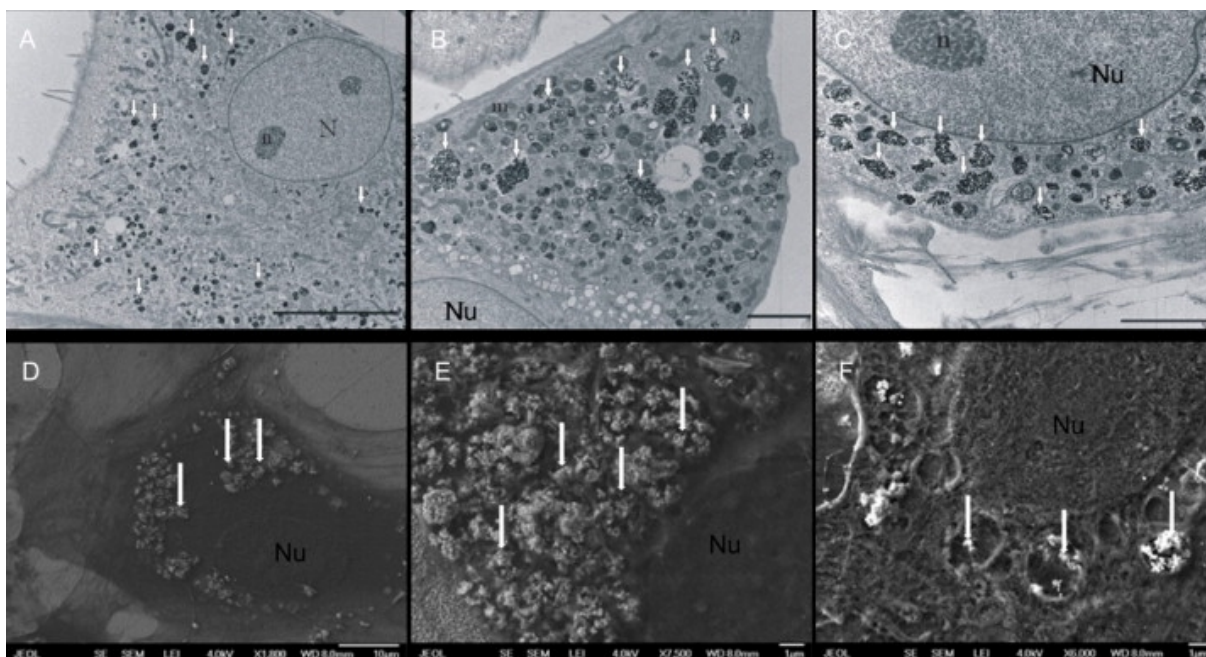
Distribuce nanomateriálu uvnitř buněk je důležitá informace každé nanobiotechnologicky zaměřené studie. Tento metodický článek (viz Příloha 1) byl sepsán za účelem kvalitního zobrazení buněk značených nanočásticemi pomocí elektronové mikroskopie.

Skenovací elektronový mikroskop (SEM) se převážně používá pro zobrazování povrchových struktur, jelikož primární svazek elektronů skenuje povrch vzorku. Naopak v transmisní elektronové mikroskopii (TEM), která se běžně pro biologické vzorky používá, musí elektrony prostoupit skrz vzorek a proto je nezbytné vzorek nakrájet na poloténkové nebo ultraténkové řezy. Skenovací elektronovou mikroskopii s autoemisní tryskou (FE-SEM) jsme dosáhli stejných výsledků jako s transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) a to díky kombinaci vysokého rozlišení FE-SEM a nově použitého vodivého materiálu (sklíčka s vrstvou fluóru dopované SnO₂, zkráceně FTO), který zajistil vysokou stabilitu biologického vzorku i při vyšším urychlovacím napětí (nutného především při materiálovém kontrastu

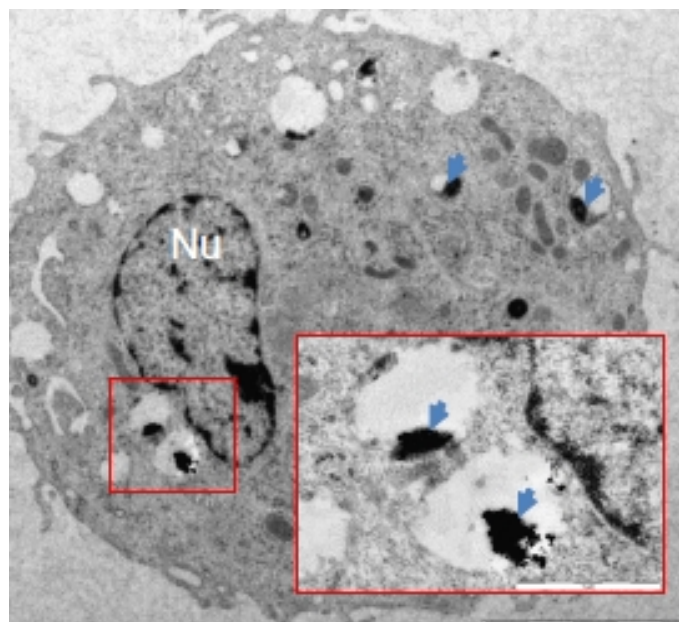
a EDS analýze). Magneticky značené buňky adherované na FTO se i po běžné úpravě vzorku pro elektronovou mikroskopii (fixaci, dehydrataci a sušení) daly zobrazit ve vysoké kvalitě a to včetně jednotlivých endo/lyzomů naplněných nanočásticemi (Obr. 11 A) i počátku endocytózy nanočástic (viz Obr. 11 B). Biologické vzorky jsou nevodivé a pokud nejsou pokovené, dochází k hromadění elektronů z primárního svazku na jejich povrchu a vzniká tzv. nabíjení. To je častým důvodem poškození vzorku nebo omezením pro větší zvětšení. Pokovením vzorku, u kterého je důležité sledovat distribuci nanočástic, by došlo k dekontaminaci nanočástic s jiným kovem a tím i ke zkreslení výsledků. K detekci nanočástic uvnitř buněk se běžně používá TEM, avšak příprava vzorku je časově i technicky náročná (převádění do acetonu, sušení, zalévání do pryskyřice, krájení na ultramikrotonu), proto zobrazení nanočástic v buňkách pomocí SEM nese velké výhody včetně zachování tvaru buněk. Mikroskopické snímky získané SEM byly porovnány s jinou studií [215], která k detekci nanočástic v kmenových buňkách použila TEM (viz Obr. 12). Výskyt nanočástic v endo/lyzosomech byl potvrzen i materiálovým kontrastem pomocí zpětně odražených elektronů a EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) analýzou povrchu vzorku. Pro porovnání vlastních výsledků byly připraveny a zobrazeny vzorky i v TEM (viz Obr. 13), aby bylo potvrzeno, že nanočástice se skutečně vyskytují v endo/lyzosomech.



Obr. 11: A) počátek endocytózy nanočástic, zvětšení 5500x, B) Primární endosomy plné nanočástic, zvětšení 12 000; černé šipky znázorňují hrubý povrch FTO, bílé šipky ukazují pohlcené nanočástice; zobrazeno mikroskopem FE-SEM JEOL 7401F.

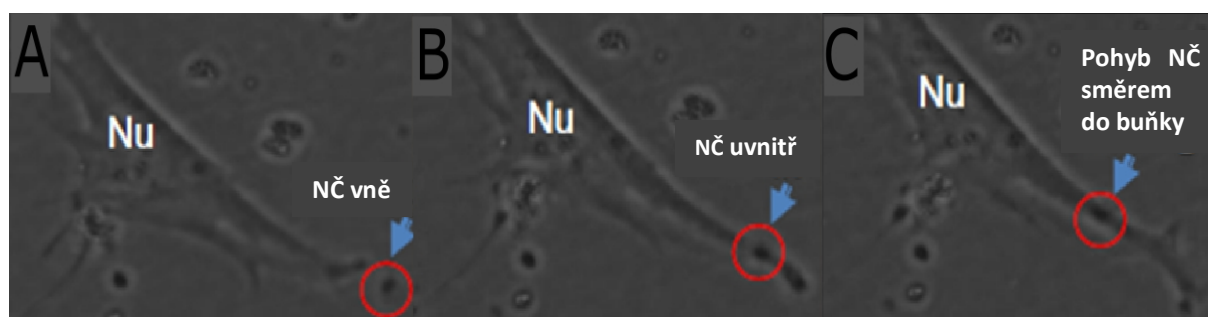


Obr. 12: Výskyt nanočástic uvnitř buněk - porovnání snímků z TEM a SEM; (A-C) TEM snímky převzaté ze studie Horák 2009 [213], (D-F) FE-SEM snímky; bílé šipky znázorňují nanočástice v endosomech, které byly lokalizované kolem jádra (Nu); zobrazeno mikroskopem FE-SEM JEOL 7401F.

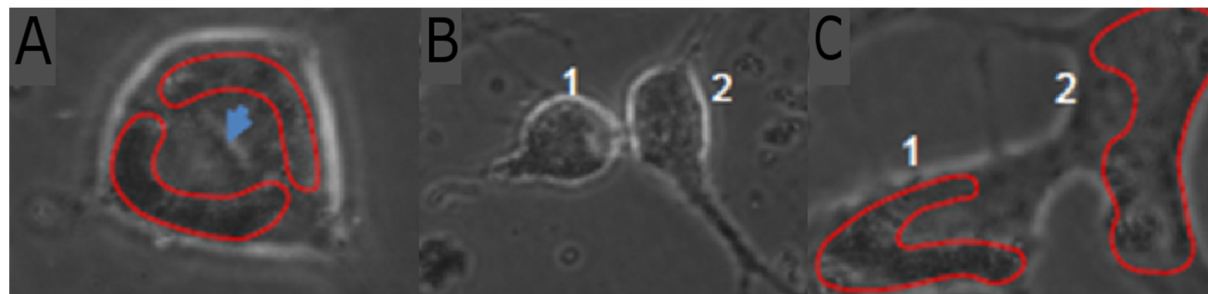


Obr. 13: TEM snímek mesenchymální kmenové buňky značené SPIO nanočásticemi; červené ohrazení zvýrazňuje endosomy s nanočásticemi (viz modré šipky); měřítko 2 μ m, zobrazeno mikroskopem JEOL-JEM 1010.

Adsorpce nanočástic na buněčnou membránu a následná endocytóza nanočástic byla zachycena i přímým monitoringem pomocí časosběrné mikroskopie, která snímala zorné pole každou minutu po dobu 24 hod. Ze všech snímků bylo vytvořeno video s buněčným uptakem SPIO nanočástic (Obr. 14). Pozorování také zachytilo mitózy magneticky značených buněk (hMSCs) a asymetrické rozdělení nanočástic do dceřiných buněk (Obr. 15). Snímky z časosběrného mikroskopu (buněčný uptake a dělení buněk) nebyly součástí této publikace, jelikož se nejednalo o výsledky z elektronové mikroskopie.



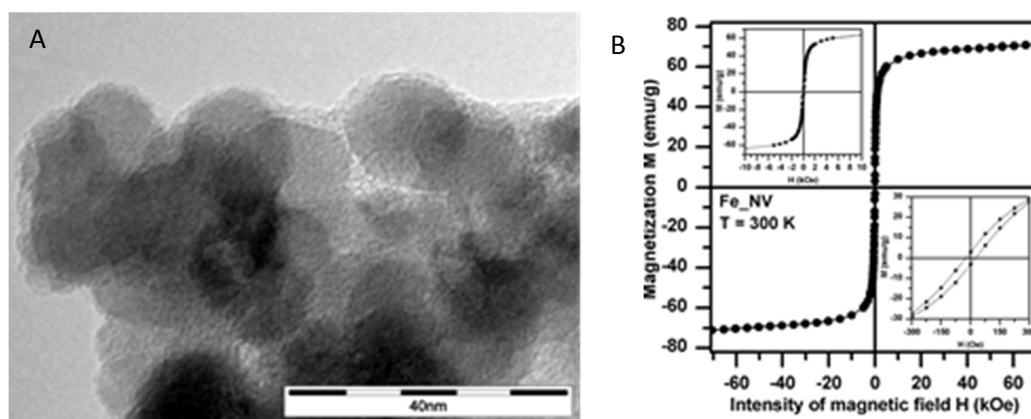
Obr. 14: Pohlcení nanočástic (NČ) buněčnou membránou; Klastř nanočástic je zvýrazněn červeným kroužkem a modrou šipkou. A) Nanočástice se vyskytují v okolí buňky, B) Pohlcení nanočástic do buňky, C) Pohyb nanočástic v buňce do okolí jádra, kde se endosomy shlukují.



Obr. 15: Mitóza magneticky značené mesenchymální kmenové buňky; A) Buňka v metafázi, modrá šipka znázorňuje chromozomy v ekvatoriální rovině dělicího vřeténka, červené oblasti ohraničují výskyt nanočástic v buňce, B) Vznik dceřiných buněk, C) Cytokineze a asymetrické přerozdělení nanočástic do dceřiných buněk; zobrazeno mikroskopem BioStation (Nikon).

3.1.2 Značení mesenchymálních kmenových buněk novými povrchově nemodifikovanými superparamagnetickými maghemitovými nanočásticemi v porovnání s komerční kontrastní látkou Resovist – základní in vitro studie

V rámci této studie (viz Příloha 2) byl sledován magnetický kontrast a kompletní cytotoxicita SPIO nanočástic s OH- skupinou na jejich povrchu a kontrastní látky Resovist vůči lidským a potkaním mezenchymálním kmenovým buňkám (rMSCs, hMSCs). Maghemitové nanočástice nazývané SAMN s velikostí 10-20 nm (viz Obr. 16) byly připravené redukcí borohydridu za vzniku magnetitu, po jehož zahřátí (400°C) došlo k oxidaci na maghemit. Podrobný postup je popsán v článku [214], podle kterého byly nanočástice stejnými autory pro tuto studii připraveny. Následně byla provedena charakterizace fyzikálních vlastností a porovnána s kontrastní látkou Resovist (viz Tab. 2). Velikostní distribuce nanočástic SAMN je znázorněna na snímku z TEM (Obr. 16 A) a superparamagnetické vlastnosti jsou vyjádřeny hysterézní smyčkou měřenou při 300 K na Obr. 16 B. Tato vysoká míra magnetizace (71 A·m²/kg při 7 T) propůjčuje SAMN nanočásticím výborné magnetické vlastnosti i v nízkém magnetickém poli, což je pro aplikaci v MRI velmi důležité.

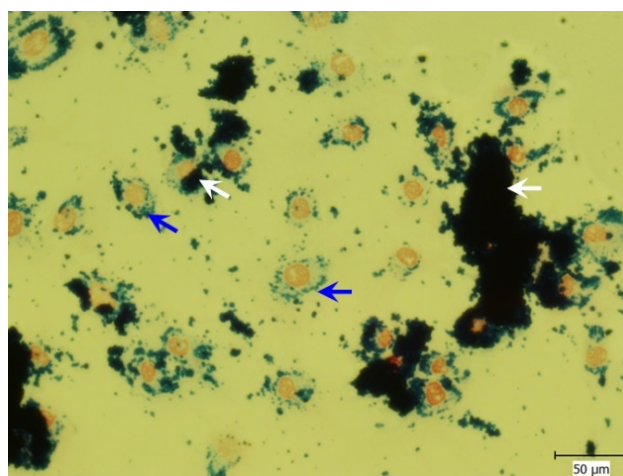


Obr. 16: TEM snímek SAMN nanočástic (A), magnetické vlastnosti SAMN nanočástic (B).

	SAMN	Resovist
Magnetické vlastnosti	Superparamagnetické	Superparamagnetické
Složení mag. jádra	γ -Fe ₂ O ₃	γ -Fe ₂ O ₃ a Fe ₃ O ₄
Modifikace povrchu	žádná	Karboxydextran
Velikost	10-20 nm	45-60 nm
Zeta potenciál (pH 7)	-22,5 mV	-20 mV
r_2	44,79 mM ⁻¹ (Fe) s ⁻¹	151 mM ⁻¹ (Fe) s ⁻¹
r_2^*	400 mM ⁻¹ (Fe) s ⁻¹	300 mM ⁻¹ (Fe) s ^{-1#}

Tab. 2: Porovnání fyzikálně-chemických vlastností nanočástic; r_2^* je převzato z [215].

Interakce nanočástic s kmenovými buňkami byla zmíněna v předchozí publikaci zaměřené na mikroskopii, proto bude rovnou popsána účinnost značení těmito nanočásticemi (tzn. stanovení obsahu Fe iontů v jednotlivých buňkách) a jejich cytotoxicita. Pro ověření buněčného uptake byl použit speciální kit obsahující červené barvivo specifické pro kontrastování buněčných jader a Pruskou modř, která modře obarví nanočástice (světlý odstín – nanočástice (nč) uvnitř buněk, tmavě modrá – nč vně buněk, viz Obr. 17).



Obr. 17: Obarvené buňky Pruskou modří zobrazeny v optickém mikroskopu – modré šipky ukazují na zabarvené nanočástice uvnitř buněk, bílé šipky znázorňují nanočástice v okolí buněk.

Obsah železa v buňkách byl stanoven pomocí atomové absorpční spektrometrie (AAS). Získané hodnoty Fe byly přepočítány na jednotlivé buňky, jejichž počet byl před analýzou určen. Výsledky po 48 hodinové inkubaci nanočástic s hMSCs jsou uvedené v Tab. 3.

	Fe_{SAMN} [pg/buňka]	Fe_{Resovist} [pg/buňka]
hMSCs od dárce 1	101,4	27,9
hMSCs od dárce 2	104,9	39,6
hMSCs od dárce 3	135,3	50,3
Průměr ± SD	113±15	39±9

Tab. 3: Množství Fe v jednotlivých buňkách po 48 hod inkubaci se SAMN a Resovistem; podaná koncentrace 50 µg/ml.

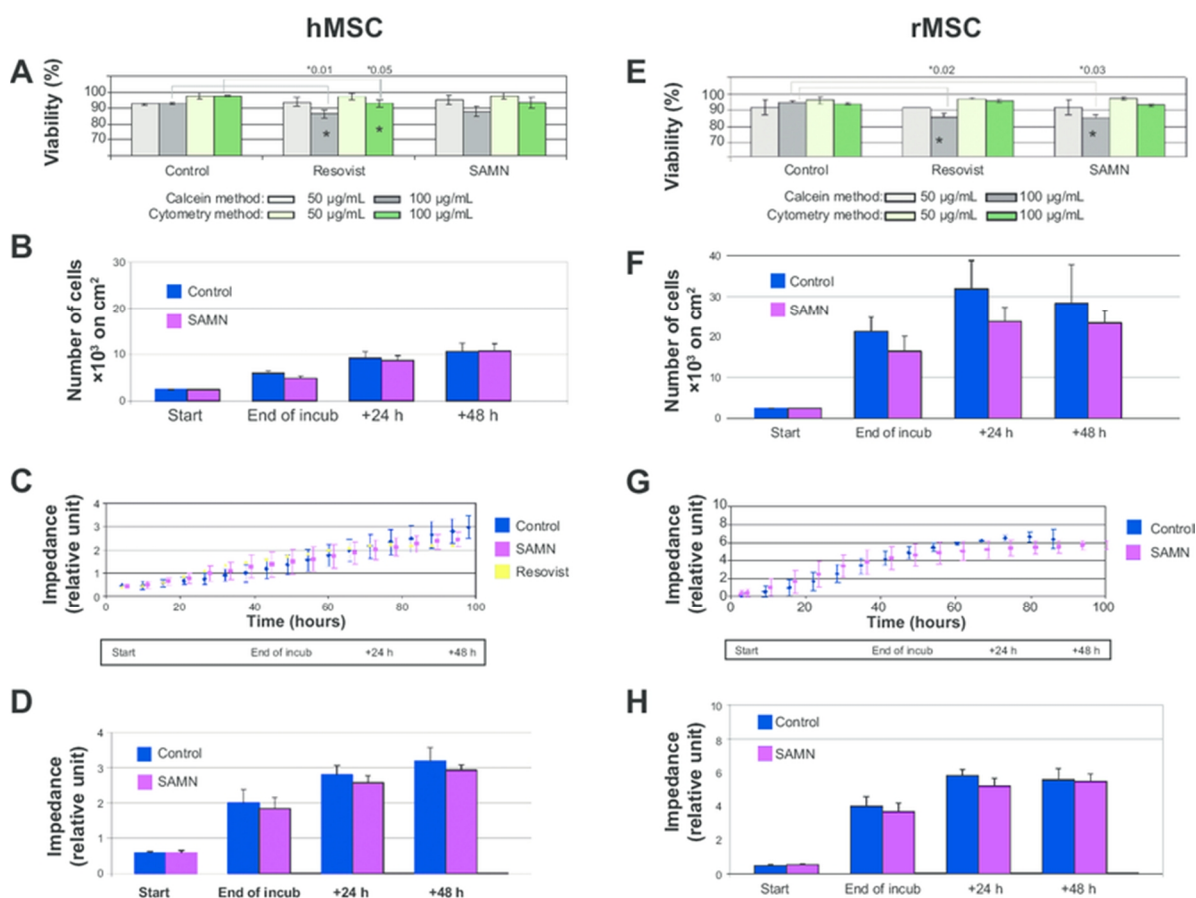
Z uvedených výsledků vyplývá, že obsah Fe v buňkách značených nanočásticemi SAMN je téměř trojnásobný (113±15 pg/buňka) ve srovnání s Resovistem (39±9 pg/buňka). Optimální dávka Fe je 25 pg/buňka a minimální požadavek na MRI kontrast je 1,4 – 3 pg Fe/buňka [216]. Oba vzorky jsou tedy velice silnými kontrastními látkami.

Viabilita značených buněk byla stanovena jednak mikroskopicky pomocí fluorescenčního kitu LIVE/DEAD, který odlišně barví živé/mrtvé buňky a následně i průtokovou cytometrií. Proliferace byla určena také mikroskopicky a pomocí speciální techniky xCELLigence založené na měření impedance adherovaných buněk. Změny ve viabilitě i proliferaci buněk hMSCs a rMSCs jsou znázorněny na Obr. 18.

Nejdříve byla stanovena viabilita buněk v koncentrační řadě 10- 200 µg/ml a z těchto výsledků byly vybrány dvě koncentrace vhodné pro dlouhodobé pozorování (50 a 100 µg/ml). Buňky označené těmito koncentracemi byly s nanočásticemi inkubovány 48 hod a viabilita i proliferace byla měřena již zmíněnými nezávislými metodami.

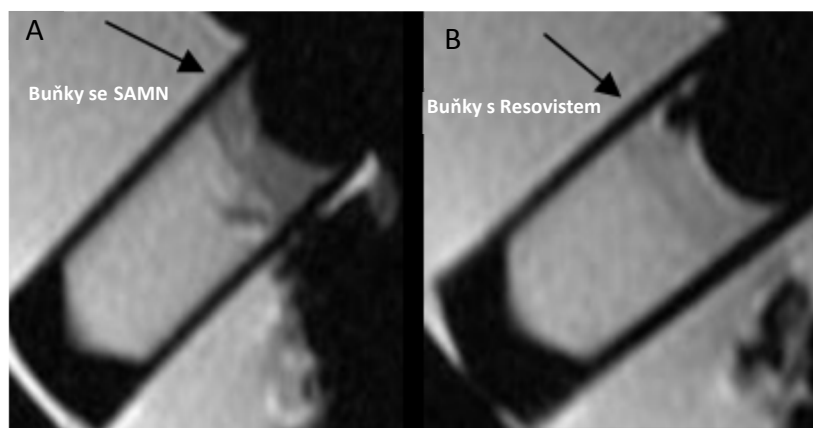
Jak je patrné z grafů na Obr. 18 A a E, viabilita obou typů buněk značených SAMN i Resovistem neklesla pod 85%. Výrazné změny mezi lidskými a potkaními kmenovými buňkami nastaly až v proliferaci. Při mikroskopické metodě se množství značených hMSCs úměrně zvyšovalo s kontrolou, zatímco výsledky z impedanční metody ukazují mírné navýšení značených buněk oproti buňkám kontrolním. Značené rMSCs výrazně přerůstaly kontrolu u všech použitých metod, impedanční metoda však znázornila vyrovnání počtu značených i kontrolních buněk po 48 hod (Obr. 18 H).

Diferenciace značených a kontrolních buněk byla stanovena pomocí speciálního kitu StemPro Osteogenesis a StemPro Adipogenesis a nebyly zaznamenány žádné změny oproti kontrolním buňkám.

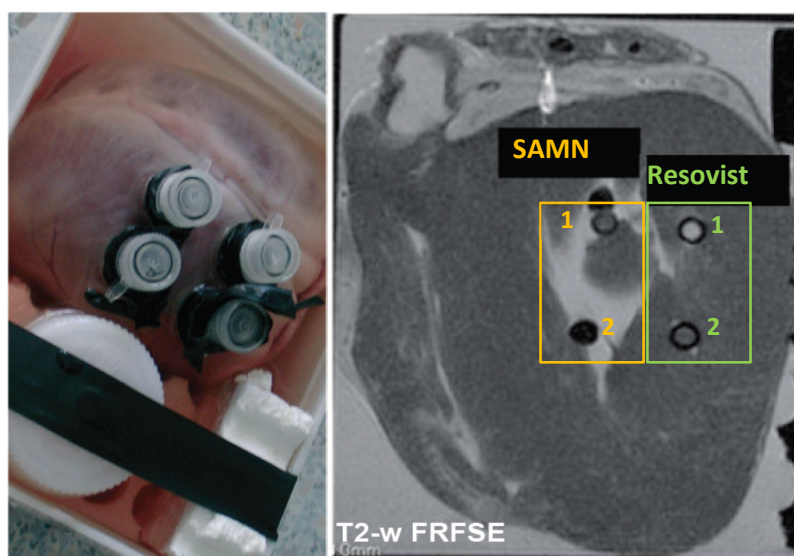


Obr. 18: Viabilita a proliferace buněk hMSCs (A – D) a rMSCs (E-H) po označení SAMN nanočásticemi. Kategorie „Start“ znamená začátek inkubace buněk s nanočásticemi, kategorie „End of incub“ znázorňuje počet buněk před výměnou média a ukončení inkubace se vzorkem.

Negativní MRI kontrast SAMN i Resovistu byl měřen na přístroji Sigma HORIZON Lx při magnetické indukci 1,5 T. Koncentrační řada (10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg a 80 µg Fe₂O₃ na ml) obou vzorků byla připravena do agarových fantomů a změřena v T₂ vážených sekvencích. Zmíněné koncentrace byly následně inkubované s hMSCs i rMSCs po dobu 48 hod, zality do agaru a také změřeny v magnetické rezonanci. MRI kontrast magneticky značených buněk byl následně porovnán se srdeční tkání, která byla izolovaná z prasete (viz Obr. 20). Srdeční tkáň byla vybraná záměrně, jelikož hMSCs by měly být v budoucnu aplikovány k regeneraci nekrotické srdeční tkáně vzniklé po infarktu myokardu. Z obou obrázků (19 a 20) vyplývá, že buňky značené SAMN měly vyšší negativní kontrast a bylo možné ho zřetelně rozlišit od okolní tkáně.



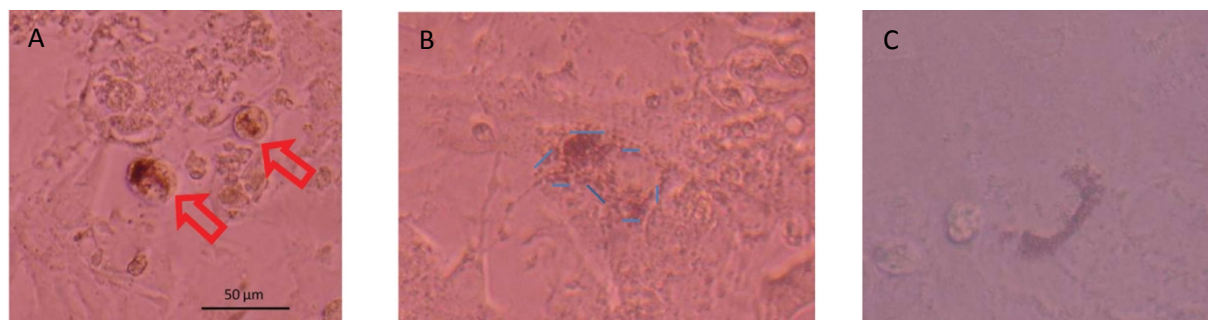
Obr. 19: Negativní kontrast buněk značených nanočásticemi (A) SAMN, (B) Resovistem; černé šipky ukazují oblast zkumavky s agarem obsahujícím značené buňky.



Obr. 20: MRI zkumavek s kontrastovanými hMSCs a porovnání šedi s okolní srdeční tkání izolované z prasete. Oranžově jsou označené vzorky se SAMN a zeleně vzorky s Resovistem. Zkumavky se liší počtem buněk (1) 50×10^3 a (2) 500×10^3 . Použitá koncentrace nanočástic ke značení buněk byla $50 \mu\text{g/ml}$, délka inkubace 48 hod.

Za účelem aplikace SAMN nanočástic v regenerační terapii tkání byla provedena kokultivace rMSCs označených SAMN nanočásticemi s potkaními myocyty. Na Obr. 21 je zřejmé, že po injekci rMSCs-SAMN (Obr. 21 A) se buňky začlenily mezi tepající myocyty (Obr. 21 B) a vytvořily elastickou tkáň (Obr. 21 C), přestože myocyty tepaly. Pevnost přilnavosti rMSCs ke kultivační misce byla testována pouze promytím vzorku, elasticita srostlé tkáně byla zachycena časosběrným mikroskopem. Tepající tkáň myokardu

a implantované rMSCs byly dlouhodobě kokultivovány až po dobu 30ti dnů, během kterých se značené buňky i množily.



Obr. 21: Kokultivace rMSCs značených SAMN nanočásticemi s tepajícími potkaními myocyty. (A) Snímek ihned po injekci rMSCs-SAMN k myocytům; červené šipky ukazují rMSCs s nanočásticemi (B) rMSCs-SAMN adherované ke kultivační misce po 24 hod inkubaci s myocyty; znázorněno modrou přerušovanou čarou, (C) týdenní kokultivace.

Cílem tohoto článku bylo testování biokompatibility nové kontrastní látky vhodné pro MRI. Řada komerčních kontrastních látek byla z trhu stažena z ekonomických důvodů [216] nebo kvůli nedostatečné biokompatibilitě [217-218]. SAMN nanočástice ze stechiometrického maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) mají superparamagnetické vlastnosti a nejsou povrchově modifikované. Jejich záporný náboj a stabilní chování zajišťují šetrnou interakci s buněčnou membránou, která je z velké části záporně nabitá [219]. Uptake záporně nabitých nanočástic je postupný, jelikož se částice nejdříve na membránu adsorbují a následně jsou pohlceny skrz endocytózu. Kladně nabitě nanočástice jsou pohlcovány pomocí clathrin- nebo calveolin-zprostředkovanou endocytózu [220] či samotnou difúzí, ta však závisí na velikosti nanomateriálu. Po optimalizaci podané koncentrace je značení kmenových buněk SAMN nanočásticemi velice šetrné, buňky si nanočástice přeskupí na různě veliké klastry, adsorbují na membránu a následně pohltní. Uvnitř buněk se SAMN nanočástice vyskytují v endo/lyzozomech, které se v závislosti na koncentraci podaných nanočástic, akumulují v cytoplazmě. Uptake SAMN nanočástic a jejich distribuce uvnitř kmenových buněk byly popsány již v Kap. 3.1, v podkapitole I.

SAMN nanočástice jsou tedy slibnou MRI kontrastní látkou, která má silnou odezvu i v nízkém magnetickém poli. Jejich syntéza je ekonomicky nenáročná a biologické vlastnosti jsou velice příznivé včetně již popsaných biodegradabilních vlastností maghemitových nanočástic v živých organismech [142]. Povrch SAMN nanočástic není chemicky modifikován a tím je potenciální toxicita vzorku minimalizována. Pro oba typy kmenových

buněk (hMSCs i rMSCs) byla stanovena optimální koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$, při které došlo během 48 hod k efektivnímu pohlcení nanočástic do buněk, aniž by nastalo snížení viability nebo inhibice/stimulace proliferace. Uptake SAMN nanočástic byl vyšší než u komerčních nanočástic Resovist a proto měly buňky značené SAMN nanočásticemi excelentní kontrast v T2 vážených sekvencích při 1,5 a 7 T. SAMN nanočástice jsou tedy nadějnou kontrastní látkou pro budoucí využití při MRI diagnostice.

3.2 Interakce uhlíkových nanostruktur s myšními fibroblasty NIH/3T3

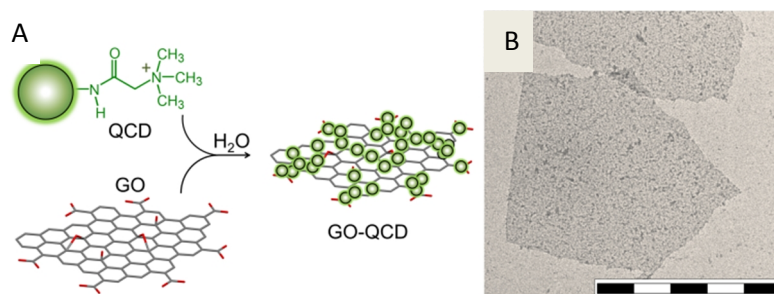
3.2.1 Grafen oxid modifikovaný kvarterními uhlíkovými tečkami pro selektivní zobrazování buněk – kontrolované značení jádra i cytoplazmy

Jak již bylo zmíněno distribuce nanomateriálů uvnitř buněk souvisí s velikostí a povrchovým nábojem nanomateriálu. V této studii (viz Příloha 3) byl testován hybridní nanomateriál složený ze záporně nabitého grafen oxidu (GO) a kladně nabitých kvartérních uhlíkových teček (QCDs). Hybridní systém GO-QCDs nesl vlastnosti obou typů nanomateriálů - biokompatibilního chování GO a fluorescenčních vlastností QCDs. Obecně CDs nabízí další výhody jako je chemická inertnost, široký excitační pás a výborná fotostabilita, což z nich dělá slibný materiál pro optické zobrazování buněk a jejich pozorování v těle [221]. Několik studií potvrdilo, že CDs mohou být využity jako fotosenzitizery ve fotodynamické terapii [222-223]. CDs se tedy řadí mezi nová teranostika s vysokým aplikačním potenciálem na aplikace.

Mnoho terapeutických metod je založeno na doručení aktivních látek do blízkosti buněčného jádra a následně jejich prostup do jádra, čímž by měly vyvolat apoptózu [224]. Dodnes nebylo zaznamenáno, že by CDs bez povrchových úprav prostoupily přes jadernou membránu [225]. Ve všech dosavadních studiích se CDs vyskytovaly v buněčné membráně nebo v cytoplazmě [225] nebo byly CDs povrchově upravené [226]. Náš experiment poprvé potvrdil prostup nemodifikovaných CDs do buněčných jader b. linie NIH/3T3 [227]. Následně autoři Y. F. Kang at al. [228] syntetizovali dusíkem dopované CDs a prokázali přítomnost těchto teček v jádrech nádorových b. liniích (PC12, A549, HepG2, MD-MBA-231). Polyethylenem funkcionalizované GQDs byly připravené autory H. Wang et al., kde bylo využito již zmiňovaného polyethyleniminu (PEI) k prostupu do buněčných jader [226].

V této práci jsme se zaměřili na využití elektrostatických interakcí mezi kladně nabitými uhlíkovými tečkami s kvartérní aminovou skupinou na jejich povrchu (QCDs) a negativně nabitou buněčnou membránou. Dále pak na vnitrobuněčnou distribuci těchto CDs po inkorporaci do záporně nabitých GO plátů. Syntéza QCDs byla publikovaná v roce 2012 autory Bourlinos A. B. et al. a nyní byly QCDs využity k syntéze hybridního fluorescenčního kompozitu QCDs-GO (viz Obr. 22) metodou „self-assembly“. Vazba mezi QCDs (ζ -potenciál + 53 mV) a GO (ζ -potenciál – 32 mV) byla pouze elektrostatická, ale i tak byl tento systém schopný vykazovat různé rozdíly spojené se snižující se koncentrací QCDs vyvázaných na

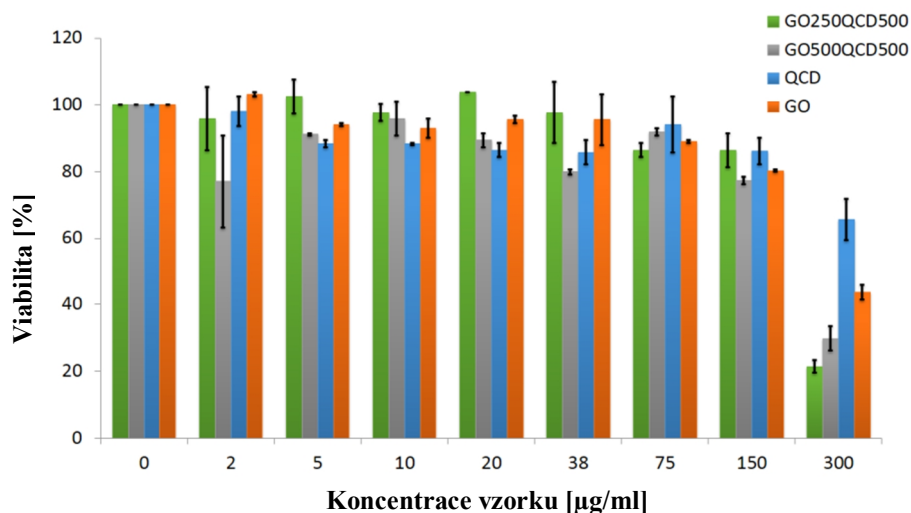
GO. Z experimentů se nově prokázalo, že nepasivované QCDs vstupují od určité koncentrace do jádra, avšak zabudované QCDs do GO se akumulovaly v cytoplasmě (QCDs zůstávaly v cytoplasmě, aniž by vstupovaly do jádra se vzrůstající koncentrací GO).



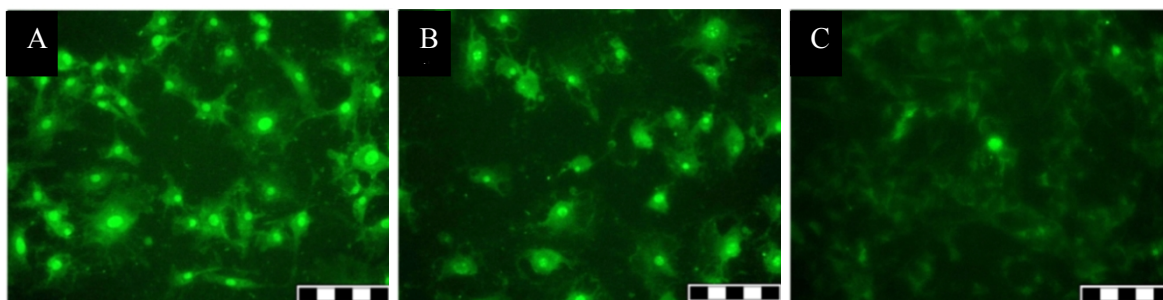
Obr. 22: A) Schématické zobrazení syntézy kompozitu QCDs-GO. B) TEM snímek QCDs-GO kompozitu (v pravém horním rohu je vložen snímek z HRTEM). Měřítko odpovídá 1 μm .

Transport QCDs do jádra je silně ovlivněn velikostí částice a povrchovou chemií CDs. Tyto faktory také ovlivňují únik CDs z endo/lyzozomů a iniciují interakce s membránovým pórovým komplexem jádra, který je detailně popsán v podkapitole 2.3.1 Průnik nanočástic přes jadernou membránu. Kladně nabitě nanosystémy obvykle prostupují přes buněčnou membránu snadněji, protože endocytóza probíhá v místech se záporně nabitou lipidovou membránou. Jaderné pórové komplexy jsou velké 20-50 nm [13] a představují tzv. komunikační místa mezi cytoplazmou a jádrem. QCDs mají velikost do 7 nm a proto snadno prostupují skrz jadernou membránu a jejich náboj podmiňuje interakci s DNA. Elektrostatické vyvážení QCDs na grafenové sheety zamezuje prudkému vstupu QCDs dovnitř buněk a tím ovlivňují míru uptake a internalizaci do jádra. Z tohoto pohledu by se GO mohly využívat jako cílené nosiče QCDs a regulovat tak místo jejich působení.

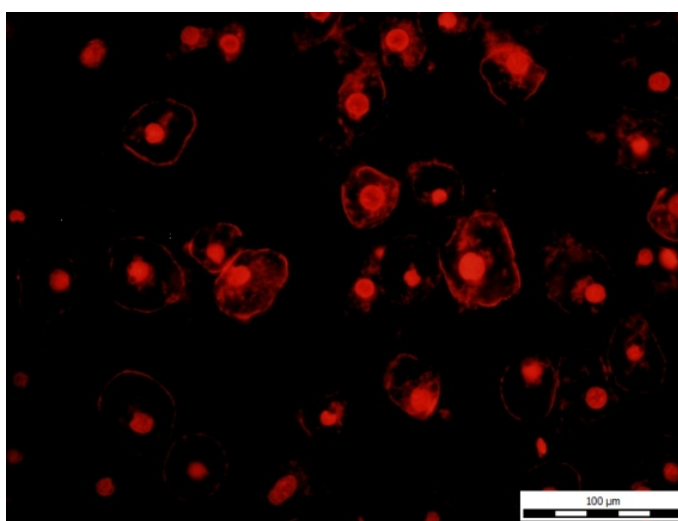
Toxicita QCDs a QCDs-GO byla testována na myších fibroblastech NIH/3T3 (Obr. 23) a pro mikroskopii a porovnání internalizace nanomateriálů byla pak zvolena koncentrace pod hodnotu IC 50 ($< 100 \mu\text{g/ml}$). Buňky byly 24 h inkubovány s QCDs a se dvěma typy kompozitů (GO250QCD500 a GO500QCD500), které se lišily obsahem GO nanostruktur. QCDs se rychleji uvolnily z hybridního systému s nižším obsahem GO a pronikly do jádra četněji než v případě kompozitu s vyšším obsahem GO struktur (Obr. 24 B, C). Buňky značené samotnými QCDs vykazovaly největší fluorescenční signál v oblasti jádra, kde se akumulovaly (viz Obr. 24 A a Obr. 25). V této studii byl tedy potvrzen vliv náboje nanomateriálu na biologické interakce a možnost specifického značení novým fluorescenčním hybridním systémem.



Obr. 23: Grafické vyjádření viability buněk (NIH/3T3) po označení vzorky QCDs, GO a GO-QCD v koncentrační řadě 0 – 300 µg/ml; ke stanovení viability byl použit MTT test.



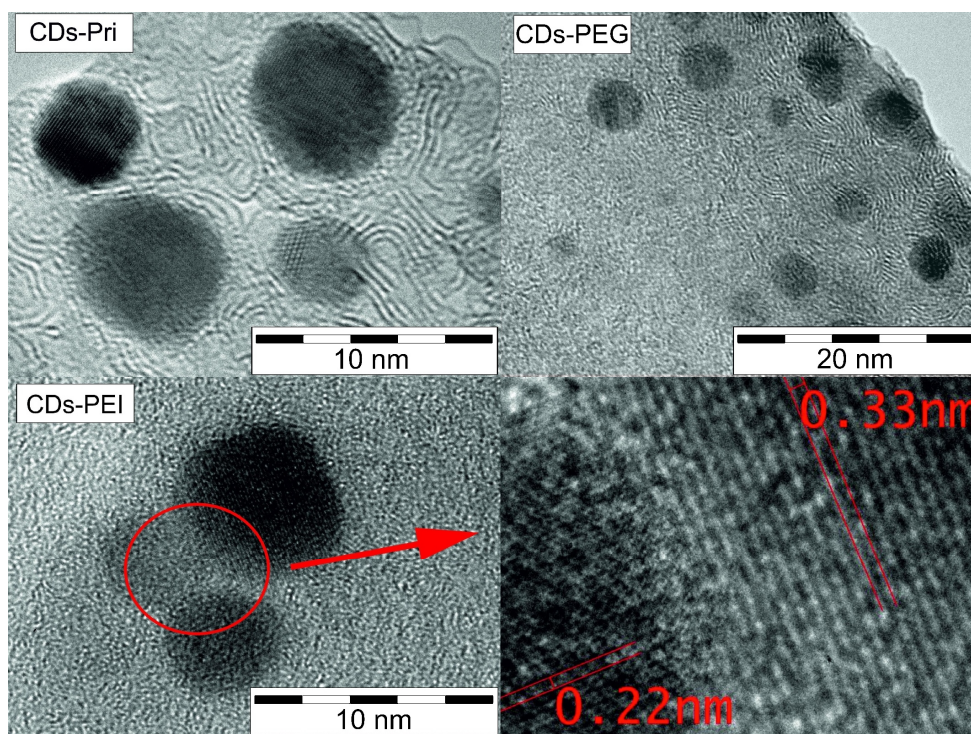
Obr. 24: Myší fibroblasty NIH/3T3 kontrastované (A) QCDs, (B) GO250QCD500, and (C) GO500QCD500. Použitá koncentrace každého vzorku byla 100 mg/mL, čas inkubace 24 hod. Měřítko 200 µm.



Obr. 25: Fluorescenčně svítící jádra buněk NIH/3T3 naplněná QCDs; Použitá koncentrace vzorku byla 100 µg/ml, čas inkubace 24 hod. Měřítko 100 µm.

3.2.2 Toxicita uhlíkových teček – Vliv povrchové funkcionalizace na buněčnou viabilitu, generaci kyslíkových radikálů a buněčný cyklus

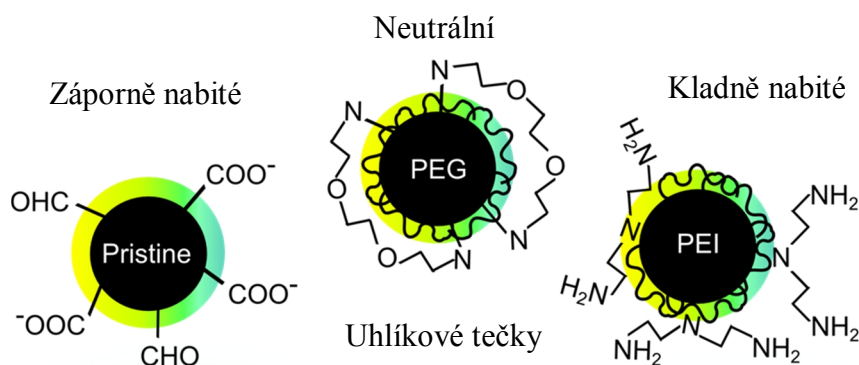
Tato studie (viz Příloha 4) byla zaměřená na vliv povrchového náboje uhlíkových teček (CDs) na jejich cytotoxicitu (viabilitu, oxidační stres a buněčný cyklus). K testování byly použité záporně nabitě CDs připravené standardní metodou oxidací vosku svíčky v HNO_3 podle článku [52]. Z takto nasyntetizovaných CDs se neuvolňují prekursorzy, které by mohly být potencionálním zdrojem toxicity a nemůžou tedy ovlivnit naši studii zaměřenou na toxicitu způsobenou povrchovým nábojem nanomateriálu. Samotné CDs byly navíc již testovány na in vivo úrovni [229-230]. Kladný a neutrální náboj byl získán vyvázáním polymeru na CDs povrch – PEI zajistil kladný náboj, PEG neutrální.



Obr. 26: Mikroskopické snímky CDs z HR-TEM; CDs-Pri – CDs bez polymeru, CDs-PEG a CDs-PEI – pasivované CDs; červený kruh s šipkou znázorňuje zvětšenou oblast, na které jsou patrné i grafitové roviny uvnitř CDs, jejichž vzdálenost je 0,22 a 0,33 nm.

CDs bez polymeru (CDs-Pri) měly ζ potenciál -28 mV při pH 7. Záporný náboj byl zapříčiněn karboxylovými a dusičnanovými skupinami, které pocházely z oxidační syntézy v HNO_3 . Přítomnost těchto skupin byla potvrzena XPS analýzou a FT-IR. CDs s polymerem na povrchu (CDs-PEG a CDs-PEI) měly ζ potenciál -6 mV a $+53$ mV při pH 7. CDs-PEG

byly tedy téměř neutrální a CDs-PEI vykazovaly silně kladný náboj (viz schématický Obr. 27). Velikost CDs podle snímků z HR-TEM byla 4 – 7 nm. Ze snímků na Obr. 26 byly také patrné roviny hexagonální mřížky grafitu o velikosti 2,2 Å (hexagonální vzdálenost) a 3,3 Å (vzd. mezi grafitovými vrstvami) [231-232].



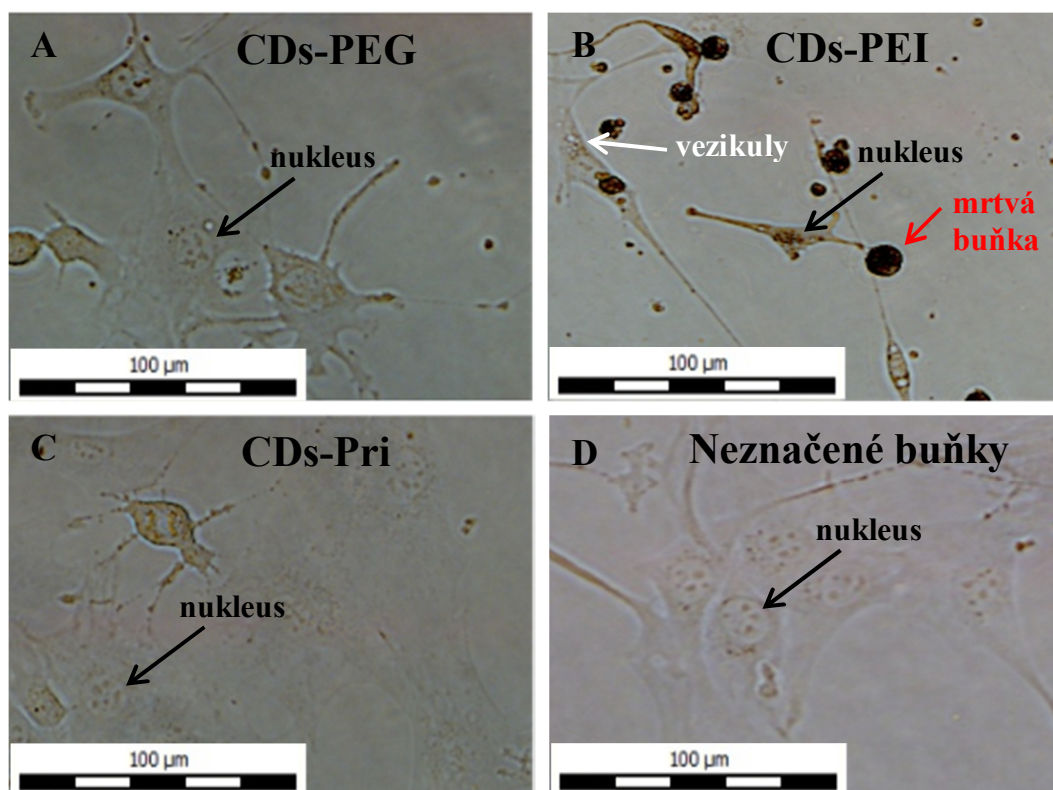
Obr. 27: Schématické zobrazení CDs s různým povrchovým nábojem.

Uptake CDs a morfologie značených buněk

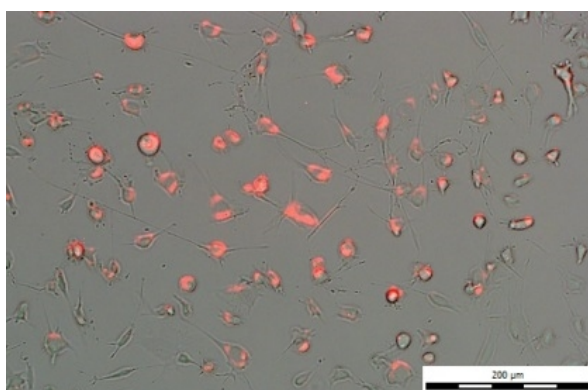
Buňky (NIH/3T3) byly se vzorky (CDs-PEG, CDs-Pri, CDs-PEI) inkubované 24 h v koncentrační řadě 5, 10, 25, 50, 100, 200 a 400 $\mu\text{g/ml}$ a následně zobrazeny světelným mikroskopem. Morfologie buněk značených vzorkem nesoucím neutrální náboj (CDs-PEG) nebyla pozměněna až do koncentrace 400 $\mu\text{g/ml}$, kdy některé buňky podlely buněčné smrti (mikroskopické snímky všech koncentrací jsou součástí Přílohy 4 (Fig. S3: 1a-d). Buňky značené negativně nabitými CDs (CDs-PEI) způsobily první známky toxicity již při 50 $\mu\text{g/ml}$ a deformace buněk stoupala úměrně s podanou dávkou nanomateriálu. Při koncentracích 200 – 400 $\mu\text{g/ml}$ docházelo v cytosolu k tvorbě vezikul a již od koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ se CDs-PEI dostaly do jader (viz Obr. 28 B). Záporně nabitý CDs bez polymeru na jejich povrchu (CDs-Pri) se chovaly velice podobně jako CDs-PEG při koncentracích nižších než 200 $\mu\text{g/ml}$, při vyšších dávkách buňky začaly měnit svůj tvar (viz Příloha 4 SI_Fig. 3 c, Fig. S3: 3c).

Je známo, že různé nanomateriály mění morfologii buněk [233-235]. Některé studie popisují, že ROS poškozují aktin v cytoskeletu a mění jeho elasticitu, která zajišťuje buněčný tvar [235]. Cytoskelet hraje také hlavní roli při pohlcení nanočástic a je součástí řady intracelulárních signálních drah [236]. Z našich výsledků vyplývá, že buněčná morfologie je výrazně ovlivněna kladně nabitými CDs-PEI, méně pak záporně nabitými CDs-Pri. CDs-PEG nezpůsobily žádné změny, ani nebylo mikroskopicky zaznamenáno, že by se snížil uptake

nanočástic při vyšších dávkách – buňky byly fluorescenční i při vysoké koncentraci CDs (Obr. 29).



Obr. 28: Morfologie buněk NIH/3T3 po 24 h inkubaci s CDs (200 µg/ml). A) CDs-PEG, B) CDs-PEI, C) CDs-Pri, D) kontrolní neznačené buňky; Mikroskop Olympus IX 70, obj. zvětšení 40, měřítko 100 µm.



Obr. 29: Fibroblasty NIH/3T3 značené CDs-PEG (inkubace 24 h, koncentrace 350 µg/ml. Fluorescenční mód světelného mikroskopu Olympus IX 70, obj. zvětšení 20, měřítko 200 µm.

Viabilita a oxidační stres po 24 hod

Cytotoxicita CDs byla určena MTT testem při stejných koncentracích jako při pozorování změn buněčné morfologie (5 – 400 µg/ml). Po 24 h inkubaci fibroblastů NIH/3T3 se vzorky (CDs-PEG, CDs-PEI, CDs-Pri) byla stanovena viabilita i hladina ROS. Totéž bylo změřeno u samotných polymerů PEG a PEI, jimiž byly buňky také značeny, aby bylo možné přesně určit podstatu toxicity. Dávky polymerů byly přepočítány na koncentrace PEG a PEI, které odpovídaly množství vyvážaného polymeru při syntéze CDs – v případě PEG se vyvázalo 8 %, u PEI 10 %. Použité koncentrace polymerů byly tedy následující: 0,4; 0,8; 2; 4; 8; 16; 24; 32 µg/ml pro PEG a 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40 µg/ml pro PEI. Pro lepší objasnění např. koncentrace 5 µg/ml CDs-PEG obsahovala 0,5 µg/ml PEG a koncentrace 5 µg/ml CDs-PEI obsahovala 0,4 µg/ml PEI.

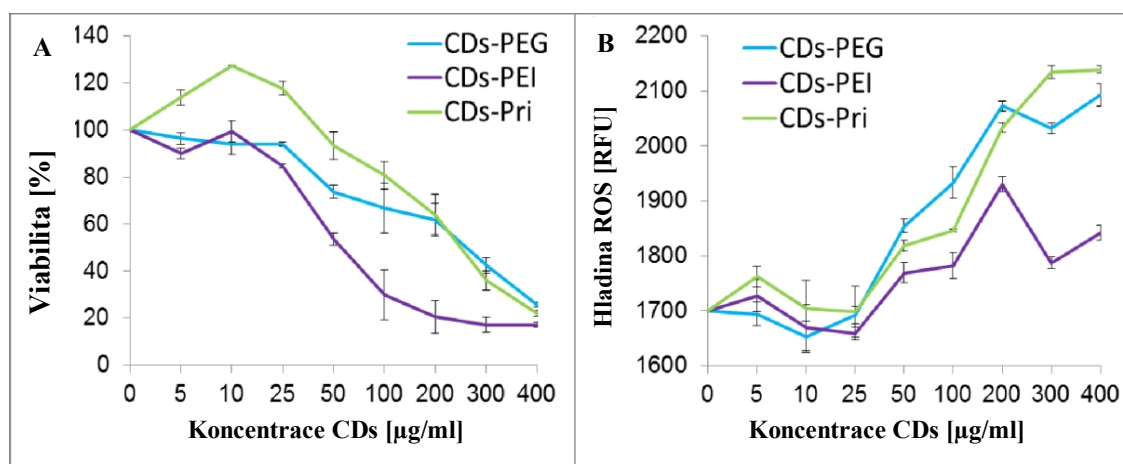
CDs-PEG s neutrálním nábojem vykazovaly koncentračně závislou cytotoxicitu (Obr. 30 A) a IC 50 nastala při 300 µg/ml. U buněk značených CDs-PEI se viabilita výrazně snížila s rostoucí dávkou vzorku a hodnota IC 50 byla 50 µg/ml (šestkrát nižší dávce než u CDs-PEG). CDs-Pri v nižších dávkách (5 – 50 µg/ml) stimulovaly buněčnou proliferaci a následně také způsobily pokles viability, který byl úměrný podané dávce. IC 50 nastala stejně jako u CDs-PEG při 300 µg/ml (viz Obr. 30 A). Viabilita buněk značených PEG pozvolna klesala až k nejvyšší koncentraci avšak IC 50 nedosáhla. Naopak toxický účinek měly výsledky naměřené na buňkách značených PEI, kdy IC 50 nastala již při 5 µg/ml (viz Obr. 31).

Nízká toxicita CDs-Pri (syntetizovaných stejnou metodou) není odlišná od předchozích studií, které uvádějí IC 50 v rozmezí 100 – 500 µg/ml [44, 63]. Nicméně, stimulace proliferace vyvolaná v nízkých koncentracích nebyla doposud popsána. Zvýšené množství kyslíkových radikálů může vést k nekontrolovatelné buněčné proliferaci a způsobit nádorové nebo jiné onemocnění [237-238]. Markantní toxicita CDs-PEI byla předpokládána, jelikož kladně nabitý polymer (PEI) má transfekční vlastnosti a snadno prostupuje skrz buněčnou membránu [49, 239]. Navzdory tomu, při srovnání toxicity CDs-PEI s jinými studiemi, CDs-PEI vykazují toxicitu až ve vyšší dávce (50 µg/ml). U pegylovaných CDs s neutrálním nábojem byla předpokládána nejvyšší biokompatibilita [49, 240], kterou jsme v rámci měření viability a oxidačního stresu potvrdili.

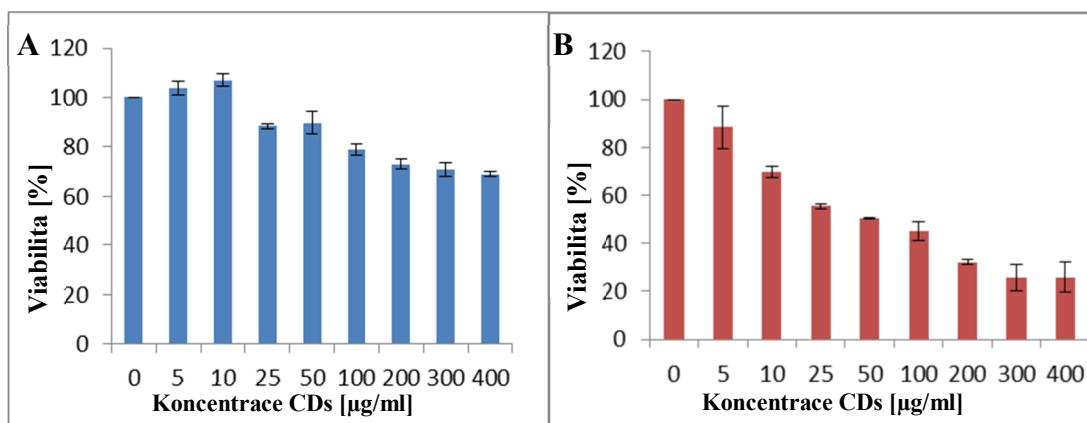
Oxidační stres je hlavním cytotoxickým mechanismem, který nanomateriály spouští [233,241] a různé buněčné linie mají rozdílnou antioxidační kapacitu [242]. Nízká hladina ROS je buňkou regulovaná v běžných fyziologických dějích, vyšší množství ROS vede

k oxidačnímu poškození buněk a k buněčné smrti [223, 235, 243]. Změřením množství ROS se stanoví maximální možná hladina ROS [236], se kterou se buňka vypořádá za 24 hod a odhalí, zda je toxický účinek pouze dočasný nebo přetrvávající [244].

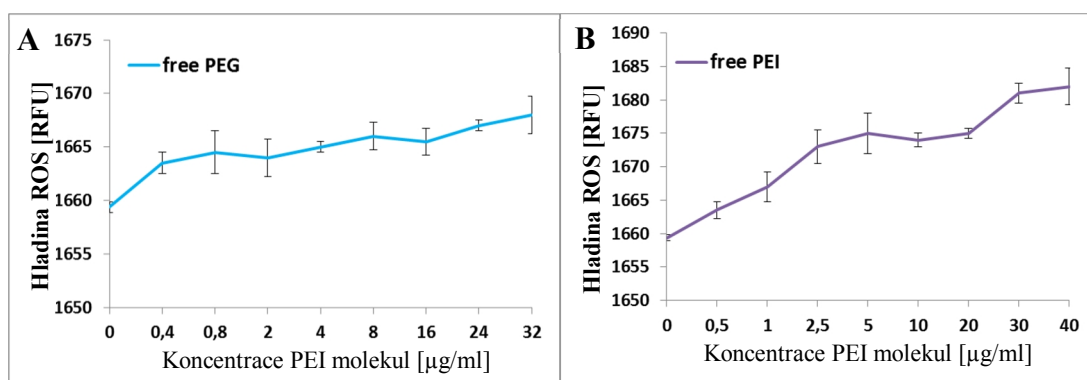
Oxidační stres byl měřen paralelně s MTT testem (po 24 h inkubaci se vzorky). Produkce ROS zvolna klesala se stoupající koncentrací vzorků (přesně opačný trend než při stanovení viability). Značný nárůst ROS se u všech vzorků objevil v rozmezí 50 – 200 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 30 B). Koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ byla pravděpodobně kritickou dávkou, od které začaly vznikat změny – prudký nárůst ROS (Obr. 30 B), výrazný pokles viability (Obr. 30 A). Stejný jev byl zaznamenán i při měření vývoje ROS od aplikace vzorku k buňkám, který je popsán v další části práce. Na grafu (Obr. 30 B) je patrné, že hladina ROS poklesla při koncentracích vyšších jak 200 $\mu\text{g/ml}$. To je pravděpodobně zapříčiněno tím, že se jedná o koncentraci, která je blízko hodnot IC 50 a jen polovina žijících buněk vytváří ROS. Zajímavým fenoménem bylo to, že nejvyšší množství ROS při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ produkovaly buňky značené CDs-Pri. Tento výsledek by mohl vysvětlit již zmíněnou stimulaci proliferace, která nastala při nízkých koncentracích CDs-Pri, avšak korelace mezi oxidačním stresem a proliferací je stále neobjasněna [242]. Výrazně nízký ROS byl naměřen u buněk značených CDs-PEI kvůli nedostatečné viabilitě buněk. Buňky značené polymerem PEG nevykazovaly žádnou abnormální hladinu ROS, u buněk značených PEI byl vývoj ROS po 24 hodinové inkubaci patrný, avšak ne markantní (viz Obr. 32).



Obr. 30: A) Procentuální vyjádření viability CDs-značených buněk a B) hladiny ROS po 24 hodinové inkubaci buněk se vzorky.



Obr. 31: Viabilita buněk po inkubaci samotných polymerů PEG a PEI, které jsou v uvedených koncentracích CDs-PEG a CDs-PEI vyvázané.

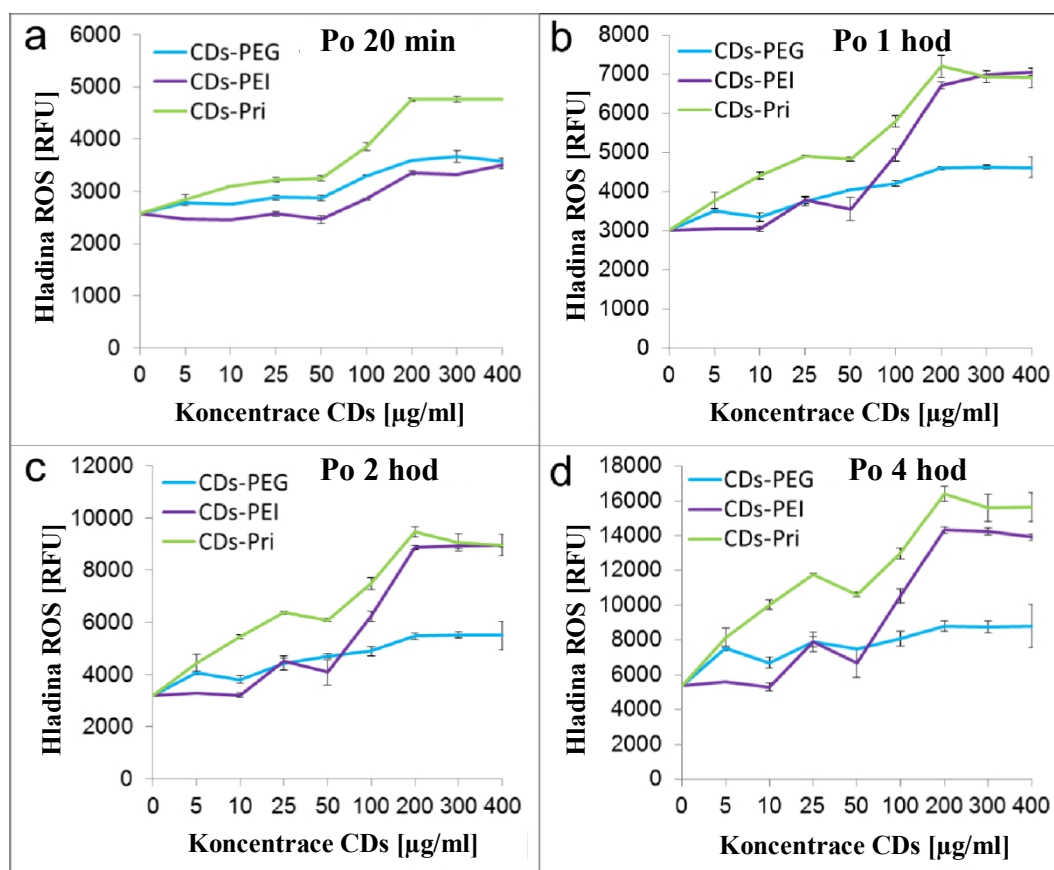


Obr. 32: Oxidační stres v buňkách NIH/3T3 značených polymery A) PEG a B) PEI; Inkubace se vzorky byla 24 hod.

Kinetika ROS během 4 hodin

K získání detailních informací o oxidačním stresu byl změřen vznik ROS během prvních čtyř hodin od aplikace vzorku k buňkám. Nárůst kyslíkových radikálů byl měřen každých 30 min a změny byly markantní a to především u vzorku CDs-PEI (Obr. 33), u kterého hladina ROS rapidně stoupala až do posledního měření, při kterém došlo k poklesu ROS při koncentraci 200 µg/ml. V grafech (viz Obr. 33 A-D) je znázorněn vývoj oxidačního stresu v závislosti na koncentraci CDs a vyjádřen během čtyř hodin. První měření bylo provedené 20 min po aplikaci vzorku, což je nezbytná doba na interakci fluorescenční próby s intracelulárním ROS. Největší změny opět nastaly při koncentraci 50 µg/ml a nejvyšších hodnot dosahovaly buňky značené kladně i záporně nabitými CDs (CDs-PEI, CDs-Pri).

Detailní vývoj ROS v závislosti na čase rozdělený pro jednotlivé koncentrace i vzorky je součástí Přílohy 4.

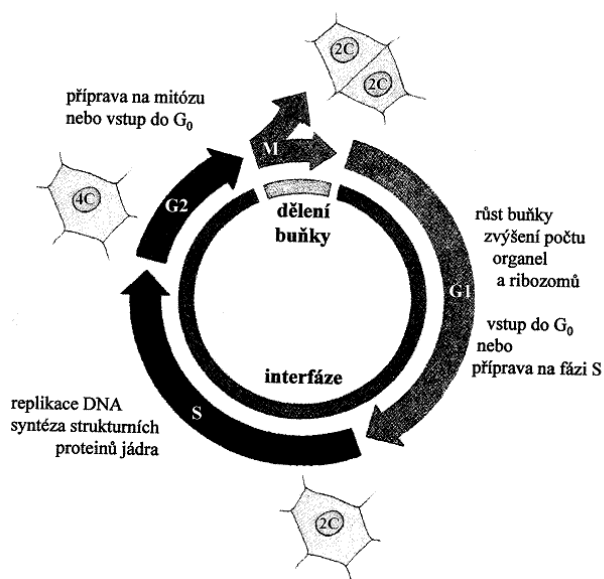


Obr. 33: Grafické vyjádření hladiny ROS během 4 hodin od aplikace vzorku. A) Množství ROS na začátku měření (20 min od inkubace CD_s-značených buněk s fluorescenční próbou), B) hladina ROS po 1 hod, C) po 2 hod, D) po 4 hod. Hodnota hladiny ROS v kontrolních buňkách je počáteční hodnotou na ose y. Hodnoty měřené po půl hodině nebyly zařazeny do této práce, jelikož neznázorňovaly graficky patrné změny.

Vliv CD_s na buněčný cyklus

Průtoková cytometrie poskytuje informace o jednotlivých buňkách a je tak nezbytná pro kompletní studii cytotoxicity. Buněčný cyklus se skládá z poslopně koordinovaných procesů a je rozdělen na interfázi (G1 fázi, S fázi, G2 fázi) [237], mitózu (M) a cytokinezi (cytoplazmatické rozdělení buněk) [245]. Buňky přetrvávající v G1 fázi rostou do potřebné velikosti a až pak vstupují do S fáze [246]. Pokud buňky dostatečně nevyrostou, zůstanou v G1 fázi (to je označeno jako G0 fáze) nebo podlehnou apoptóze. V S fázi dochází k replikaci DNA a následně buňky přechází do G2 fáze, ve které se buňky připravují

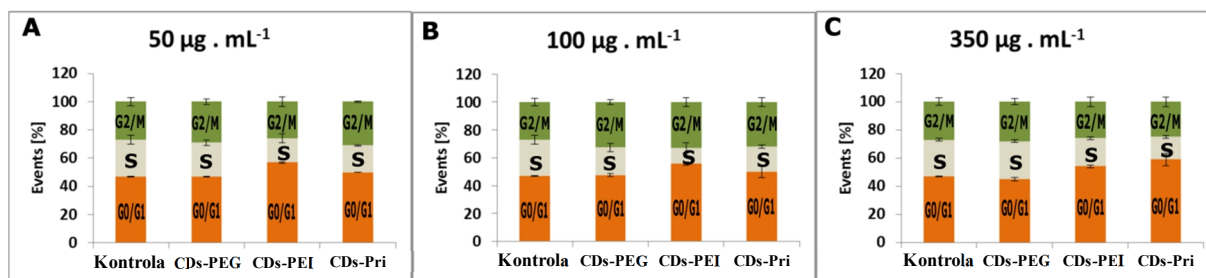
na mitózu (viz Obr. 34). Mezi G1 – S fází a S – G2 fází se nachází kontrolní body, které hlídají „kvalitu“ DNA. Pokud je DNA poškozená nebo je její struktura abnormální, buněčný cyklus se prodlouží o čas vynaložený na opravu DNA, přestavbu chromatinu či metabolické změny. Jestliže buňka není schopná reparace, podlehně buněčné smrti [247]. Nanomateriály mohou způsobit změny v jednotlivých fázích buněčného cyklu [248]. V této práci byly analyzovány jednotlivé buňky značené CDs, jejichž buněčné fáze (G0/G1, S, G2/M) jsou znázorněny ve 2D histogramu, který vyjadřuje počet buněk versus množství DNA určené intenzitou propidium iodidu (PI) (Příloha 4, Fig. S5).



Obr. 34: Schéma buněčného cyklu s jednotlivými fázemi, převzato z [249].

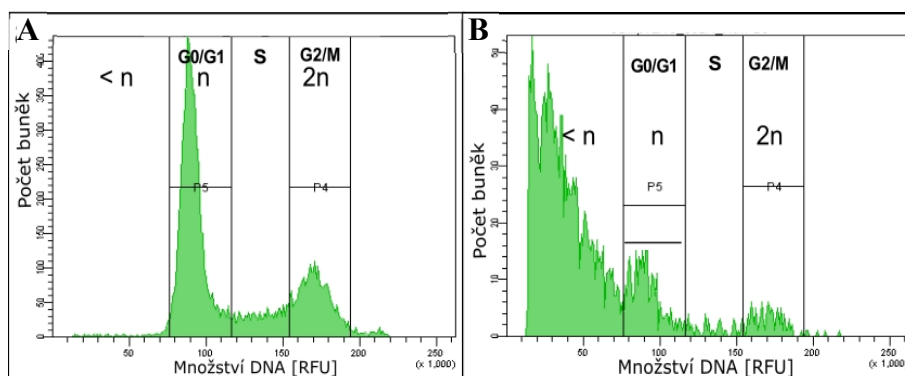
Výsledky ukázaly, že CDs-PEG nezpůsobily žádné výrazné změny buněčného cyklu při porovnání s kontrolními buňkami (Obr. 35 A-C). Nízké koncentrace CDs-Pri také buněčný cyklus neovlivnily, avšak dávka 100 µg/ml mírně prodloužila G2/M fázi (o 5% vůči kontrole), (viz Obr. 35 B), nicméně není možné odlišit, kolik buněk bylo v mitóze a zda se nejednalo jen o vyšší počet buněčné populace ve fázi dělení. Ve vysoké koncentraci (nad hodnotu IC 50) se vyskytlo zdržení G1/G0 fáze a nemnoho buněk překonalo kontrolní bod a přešlo do S fáze (Obr. 35 C). Tyto buňky pravděpodobně přešly do G0 fáze nebo podlehly apoptóze. Pozitivně nabitě CDs-PEI inhibovaly buněčnou proliferaci přes zdržení G0/G1 fáze v koncentraci 50 a 100 µg/ml (Obr. 35 A, B). Navíc při 100 µg/ml došlo ke zvýšení buněčné populace v G2/M fázi oproti S fázi (poměr mezi S a G2/M fází CDs-PEI značených buněk byl 11:33, kdežto u kontrolních buněk je poměr těchto fází 26:27). Z toho

vyplývá, že buňky značené toxickou dávkou 100 $\mu\text{g/ml}$ měly prodlouženou G1 fází, ale také i G2 fází a to vedlo k buněčné smrti.



Obr. 35: Graficky zpracované výsledky z průtokového cytometru – porovnání jednotlivých fází buněčného cyklu myších fibroblastů NIH/3T3 značených CDs-PEG, CDs-PEI, CDs-Pri; Podané koncentrace: A) 50 $\mu\text{g/ml}$, B) 100 $\mu\text{g/ml}$, C) 350 $\mu\text{g/ml}$; Originální naměřená data jsou součástí Přílohy 4.

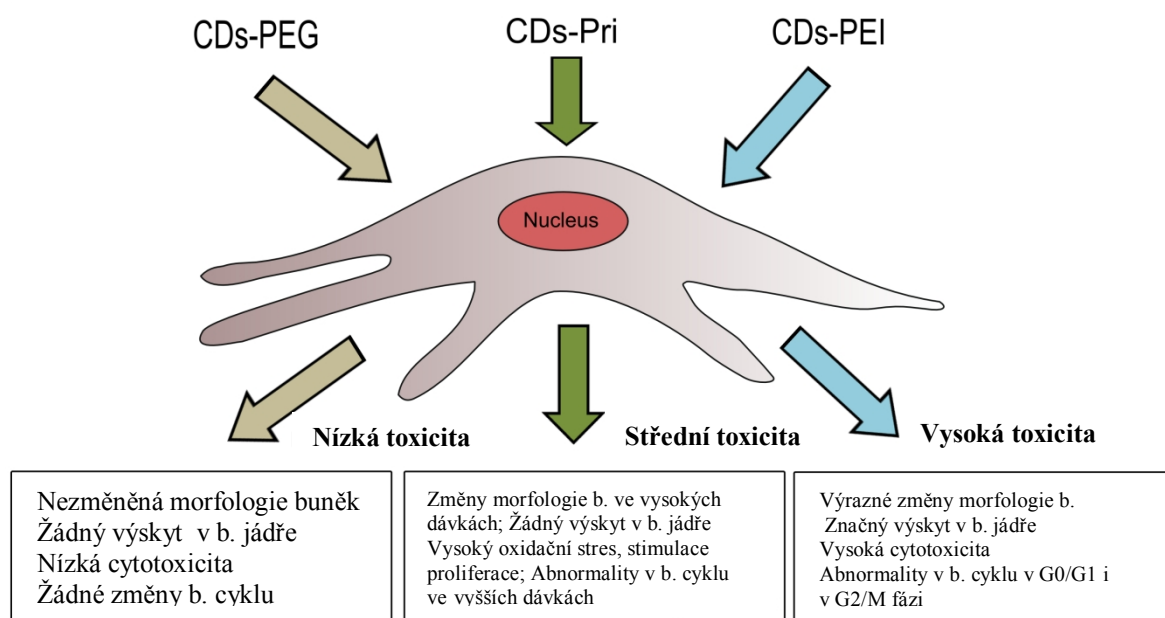
Tato kvantifikace buněčné populace v G0/G1, S a v G2/M fázi byla vytvořena z „basic gate“, který zahrnuje buňky v G1 fázi s normálním množstvím DNA (n), buňky v G2/M fázi se zdvojeným množstvím DNA (2n) a také buňky v S fázi, které měly obsah DNA v intervalu mezi n a 2n (Obr. 36 A). Obecně, tato „basic gate“ představuje přibližně 90% všech „events“ (to znamená všech buněk a dalších částic detekovaných průtokovým cytometrem), pouze 10% jsou rozbité buňky a malé debris. V případě CDs-PEI značených buněk koncentrací 350 $\mu\text{g/ml}$ byla „basic gate“ pouze 20% ze všech „events“ a značná většina buněk obsahovala menší než standardní množství DNA (viz Obr. 36 B). To potvrdilo, že převážné množství těchto buněk je odumřelých a rozpadlých. Stejně výsledky byly patrné i ze snímků světelného mikroskopu, které jsou součástí Přílohy 4 (SI, Fig. S5). Přehled toxických účinků způsobených CDs je shrnutý na Obr. 37.



Obr. 36: Buněčný profil A) kontrolních buněk NIH/3T3, B) CDs-PEI značených buněk NIH/3T3 koncentrací 350 $\mu\text{g/ml}$.

Analýza buněčného cyklu byla provedena i u buněk značených pouze polymery PEG a PEI (opět v adekvátně přepočítaných koncentracích polymeru na dávku vzorku – viz podkapitola Viabilita a oxidační stres po 24 hod) a bylo zjištěno, že samotné molekuly PEG jsou biokompatibilní a PEI způsobují prodloužení G0/G1 fáze při koncentracích 10 a 35 $\mu\text{g/ml}$ stejně jako tomu bylo u komplexu CDs-PEI při koncentraci 100 a 350 $\mu\text{g/ml}$ (pozn. tyto koncentrace PEI jsou přítomny ve vzorku CDs-PEI v koncentracích 100 a 350 $\mu\text{g/ml}$). Tyto výsledky reflektují, že polymer PEI ovlivňuje buněčný cyklus b. linie NIH/3T3 a to jak ve volné tak i v navázané formě. Ovlivnění G0/G1 fáze molekulami PEI bylo také zaznamenáno u b. linie HepG2 [250]. Je velice zajímavé, že samotné PEI i komplex CDs-PEI způsobuje stejnou abnormalitu buněčného cyklu. Pravděpodobně nezáleží na mechanismu uptake (PEI – difúzně, CDs-PEI – endocytózou + únik z endo/lyzozomů přes „proton sponge“) nebo je naopak mechanismus stejný pro PEI i CDs-PEI, jelikož CDs jsou dostatečně malé, aby prošly přes membránu difúzně. Nicméně oba tyto vzorky interagují s organelami, prostupují do jádra a ovlivňují buněčný cyklus.

Kompletní přehled cytotoxicity, která byla u vzorků CDs-PEG, CDs-Pri, CDs-PEI naměřena je znázorněna ve schématickém obrázku 37.



Obr. 37: Schématické vyjádření toxicity CDs-PEG, -Pri, -PEI vůči buněčné linii NIH/3T3.

4 SHRNU TÍ

Tato disertační práce se zabývala širokým tématem interakce nanomateriálů s buněčnými kulturami. V teoretické části byly představeny vybrané nanomateriály – polovodičové a uhlíkové kvantové tečky, grafeny, grafen oxidy a superparamagnetické nanočástice, u kterých byla prorešeršována jejich cytotoxicita a aplikace. Druhá část práce obsahuje přehled okomentovaných výsledků, které byly dosaženy ve zmíněných publikacích na lidských i potkaních mesenchymálních kmenových buňkách a na myších fibroblastech NIH/3T3. Tato práce by měla být podrobným náhledem na cytotoxicitu studovaných nanomateriálů (CDs, GO, GO-QCDs a SPIO NPs), které se zdají být příslibné pro budoucí bioaplikace. Dalším cílem bylo ukázat, jak moc je důležité kombinovat běžné metody používané molekulárními biology (MTT test, ROS analýza či průtoková cytometrie) se světelnou, fluorescenční i elektronovou mikroskopií. Právě tato komplementarita metod, které jsem ve své práci používala, dává komplexní přehled o chování studovaných buněčných linií, které jsou inkubovány s nově připravenými nanomateriály. Každý nově nasyntetizovaný materiál je originální a není triviální odhalit, jaké děje v buňce při setkání s daným materiálem probíhají. Navíc běžné laboratorní metody s nanočásticemi nemusí fungovat, a také každá buněčná linie reaguje na přítomnost daného nanomateriálu odlišně. Se všemi nástrahami a problémy se mi podařilo během experimentální práce vypořádat a mohla jsem tak svými výsledky přispět nejen k sepsání a úspěšnému publikování vědeckých článků, ale také k vytvoření optimalizovaných protokolů všech výše zmíněných metod zabývajících se interakcí nanomateriálů s buněčnými kulturami.

5 SUMMARY

This thesis described rich topic about interactions between nanomaterials and mammalian cells. In theoretical part, cytotoxicity and bio applications of semiconductor and carbon quantum dots, graphene, graphene oxide and superparamagnetic nanoparticles were introduced. The second part contains results from microscopic and cytotoxic studies, which were measured on rat and human mesenchymal stem cells and mouse skin fibroblasts NIH/3T3. The goal of this work was to show up an overview of detailed studies about carbon and iron nanomaterials which are important for bio applications. The thesis has been written from four chosen publication focused on microscopic techniques used for detection of nanomaterials inside cells and cytotoxic methods which helped to determine viability and oxidative stress of nano-labeled cells. Each newly prepared nanomaterial has original properties, thus is very important to carefully observe interactions of the sample with cells. Common laboratory assays might not work and from this reason the microscopy is indispensable to find out intracellular happenings caused by nanomaterials. Therefore, optimalization of protocols has been included.

6 REFERENCE

- [1] Cho E. Ch., Glaus Ch., Chen J., Welch M. J., Xia Y. Inorganic nanoparticle-based contrast agents for molecular imaging. *Trends in Molecular Medicine* 16: 561-573, 2010
- [2] Sharma P. A., Maheshwari R., Tekade M., Tekade R. K. Nanomaterial based approaches for the diagnosis and therapy of cardiovascular diseases. *Current Pharmaceutical Design* 21: 4465-4478, 2015
- [3] Weissleder, R., Mahmood, U. Molecular imaging. *Radiology* 219: 316-333, 2001
- [4] Achilefu S. Introduction to concept and strategies for molecular imaging. *Chem. Rev.* 110: 2575-2578, 2010
- [5] Licha, K., Contrast agents for optical imaging. *Topics Curr. Chem.* 222: 1-29, 2002
- [6] Lanza, G. M., Winter P. M., Caruthers S. D., Morawski A. M., Schmieder A. H., Crowder K. C., Wickline S. A. Magnetic resonance molecular imaging with nanoparticles. *J. of Nuclear Cardiology* 11: 733-743, 2004
- [7] Skrabalak, S. E., Chen J., Sun Y., Lu X., Au L., Cobley C. M., Xia Y. Gold nanocages: Synthesis, properties, and applications. *Acc. Chem. Res.* 41: 1587-1595, 2008
- [8] Murphy, C. J., Gole A. M., Stone J. W., Sisco P. N., Alkilany A. M., Goldsmith E. C., Baxter S. C. Gold nanoparticles in biology: Beyond toxicity to cellular imaging. *Acc. Chem. Res.* 41: 1721-1730, 2008
- [9] Gao J., Chen K., Xie R., Xie J., Lee S., Cheng Z., Peng X., Chen X. Ultrasmall near infrared non-cadmium quantum dots for in vivo tumor imaging. *Small* 6: 256-261, 2010
- [10] Heesakkers, R. A., Hövels A. M., Jager G. J., van den Bosh H. C., Witjes J. A., Raat H. P., Severens J. L., Adang E. M., van der Kaa C. H., Fütterer J. J., Barentsz J. MRI with a lymph-node-specific contrast agent as an alternative to CT scan and lymph-node dissection in patients with prostate cancer: a prospective multicohort study. *Lancet Oncol.* 9: 850-856, 2008
- [11] Huh Y.-M., Jun Y.-W., Song H.-T., Kim S., Choi J.-S., Lee J.-H., Yoon S., Kim K.-S., Shin J.-S., Suh J.-S., Cheon J. In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 12387-12391, 2005
- [12] Thorek D. L., Chen A. K., Czupryna J., Tsourkas A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Ann. Biomed. Eng.*: 34, 23-38, 2006

- [13] Kumar Ch. S. S. R. *Nanomaterials for Cancer Diagnosis, Nanotechnologies for the Life Sciences*, Vol. 7, page 53, USA, ISBN 978-3-527-31387-7, 2007
- [14] Smith, A. M., Nie S. *Semiconductor nanocrystals: structure, properties and band gap engineering. Acc. Chem. Res.* 43: 190-200, 2010
- [15] Alivisatos A. P. *Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. J. Phys. Chem.* 100: 13226-13239, 1996
- [16] Gao X., Yang L., Petros J. A., Marshall F. F., Simons J. W., Nie S. *In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 63-72, 2005
- [17] Michalet X., Pinaud F. F., Bentolila L. A., Tsay J. M., Doose S., Li J. J., Sundaresan G., Wu A. M., Gambhir S. S., Weiss S. *Quantum dots for live cells, in vivo imaging and diagnostics. Science* 28: 538-544, 2005
- [18] Sukhanova A., Devy J., Venteo L., Kaplan H., Artemyev M., Oleinikov V., Klinov D., Pluot M., Cohen J. H., Nabiev I. *Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. Anal. Biochem.* 324: 60-67, 2004
- [19] Wu X., Liu H., Liu J., Haley K. N., Treadway J. A., Larson J. P., Ge N., Peale F., Bruchez M. P. *Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. Nat. Biotechnol.* 21: 41-46, 2003
- [20] Akerman M. E., Chan W. C., Laakkonen P., Bhatia S. N., Ruoslahti E. *Nanocrystal targeting in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99, 12617-12621, 2002
- [21] Tokumasu F., Dvorak J. *Development and application of quantum dots for immunocytochemistry of human erythrocytes. J. Microsc.* 211, 256-261, 2003
- [22] Lidke D. S., Nagy P., Heintzmann R., Arndt-Jovin D. J., Post J. N., Grecco H. E., Jares-Erijman E. A., Jovin T. M. *Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. Nat. Biotechnol.* 22: 198-203, 2004
- [23] Bruchez M., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A. P. *Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. Science* 281: 2013-2016, 1998
- [24] Michalet X., Pinaud F., Lacoste T. D., Dahan M., Bruchez M., et al. *Properties of fluorescent semiconductor nanocrystals and their applications to biological labeling. Single Mol.* 2: 261-276, 2001
- [25] Lacoste T. D., Michalet X., Pinaud F., Chemla D. S., Alivisatos A. P., Weiss S. *Ultra-high-resolution multicolor colocalization of single fluorescent probes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97: 9461-9466, 2000

- [26] Jaiswal J. K., Mattoussi H., Mauro J. M., Simon S. M. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat. Biotechnol.* 21: 47-51, 2003
- [27] Mattheakis L.C., Dias J. M., Choi Y.-J., Gong J., Bruchez M. P., Liu J., Wang E. Optical coding of mammalian cells using semiconductor quantum dots. *Anal. Biochem.* 327: 200-208, 2004
- [28] Dubertret B., Skourides P., Norris D. J., Noireaux V., Bivanlou A. H., Libchaber A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles, *Science* 298: 1759-1769, 2002
- [29] Chan W. C. W, Nie S. M. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 281, 2016-2018, 1998
- [30] Dahan M., Lévi S., Luccardini C., Rostaing P., Riveau B., Triller A. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking, *Science* 302: 442-445, 2003
- [31] Pinaud F., King D., Moore H.-P., Weiss S., Bioactivation and cell targeting of semiconductor CdSe/ZnS nanocrystals with phytochelatin-related peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 6115-6123, 2004
- [32] Winter J. O., Liu T. Y., Korgel B. A., Schmidt C. E., Recognition molecule directed interfacing between semiconductor quantum dots and nerve cells. *Adv. Mater.* 13, 1673-1677, 2001
- [33] Derfus A. M., Chan W. C. W., Bhatia S. N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* 4: 11-18, 2004
- [34] Rosenthal S. J., Tomlinson I., Adkins E. M., Schroeter S., Adams S., Swafford L., McBride J., Wang Y., DeFelice L. J., Blakely R. D. Targeting cell surface receptors with ligand-conjugated nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 4586-4594, 2002.
- [35] Gao X., Cui Y., Levenson R. M., Chung L. W. K., Nie S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 22: 969-976, 2004
- [36] Allen P. M., Liu W., Chauhan V. P., Lee J., Ting A. Y., Fukumura D., Jain R. K., Bawendi M. G. InAs(ZnCdS) quantum dots optimized for biological imaging in the near-infrared. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 470-471, 2009
- [37] Chan W.C.W., Dustin J. M., Gao X., Robert E. B., Han M., Nie S. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 40-46, 2002

- [38] Shashkov E. V., Everts M., Galanzha E. I., Zharov V. P. Quantum dots as multimodal photoacoustic and photothermal contrast agents. *Nano Lett.* 8: 3953-3958, 2008
- [39] Kloepfer J. A., Mielke R. E., Neilson K. H. Stucky G., Nadeau J. L. Quantum dots as strain- and metabolism-specific microbiological labels. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4205-4013, 2003
- [40] Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450, 1985
- [41] Gabe Y., Urano Y., Kikuchi K., Kojima H., Nagano T. Highly sensitive fluorescence probes for nitric oxide based on boron dipyrromethene chromophore-rational design of potentially useful bioimaging fluorescence probe. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 3357-3367, 2004
- [42] Derfus A. M., Chan W. C. W., Bhatia S. N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* 4: 11-18, 2004
- [43] Liu Z., Tabakman S., Welsher K., Dai H. J. Carbon nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery, *Nano Res.* 2: 85-120, 2009
- [44] Mohan N., Chen C. S., Hsieh H. H., Wu Y. C., Chang H. C. In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*. *Nano Lett.* 10: 3692-3699, 2010
- [45] Yang S. T., Wang X., Wang H. F., Lu F. S., Luo P. J. G., Cao L., Meziari M. J., Liu J. H., Liu Y. F., Chen M. Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents, *J. Phys. Chem. C* 113: 18110-18114, 2009
- [46] Shen J., Zhu Y., Yang X., Li C. Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices. *Chem. Commun.* 48: 3686-3699
- [47] Georgakilas Vasilios, Perman J. A., Tucek J., Zboril R. Broad family of carbon nanoallotropes: classification, chemistry, and applications of fullerenes, carbon dots, nanotubes, graphene, nanodiamonds, and combined superstructures. *Chem. Rev.* 115: 4744-4822, 2015
- [48] Li Q., Ohulchanskyy T. Y., Liu R., Koynov K., Wu D., Best A., et al. Photoluminescent carbon dots as biocompatible nanoprobe for targeting cancer cells. *J. Phys. Chem. C* 114: 12062–12068, 2010
- [49] Luo P. G., Sahu S., Yang S. T., Sonkar S. K., Wang J., Wang H., et al. Carbon “quantum” dots for optical bioimaging. *J. Mater. Chem. B* 1: 2116-2117, 2013

- [50] Wang Y., Anilkumar P., Cao L., Liu J.-H., Luo P. G., Tackett K. N., Sahu S., Wang P., Wang X., Sun Y.-P. Carbon dots of different composition and surface functionalization: cytotoxicity issues relevant to fluorescence cell imaging. *Exp. Biol. Med.* 236:1231–8, 2011
- [51] Yang S.-T., Cao L., Luo P. G., Lu F., Wang X., Wang H., et al. Carbon dots for optical imaging in vivo. *J. Am. Chem. Soc.* 131:11308–11309, 2009
- [52] Cao L., Wang X., Mezziani M. J., Lu F., Wang H., Luo P. G., et al. Carbon dots for multiphoton bioimaging. *J. Am. Chem. Soc.* 129:11318–11319, 2007
- [53] Liu H., Ye T., Mao, C. Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot. *Angewandte Chemie International Edition* 46: 6473-6475, 2007
- [54] Esteves da Silva J. C. G., Gonçalves H. M. R. Analytical and bioanalytical applications of carbon dots. *Revs Anal. Chem.* 30:1327–1336, 2011
- [55] Ding C, Zhu A, Tian Y. Functional surface engineering of C-dots for fluorescent biosensing and in vivo bioimaging. *Acc. Chem. Res.* 47: 20–30, 2014
- [56] Wu L., Luderer M., Yang X., Swain C., Zhang H., Nelson K., et al. Surface passivation of carbon nanoparticles with branched macromolecules influences near infrared bioimaging. *Theranostics* 3: 677–86, 2013
- [57] Hola K., Zhang Y., Wang Y., Giannelis E. P., Zboril R., Rogach A. L. Carbon dots—Emerging light emitters for bioimaging, cancer therapy and optoelectronics. *Nano Today* 9: 590–603, 2014
- [58] Huang, X., Zhang, F., Zhu, L., Choi K. Y., Guo N., Guo J., Tackett K., Anilkumar P., Liu G., Quan Q., Choi H. S., Niu G., Sun Y., Lee S. Effect of injection routes on the tumor uptake of carbon dots. *ACS Nano* 7: 5684–5693, 2013
- [59] Chandra S., Das P., Bag S., Laha D., Pramanik P. Synthesis, functionalization and bioimaging applications of highly fluorescent carbon nanoparticles. *Nanoscale* 3, 1533-1540, 2011
- [60] Liang Q. H., Ma W. J., Shi Y., Li Z., Yang X. M. Easy synthesis of highly fluorescent carbon quantum dots from gelatin and their luminescent properties and applications. *Carbon* 60: 421-428, 2013
- [61] Kong W., Liu R., Li H., Liu J., Huang H., Liu Y., Kang Z. High-bright fluorescent carbon dots and their application in selective nucleoli staining. *J. Mater. Chem. B* 2: 5077-5082, 2014

- [62] Milosavljevic V., Nguzen H. V., Michalek P., Moulick A., Kopel P., Kizek R., Adam V., Synthesis of carbon quantum dots for DNA labeling and its electrochemical, fluorescent and electrophoretic characterization, *Chemical Papers* 69: 192-201, 2014
- [63] Dong Y., Chen C., Zheng X., Gao L., Cui Z., Yang H., Guo Ch., Chi Y., Li Ch. M. One-step and high yield simultaneous preparation of single-and multi-layer graphene quantum dots from CX-72 carbon black. *J. of Mat. Chem.* 22: 8764-8766, 2012
- [64] Ray S. C., Saha A., Jana, N. R., Sarkar R. Fluorescent carbon nanoparticles: synthesis, characterization, and bioimaging application. *The J. of Phys. Chem. C* 113: 18546-18551, 2009
- [65] Sun Y.-P., Zhou B., Lin Y., Wang W., Fernando K. A. S., Pathak P., Meziani M. J., Harruff B., Wang X., Wang H., Luo P. G., Yang H., Kose M. E., Chen B., Veca L. M., Xie, S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 7756–7757, 2006
- [66] Zhao Q.-L., Zhang Z.-L., Huang B.-H., Peng J., Zhang M., Pang D.-W. Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite. *Chem. Commun.* 41: 5116–5118, 2008
- [67] Ruan S., Zhu B., Zhang H., Chen J., Shen S., Qian J., He Q., Gao H. J. A simple one-step method for preparation of fluorescent carbon nanospheres and the potential application in cell organelles imaging. *J. Colloid Interface Sci.* 422: 25–29, 2014
- [68] Liu J.-H., Anilkumar P., Cao L., Wang X., Yang S.-T., Luo P. G., Wang H., Lu F., Meziani M. J., Liu Y., Korch K., Sun Y.-P. Cytotoxicity Evaluations of Fluorescent Carbon Nanoparticles. *Nano Life* 01: 153–161, 2010
- [69] Nie S. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine* 5: 523–528, 2010
- [70] Nurunnabi M., Khatun Z., Huh K. M., Park S. Y., Lee D. Y., Cho K. J., Lee Y. In vivo biodistribution and toxicology of carboxylated graphene quantum dots. *ACS Nano* 7: 6858–6867, 2013
- [71] Yuan X., Liu Z., Guo Z., Ji Y., Jin M., Wang X., Cellular distribution and cytotoxicity of graphene quantum dots with different functional groups, *Nanoscale Res. Lett.* 9: 108, 2014
- [72] Wörle-Knirsch J. M., Pulskamp K., Krug H. F. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett.* 6: 1261–1268, 2006
- [73] Casey A., Herzog E., Davoren M., Lyng F. M., Byrne H. J., Chambers G. Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon

- nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon* 45: 1425–1432, 2007
- [74] Sanchez V. C., Jachak A., Hurt R. H., Kane A. B. Biological Interactions of Graphene-family nanomaterials: An interdisciplinary review. *Chem. Res. Toxicol.* 25: 15-34, 2012
- [75] Won R.: Photovoltaics graphene-silicon solar cells. *Nat. Photonics* 4:411, 2010
- [76] Lee B., Kim J., Kang D., Lee D., Ko S., Lee H., Lee C., Kim J., Shin H., Song M. Highly efficient polymer light-emitting diodes using graphene oxide as a hole transport layer. *ACS Nano* 6: 2984–2991, 2012
- [77] Zhang W., Guo Z., Huang D., Liu Z., Guo X., Zhong H. Synergistic effect of chemophothermal therapy using PEGylated graphene oxide. *Biomaterials* 32: 8555–8561, 2011
- [78] Nurunnabi M., Khatun Z., Huh K. M., Park S. Y., Lee D. Y., Cho K. J., Lee Y. K., In vivo biodistribution and toxicology of carboxylated graphene quantum dots. *ACS Nano* 7: 6858-6867, 2013
- [79] Nurunnabi M., Khatun Z., Nafiujjaman M., Lee D. G., Lee Y. K. Surface coating of graphene quantum dots using mussel-inspired polydopamine for biomedical optical imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5: 8246-8253, 2013
- [80] Dembereldorj U., Kim M., Kim S., Ganbold E.-O., Lee S. Y., Joo S.-W. A spatiotemporal anticancer drug release platform of PEGylated graphene oxide triggered by glutathione in vitro and in vivo. *J. Mater. Chem.* 22: 23845-23851, 2012
- [81] Depan D., Shah J., Misra R. D. K. Controlled release from folate-decorated and graphene mediated drug delivery system: Synthesis, loading efficiency, and drug release response. *Mater. Sci. Eng. C* 31: 1305-1312, 2011
- [82] Zheng X. T., Ma X. Q., Li C. M. Highly efficient nuclear delivery of anti-cancer drugs using a bio-functionalized reduced graphene oxide. *J. of Colloid ant Int. Sci.* 467: 35-42, 2016
- [83] Yang X., Zhang X., Ma Y., Huang Y., Wang Y., Chen Y. Superparamagnetic graphene oxide-Fe₃O₄ nanoparticles hybrid for controlled targeted drug carriers. *J. Mater. Chem.* 19: 2710-2714, 2009
- [84] Yang Y., Wang Y., Huang X., Ma Y., Huang Y., Yang R., Duan H., Chen Y. Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH-sensitivity. *J. Mater. Chem.* 21: 3448-3454, 2011

- [85] Xu Z., Wang S., Li L., Wang M., Shi P., Huang X. Covalent functionalization of graphene oxide with biocompatible poly(ethylene glycol) for delivery of paclitaxel. *ACS Appl. Mater. Int.* 6: 17268-17276, 2014
- [86] Parvez K., Li R., Puniredd S. R., Hernandez Y., Hinkel F., Wang S., Feng X., Mullen K. Electrochemically exfoliated graphene as solution-processable, highly conductive electrodes for organic electronics. *ACS Nano* 7: 3598-3606, 2013
- [87] Novoselov K. S., Geim A. K., Morozov S. V., Jiang D., Zhang Y., Dubonos S. V., Grigorieva I. V., Firsov A. A. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* 306: 666-669, 2004
- [88] Novoselov, K. S. Grafén: materiály v plochem světe, Nobelovská přednáška 8.12. 2010, The Nobel Foundation 2010, Čs. čas. fyz. 62 (2012)
- [89] Novoselov N. S., Fal'ko V. I., Colombo L., Gellert P. R., Schwab M. G., Kim K. A roadmap for graphene. *Nature* 490: 192-200, 2012
- [90] Liu Z., Tabakman S., Welsher K., Dai H. Carbon nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Res.* 2, 85-120, 2009
- [91] Gurunathan S., Han J. W., Eppakayala V., Dayem A. A., Kwon D. N. Kim J. H. Biocompatibility effects of biologically synthesized graphene in primary mouse embryonic fibroblast cell. *Nanoscale Res. Lett.* 8: 393, 2013
- [92] Chng E. L., Pumera M. The toxicity of graphene oxides: Dependence on the oxidative methods used. *Chem.Eur. J.* 19: 8227-8235, 2013
- [93] Akhavan O., Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano* 4: 5731-5736, 2010
- [94] Tazawa H., Tatemichi M., Sawa T., Gilibert I., Ma N., Hiraku Y., Donehower L. A., Ohgaki H., Kawanishi S., Ohshima H. Oxidative and nitrative stress caused by subcutaneous implantation of a foreign body accelerates sarcoma development in Trp53^{+/-} mice. *Carcinogenesis* 28: 191-198, 2007
- [95] Williams L. B., Metge D. W., Eberl D. D., Harvey R.W., Turner A. G., Prapaipong P., Poret-Peterson A. T. What Makes a Natural Clay Antibacterial? *Environ. Sci. Tech.* 45: 3768-3773, 2011
- [96] Chang, Y., Yang, S. T., Liu, J. H., Dong, E., Wang, Y., Cao, A., Liu, Y., Wang H. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol. Lett.* 200: 201-210, 2011
- [97] Wang, K., Ruan, J., Song, H., Zhang, J., Wo, Y., Guo, S., and Cui, D. Biocompatibility of graphene oxide. *Nanoscale Res Lett.* 6: 8, 2011

- [98] Zhang, Y., Ali, S. F., Dervishi, E., Xu, Y., Li, Z., Casciano, D., and Biris, A. S. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS Nano* 4, 3181–3186, 210
- [99] Akhavan O., Ghaderi E., Akhavan A. Size-dependent genotoxicity of graphene nanoplatelets in human stem cells. *Biomaterials* 33: 8017-8025, 2012
- [100] Akhavan O., Ghaderi E., Emamy H., Akhavan F. Genotoxicity of graphene nanoribbons in human mesenchymal stem cells. *Carbon* 54: 419-431, 2013
- [101] Markovic Z. M., Harhaji-Trajkovic L. M., Todorovic-Markovic B. M. In vitro comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes. *Biomaterials* 32: 1121-1129, 2011
- [102] Yuan J., Gao H., Ching C. B. Comparative protein profile of human hepatoma HepG2 cells treated with graphene and single walled carbon nanotubes: an iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis. *Toxicol. Lett.* 207:213-221, 2011
- [103] Pinto A. M., Moreira S., Concalves I. C., Gama F. M., Mendes A. M., Magalhaes F. D., Biocompatibility of poly(lactic acid) with incorporated graphene-based materials. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 104: 229-239, 2013
- [104] Guo M., Li D., Zhao M., Zhang Y. T., Geng D. S., Lushington A., Sun X. Nitrogen ion implanted graphene as thrombo-protective safer and cytoprotective alternative for biomedical applications. *Carbon* 61: 321-328, 2013
- [105] Yoon O. J., Kim C. H., Sohn I. Y., Lee N. E. Toxicity analysis of graphene nanoflakes by cell-based electrochemical sensing using an electrode modified with nanocomposite of graphene and Nafion. *Sensors and Actuators B-Chemical* 188: 454-461
- [106] Yoon O. J., Kim I., Sohn I. Y., Kieu T. T., Lee N. E. Toxicity of graphene nanoflakes evaluated by cell-based electrochemical impedance biosensing. *J. Biomed Mater. Res. Part A.* 102: 2288-2294
- [107] Chowdhury S. M., Lalwani G., Zhang K. V., Yang J. Y., Neville K., Sitharaman B. Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons. *Biomaterials* 34: 283-293, 2013
- [108] Begum P., Fugetsu B. Induction of cell death by graphene in Arabidopsis thaliana (Columbia ecotype) T87 cell suspensions. *J. Hazard Mater.* 260: 1032-1041, 2013
- [109] K. Wang, J. Ruan, H. Song, J. Zhang, Y. Wo, S. Guo, D. Cui, Biocompatibility of graphene oxide, *Nanoscale Res. Lett.* 6: 8, 2010
- [110] Syama S., Mohanan P. V. Safety and biocompatibility of graphene: A new generation nanomaterial for biomedical application, *Int. J. of Biol. Macromol.* 86: 546-555, 2016

- [111] Lu C. H., Zhu C. L., Li J., Liu J. J., Chen X., Yang H. H. Using graphene to protect DNA from cleavage during cellular delivery. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* 46: 3116–3118, 2010
- [112] Hu W., Peng C., Lv M., Li X., Zhang Y., Chen N., Fan C., Huang Q. Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. *ACS Nano* 5: 3693–3700, 2011
- [113] Sasidharan A., Panchakarla L. S., Chandran P., Menon D., Nair S., Rao C. N. R., Koyakutty, M. Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene. *Nanoscale* 3: 2461–2464, 2011
- [114] Neyakati T., Cousins B. G., Seifalian A. M., Toxicology of chemically mod. graphene-based materials for medical application. *Arch. Toxicol.* 88: 1987-2012, 2014
- [115] Liu Z., Tabakman S., Welsher K., Dai H. J., Carbon Nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Res.* 2: 85-120, 2009
- [116] Lalwani G., Sitharaman B., Multifunctional fullerene- and metallofullerene-based nanobiomaterials. *Nano Life* 3: 1342003, 2013
- [117] Zhang S., Yang K., Feng L., Liu Z. In vitro and in vivo behaviors of dextran functionalized graphene. *Carbon* 49: 4040-9, 2011
- [118] Yang K., Wan J., Zhang Y., Lee S.-T., Liu Z. In vivo pharmacokinetics, longterm biodistribution, and toxicology of pegylated graphene in mice. *ACS Nano* 5: 516-522, 2011
- [119] ICH guidance on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies s3a
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S3A/Step4/S3A_Guidelinepdf1994 .
- [120] OECD guidelines for the testing of the chemicals-draft proposal for a revised TG 417: Toxicokinetics. <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/41690691pdf.2008> .
- [121] M3(R2) nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals.
<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm129520.htm>
<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm129520.htm2010> .
- [122] Guidance for industry, developing medical imaging drug and biological products, part 1: conducting safety assessments. Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration; 2004. <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

- [123] Kanakia S., Toussaint J. D., Chowdhurz S. M., Tembulkar T., Lee S., Jiang Y-P., Lin R. Z., Shroyer K. R., Moore W., Sitharaman B. Dose ranging, expanded acute toxicity and safety pharmacology studies for intravenously administered functionalized graphene nanoparticle formulations. *Biomaterials* 35: 7022-7031, 2014
- [124] Olive P. L., Durand R., Detection of hypoxic cells in a murine tumor with the use of the comet assay, *J. of the National Cancer Institute* 84, 707-711, 1992
- [125] Liu Y., Luo Y., Wu J., Wang Y., Yang X., Yang R., Wang B., J., Zhang N. Graphene oxide can induce in vitro and in vivo mutagenesis. *Sci. Rep.* 3: 3469
- [126] Wang A., Pu K., Dong B., Liu Y., Zhang L., Zhang Z., Duan W., Zhu Y. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity and genotoxicity of graphene oxide towards human lung fibroblast cells. *J. Appl. Toxicol.* 33: 1156-1164, 2013
- [127] Bengtson S., Kling K., Madsen A. M. Noergaard A. W., Jacobsen N. R., Clausen P. A., Alonso B., Pesquera A., Zurutuza A., Ramos R., Okuno H., Dijon J., Wallin H., Vogel U. No cytotoxicity or genotoxicity of graphene and graphene oxide in murine lung epithelial FE1 Cells in vitro. *Environ. and Molecular Mutagenesis* 57: 469-482, 2016
- [128] Akhavan O., Ghaderi E., Akhavan A., Size-dependent genotoxicity of graphenenanoplatelets in human stem cells. *Biomaterials* 33: 8017–8025, 2012
- [129] Ren H., Wang C., Zhang J., Zhou X., Xu D., Zheng J., Guo S. Zhang J. DNA cleavage system of nanosized graphene oxide sheets and copper ions. *ACS Nano* 4: 7169-7174, 2010
- [130] Turrens J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J. Physiol.London* 552: 335–344, 2003
- [131] Li Y., Liu Y., Fu Y., Wei T., Guyader L. L., Gao G., Liu R., Chang Y., Chen C. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials* 33: 402-411, 2012
- [132] Zhou H., Zhao K., Li W., Yang N., Liu Y., Chen C., Wei T. The interactions between pristine graphene and macrophages and the production of cytokines/chemokines via TLR- and NF-κB-related signaling pathway. *Biomaterials* 33: 6933-6942, 2012
- [133] Lammel T., Boisseaux P., Fernandez/Cruz M.-L., Navas J. M. Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. *Particle and Fibre Toxicology* 10: 27, 2013
- [134] Zorov D. B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochem. Biophys. Acta-Bioenerg* 1757(5–6): 509–517, 2006

- [135] Jacobsen N. R., Saber A. T., White P., Moller P., Pojana G., Vogel U., Loft S., Gingerich J., Soper L., Douglas G. R., Wallin H. Increased mutant frequency by carbon black, but not quartz, in the lacZ and cII transgenes of muta mouse lung epithelial cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 48: 451-461, 2007
- [136] Jacobsen N. R., Pojana G., White P., Moller P., Cohn C. A., Korsholm K. S., Vogel U., Marcomini A., Loft S., Wallin H. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Muttrade mark-Mouse lung epithelial cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 49: 476-487, 2008
- [137] Zhou H., Zhang B., Zheng J., Yu M., Zhou T., Zhao K., Jia Y., Gao X., Chen C., Wei T. The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene via the impairment of mitochondrial respiration. *Biomaterials* 35: 1597-1607, 2014
- [138] Goenka S., Sant V., Sant S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *J. Controlled Release* 173: 75, 2014
- [149] Tian B., Wang C., Zhang S., Feng L., Liu Z. Photothermally enhanced photodynamic therapy delivered by nano-graphene oxide. *ACS Nano* 5, 7000-7009, 2011
- [140] Huang P., Xu C., Lin J., Wang C., Wang X., Zhang C., Zhou X., Guo S., Cui D. Folic acid-conjugated graphene oxide loaded with photosensitizers for targeting photodynamic therapy. *Theranostics* 1: 240-250, 2011
- [141] Wojtoniszak M., Urbas K., Perużyńska M., Kurzawski M., Drożdżik M., Mijowska E. Covalent conjugation of graphene oxide with methotrexate and its antitumor activity. *Chem. Phys. Lett.* 568–569: 151-156, 2013
- [142] Rana V. K., Choi M.-C., Kong J.-Y., Kim G. Y., Kim M. J., Kim S.-H., Mishra S., Singh R. P., Ha C. S. Synthesis and drug-delivery behavior of chitosan-functionalized graphene oxide hybrid nanosheets. *Macromol. Mater. Eng.* 296: 131-140, 2011
- [143] Tuček J., Sofer Z., Bouša D., Pumera M., Holá K., Malá A., Poláková K., Havrdová M., Čépe K., Tomanec O., Zbořil R., Air-stable superparamagnetic metal nanoparticles entrapped in graphene oxide matrix. *Nat. Commun.* 7: 12879, 2016
- [144] Kluchova K., Zboril R., Tucek J., Pecova M., Zajoncova L., Safarik I., Mashlan M., Markova Z., Jancik D., Sebel M., Bartonkova H., Bellesi V., Novak P. and Petridis D., Superparamagnetic maghemite nanoparticles from solid-state synthesis – their functionalization towards peroral MRI contrast agent and magnetic carrier for trypsin immobilization. *Biomaterials* 30:2855–2863, 2009
- [145] Tucek J. Magnetismus nanocastic oxidu zeleza a dvojneho perovskitu typu Sr₂FeRuO₆. PhD thesis, Univerzita Palackeho v Olomouci, 2008

- [146] Bastow T. J., Trinchi A. NMR analysis of ferromagnets: Fe oxides. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 35: 25-31, 2009
- [147] Nguyen T. K. Thanh. Magnetic nanoparticles: From fabrication to clinical applications. CRC Press 2012, ISBN 9781439869321
- [148] Herchel R., Tuček J., Trávníček Z. Střídavá susceptibilita a vysokoteplotní magnetická měření a jejich využití v chemii a fyzice. Učební text v rámci projektu FRVŠ 1623/2009, 2009.
- [149] Xu C., Sun S. Mododisperse magnetic nanoparticles for biomedical applications. *Polym. Int.* 56: 821-826, 2007
- [150] Mahmoudi M., Simchi A., Imani M., Hafeli U. O. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles with rigid cross-linked polyethylene glycol fumarate coating for application in imagin and drug delivery. *J. Phys. Chem. C* 113: 8124–8131, 2009
- [151] Mahmoudi M., Simchi A., Imani M., Milani A. S., Stroeve P. Optimal design and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with polyvinyl alcohol for targeted delivery and imaging. *J. Phys. Chem. B* 112: 14470-14481, 2008
- [152] Mahmoudi M., Simchi A., Imani M., Milani A. S., Stroeve P. An in vitro study of bare and poly(ethylene glycol)-co-fumarate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: A new toxicity identification procedure. *Nanotechnology* 20: 225104-225104, 2009
- [153] Mahmoudi M., Simchi A., Imani M., Shokrgozar M. A., Milani A. S., Hafeli U. O., Stroeve P. A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids Surf. B* 75: 300–309, 2010
- [154] M. Mahmoudi, A. Simchi, M. Imani, P. Stroeve and A. Sohrabi Templated growth of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by temperature programming in the presence of poly(vinyl alcohol). *Thin Solid Films* 518: 4281-4289, 2010
- [155] Mahmoudi M., Simchi A., Milani A. S., Stroeve P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 336: 510-518, 2009
- [156] Mahmoudi M., Simchi A., Vali H., Imani M., Shokrgozar M. A., Azadmanesh K., Azari F. Cytotoxicity and cell cycle effects of bare and poly(vinyl alcohol)-coated iron oxide nanoparticles in mouse fibroblasts. *Adv. Eng. Mater.* 11: B243–B250, 2009
- [157] Bulte J. W., Douglas T., Witwer B., Zhang S. C., Strable E., Lewis B. K., Zywicke H., Miller B., van Gelderen P., Moskowitz B. M., Duncan I. D., Frank J. A. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19: 1141-1147, 2001

- [158] Bulte J. W., Duncan I. D., Frank J. A. In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22: 899-907, 2002
- [159] Lewin M., Carlesso N., Tung C. H., Tang X. W., Cory D., Scadden D. T., Weissleder R., Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat. Biotechnol.* 18: 410-414, 2000
- [160] Safarik I., Safarikova M. Magnetic nanoparticles for in vitro biological and medical applications an overview. In Nguyen T. K. Thanh, editor, *Magnetic nanoparticles from fabrication to clinical applications*, pages 215–236. Taylor & Francis Group, 2012
- [161] Bulte J. W., Kraitchman D. L. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR in biomedicine* 17: 484-499, 2004
- [162] Berman S. M. C., Walczak P., Bulte J. W. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Nanomed. and Nanobiotech.* 3: 343-55, 2011.
- [163] Dunnett S. B., Bjorklund A., Lindvall O., Cell therapy in parkinson's disease – stop or go? *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 365-369, 2001
- [164] Jiang Q., Zhang Z. G., Ding G. L., Silver B., Zhang L., Meng H. et al. MRI detects white matter reorganization after neural progenitor cell treatment of stroke. *Neuroimage* 32: 1080-1089, 2006
- [165] Jiang Q., Zhang Z. G., Ding G. L., Zhang L., Ewing J. R., Wang L. et al., Investigation of neural progenitor cell induced angiogenesis after embolic stroke in rat using MRI. *Neuroimage* 28: 698-707, 2005
- [166] Hoehn M., Kustermann E., Blunk J., Wiedermann D., Trapp T., Wecker S., et al., Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: A highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16267-16272, 2002
- [167] Arbab A. S., Yocum G. T., Kalish H., Jordan E. K., Anderson S. A., Khakoo A. Y, et al., Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood* 104: 1217-1223, 2004
- [168] Bulte J. W., Douglas T., Witwer B., Zhang S. C., Strable E., Lewis B. K., et al., Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19: 1141-1147, 2001
- [169] Weissleder R., Stark D. D., Engelstad B. L., Bacon B. R., Compton C. C., White D. L., Jacobs P., Lewis J. *Am. J. Roentgenol.* 152: 167-173, 1989

- [170] Glickstein H., El R. B., Link G., Breuer W., Konijn A. M., Hershko C., Nick H., Cabantchik Z. I. Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: Accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. *Blood* 108: 3195-3203, 2006
- [171] Kokeny P., Cheng Y-Ch. N., Liu S., Xie H., Jiang Q. Quantifications of in vivo labeled stem cells based on measurements of magnetic moments. *Magnetic Resonance Imaging* 35: 141-147, 2017
- [172] Frank J. A., Miller B. R., Arbab A. S., Zywicke H. A., Jordan E. K., Lewis B. K., et al., Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology* 228: 480-487, 2003
- [173] Bulte J. W., Kraitchman D. L., Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging, *NMR Biomed.* 17: 484-499, 2004
- [174] Bulte J. W., Ben-Hur T., Miller B. R., Mizrahi-Kol R., Einstein O., Reinhartz E., et al., MR microscopy of magnetically labeled neurospheres transplanted into the Lewis EAE rat brain. *Magn. Reson. Med.* 50: 201-205, 2003
- [175] Bulte J. W., Cuyper M. D., Magnetoliposomes as contrast agents, *Methods Enzymol.* 373: 175-198, 2003
- [176] Frank J. A., Anderson S. A., Kalsih H., Jordan E. K., Lewis B. K., Yocum G. T., et al. Methods for magnetically labeling stem and other cells for detection by in vivo magnetic resonance imaging. *Cytotherapy* 6: 621-625, 2004
- [177] Arbab A. S., Yocum G. T., Rad A. M., Khakoo A. Y., Fellowes V., Read E. J., et al. Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells, *NMR Biomed* 18: 553-559, 2005
- [178] Janowski M., Walczak P., Kropiwnicki T., Jurkiewicz E., Domanska-Janik K., Bulte J. W., et al. Long-term MRI cell tracking after intraventricular delivery in a patient with global cerebral ischemia and prospects for magnetic navigation of stem cells within the csf. *PLoS One* 9: p. e97631, 2014
- [179] Bulte J. W., In vivo MRI cell tracking: clinical studies, *AJR Am. J. Roentgenol* 193: 314-325, 2009
- [180] Tallheden T., Nannmark U., Lorentzon M., Rakotonirainy O., Soussi B., Waagstein F., Jeppsson A., Sjögren-Jansson E., Lindahl A., Omerovic E. In vivo MR imaging of magnetically labeled human embryonic stem cells. *Life Sciences* 79: 999-1006, 2006

- [181] Reddy L. H., Arias J. L., Nicolas J., Couvreur P. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemical Rev.* 112: 5818-5878, 2012
- [182] Zhao F., Zhao Y., Liu Y., Chang X., Chen C., Zhao Y. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small* 7: 1322-1337, 2011
- [183] Hoshino A., Fujioka K., Oku T., Suga M., Sasaki Y. F., Ohta T., Yasuhara M., Suzuki K., Yamamoto K. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nano Lett.* 4: 2163-2169, 2004
- [184] Alcantar N., Aydil E. S., Israelachvili J. N. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 51: 343-351, 2000
- [185] Bjugstad K. B., Lampe K., Kern D. S., Mahoney M. Biocompatibility of poly(ethylene glycol)-based hydrogels in the brain: An analysis of the glial response across space and time. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 95:79-91, 2010
- [186] Moghimi S., Symonds P., Murray J., Hunter A., Debska G., Szewczyk A. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol. Ther.* 11: 990-995, 2005
- [187] Iida T., Mori T., Katayama Y., Niidome T. Overall interaction of cytosolic proteins with the PEI/DNA complex. *J. Control Release* 18: 364-369, 2007
- [188] Kircheis R., Wightman L., Wagner E. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53: 341-358, 2001
- [189] Pierrat P., Wang R., Kereselidze D., Lux M., Didier P., Kichler A., et al. Efficient in vitro and in vivo pulmonary delivery of nucleic acid by carbon dot-based nanocarriers. *Biomaterials* 51: 290-302, 2015
- [190] Leroueil P. R., Berry S. A., Duthie K., Han G., Rotello V. M., McNerny D. Q., Baker J. R., Orr B. G., Holl M. M. Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano Letters* 8: 420-424, 2008
- [191] von Gersdorff K., Sanders N. N., Vandenbroucke R., De Smedt S. C., Wagner E., Ogris M., The internalization route resulting in successful gene expression depends on both cell line and polyethylenimine polyplex type. *Mol. Ther.* 14: 745-753, 2006
- [192] Rémy-Kristensen A., Clamme J. P., Vuilleumier C., Kuhry J. G., Mély Y. Role of endocytosis in the transfection of L929 fibroblasts by polyethylenimine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta* 1514: 21-32, 2001
- [193] Akinc A., Langer R., Measuring the pH environment of DNA delivered using nonviral vectors: implications for lysosomal trafficking. *Biotechnol Bioeng* 78: 503-508, 2002

- [194] Merdan T., Kunath K., Fischer D., Kopecek J., Kissel T. Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm. Res.* 19: 140-146, 2002
- [195] Miyata K., Oba M., Nakanishi M., Fukushima S., Yamasaki Y., Koyama H. et al. Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 130: 16287-16294, 2008
- [196] Benjaminsen R. V., Matthebjerg M. A., Hneriksen J. R., Moghimi S. M., Andersen T. L. The possible „proton sponge“ effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH. *Mol. Ther.* 21: 149-157, 2013
- [197] Zhang X-Q., Xu X., Bertrand N., Pridgen E., Swami A., Farokhzad O. C. Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine. *Adv. Drug Del. Rev.* 64: 1363-1384, 2012
- [198] Stoffler D., Fahrenkrog B., Aebi U., The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 391-401, 1999
- [199] Conti E., Izaurralde E. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr. Opin Cell Biol.* 13: 310-319, 2001
- [200] Cooper G. M., *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd edition, ASM Press 2000, ISBN 0-87893-106-6
- [201] Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Základy buněčné biologie*, ISBN: 80-902906-2-0, Espero Publishing 2005
- [202] Přednáška doc. MUDr. Tomáše Kučery, Ph.D., Ústav histologie a embryologie 1. LF UK: <http://docplayer.cz/8959155-Bunka-v-jadro-bunecny-cyklus-a-bunecne-deleni-mitosa-ustav-histologie-a-embryologie-1-lf-uk.html>
- [203] <http://slideplayer.cz/slide/3008839/>
- [204] Fahrenkrog B., Aebi U., The nuclear pore complex: Nucleocytoplasmic transport and beyond, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 757-766, 2003
- [205] Stoffler D., Feja B., Fahrenkrog B., Walz J., Typke D., Aebi U. Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture – implications for nucleocytoplasmic transport. *J. Mol. Biol.* 328: 119-130, 2003
- [206] Hinshaw J. E., Carragher B. O., Milligan R. A. Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* 69: 1133-1141, 1992

- [207] Akey C. W., Radermacher M. Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by 3-dimensional cryo-electron microscopy. *J. Cell Biol.* 122: 1-19, 1993
- [208] Wang R., Brattain M. G., The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60 kDa, *FEBS Lett.* 581: 3164-3170, 2007
- [209] Barua S., Mitragotri S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects, *Nano Today* 9: 223-243, 2014
- [210] Mohr D., Frez S., Fischer T., Guttler T. Gorlich D. Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. *EMBO J.* 28: 2541-53, 2009
- [211] Samudram A., Mangalassery B. M., Kowshik M., Patincharath N., Varier G. K., Passive permeability and effective pore size of HeLa cell nuclear membranes, *Cell Biol. Int.* 40: 991-998, 2016
- [212] Holden P., Horton W. A., Crude subcellular fractionation of cultured mammalian cell lines, *BMC Res Notes* 2: 243, 2009
- [213] <http://www.cram.com/flashcards/mcp-lect-19-nucleus-2278234>
- [214] http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/bunka/2008/11_2008%2008%20-%20Jadro.pdf
- [215] Horák D., Babič M., Jendelová P., Herynek V., Trchová M., Likavčanová K., Kapcalová M., Hájek M. and Syková E. Effect of different magnetic nanoparticle coatings on the efficiency of stem cell labeling. *J. of Magnetism and Magnetic Materials* 321: 1539-1547, 2009
- [216] Magro M., Sinigaglia G., Nodari L., Tucek J., Polakova K., Marusak Z., Cardillo S., Salviulo G., Russo U., Stevanato R., Zboril R., Vianello F., Charge binding of rhodamine derivative to OH(-) stabilized nanomaghemite: Universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors. *Acta Biomater.* 8: 2068-76, 2012
- [217] Golovko D. M., Henning T., Bauer J. S., et al. Accelerated stem cell labeling with ferucarbotran and protamine. *Eur Radiol.* 20: 640–648, 2010
- [218] Heyn. C., Bowen C. V., Rutt B. K., Gareau P. J. Single cell detection with FIESTA: Effect of iron loading and distribution. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 11: 805, 2003
- [219] Berman S. M. C., Walczak P., Bulte J. W. M., Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Wiley Int. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 3: 343-355, 2011

- [220] Kostura L., Kraitchman D. L., Mackay A. M., Pittenger M. F., Bulte J. W. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed.* 17:513-517, 2004
- [221] Chang Y. K., Liu Y. P., Ho J. H., Hsu S. C., Lee O. K. Amine surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles interfere with differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 30:1499-1506, 2003
- [222] Wilhelm C., Gazeau F., Roger J., et al. Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: Kinetic analysis of membrane adsorption and subsequent internalization. *Langmuir* 18: 8148-8155, 2002
- [223] Haruhs-Frenkel O., Debotton N., Benita S., Altschuler Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353: 26-32, 2007
- [224] Ding C., Zhu A., Tian Y. Functional surface engineering of C-dots for fluorescent biosensing and in vivo bioimaging. *Acc. Chem. Res.* 47, 20-30, 2014
- [225] Christensen I. L., Sun Y. P., Juzenas P. Carbon dots as antioxidants and prooxidants. *J. Biomed. Nanotechnol.* 7: 667-676, 2011
- [226] Markovic M. Z., Ristic B. Z., Arskin K. M., Klisic D. G., Harhaji-Trajkovic L. M., Todorovic-Markovic B. M. et al. Graphene quantum dots as autophagy-inducing photodynamic agents. *Biomaterials* 33: 7084-7092, 2012
- [227] Biju V., Muraleedharan D., Nakayama K., Shinohara Y., Itoh T., Baba Y., Ishikawa M. Quantum dot-insect neuropeptide conjugates for fluorescence imaging, transfection, and nucleus targeting of living cells. *Langmuir* 23: 10254-10261, 2007
- [228] Luo P. G., Yang F., Yang S.-T., Sonkar S. K., Yang L., Broglie J. J., Liu Y., Sun Y. P. Carbon-based quantum dots for fluorescence imaging of cells and tissues. *RSC Adv.* 4: 10791-10807, 2014
- [229] Wang H., Wang X. In vitro nucleus nanoprobe with ultra-small polyethylenimine functionalized graphene quantum dots. *RSC Adv.* 5: 75380-75385, 2015
- [230] Yuan F., Li S., Fan Z., Meng X., Fan L., Yang S., Shining carbon dots: Synthesis and biomedical and optoelectronic applications. *Nanotoday* 11: 565-586, 2016
- [231] Kang Y. F., Fang Y. W., Li Y. H., Li W., Yin X. B. Nucleus staining with biomolecule-mimicking nitrogen-doped carbon dots prepared by a fast neutralization heat strategy. *Chem. Commun.* 51: 16956-16959, 2015
- [232] Gao Z., Shen G. et al. Carbon dots: A safe nanoscale substance for the immunologic system of mice. *Nanoscale Res Lett.* 8: 276, 2013

- [233] Wang K., Gao Z., Gao G., Wo Y., Wang Y., Shen G., Cui D. Systematic safety evaluation on photoluminescent carbon dots. *Nanoscale Res. Lett.* 8: 122, 2013
- [234] Jin S.H., Kim D. H., Jun G. H., Hong S. H., Jeon S. Tuning the photoluminescence of graphene quantum dots through the charge transfer effect of functional groups. *ACS Nano* 7: 1239-1245, 2013
- [235] Li H. T., He X., Kang Z., Huang H., et al. Water-Soluble Fluorescent Carbon Quantum Dots and Photocatalyst Design. *Angewandte Chemie-International Edition* 49: 4430-4434, 2010
- [236] Soenen S. J., Manshian B. B., Himmelreich U., Demeester J., Breackmans K., De Smedt S. C. The performance of gradient alloy quantum dots in cell labeling. *Biomaterials* 35: 7249-7258, 2014
- [237] Magrez A., Kasas S., Salicio V., Pasquier N., Seo J. W., et al. Cellular Toxicity of Carbon-Based Nanomaterials. *Nano Lett.* 6: 1121-1125, 2006
- [238] Buyukhatipoglu K., Clyne A. M., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *J. Biomed. Mater. Res. A* 96: 186-195, 2011
- [239] Soenen S. J., Rivera-Gil P., Montenegro J.-M., et al. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* 6: 444-465, 2011
- [240] Verbon E. H., Post J. A., Boonstra J. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 511: 1-6, 2012
- [241] Wells P. G., McCallum G. P., Chen C. S., Henderson J. T., Lee C. J., Perstin J., Preston T. J., Wiley M. J., Wong A. W. Oxidative Stress in Developmental Origins of Disease: Teratogenesis, Neurodevelopmental Deficits, and Cancer. *Toxicological Sciences* 108: 4-18, 2009
- [242] Lim, Y. B., Kim S., Suh H., Park J. Biodegradable, endosome disruptive, and cationic network-type polymer as a highly efficient and nontoxic gene delivery carrier. *Bioconjugate Chemistry* 13: 952-957, 2002
- [243] Park J., Nam J., Won N., Jin H. et al. Compact and stable quantum dots with positive, negative, or zwitterionic surface: Specific cell interaction and non-specific adsorptions by the surface charges. *Adv. Funct. Mater.* 21: 1558-1566, 2011
- [244] Chen N., He Y., Su Y., Li X., Huang Q., Zhang X., Tai R., Fan C. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials* 33: 1238-1244, 2012

- [245] Soenen S. J., Manshian B. B., Aubert T., Himmelreich U. et al. Cytotoxicity of cadmium-free quantum dots and their use in cell bioimaging. *Chem. Res. Toxicol.* 27: 1050-1059, 2014
- [246] Liu Y.X., Wang P., Wang Y., Zhu Z., Fang L. et al. The influence on cell cycle and cell division by various cadmium-containing quantum dots. *Small* 9: 2440-2451, 2013
- [247] Christensen I. L., Sun Y. P., Juzenas P. Carbon dots as antioxidants and prooxidants. *J. of Biomed. Nanotech.* 7: 667-676, 2011
- [248] Wolfe S. L. Introduction in cell and molecular biology, 1995, ISBN-10: 0534237789, ISBN-13: 978-0534237783
- [249] Collins K., Jacks T., Pavletich N. P. The cell cycle and cancer. *Proc. of the Nat. Ac. of Sci. of the USA* 94: 2776-2778, 1997
- [250] Lukas J., Lukas C., Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* 3: 997-1007, 2004
- [251] Cui D., Tian F., Ozkan C. S., Wang M., Gao H. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicology Lett.* 155: 73-85, 2005
- [252] <http://www.scrigroup.com/limba/ceha-slovaca/19/Bunn-cyklus-a-jeho-regulace91366.php>
- [253] Tomankova K., Kolarova H., Bajgar R., Jirova D., Kejlova K., Mosinger J. Study of the photodynamic effect on the A549 cell line by atomic force microscopy and the influence of green tea extract on the production of reactive oxygen species. *Ann. NY Acad. Sci.* 1171: 549-558, 2009

7 PŘÍLOHY

Příloha 1:

Havrdova M., Polakova K., Skopalik J., Vujtek M., Mokdad A., Homolkova M., Tucek J., Nebesarova J., Zboril R. Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM) as an Approach of Nanoparticles Detection Inside Cells. *Micron* 67: 149-154, 2014

Příloha 2:

Datta K. K. R., Kozak O., Ranc V., **Havrdova M.**, Bourlinos A. B., Safarova K., Hola K., Tomankova K., Zoppellaro G., Otyepka M., Zboril R. Quaternized Carbon Dots Modified Graphene Oxide for Selective Cell Labelling – Controlled Nucleus and Cytoplasm Imaging. *Chem. Commun.* 50: 10782-10785, 2014

Příloha 3:

Skopalik J., Polakova K., **Havrdova M.**, Justan I., Magro M., Milde D., Knopfova L., Smarda J., Polakova H., Gabrielova E., Vianello F., Michalek J., Zboril R. Mesenchymal Stromal Cell Labeling by New Uncoated Superparamagnetic Maghemite Nanoparticles in Comparison with Commercial Resovist – an Initial In Vitro Study. *Int. J. of Nanomedicine* 9: 5355-5372, 2014

Příloha 4:

Havrdova M., Hola K., Skopalik J., Tomankova K., Petr M., Cepe K., Polakova K., Tucek J., Bourlinos A. B., Zboril R. Toxicity of Carbon Dots – Effect of Surface Functionalization on The Cell Viability, Reactive Oxygen Species Generation and Cell Cycle. *Carbon* 99: 238-248, 2016



Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) as an approach for nanoparticle detection inside cells



M. Havrdova^{a,*}, K. Polakova^a, J. Skopalik^b, M. Vujtek^c, A. Mokdad^a, M. Homolkova^d, J. Tucek^a, J. Nebesarova^e, R. Zboril^a

^a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Experimental Physics and Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17 listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^b Integrated Center of Cellular Therapy and Regenerative Medicine, ICRC - St. Anne's University Hospital, Pekarska 63, 62500 Brno, Czech Republic

^c Department of Experimental Physics, Faculty of Science, Palacky University, 17 listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^d Institute of Complex Systems Nove Hradky, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Zamek 136, 373 33 Nove Hradky, Czech Republic

^e Institute of Parasitology, Biology Centre, ASCR, v.v.i., Branisovska 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2014

Received in revised form 1 August 2014

Accepted 3 August 2014

Available online 13 August 2014

Keywords:

Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM)

Stem cells

Iron oxide nanoparticles

Cellular morphology

Endosomes

Cell uptake

ABSTRACT

When developing new nanoparticles for bio-applications, it is important to fully characterize the nanoparticle's behavior in biological systems. The most common techniques employed for mapping nanoparticles inside cells include transmission electron microscopy (TEM) and scanning transmission electron microscopy (STEM). These techniques entail passing an electron beam through a thin specimen. STEM or TEM imaging is often used for the detection of nanoparticles inside cellular organelles. However, lengthy sample preparation is required (i.e., fixation, dehydration, drying, resin embedding, and cutting). In the present work, a new matrix (FTO glass) for biological samples was used and characterized by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) to generate images comparable to those obtained by TEM. Using FE-SEM, nanoparticle images were acquired inside endo/lysosomes without disruption of the cellular shape. Furthermore, the initial steps of nanoparticle incorporation into the cells were captured. In addition, the conductive FTO glass endowed the sample with high stability under the required accelerating voltage. Owing to these features of the sample, further analyses could be performed (material contrast and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS)), which confirmed the presence of nanoparticles inside the cells. The results showed that FE-SEM can enable detailed characterization of nanoparticles in endosomes without the need for contrast staining or metal coating of the sample. Images showing the intracellular distribution of nanoparticles together with cellular morphology can give important information on the biocompatibility and demonstrate the potential of nanoparticle utilization in medicine.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Many advancements have occurred in a bid to properly image cells and intracellular structures, ranging from optical microscopy to the present techniques based on electron microscopy (Bogner et al., 2007). Electron microscopy has been a popular method for identifying subcellular structures since 1944, when scientist Keith R. Porter and Albert Claude first used an electron microscope to

observe the morphology and composition of cells (Porter et al., 1945). Subsequent imaging of cells rapidly expanded scientific knowledge of their morphology and the organization of organelles (Claude, 1948, 1950). This in turn prompted significant developments in molecular biology and medicine (Claude, 1962). Progress in medicine and other applications (such as electronics, textiles and biomaterials) was further stimulated in 1959 with the advent of nanotechnology (Singh et al., 2013). Nanotechnology has improved many of the tools and technologies required to view and understand nano-environments directly relevant to cell function and disease (Chen et al., 2014; Weissleder et al., 2014; Zhou et al., 2014).

Magnetic nanoparticles have found an irreplaceable role as magnetic markers of cells in magnetic resonance imaging (MRI).

* Corresponding author. Tel.: +420 585634485; fax: +420 585634958.

E-mail address: marketa.havrdova@upol.cz (M. Havrdova).

Thus, extensive searches have been made to find suitable types of magnetic nanoparticles and methods for characterizing cell behavior after magnetic nanoparticle labeling (Reddy et al., 2012). Many studies have demonstrated that the best magnetic properties are shown by superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) (Lodhia et al., 2010; Wilhelm et al., 2002). SPIONs have been used for cell labeling and tracking, cell sorting and also as magnetic resonance contrast agents (Babič et al., 2008). Analysis of the biocompatibility, rate of adsorption and internalization of SPIONs by mammalian cells is important for medical purposes (Singh et al., 2010). Thus, it is essential to image the presence of internalized nanoparticles and follow their distribution in cytoplasm.

Traditional toxicity studies provide global information about the interaction of nanoparticles with surrounding tissue. However, they lack the spatial resolution necessary to study individual nanoparticles and their interactions within a biological system. Electron analysis of tissue samples for nanoparticles localization can, in addition to standard cytotoxicological testing, provide detailed information on the toxicity and distribution of nanoparticles (Kempen et al., 2013).

Transmission electron microscopy (TEM) is usually employed to image nanoparticles inside organelles (Gupta and Gupta, 2005; Huang et al., 2013). However, the sample preparation required is time consuming and complicated, requiring many treatment processes such as fixation, dehydration, drying, embedding, trimming and cutting, and heavy metal staining (Donovan et al., 2002). Centrifugation and cell fixation processes can alter membrane properties (Nakase et al., 2004), leading to spurious uptake of nanoparticles (Zheng et al., 2011). Some of the above-mentioned steps can be eliminated by imaging in liquid, which is regarded as an emerging field of electron microscopy (Peckys and Jonge, 2014). However, these methods have not yet been refined sufficiently for general use. Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) coupled with energy dispersive X-ray (EDX) microanalysis and backscattered electron imaging (BEI) is an ideal analytical technique for characterizing and visualizing the elemental composition of a specimen (Patri et al., 2009; Zheng et al., 2011). FE-SEM has a spatial resolution of <1 nm and a number of other advantages, including much improved performance at low accelerating voltages (Goodhew et al., 2001). These properties of FE-SEM have allowed new approaches for life science studies to emerge, based on high resolution images previously only obtainable by using TEM. However, all previous studies in which FE-SEM has been used for cellular observation have focused on imaging nanoparticles adhering to the cellular membrane (Gupta and Curtis, 2004; Plascencia-Villa et al., 2012). In spite of the advanced capabilities of FE-SEM, no study has yet described its use for the accurate ultrastructural localization of nanoparticles inside cells. Here, we demonstrate high resolution FE-SEM images of nanoparticles inside endosomes which are comparable to TEM images.

The aim of this study was to follow the natural responses of cells during labeling by SPIONs. Different cell types reportedly exhibit different responses to different kinds of nanoparticles (Gupta and Curtis, 2004). In our work, we chose mesenchymal stem cells and SPIONs as both are important in the emerging fields of nanomedicine, especially in regenerative therapies (Ikebe and Suzuki, 2014; Odintsov et al., 2013; Wang et al., 2009). The ultra-high resolution of FE-SEM offers new insights into the dynamical processes of interactions between nanoparticles and cells. The preparation of samples for scanning electron microscopy (SEM) avoids the need for some of the time consuming steps required in TEM, such as resin embedding and sectioning. In addition, the unbroken shape of fixed cells allows details of the adsorption and mechanism of uptake to be obtained. Analysis of the influence of nanoparticles on the cellular morphology during their adsorption/uptake and subsequent investigation of the endosomes

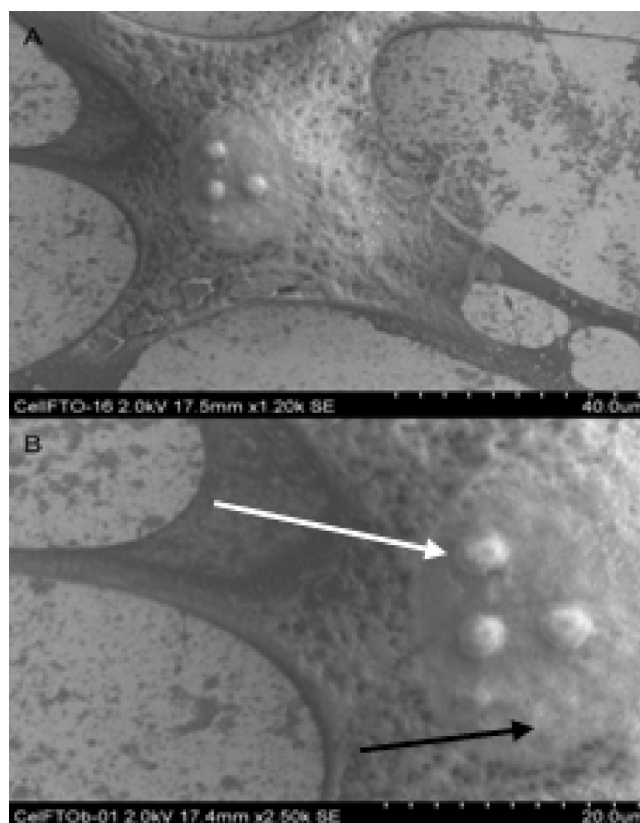


Fig. 1. Original morphology of a rat mesenchymal stem cell. The nucleus (black arrow) and nucleolus (white arrow) are well resolved in the image despite being located inside the cell. Magnification (a) 1200, (b) 2500 (Hitachi SU6600).

enables any potential cytotoxic effects of the nanoparticles to be assessed.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Transparent conducting oxide-coated glass (TCO22-15), comprising 2.2 mm thick sodalime glass coated on one side with a fluorine doped tin oxide ($\text{SnO}_2:\text{F}$) layer ("FTO" glass), was bought from Solaronix (Switzerland). The FTO sheet ($5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$) was cut into 1 cm pieces and then fashioned into a circular shape matching the shape of the wells in the plates used for cell cultivation. Thermanox coverslips were bought from Thermo Scientific (USA).

2.2. Cell cultivation and preparation of the sample

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) were isolated from the adipose tissue of healthy persons removed during liposuction. The cells were seeded on 24 well plates and grown in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 10% FBS and 2% penicillin/streptomycin at 37°C using a humidified 5% CO_2 incubator. The hMSCs were trypsinized (after the cells reached 60% confluency) and reseeded on the 24 well plates. In each well, a piece of FTO glass or Thermanox slide was inserted. The cells were allowed to grow on the FTO glass for 24 h, after which nanoparticles were added ($50\ \mu\text{g Fe ml}^{-1}$) to each well. The cells were incubated with nanoparticles for 2 days to allow a sufficient number of nanoparticles to be incorporated inside. SPION labeled cells grown on FTO glass were fixed with 3% glutaraldehyde (in PBS) and then washed three times with 0.2 M phosphate buffer ($\text{pH}=7.2$) (two fast washes and $1 \times 5\text{ min}$ slow wash with stirring using

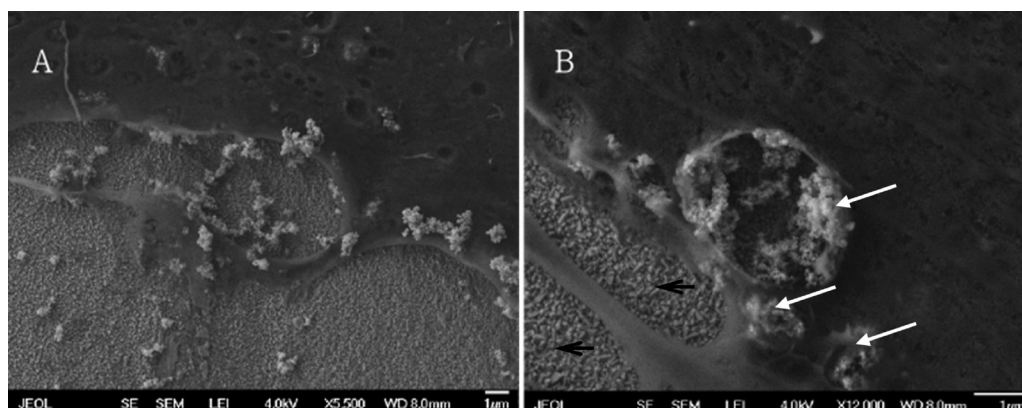


Fig. 2. Intracellular uptake and retention of nanoparticles: (a) Initiation of an early endosome, magnification 5500 \times ; (b) Different sizes of early endosomes full of nanoparticles (white arrows), black arrows show the rough surface of the matrix (FTO glass). Magnification 12,000 (JEOL 7401F), scale bar = 1 μm .

Vortex). The samples were dehydrated using an ethanol series of 30% (20 min), 50% (10 min), 60% (10 min), 70% (once 10 min, subsequently overnight in 4 $^{\circ}\text{C}$), 80% (10 min), 90% (10 min), 95% (10 min), 100% (3 \times 15 min) and then dried overnight at room temperature (RT). Images were acquired with two different FE-SEM instruments (JEOL 7401F and Hitachi SU6600). The Hitachi SU6600 microscope included EDS, which was used for material analysis.

3. Results and discussion

The distribution of incorporated nanoparticles has been shown to depend on their chemical and physical properties (such as composition, stability, size, shape, surface functionality and charge) and dose used (Stark, 2011). Although each newly synthesized SPION may exhibit unique behavior, the abovementioned parameters appear to be the main factors affecting cellular responses. Maghemite nanoparticles with a size distribution of 20 to 40 nm have previously been used for stem cell labeling (Magro et al., 2012). The nanoparticles were first synthesized and then incubated with stem cells for 48 h at a concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Mesenchymal stem cells (MSCs) were chosen for the present study owing to their large size (about 100 μm , see Fig. 1) in comparison to other cell types (with typical size ranging from 10 to 30 μm). MSCs were loaded with nanoparticles into their well-spread cytoplasm by invagination of nanoparticles into early endosomes (Fig. 2). After uptake, endosomes continued surrounding the nucleus (Fig. 3). Subsequently, endosomes filled the remaining areas of the cytoplasm (Fig. 4a). FE-SEM in gentle beam mode (GB-mode) provided a sufficiently gentle approach for imaging details of nanoparticles

in endosomes with high resolution at relatively low accelerating voltage (Fig. 4). With this technique, we obtained similar images of the nanoparticle distribution inside cells as previous TEM images reported in the study by Horák et al. (2009) (Fig. 5). Our microscopic study based on FE-SEM to evaluate the cellular uptake of nanoparticles yielded valuable information about not only the cell structural morphology but also the organization of nanoparticles inside vesicles with high resolution and plasticity.

Comparing the TEM and FE-SEM images (Fig. 5), it can be seen that FE-SEM was able to resolve nanoparticles inside the cells with an equivocally high contrast as TEM but without the need for ultrathin sectioning. For many applications, a correlative study between nanoparticle locations and inner cell structures is needed. Our images suggest that FE-SEM gives a lower contrast when resolving large inner structures (for example, the nucleus boundary is much more distinguishable in TEM). On the other hand, the mutual positions of nanoparticles and fine cell morphology structures are better resolved in FE-SEM than in TEM. These findings have implications, for example, for studies of the influence of cell surfaces on nanoparticle uptake.

Advanced microscopic techniques such as TEM or STEM are able to characterize intracellular components in detail. However, the cell membrane undergoes significant structural changes during the preparation of the cells via centrifugation. For this reason, it is better to observe SPION-labeled cells in their most natural shape. SEM is a technique widely used for imaging surface topographies, but our images show that nanoparticles can be mapped inside cells using FE-SEM as nanoparticles protrude through the membrane during dehydration and drying of the cells (Fig. 6). This experiment

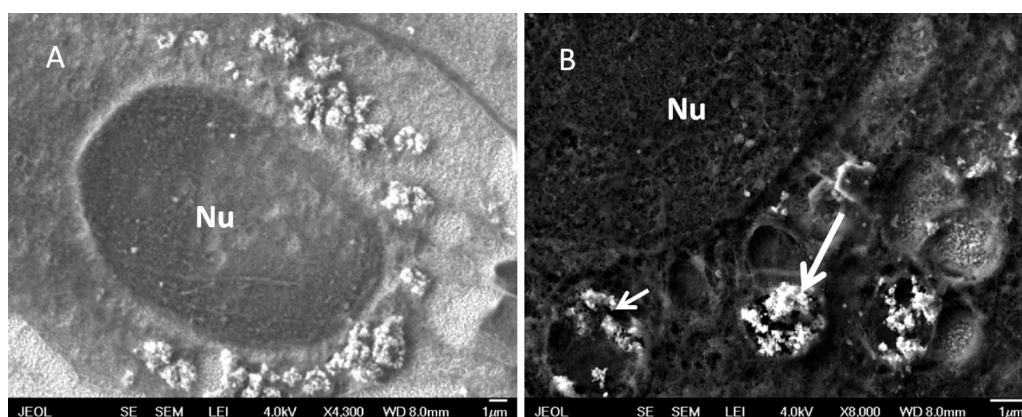


Fig. 3. Imaging of nanoparticles entrapped in endosomes: (a) Distribution of vesicles around the nucleus; (b) Detail of the nucleus surrounded by a clear region of endosomes containing nanoparticles (white arrows). Magnification (a) 4300 \times , (b) 8000 \times (JEOL 7401F), scale bar = 1 μm .

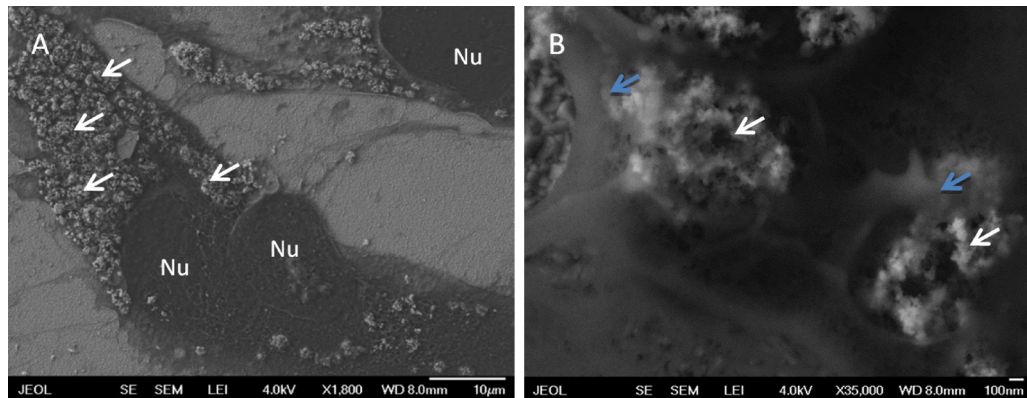


Fig. 4. (a) Cytoplasm filled with endosomes (white arrows show nanoparticles in vesicles). (b) Residue of a cellular membrane damaged by nanoparticles during dehydration of the cell; nanoparticles (white arrow), the remaining part of the membrane (blue arrow). Magnification 35,000, scale bar = 100 nm (JEOL 7401F).

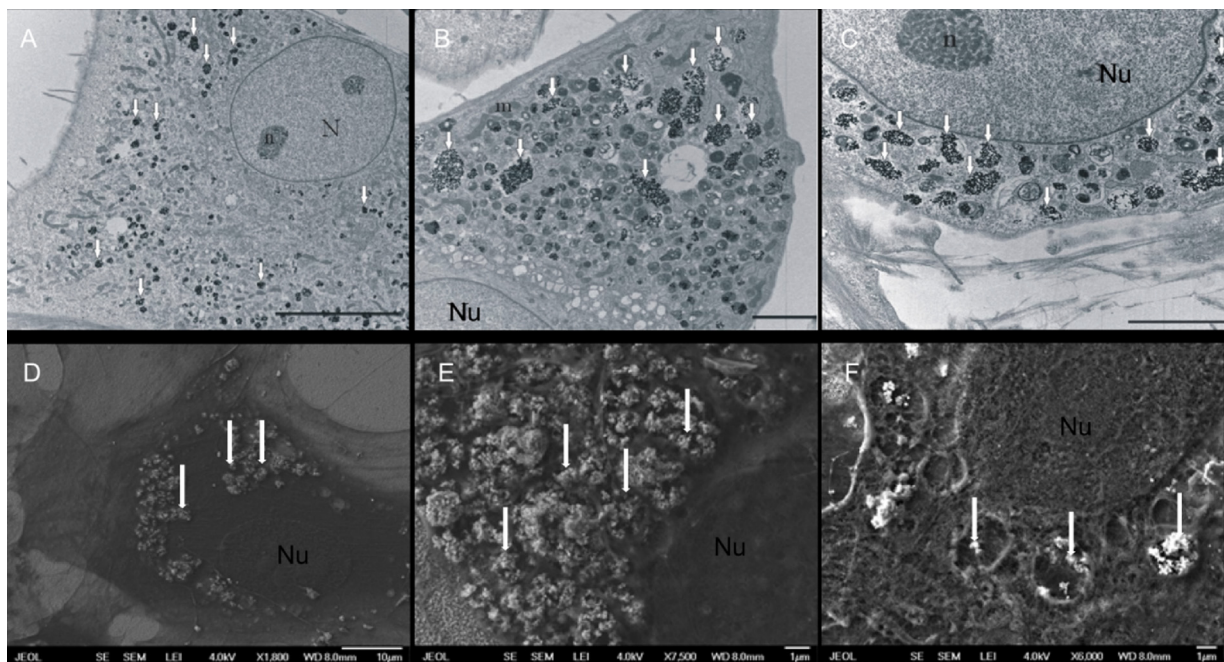


Fig. 5. Representative TEM pictures (a–c) for comparison with FE-SEM images of nanoparticles (d–f). White arrows depict intracellular endosomes with nanoparticles. The size of the endosomes was in the range 1–3 μm ; Nu = nucleus; (JEOL 7401F).

Reprinted with permission from Horák et al. (2009), Copyright 2009, Elsevier B.V.

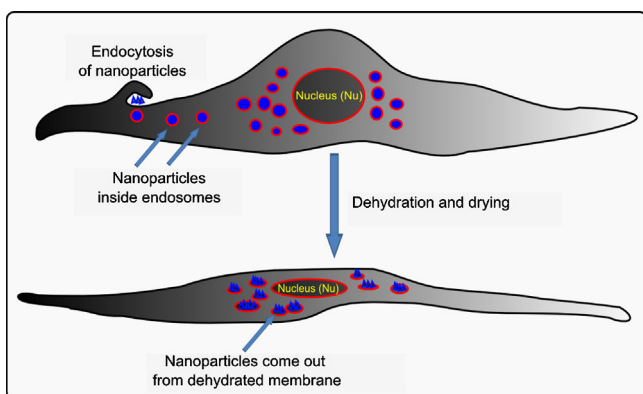


Fig. 6. Schematic representation of the cellular uptake of nanoparticles and change in cell morphology after sample preparation for FE-SEM observation.

required the biological sample to be stable at relatively high accelerating voltage (4–15 kV). We compared the surface of two different sample matrices. First, we tested coverslips (Thermanox) intended for the cultivation of cells. These substrates are often used for semi-permanent/permanent preparations for light microscopy and atomic force microscopy (AFM) analysis because of their good cell adhesion and transparency. This nonconductive material was also used to test whether the same substrate (and cells) could be used for observation by different microscopy methods (e.g., AFM, electron, light and fluorescent microscopy). However, stable imaging of the Thermanox coverslips was only possible up to an accelerating voltage of 1 kV (Fig. 7a). Charging effects and consequent image deterioration is a common problem in SEM (Donovan et al., 2002). Thus, a second material – conductive FTO glass – was also tested. The conductive FTO glass had a resistivity of 15 Ω/square , enabling high contrast images, and showed good stability as a cell substrate under the electron beam (Fig. 7b). The adhesion of cells to the FTO glass was also satisfactory.

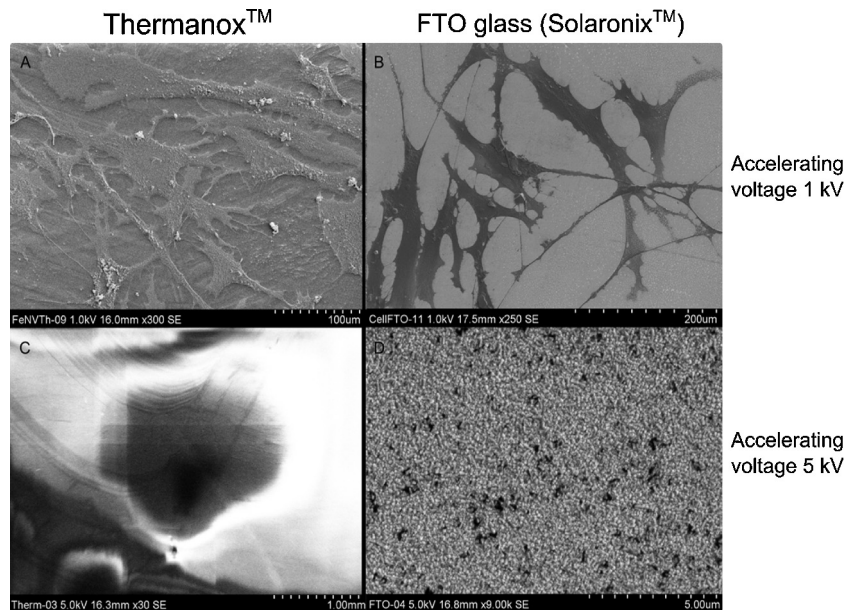


Fig. 7. Comparison of the contrast obtained with cells on different surfaces: (a) Thermanox, (b) FTO glass (accelerating voltage: 1 kV). Comparison of the stability of the bare materials: (c) Thermanox, (d) FTO glass (accelerating voltage 5 kV, Hitachi SU660).

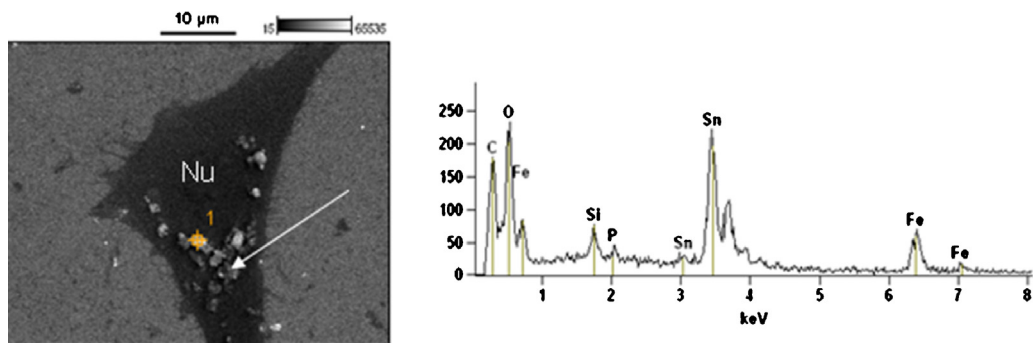


Fig. 8. Spectrum obtained by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) used to localize the nanoparticles (Hitachi SU6600).

The limited range of accelerating voltages allowed with the Thermanox substrate precluded the use of EDS for further analysis of the iron oxide nanoparticles. Owing to the location of the iron K-lines, such analysis requires stable imaging with an accelerating voltage of 15 kV. Thus, EDS was only possible for the sample on FTO glass, which confirmed the presence of iron within the cells (see Fe peak in Fig. 8). In contrast, the point EDS analysis outside the cells showed no iron content. The EDS

spectrum also contained peaks corresponding to chemical elements (C, O, Si, P) originating from the cell and a significant peak due to tin (Sn) in the FTO glass (Fig. 8). From Fig. 2b, it can be seen that images of the nanoparticles were clearly distinguishable from random structures on the FTO glass. The contrast of nanoparticles in the cytosol was obtained by back-scattered electrons (BSE) using a solid-state BSE detector and YAG detector (Fig. 9b).

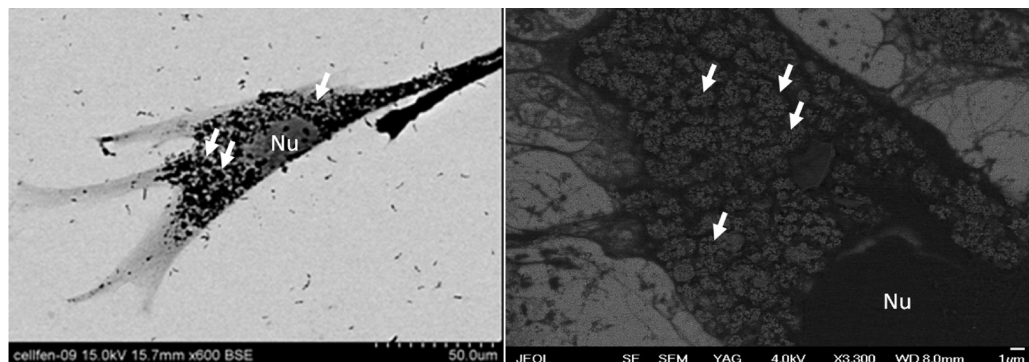


Fig. 9. Material contrast of labeled cells grown on FTO substrates. (a) Cell dosed with nanoparticles (black spots) (image obtained using a solid-state BSE detector, magnification 600 \times , scale bar = 50 μ m, Hitachi SU6600). (b) Vesicles full of nanoparticles accumulated in the cytosol (material contrast obtained using a YAG detector, Nu = nucleus, magnification 3300 \times , JEOL 7401F).

The material contrast of nanoparticles in the cytosol was obtained by back scattered electrons (BSE) using a solid-state BSE detector and YAG detector (Fig. 9b). These images were obtained on different microscopes operating at different accelerating voltages, which may explain the variation in contrast of the nanoparticles (Hejna, 1995). However, they demonstrate the validity of using FE-SEM for imaging iron oxide nanoparticles in cells with different instruments.

4. Conclusion

Mesenchymal stem cells loaded with iron oxide nanoparticles were used for imaging nanoparticles in an intracellular environment by FE-SEM. A new conductive substrate – FTO glass – was shown to be a suitable matrix for SEM of biological samples. This material showed a high stability under an electron beam combined with excellent biocompatibility. Cells fixed on this surface could be examined in detail. Moreover, the material contrast and EDS spectra could be obtained. In addition, FTO glass can also be used as a substrate for AFM to ensure good orientation of the sample during imaging (data not shown). In the present study, we demonstrated that the nanoparticle distribution inside cells could be measured without the need for ultrathin sectioning. The cells were fixed in a natural shape and nanoparticles were imaged from the start of endocytosis. Nanoparticles entrapped in endosomes were found to accumulate inside the cytosol and surrounded the cell nucleus. From a comparison of TEM and FE-SEM images, we showed that FE-SEM is able to resolve nanoparticles inside cells with a contrast equivalent to that of TEM. Further, we demonstrated that nanoparticles inside cells could be mapped using FE-SEM as the nanoparticles protruded through the membrane during the dehydration and drying sample preparation steps.

Acknowledgments

The authors acknowledge support from the Operational Program Research and Development for Innovations – European Regional Development Fund (CZ.1.05/2.1.00/03.0058) and Operational Program Education for Competitiveness – European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/20.0058 and CZ.1.07/2.4.00/17.0084) of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, and projects funded by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project No. LM2011017), and Ministry of Health of the Czech Republic (Project No. NT11137). This work was further supported by student projects (IGA.PrF.2014.023 and IGA.PrF.2014.017) of Palacky University in Olomouc. The authors are grateful to Klara Safarova (Regional Centre of Advanced Technologies, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, Czech Republic) for providing the EDS spectra.

References

- Babič, M., Horák, D., Trchová, M., Jandelová, P., Glogarová, K., Lesný, P., Herynek, V., Hájek, M., E. S., 2008. Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjugate Chem.* 19, 740–750.
- Bogner, A., Jouneau, P.H., Thollet, G., Basset, D., Gauthier, C., 2007. A history of scanning electron microscopy developments: towards “wet-STEM” imaging. *Micron* 38, 390–401.
- Claude, A., 1948. Studies on cells – morphology, chemical constitution, and distribution of biochemical functions. *Harvey Lect.* 43, 121–164.
- Claude, A., 1950. Studies on cell morphology and functions – methods and results. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 50, 854–860.
- Claude, A., 1962. A spontaneous, transplantable renal carcinoma of the mouse. Electron microscope study of the cells and of an associated virus-like particle. *J. Ultrastruct. Res.* 6, 1–18.
- Donovan, N.L., Chandler, G.W., Supapan, S., 2002. *Scanning Electron Microscopy*. John Wiley & Sons, Inc.
- Goodhew, P.J., Humphreys, J., Beanland, R., 2001. *Electron Microscopy and Analysis, 3th ed.* Taylor & Francis.
- Gupta, A.K., Curtis, A.S.G., 2004. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture. *J. Mater. Sci. – Mater. Med.* 15, 493–496.
- Gupta, A.K., Gupta, M., 2005. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 26, 1565–1573.
- Hejna, J., 1995. Topographic and material contrast in low-voltage scanning electron microscopy. *Scanning* 17, 387–394.
- Horák, D., Babič, M., Jandelová, P., Herynek, V., Trchová, M., Likavčanová, K., Kapcalová, M., Hájek, M., Syková, E., 2009. Effect of different magnetic nanoparticle coatings on the efficiency of stem cell labeling. *J. Magn. Magn. Mater.* 321, 1539–1547.
- Huang, X., Zhang, F., Wang, H., Niu, G., Choi, K.Y., Swierczewska, M., Zhang, G., Gao, H., Wang, Z., Zhu, L., Choi, H.S., Lee, S., Chen, X., 2013. Mesenchymal stem cell-based cell engineering with multifunctional mesoporous silica nanoparticles for tumor delivery. *Biomaterials* 34, 1772–1780.
- Chen, J., Zhu, S., Tong, L.Q., Li, J.S., Chen, F., Han, Y.F., Zhao, M., Xiong, W., 2014. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles mediated I-131-hVEGF siRNA inhibits hepatocellular carcinoma tumor growth in nude mice. *BMC Cancer*, 14.
- Ikebe, C., Suzuki, K., 2014. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. *Biomol. Res. Int.*
- Kempen, P.J., Thakor, A.S., Zavaleta, C., Gambhir, S.S., Sinclair, R., 2013. A scanning transmission electron microscopy approach to analyzing large volumes of tissue to detect nanoparticles. *Microsc. Microanal.* 19, 1290–1297.
- Lodhia, J., Mandarano, G., Ferris, N.J., Eu, P., Cowell, S., 2010. Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 1): synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI. *Biomed. Imaging Interv. J.* 6, e12.
- Magro, M., Sinigaglia, G., Nodari, L., Tucek, J., Polakova, K., Marusak, Z., Cardillo, S., Salviulo, G., Russo, U., Stevanato, R., Zboril, R., Vianello, F., 2012. Charge binding of rhodamine derivative to OH-stabilized nanomaghemite: universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors. *Acta Biomater.* 8, 2068–2076.
- Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J.C., Jones, A.T., Sugiura, Y., Futaki, S., 2004. Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther.* 10, 1011–1022.
- Odintsov, B., Chun, J.L., Berry, S.E., 2013. Whole body MRI and fluorescent microscopy for detection of stem cells labeled with superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles and Dil following intramuscular and systemic delivery. *Imaging Track. Stem Cells: Meth. Protoc.* 1052, 177–193.
- Patri, A., Umbreit, T., Zheng, J., Nagashima, K., Goering, P., Francke-Carroll, S., Gordon, E., Weaver, J., Miller, T., Sadrieh, N., McNeil, S., Stratmeyer, M., 2009. Energy dispersive X-ray analysis of titanium dioxide nanoparticle distribution after intravenous and subcutaneous injection in mice. *J. Appl. Toxicol.* 29, 662–672.
- Peckys, D.B., Jonge, N., 2014. Gold nanoparticle uptake in whole cells in liquid examined by environmental scanning electron microscopy. *Microsc. Microanal.* 20, 189–197.
- Plascencia-Villa, G., Starr, C.R., Armstrong, L.S., Ponce, A., Jose-Yacamán, M., 2012. Imaging interactions of metal oxide nanoparticles with macrophage cells by ultra-high resolution scanning electron microscopy techniques. *Integr. Biol. (Camb.)* 4, 1358–1366.
- Porter, K.R., Claude, A., E.F. F., 1945. A study of tissue culture cells by electron microscopy. *J. Exp. Med.* 81, 233–246.
- Reddy, L.H., Arias, J.L., Nicolas, J., Couvreur, P., 2012. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem. Rev.* 112, 5818–5878.
- Singh, N., Jenkins, G.J., Asadi, R., Doak, S.H., 2010. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev.* 1, 5358.
- Singh, S.K., Kulkarni, P.P., Dash, D., 2013. *Bio-nanotechnology*. Blackwell Publishing Ltd., pp. 1–32.
- Stark, W.J., 2011. Nanoparticles in biological systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50, 1242–1258.
- Wang, Z., Ruan, J., Cui, D., 2009. Advances and prospect of nanotechnology in stem cells. *Nanoscale Res. Lett.* 4, 593–605.
- Weissleder, R., Nahrendorf, M., Pittet, M.J., 2014. Imaging macrophages with nanoparticles. *Nat. Mater.* 13, 125–138.
- Wilhelm, C., Gazeau, F., Roger, J., Pons, J.N., Bacri, J.C., 2002. Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization. *Langmuir* 18, 8148–8155.
- Zheng, J.W., Nagashima, K., Parmiter, D., de la Cruz, J., Patri, A.K., 2011. SEM X-ray microanalysis of nanoparticles present in tissue or cultured cell thin sections. *Charact. Nanopart. Intend. Drug Deliv.* 697, 93–99.
- Zhou, J., Fa, H., Yin, W., Zhang, J., Hou, C., Huo, D., Zhang, D., Zhang, H., 2014. Synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with a DDNP-carboxyl derivative for in vitro magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease. *Mater. Sci. Eng. C: Mater. Biol. Appl.* 37, 348–355.

Mesenchymal stromal cell labeling by new uncoated superparamagnetic maghemite nanoparticles in comparison with commercial Resovist – an initial in vitro study

Josef Skopalik¹
 Katerina Polakova²
 Marketa Havrdova²
 Ivan Justan¹
 Massimiliano Magro³
 David Milde²
 Lucia Knopfova⁴
 Jan Smarda⁴
 Helena Polakova¹
 Eva Gabrielova⁵
 Fabio Vianello^{2,3}
 Jaroslav Michalek¹
 Radek Zboril²

¹Department of Pharmacology, Masaryk University, Brno, Czech Republic;
²Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry and Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc, Czech Republic; ³Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padua, Padova, Italy;
⁴Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic; ⁵Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

Correspondence: Josef Skopalik
 Department of Pharmacology, Masaryk University,
 Kamenice 3, Brno 62500, Czech Republic
 Tel +420 776 122 097
 Fax +420 776 122 097
 Email j.skopalik@gmail.com

Katerina Polakova
 RCPTM, Palacky University, Slechtitelu 11,
 Olomouc 783 71, Czech Republic
 Tel +420 585 634 973
 Fax +420 585 634 958
 Email katerina.polakova@upol.cz

Objective: Cell therapies have emerged as a promising approach in medicine. The basis of each therapy is the injection of 1–100×10⁶ cells with regenerative potential into some part of the body. Mesenchymal stromal cells (MSCs) are the most used cell type in the cell therapy nowadays, but no gold standard for the labeling of the MSCs for magnetic resonance imaging (MRI) is available yet. This work evaluates our newly synthesized uncoated superparamagnetic maghemite nanoparticles (surface-active maghemite nanoparticles – SAMNs) as an MRI contrast intracellular probe usable in a clinical 1.5 T MRI system.

Methods: MSCs from rat and human donors were isolated, and then incubated at different concentrations (10–200 µg/mL) of SAMN maghemite nanoparticles for 48 hours. Viability, proliferation, and nanoparticle uptake efficiency were tested (using fluorescence microscopy, xCELLigence analysis, atomic absorption spectroscopy, and advanced microscopy techniques). Migration capacity, cluster of differentiation markers, effect of nanoparticles on long-term viability, contrast properties in MRI, and cocultivation of labeled cells with myocytes were also studied.

Results: SAMNs do not affect MSC viability if the concentration does not exceed 100 µg ferumoxide/mL, and this concentration does not alter their cell phenotype and long-term proliferation profile. After 48 hours of incubation, MSCs labeled with SAMNs show more than double the amount of iron per cell compared to Resovist-labeled cells, which correlates well with the better contrast properties of the SAMN cell sample in T2-weighted MRI. SAMN-labeled MSCs display strong adherence and excellent elasticity in a beating myocyte culture for a minimum of 7 days.

Conclusion: Detailed in vitro tests and phantom tests on ex vivo tissue show that the new SAMNs are efficient MRI contrast agent probes with exclusive intracellular uptake and high biological safety.

Keywords: mesenchymal stromal cells, stem cell tracking, magnetic resonance imaging, superparamagnetic iron oxide nanoparticles, stem cell labeling

Introduction

Cellular therapies exploit the high regenerative potential of stem cells or multipotent cells. Mesenchymal stromal cells (MSCs) are currently the type of multipotent cells most extensively used in preclinical and clinical applications. These cells are able to repair damaged tissues, support the growth of original cells, and regulate inflammation. They are able to halt numerous degenerative diseases. MSC therapy procedures are based on injecting 1–100×10⁶ MSCs directly into the body's target

(eg, heart, skin scar tissue, knee joint) or infusing MSCs into the blood circulation.¹⁻³ A very complex biophysical process begins after the administration of MSCs, consisting of their interaction with the patient's healthy and pathological cells and with the extracellular matrix. This leads either to cell attachment or cell rejection.⁴ Physicians should ideally have a monitoring tool capable of determining the fate of the injected stem cells. Such tools should provide information about the stem cell biodistribution immediately after injection, migration after several hours or days, and, over a longer term, stem cell survival and differentiation of grafted stem cells *in vivo*. Among the many diagnostic tools available, magnetic resonance imaging (MRI) is today the most widespread and seemingly ideal noninvasive method for monitoring stem cell migration and biodistribution in clinical practice.^{5,6} MRI enables *in vivo* imaging of the transplanted cells with high spatial resolution in three dimensions, together with visualization of the surrounding tissues, and without promoting cell toxicity or negative side effects.⁷

In order to monitor the cells' biodistribution in a patient's body, the MSCs must be labeled with a suitable contrast agent because unlabeled MSCs cannot be differentiated from other original cells in the body. Superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles present the most convenient alternative among MRI contrast agents for stem cell labeling and monitoring by MRI. In fact, since they promote negative hypointense signal of the transplanted MSCs, SPIO particles increase the T2-weighted contrast of the transplanted tissue from surroundings.⁸

The commonly used SPIO nanoparticles consist of maghemite and/or a magnetite magnetic core. Because of the spinel structure with two nonequivalent magnetic sublattices favoring the establishment of ferrimagnetic ordering, these two iron oxide polymorphs exhibit strong magnetic properties achievable under low applied magnetic fields (<1.5 T), which makes them suitable for many biomedical applications. Moreover, when the size of iron oxide nanoparticles falls below a certain value (~30 nm), they become superparamagnetic even at room temperature.^{9,10} Besides their use in MRI,^{5,11} they are used in biomagnetic separations, magnetic hyperthermia treatment, or targeted drug delivery.^{9,12,13} The size of the SPIO nanoparticles in biomedical applications ranges from a few nanometers for individual particles to several hundred nanometers for clusters. SPIO particles are characterized by extremely large magnetic moments (with a saturation magnetization in the range of 60–80 emu/g), which affect the MRI signal.^{9,10,14}

SPIO nanoparticles require a surface coating to prevent destabilization and agglomeration of the colloidal suspension. Most generally, SPIO nanoparticles are coated with dextran, carboxydextran, starch, poly(ethylene glycol) (PEG), or poly(vinyl alcohol) (PVA).^{14,15} However, most commercial SPIO contrast agents (eg, Endorem or Resovist, which are stabilized with dextran or carboxydextran) show low efficiency in endocytosis and other processes of uptake by MSCs. Moreover, the coating on the nanoparticles reduces the magnetic properties of the material, introduces a magnetically inert polymer, and selects a defined surface chemistry. We have recently developed new SPIO maghemite nanoparticles, known as surface-active maghemite nanoparticles (SAMNs), wherein good colloidal and surface properties have been combined harmoniously even without the polymer coating. It was also shown that they have the ability to bind biomolecules from the suspensions¹⁶ and can be internalized into HeLa cells successfully.¹⁷ It is therefore meaningful to test their potential for stem cell labeling and to compare their MRI contrast efficacy with the commercial contrast agent Resovist. Moreover, the bare nanoparticles are commonly said to be more toxic than the coated ones and therefore not appropriate for bioapplications. It is also questionable whether the protein corona or biomolecules in media, which are strongly adsorbed on the surface of bare SPIO nanoparticles during the incubation, form a self-assembled biomimetic system more natural and less toxic than various synthetic polymer-coated nanoparticles.

The aim of this study was threefold: 1) to assess the complex *in vitro* characteristics (viability, proliferation, migration, and differentiation) of SAMN-labeled stem cells in rat and human MSCs (rMSCs and hMSCs, respectively); 2) to investigate the SPIO labeling efficiency using various microscopic (optical microscopy, scanning electron microscopy [SEM], atomic force microscopy [AFM]) and spectroscopic techniques (atomic absorption spectroscopy [AAS]), and long-term labeling analysis and cocultivation of SAMN-labeled stem cells with myocytes; and 3) to test the contrast properties of SAMN- and Resovist-labeled cells at 1.5 and 7 T clinical MRI in T2-weighted images. All these tests were designed to prove the preliminary hypothesis that 48-hours labeling of rMSCs and hMSCs by novel SAMN nanoparticles using 50 µg/mL or 100 µg/mL is safe and that this labeling method will ensure sufficient incorporation of SAMNs into the internal space of cells, giving a satisfactory contrast of MSCs under T2 MRI scanning modes with a detection limit better than 100×10³ cells per cubic centimeter.

Materials and methods

Synthesis and characterization of SAMN nanoparticles

Maghemite nanoparticles (SAMNs) were synthesized by borohydride reduction (53 mmol in liquid ammonia) of ferric chloride $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (37 mmol), both purchased from Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA), at room temperature. After the reduction reaction (indicated by change of color to black), the temperature of the mixture was increased to 100°C and held constant for 2 hours. After cooling the mixture to room temperature, the magnetic fraction was separated using an external magnet and washed several times with water. The final step of the synthesis included thermal treatment of the intermediate at 400°C for 2 hours. The product obtained was dispersed in deionized water (Milli-Q) in an ultrasonic bath, giving the suspension its stable colloidal character as confirmed by monitoring over a few months. Detailed description of the synthesis and the precise physical and chemical characterization of these maghemite nanoparticles are described in our previous paper.¹⁸

Magnetic relaxometry of SAMNs was performed with a 3 T MRI scanner (Siemens Skyra, Erlangen, Germany) at the specialized experimental laboratory at Graz University, Graz, Austria. For all measurements, a circular polarized coil (“animal-coil”) with an inner diameter of 7.5 cm (RAPID Biomedical GmbH, Rimpfing, Germany) was used to obtain a high signal-to-noise ratio. More information about the measurement and evaluation of relaxivity indexes is given in the Supplementary materials.

Cell cultures

Rat bone marrow stromal cells were harvested and cultured as described by Gallo et al.¹⁹ Briefly, bone marrow cells were isolated from the bone marrow of femurs by flushing the medium into the bone shaft. The cell suspension was filtered through a 40 µm nylon filter (Falcon) and plated at a density $2.5 \times 10^3/\text{cm}^2$ in chambers of 24-well plates. Cells were grown in complete Iscove’s modified Dulbecco Modified Eagle’s Medium (DMEM) (with 10% fetal bovine serum [FBS] and 2% penicillin–streptomycin) at 37°C and 5% CO_2 . Passaging was repeated when 80% confluence was obtained. MSCs from the third or fourth passage were used for our experiments.

hMSCs were isolated from the fatty tissue of three healthy donors who had undergone cosmetic liposuction (one male, two female). Isolation of hMSCs was based on the incubation of lipoaspirates with collagenase. MSCs were expanded in complete DMEM supplemented with 5%

platelet lysate. The passaging procedure was the same as in the case of rMSCs.

Morphology and cluster of differentiation (CD) markers of rMSCs and hMSCs were checked before and after SPIO labeling. We analyzed CD90, CD73, D105, and CD34 expression using fluorescence-activated cell sorting (FACS) (BD FACSCanto, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

All animal experiments were performed in accordance with the law of Czech Republic (Law on Animal Protection and Decree of Ministry of Agriculture on Experimental Animal Use and Breeding) and were approved by the Committees for the Use of Experimental Animals at Masaryk University and Palacky University. All collection of waste lipoaspirates from liposuction was performed after approval of the Ethical Committee of Masaryk University and with signature-documented informed consent of patients.

Analysis of viability, proliferation, and migration capacity

For both rMSCs and hMSCs, we tracked the potential negative effect of SPIO nanoparticles on the growth rate of the cells. At the “pre-analysis” stage, we performed hMSC cultivation in SAMN solutions (over a wide range of 10–200 µg SAMN/mL in the cultivation medium for 24–48 hours). On the basis of this screening, we selected a narrow concentration interval and pertinent labeling time for the next main analysis; hMSCs and rMSCs were seeded at a density $2.5 \times 10^3/\text{cm}^2$ and incubated for 48 hours in the medium with the addition of new SAMNs at concentrations of 50 µg and 100 µg ferumoxides/mL for 48 hours. After this simple labeling process, the MSCs were washed out by culture medium exchange. Viability of the MSCs was detected using the LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for detection of viable and dead cells (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and flow cytometry assay based on propidium iodide (PI) staining (BD FACSCanto).

Proliferation of the labeled and nonlabeled cells was compared using two independent methods: 1) visual microscopic quantification of viable cells with ferumoxide staining (at the beginning of incubation with SPIO, at the end of incubation, and after the next 24 hours and 48 hours). Olympus IX 70 and CKX41 light fluorescence microscopes (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) were used; 2) the xCELLigence system for measuring growth of adherent cells (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), which is a modern automatic quantification method based on the measurement of impedance.

Results of the described measurements on SAMN-labeled MSC were compared with those for control MSCs without

SAMNs and with results using Resovist-labeled MSCs (with the same ferumoxide concentration and time of labeling). Part of the labeled hMSCs (1×10^6) was trypsinized after 48 hours of labeling and used for MRI contrast evaluation (details in section “MRI phantom experiments”).

Migration capacity of labeled and unlabeled hMSCs was compared using two methods: 1) transwell dish with 8 μm pore filters (Corning® Costar®, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) inserted in normal 24-well combined with gradient 0%–30% FBS between the upper and bottom dish (bottom dish 300 μL DMEM + FBS, upper dish DMEM with 10×10^3 hMSC, percentage of migrated cells computed after 48 hours); 2) 24 wells with sterile plastic stoppers (6 mm diameter) in the central area and DMEM (stopper was removed after 10×10^3 hMSC attachment to dish, migration of cells to central area in 24 hours was computed using light microscopy). Differentiation properties of unlabeled hMSCs and SAMN-labeled hMSCs were compared using the StemPro Osteogenesis and StemPro Adipogenesis differentiation kits (Thermo Fisher Scientific).

Qualitative and quantitative cell uptake analysis of SAMNs

The localization of SAMN uptake during incubation and incorporation in the cells were analyzed by optical microscopy (Olympus IX 70), Prussian blue staining by commercial kit Accustain® (Sigma-Aldrich), by advanced SEM (SU6600, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan), and by AFM (INTEGRA Aura). Details of SEM and AFM sample preparation are described in the Supplementary materials.

Iron concentration inside the cells was determined by AAS (Avanta Suma; GBC - Scientific Equipment, Braeside, VIC, Australia) in an acetylene–air flame. After the simple labeling process (50 μg ferumoxides/mL for 24 hours, 36 hours, and 48 hours, variable SAMNs and Resovist), the hMSCs were washed out by the culture medium, exchanged, and trypsinized, and 0.5×10^6 of hMSC from three different donors were diluted in HCl and water (demineralized water 18.2 M Ω -cm). External calibration solutions in the range 0.5–10 mg/L were prepared by diluting a certified reference material–water calibration solution with an Fe concentration 1.000 ± 0.002 g/L (Analytika, s.r.o., Praha, Czech Republic). The iron content per cell for each variant was computed.

The immunophenotype and forward/side scatter of MSCs (SAMN-labeled cells, Resovist-labeled cells, and control cells) were characterized by flow cytometry. Briefly, the cells were washed twice in Dulbecco’s phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and stained for 30 minutes at 4°C with

antiCD90 – FITC, antiCD73 – PE, antiCD105 – APC, and antiCD34 – PerCP-Cy5 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). The cells were washed with PBS and measured by a flow cytometer (BD FACS Canto II, BD Biosciences).

Long-term labeling experiment

For gaining additional insights into the potentially adverse effects after SAMN labeling, we arranged two types of long-term analyses.

First, we measured the growth curve using the xCELLigence impedance system (Roche). MSCs were seeded at density $2.5 \times 10^6/\text{cm}^2$ and cultivated in 96-well plates (E-Plate16 for the xCELLigence system). MSCs were exposed to the medium containing 50 μg and 100 μg ferumoxides/mL (SAMNs and Resovist) for ~100 hours without washing or exchanging the medium.

Second, after a standard 48-hours labeling (50 μg ferumoxides/mL), the morphology of three samples of labeled hMSCs and rMSCs (3×24 wells, initial confluence $2.5 \times 10^6/\text{cm}^2$, cultivation in DMEM with 5% PL) was imaged after 3 weeks and 6 weeks by optical microscopy. Passaging was done in each case after the first 2 weeks.

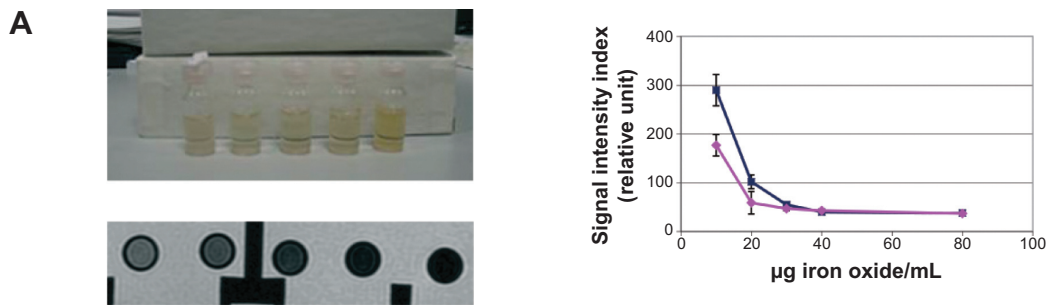
MRI phantom experiments

All MRI measurements were performed on a 1.5 T MRI scanner (Signa HORIZON Lx, GE Healthcare) with the acquisition of two-dimensional T2 fast-recovery fast spin echo (FRFSE) or gradient-recalled echo (GRE) sequences. Three types of tests were run.

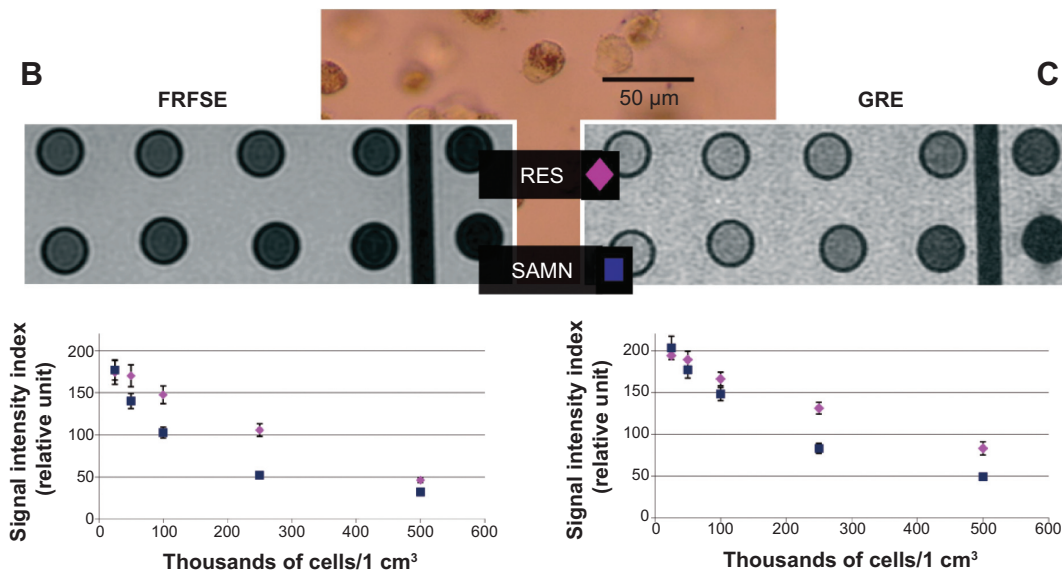
First, we compared the negative contrast effect in the T2-weighted images of SAMN and Resovist nanoparticles in the concentration series 10 μg , 20 μg , 30 μg , 40 μg , 80 μg ferumoxides/mL (nanoparticles were resuspended in hot agar and then the sample was put into 1 mL test tubes; they were solidified at 4°C before MRI measurements) (Figure 1A). For this measurement, the following parameters for FRFSE sequence were used: TR (repetition time) = 2,600 ms, TE (echo time) = 91.7 ms, field of view (FOV) = 11 cm \times 11 cm. The horizontal section of each tube was displayed as a circle with a certain gray-scale value, and this value (“signal intensity index”) was quantified by the Signa Horizon LX software.

Second, the tubes with SAMN- and Resovist-labeled cells (50, 100, 250, 500×10^3 hMSC per mL of agar) were measured by FRFSE sequences in T2-weighted images (TR = 2,500 ms, echotime = 32.6 ms, FOV = 14 cm \times 14 cm (Figure 1B) and by GRE sequence (TR = 1,740 ms, TE = 90 ms, FOV = 14 \times 14 cm) (Figure 1C). Cells were prepared by incubation with the 50 μg ferumoxides/mL solution as described earlier. We

Nanoparticles in agar tube



Cells in agar tube (water background)



Cells in agar tube (tissue background)

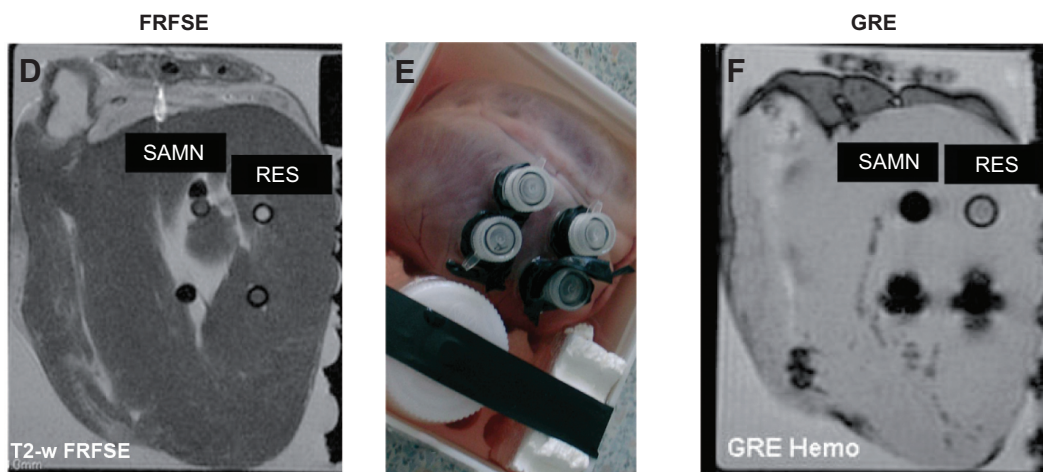


Figure 1 Comparison of MRI contrast effect of SAMNs and Resovist.

Notes: (A) Tubes with 10, 20, 30, 40, 80 µg ferumoxides/mL and their illustrative MRI T2 weighted image. All data are summarized into signal intensity curve of SAMNs (blue) and Resovist (violet). (B and C) Images of negative contrast of SAMN-labeled compared to Resovist-labeled MSCs (50, 100, 250, 500×10³ cells per mL of agar) and their signal intensity curves measured by fast-recovery fast spin echo (FRFSE) or gradient echo (GRE), respectively (average ± SD). Plastic tubes diameter = 10 mm, water used as a background. The central photo between Figure B and C shows hMSC labeled with SAMNs after trypsinization and resuspension in fresh liquid agar. (E) Photo of freshly extracted heart with inserted tubes containing 50 and 500×10³ of SAMN (left couple of tubes) and Resovist-labeled cells (right couple). (D and F) Representative scans with hypointense lesions of SAMN- and Resovist-labeled cells in the heart tissue scanned in FRFSE and GRE sequences, respectively.

Abbreviations: MRI, magnetic resonance imaging; SAMNs, surface-active maghemite nanoparticles; MSC, mesenchymal stromal cell; RES, Resovist; SD, standard deviation.

made measurements of the tube's horizontal section; each tube was measured for a minimum of three sections, and the same measurements were carried out for cells of the other two donors. The graphs showing the dependence of the signal intensity index (defined earlier) of cell solutions on the concentrations of cells were constructed.

Third, SAMN- and Resovist-labeled cell samples of 50 and 500×10^3 were inserted into fresh swine heart (illustrative Figure 1F) and scanned by two-dimensional T2 FRFSE and GRE sequences (Figure 1D and E). The parameters for FRFSE were as follows: TR = 1,740 ms, TE = 90, matrix = 256×192 , FOV = 12×12 cm. For the GRE sequences, these parameters were set as follows: TR = 420 ms, TE = 15, matrix = 320×224 , FOV = 24×18 cm. The quantification of the mean signal intensity index of the desired dark spots containing SPIO nanoparticles or SPIO-labeled stem cells in phantoms was processed using the original GE Signa Horizon Lx software.

We also made additional scans of tubes containing $50\text{--}500 \times 10^3$ hMSC per mL of agar in MERGE sequence mode on the 7 T experimental machine (Figure S4).

SAMNs-labeled MSC implantation into in vitro myocyte culture

SAMN-labeled MSCs totaling 5×10^3 were pipetted into the 2 cm² chamber containing 5-day-old beating rat neonatal myocytes. Neonatal myocytes in the chamber were prepared by the Department of Medical Chemistry and Biochemistry (obtained by methods of Chlopcikova et al,²⁰ arranged on collagen I-coated plastic at density $5 \times 10^4/\text{cm}^2$). The MSC cell surface was stained with a fluorescence probe (anti-CD90-FITC cn 568-F [BD Biosciences] or PKH26 [Sigma-Aldrich]) immediately before cocultivation and washed by PBS. The fate of SAMN-labeled MSCs in coculture was analyzed using bright-field and fluorescence microscopy at 1 hour, 24 hours, and 7 days after application.

Statistical analysis

Test of viability: three independent experiments were performed for the statistical analysis of viability. For quantification of cell viability using the calcein methods, we acquired random images of each sample using a 20 \times objective, and quantified the number of calcein-positive MSCs as a percentage of the total number of cells. For quantification of cell viability using the PI flow cytometry method, we acquired a minimum 1×10^3 freshly trypsinized cells, and quantified the number of PI-negative MSCs as a percentage of the total number of cells using the BD FACS Diva Software version 4.

Test of proliferation: the growth curve for each SAMN, Resovist, and control MSC samples from each donor or

experimental animal was measured in triplicate and an average curve was constructed. Three average curves from the three independent donors or animals were used to construct the final growth curve for each species and to calculate standard deviations. Tests for statistical significance of differences at defined time checkpoints on the growth curves were analyzed using paired two-sided *t*-tests.

The migration assays were measured in triplicates. Tests for statistical significance of differences were analyzed by *t*-tests. The iron concentration was determined for hMSCs from three donors, and the results are given in Table 1.

MRI contrast measurements of sets of tubes with SAMN- and Resovist-labeled hMSC cells were done independently for hMSCs from each donor. Each tube was measured in three horizontal sections and the average of signal intensity index was computed (\pm standard deviation [SD]). We used the results from donor 1 as representative of all donors in Figure 1B and C (average \pm SD for each tube). All calculations were made using MS Excel 2003 and MedCalc version 12.

Results

Characterization of SAMN nanoparticles

From Mössbauer spectroscopy, it was determined that the SAMN nanoparticles had a maghemite polymorphic structure without traces of any other chemical phase (data not shown). As shown in Figure 2, the particles have a globular shape with a size distribution of $\sim 10\text{--}20$ nm (transmission electron microscopy imaging). Based on gas analysis and spectral data from Fourier transform infrared spectroscopy published in our previous work,¹⁸ we could confirm that the surface of the particles interacted with surrounding water molecules, maintaining low interparticle forces and good colloidal stability.

From the measurement of the hysteresis loop of particles at 300 K, a very high magnetization value was observed (nearly $71 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$ at 7 T), which is comparable to the value for bulk maghemite ($85 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$).²¹ The bare SAMN nanoparticles exhibit at 293 K longitudinal relaxation rate (r_1) of $0.419 \text{ mM}^{-1} (\text{Fe}) \text{ s}^{-1}$ and transverse relaxation rate (r_2) of 44.79 mM^{-1} .

Table 1 Physicochemical properties of novel SAMN and traditional Resovist nanoparticles

	SAMNs	Resovist
Magnetic properties	Superparamagnetic	Superparamagnetic
Core composition	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ and Fe_3O_4
Surface	Uncoated	Carboxydextran
Size	10–20 nm	45–60 nm
Zeta potential pH (7.0)	–22.5 mV	–20 mV
r_2	$44.79 \text{ mM}^{-1} (\text{Fe}) \text{ s}^{-1}$	$151 \text{ mM}^{-1} (\text{Fe}) \text{ s}^{-1}$
r_2^*	$400 \text{ mM}^{-1} (\text{Fe}) \text{ s}^{-1}$	$300 \text{ mM}^{-1} (\text{Fe}) \text{ s}^{-1\#}$

Note: r_2^* for Resovist obtained from Golovko et al.³⁷

Abbreviation: SAMN, surface-active maghemite nanoparticle.

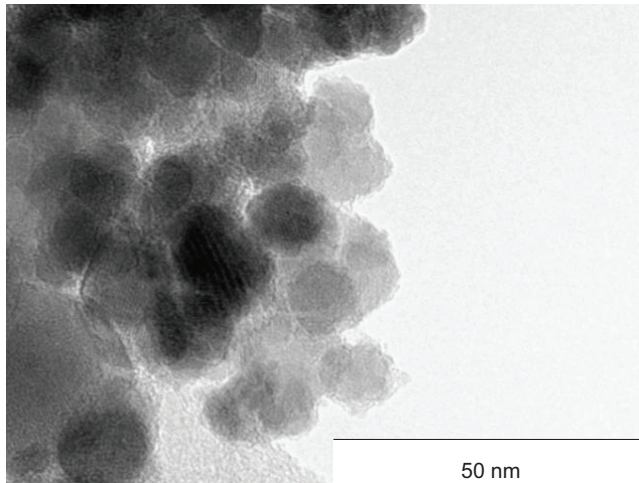


Figure 2 Transmission electron microscopy image of surface-active maghemite nanoparticles.

(Fe) s^{-1} , whereas Resovist has an r_2 of $151 \text{ mM}^{-1}(\text{Fe}) \text{ s}^{-1}$. We also measured the r_2^* index in SAMN particles, which reaches the very high value of $400 \text{ mM}^{-1}(\text{Fe}) \text{ s}^{-1}$, demonstrating a rapid loss of phase coherence of protons. A summary of all basic physical properties of SAMNs and Resovist is given in Table 1.

Analysis of viability, proliferation, and migration capacity of labeled cells

Results from main viability experiments, where hMSCs were labeled using 50 and 100 μg ferumoxides/mL for 48 hours, are presented in Figure 3A, and data for rMSCs in Figure 3E. In light of the results from this viability assay, we can say that 100 μg ferumoxides/mL can have a small negative effect on the viability (rMSC). A subsequent detailed proliferation

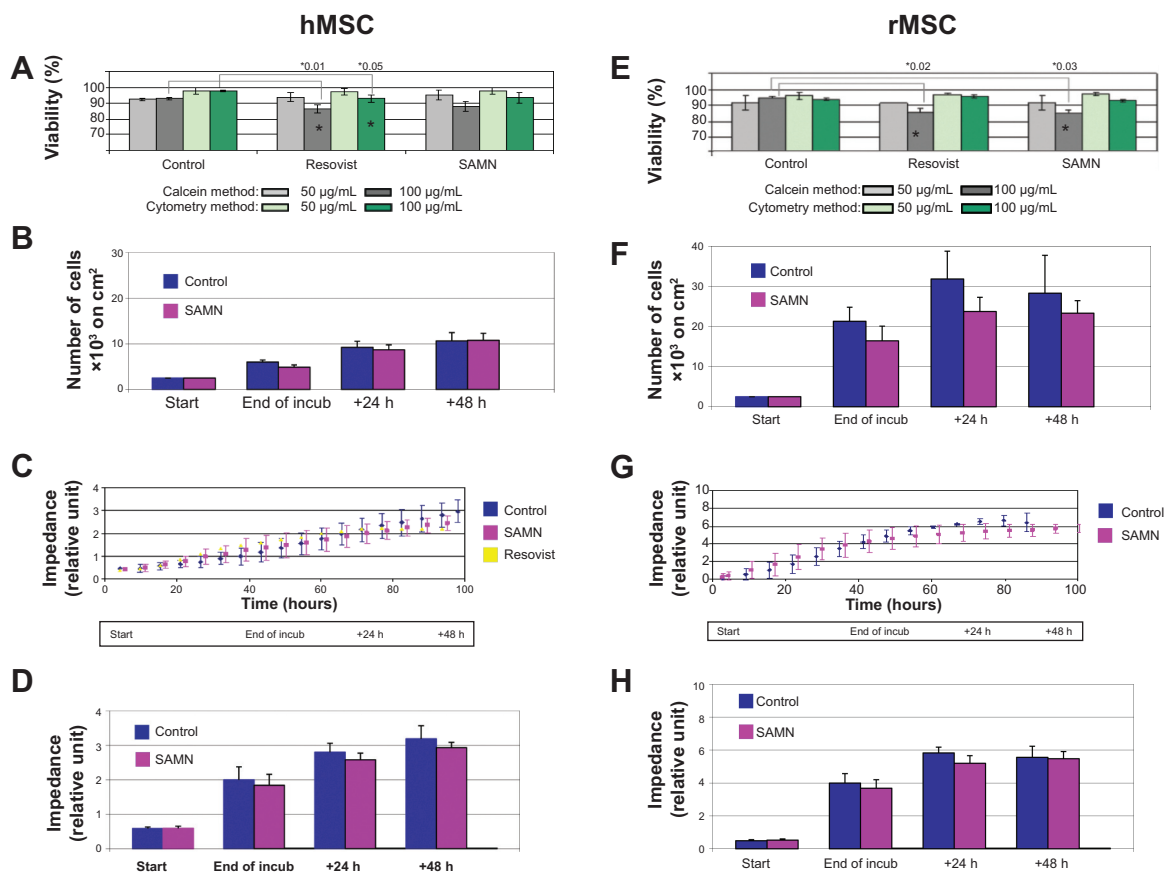


Figure 3 Comparison of viability and proliferation of SAMNs and Resovist-labeled cells.

Notes: (A) Human mesenchymal stromal cell (hMSC) viability after 48 hours incubation in 50 μg and 100 μg ferumoxides/mL, measured by two independent methods (gray bars – fluorescence microscopy calcein assay; green bars – flow cytometer propidium iodide assay). (B) hMSC growth curve measured by microscopy assay (blue bars – growth curve of control hMSC without nanoparticle labeling; violet bars – growth curve of hMSCs incubated for 48 hours with 50 μg of SAMNs/mL). (C) Illustrative hMSC growth curves measured by the xCELLigence automatic system (cell sample from donor 1), cells were incubated without nanoparticles or with addition of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of SAMNs or Resovist. (D) Summarized data from xCELLigence for all cell donors. E–H denote analogous results for rat mesenchymal stromal cells (rMSCs). Error bars represent standard deviations. Statistically significant differences between mean value of the sample and mean value of its control are highlighted by a star and P-value by a number.

Abbreviations: incub, incubation; h, hours; CTRL, control; SAMNs, surface-active maghemite nanoparticles; SAMN50, surface-active maghemite nanoparticles 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; RES50, Resovist 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; RES 100, Resovist 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; SAMN100, surface-active maghemite nanoparticles 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

assay was run using just only 50 μg ferumoxides/mL (results from microscopy analysis are presented in Figure 3B and F, representative data from xCELLigence assay in Figure 3C and G, and the statistical summary of all xCELLigence assay in Figure 3D and H). Both the microscopy assay (Figure 3B, F) and xCELLigence assay (Figure 3D, H) confirmed that SAMN solution of 50 μg ferumoxides/mL in combination with 48 hours labeling time did not affect cell proliferation.

Migration capacity of labeled and unlabeled hMSC quantified by the FBS gradient migration method was $6.2\% \pm 1.0\%$ and $6.8\% \pm 0.8\%$, whereas the central stopper method gave 104 ± 19 and 112 ± 16 (number of cells that migrated into free central area). Differences between control and labeled cells were without statistical significance, and differentiation properties of SAMN-labeled hMSCs were not affected. The result from differentiation assay was the amount of adipogenic and osteogenic cells in the samples; the assay showed minimal differences between control and labeled samples (data not shown).

Qualitative and quantitative cell uptake analysis of SAMNs

The important physiological markers of labeled MSCs are their shape and surface area after SAMN labeling. The images from optical microscopy presented in Figure 4A demonstrate that 50 μg ferumoxides/mL labeled cells are identical to the control cells (microphotographs were taken 2 days after staining). After 48 hours of labeling, more than 95% of the hMSCs or rMSCs had internalized SAMN nanoparticles (Figure 4C). Light microscopy images of SAMN-labeled MSCs after Prussian blue staining show the presence of iron in the cell cytoplasm (Figure 4B).

SEM images showing cell morphology also demonstrate the flattened shape of SAMN-labeled cells with lamellipodia and their similarity to the normal native MSCs. It can be seen clearly (Figure S2A) that the intracellular nanoparticles are distributed around and close to the nucleus, where lysosomes should be largely and mostly situated. The image in Figure S2B is created using backscattered electrons, which improves the material contrast. In this case, we can see the

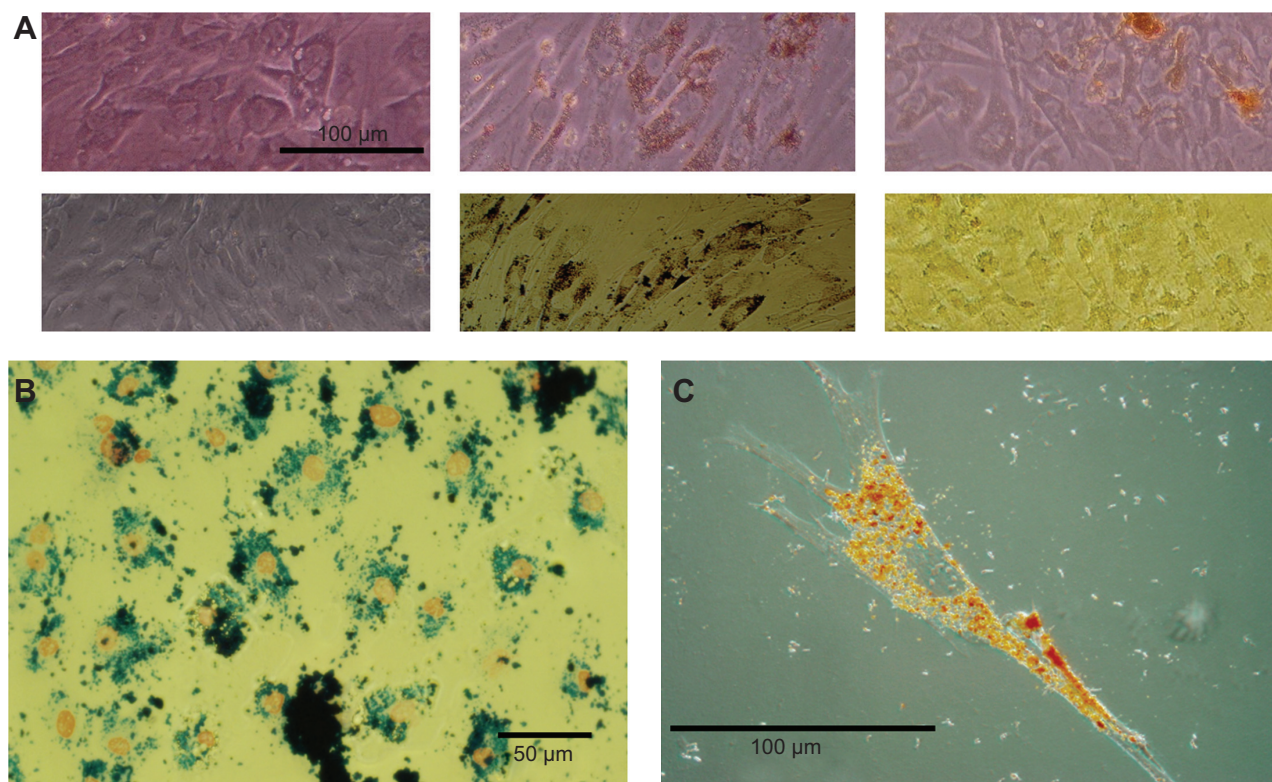


Figure 4 Light microscopy images.

Notes: (A) MSCs (top line – hMSC; bottom line – rMSC), (left) control nonlabeled cells, (middle) SAMN-labeled cells, and (right) Resovist-labeled cells. Incubation 48 hours, 50 μg ferumoxide/mL; objective 20 \times . (B) SAMN-labeled MSCs after Prussian blue staining showing the presence of iron (blue spots) in the cell cytoplasm. Red spots depict the nuclei of cells. (C) Representative image of fully labeled hMSC with SAMNs. Objective 40 \times .

Abbreviations: MSCs, mesenchymal stromal cells; hMSC, human mesenchymal stromal cell; rMSC, rat mesenchymal stromal cell; SAMN, surface-active maghemite nanoparticle.

presence of iron oxide nanoparticles as black dots (as heavy element here) whereas the rest of the cell body, grown on the FTO film (soda-lime glass slides with a fluorine-doped tin oxide [SnO₂:F] layer) (methods in the Supplementary materials), is almost colorless (due to tin from the FTO). Moreover, the energy dispersive X-ray spectrum of this sample was also measured and the significant peaks were assigned to the iron from the nanoparticles and tin from the FTO film (detailed methods in the Supplementary materials).

The Figure S2C presents a detailed three-dimensional map of the same stem cell body as was measured by SEM but constructed using AFM. There is a noticeable difference between the fuzzy shaped SAMN internalized within the cell body and those adsorbed on the cell surface membrane, for which the bounds of the globular nanoparticles are sharply delineated.

Results of flow cytometry confirmed that a concentration of 50 µg/mL of SAMN labeling does not alter the CD phenotype of hMSCs and rMSC (Figure S3). Cytometry analysis also showed no increase of autofluorescence after the nanoparticle uptake.

Determination of iron content in labeled hMSC cells brought significantly higher Fe concentration in SAMN-labeled cells (113±9 pg Fe/cell) compared to Resovist (39±9 pg Fe/cell) after 48 hours of labeling (Table 2). Measurements after 24, 36 and 48 hours show almost linearly increasing Fe content in SAMN-labeled hMSC (data not shown). Another interesting point of view could be the correlation between the results from AAS method and flow cytometry. The ratio of higher Fe content in SAMN-labeled cells correlates well with their higher side scatter in comparison to lower side scatter of Resovist-labeled cells (Figure S3).

Long-term labeling experiment

In the first long-term experiment, measured in situ by the xCELLigence system, the cells were exposed to 50 and 100 µg/mL of ferumoxides for 110 hours. From the graph in Figure S1A, we can see that during the standard 48-hours incubation, all growth curves show negligible differences in

comparison with nonlabeled control cells. After 48 hours, only the shape of the SAMN-labeled MSCs (50 µg/mL) is similar to the control curve (less than 20% difference). The rest of the curves show statistically significant differences compared to the control curve (30% and more).

During additional long-term monitoring (up to 96 hours) of labeled cells by optical microscopy, it was illustrated that the high ferumoxide concentration (visible dark dots under light microscopy; probably lysosomes full of SAMNs) in the cytoplasm was divided into the daughter cells. Another very important aspect of SAMN uptake is the absence of nanoparticles in the cell nucleus. Cell morphology was depicted on all microphotos after the first 48 hours of labeling (Figure 4A) and also after 3 and 6 weeks (Figure S1C) and shows that the exposed cells kept standard shape and size as nonlabeled cells.

MRI phantom experiments

Nanoparticle concentration series (10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 80 µg of ferumoxides per milliliter of agar in tubes) were scanned simultaneously using a 1.5 T MRI instrument. The value of gray inside the circles well correlates with the concentration of iron oxide nanoparticles. With increasing ferumoxide concentration, the signal intensity decreases. These two curves (each point is the average from three independent experiments) show that SAMNs display no hypointensity of the signal intensity index (images of SAMN display are less dark than Resovist) at lower concentrations (0–30 µg/mL), but the degree of gray in the case of higher ferumoxide concentrations of SAMNs and Resovist nanoparticles is almost identical (Figure 1A).

As can be seen in Figure 1B and C, 50–500×10³ cells labeled with both SAMNs and Resovist (dispersed in 1 mL of agar inside a tube of 1 cm diameter) provide very good negative contrast. From the curves of signal intensities, it is obvious that in both sequences (FRFSE and GRE) the cells labeled with SAMNs give more hypointense signal in comparison with Resovist-labeled cells. Consequently, we compared T2 FRFSE sequences and GRE heme sequences (GRE is historically established for detecting hemosiderin in the brain)²² for samples of labeled cells incorporated into freshly extracted heart (Figure 1F). The signal intensity of the labeled cells (especially in the 50×10³ MSC tube) scanned by FRFSE (Figure 1D) is comparable with that of fresh heart tissue. On the contrary, GRE sequences display the tube with 50×10³ SAMN-labeled cells with a sufficient contrast, similar to results of Smirnov et al²³ enabling very clear visualization of this amount of MSC cells (Figure 1E).

Table 2 Comparison of Fe concentration per cell for SAMNs and Resovist-labeled hMSCs (three donors, 48 hours of incubation)

	Fe _{SAMNs} (pg/cell)	Fe _{Resovist} (pg/cell)
hMSC – donor 1	101.4	27.9
hMSC – donor 2	104.9	39.6
hMSC – donor 3	135.3	50.3
Average ± SD	113±15	39±9

Abbreviations: SAMNs, surface-active maghemite nanoparticles; hMSC, human mesenchymal stromal cell; SD, standard deviation.

Another detailed comparison of contrast properties of labeled cells under different scanning modes and labeling methods is part of Figure S4.

MSC implantation into in vitro myocyte culture

Figure 5A shows the shape of MSCs immediately after injection into myocardial culture. They have a globular appearance, with ferumoxide complexes visible inside the cells. MSCs attached very well to the beating myocardial tissue (strong attachment was tested by moderate flushing using a micropipette), changed to a flattened shape, and displayed strong adherence but also excellent elasticity in cases where the surrounding tissue was contracting (Figure 5B and [Video S1](#)). The MSCs survived in the myocardial culture for at least 7 days (Figure 5C), still with strong adherence, elasticity, and visible ferumoxide SPIO clusters inside their cytoplasm. Our preliminary data show that the incorporated MSCs are recognizable in that contractile myocyte layer also after 15 days and 30 days.

Discussion

The increasing demand for new MRI probes suitable for clinical cell tracking, and the lack of commercial contrast agents based on SPIO nanoparticles at the same time, has led to intensive research in this field. Several traditional contrast agents have been withdrawn from the market⁷ recently or have displayed insufficient biocompatibility.^{24,25} Thus, the quest to fabricate economically accessible and yet efficient new contrast probes has taken on great importance. Our bare stoichiometric maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanoparticles are named “SAMNs” because their most prominent characteristic is their ability to form stable colloidal suspensions in water without any organic or inorganic coating. Moreover, SAMNs reveal unique spectroscopic properties and a well-defined crystal-line structure.²⁶

The usual way to incorporate nanoparticles with size smaller than 100 nm into the cell in vitro is through their direct addition to the cultivation medium. The incorporation process of the SPIO nanoparticles involves adsorption to cell membrane, which is followed by active/passive transport across the cell membrane.^{27–29} Cationic particles are taken into cells through clathrin- or caveolin-mediated endocytosis, but anionic particles enter by mediator-independent endocytosis.³⁰ We can assume that our anionic SAMNs enter the MSCs in the same way. Numerous publications describe nanoparticles with positive surface charge which are internalized into cells more efficiently than those with negative surfaces.^{31–33} Some studies, however, show an uptake behavior that is just the opposite.^{34,35} Despite the fact that the cellular membrane is in general negatively charged, it does have some areas with cationic sites which allow the binding of anionic nanoparticles.³⁶ We also must have in mind that, although bare SAMNs surface characteristics confer the ability to form stable colloidal suspensions, suggesting a network of interactions with water molecules and repulsive forces inhibiting nanoparticle aggregation, the nanoparticle surface is able to interact with organic molecules in solution.^{26,37} SAMN’s ability to bind molecules could lead to a fast opsonization in the cell culture media and, subsequently, the resulting protein shell could make SAMNs a nontoxic biomimetic nanosystem recognizable by stem cells and stimulate the nanoparticle uptake. As we can see from time-lapse microscopy movies, SAMN clusters are efficiently internalized into the cells followed by their dynamic reordering among cells during cell life and cell division (Figure S1B).

It is very promising that all hMSC and rMSC proliferation experiments together lead to the conclusion that toxicity induced by 48 hours of incubation in 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of SAMN is minimal and without statistical significance during the first 2 days of staining and minimal during the next 2 days after cultivation in complete medium. Our 48-hours SPIO labeling process with precise cell washing yields well-labeled cells

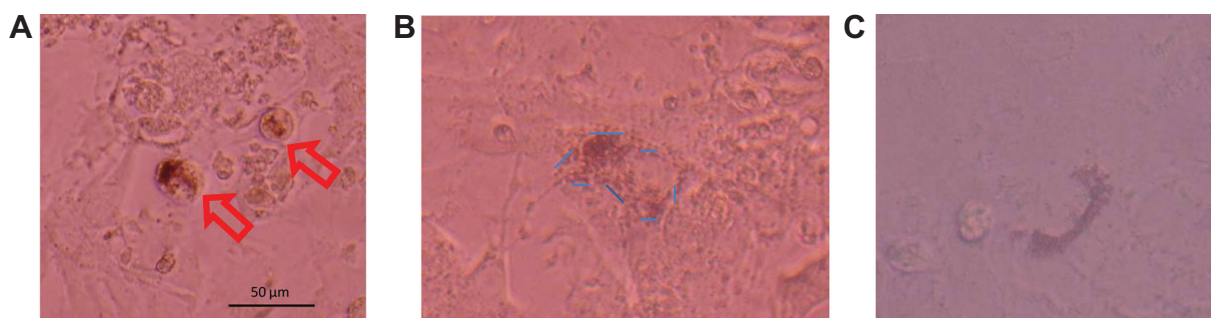


Figure 5 Optical images of MSCs labeled with SAMNs.

Notes: (A) Immediately after trypsinization and injection into myocardial culture (highlighted by red arrows). (B) After 24 hours of cocultivation with myocytes (highlighted by blue border). The flattened shape of MSCs is clearly visible. (C) MSCs in myocardial culture after 7 days.

Abbreviations: MSC, mesenchymal stromal cell; SAMNs, surface-active maghemite nanoparticles.

where most of the ferrous complexes are actually inside the cells and not on the cell surface.

We also demonstrate this excellent SAMN intracellular integration by advanced microscopy techniques such as SEM and AFM with unique cell sample preparation using an FTO substrate for cell fixing. This novel universal cell fixing method provides two- or three-dimensional mapping of the same MSC sample under AFM and SEM.

Quantification and comparison of magnetic response of 50, 100, 250, and 500×10³ cells containing SAMN or Resovist show significant advantages of SAMN over Resovist (Figure 1B, C and Figure S4). Additionally, the better parameters of SAMN-labeled cells were also proved under the 7 T scanner (Figure S4). The quantified higher MRI contrast correlates well with the higher Fe content in SAMN-labeled cells. Following the physical theory of magnetic resonance, we can identify only two possible reasons that can explain this more hypointense signal: 1) a higher content of ferumoxide inside the cell (within the given volume); and/or 2) a higher relaxivity index of the SAMN sample over Resovist having the same Fe concentration (pg/mL) within the same volume (1 cm³). Nevertheless, the SAMN sample (phantom solution without cells) does not show a higher contrast effect than Resovist (as proved by the experiments featured in Figure 1A and by relaxivity measurements). Thus, the latter reason is not relevant. The higher contrast effect (hypointensity) of SAMN-labeled cells can therefore be explained in terms of the higher content of ferumoxide per cell compared to that in Resovist. This higher content was also confirmed by the AAS measurements (Table 2).

This deduction brings the secondary question, namely how to explain better SAMN uptake over Resovist. We hypothesized that SAMNs have a more suitable size and their nanoparticle surface provides better biomolecule opsonization for the following internalization process into the cells; SAMN could also exhibit higher saturation limit for the storage of nanoparticles in internal organelles (probably in lysosomes), but the confirmatory confocal analysis is now at the beginning stage.

This higher ferumoxide content definitely stems from a more efficient uptake of the SAMNs compared to Resovist during the 48-hours incubation period. From the quantitative analysis of Fe concentration per cell (measured by AAS), it was confirmed that the amount of Fe in cells labeled with SAMNs incubated for 48 hours is more than two times that in 48-hours incubated Resovist-labeled cells. Nevertheless, it did not show any higher toxicity over Resovist (as shown in the complex viability analysis results).

Another important result is that labeled MSCs survived very well in *in vitro* monoculture and also in the heterogeneous cocultures, for example, in coculture with myocytes for at least 7 days (Figure 5C). Our preliminary data show that the incorporated MSCs are viable and recognizable in the contractile myocyte layer also after 15 days and 30 days (data not shown).

The next crucial point for future *in vivo* MRI monitoring of SAMN-labeled cells is also the choice of suitable scanning sequences. We compared FRFSE sequences and GRE heme sequences for several phantom samples. As seen in Figure 1D and E and Figure S4, our SPIO-labeled stem cells in tissue phantoms are more visible in GRE than in FRFSE sequences. This GRE experiment shows that the detection limit for SAMN-labeled cells in heart tissue is minimally 50×10⁶, which is better than limit of Resovist under the same staining conditions (ferumoxide concentration and time) and scanning conditions.

Results of this study confirm our assumed hypothesis described in the introduction, that bare SAMNs could become favorable contrast agent for noninvasive MRI stem cell tracking. From the clinical perspective, there are, however, some additional aspects that should be clarified in the near future such as the kinetics of the nanoparticle elimination from the cell cytoplasm, nanoparticle storage, and degradation in internal organelles.

Conclusion

The newly and easily synthesized maghemite nanoparticles, called SAMNs, with their peculiar surface colloidal properties, show a high efficiency in labeling rat and human MSCs. A concentration of 50 μg/mL and 48 hours of labeling were found to be optimal for hMSC and rMSC labeling. The uptake efficiency under these conditions is significantly higher than that of commercial Resovist. Moreover, the viability and proliferation profile of both human and rat SAMN-labeled MSCs were not affected. These SAMN-labeled MSCs provide excellent contrast in T2-weighted 1.5- and 7 T MRI measurements. Phantom cell samples with concentration of 50–500×10³ SAMN-labeled cells/mL offer significantly higher contrast than Resovist-labeled cell samples. Thus, SAMNs can be a promising contrast agent for future noninvasive *in vivo* MSC tracking by MRI.

Acknowledgments

This study was financially supported by the Czech Ministry of Education (project LM2011017), the Czech Ministry of Health (project NT11137), the European Regional Development Funds (CZ.1.05/2.1.00/03.0058, CZ.1.07/2.3.00/20.0183), Ministry of Education, Youth and Sports of Czech Republic

(project LO1304), and IGA_PrF_2014017. The authors wish to thank Clemens Diwoy (Graz University, Austria) for the measurement of MR relaxivity indexes of SAMNs, Dr Pavol Szomolanyi (General Hospital, Vienna) for the performance of MRI phantom experiments, Monika Homolkova (Institute of Complex Systems, Nove Hrad, Czech Republic) for time-lapse measurement of labeled cells, and the company Medihope s.r.o. for tissue MRI measurements.

Disclosure

All authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J*. 2008;29:1807–1818.
- Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, Toritsuka Y, Nakamura Y, Horibe S. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant*. 2004;13:595–600.
- Kebriaei P, Robinson S. Treatment of graft-versus-host-disease with mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2011;13:262–268.
- Wang Z, Ruan J, Cui DX. Advances and prospect of nanotechnology in stem cells. *Nanoscale Res Lett*. 2009;4:593–605.
- Corot C, Robert P, Idée JM, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58:1471–1504.
- Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, et al. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation*. 2003;107:2290–2293.
- Berman SMC, Walczak P, Bulte JWM. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2011;3:343–355.
- Bulte JWM, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed*. 2004;17:484–499.
- Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D Appl Phys*. 2003;36:R167–R181.
- Wang YXJ, Hussain SM, Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol*. 2001;11:2319–2331.
- Weissleder R, Moore A, Mahmood U, et al. In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat Med*. 2000;6:351–355.
- Berry CC, Curtis ASG. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D Appl Phys*. 2003;36:198–206.
- Alexiou C, Jurgons R, Seliger G, Iro H. Medical applications of magnetic nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006;6:2762–2768.
- Laurent S, Forge D, Port M, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterization, and biological applications. *Chem Rev*. 2008;108:2064–2110.
- Thanh NTK. *Magnetic Nanoparticles from Fabrication to Clinical Applications*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis; 2012. ISBN 978-1-4398-6932-1.
- Sinigaglia G, Magro M, Miotto G, et al. Catalytically active bovine serum amine oxidase bound to fluorescent and magnetically drivable nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2249–2259.
- Venerando R, Miotto G, Magro M, et al. Magnetic nanoparticles with covalently bound self-assembled protein corona for advanced biomedical applications. *J Phys Chem C*. 2013;117:20320–20331.
- Magro M, Sinigaglia G, Nodari L, et al. Charge binding of rhodamine derivative to OH⁻ stabilized nanomaghemite: universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors. *Acta Biomater*. 2012;8:2068–2076.
- Gallo MP, Ramella R, Alloati G, et al. Limited plasticity of mesenchymal stem cells cocultured with adult cardiomyocytes. *J Cell Biochem*. 2007;100:86–99.
- Chlopčikova S, Psotova J, Miketova P. Neonatal rat cardiomyocytes – a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2001;145:49–55.
- Tucek J, Zboril R, Petridis D. Maghemite nanoparticles by view of Mossbauer spectroscopy. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006;6:926–947.
- Shapiro EM, Skrtic S, Sharer K, Hill JM, Dunbar CE, Koretsky AP. MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:10901–10906.
- Smirnov P, Gazeau F, Beloeil JC, Doan BT, Wilhelm C, Gillet B. Single-cell detection by gradient echo 9.4 T MRI: a parametric study. *Contrast Media Mol Imaging*. 2006;1:165–174.
- Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF, Bulte JW. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed*. 2004;17:513–517.
- Chang YK, Liu YP, Ho JH, Hsu SC, Lee OK. Amine surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles interfere with differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 2003;30:1499–1506.
- Magro M, Faralli A, Baratella D, et al. Avidin functionalized maghemite nanoparticles and their application for recombinant human biotinyl-SERCA purification. *Langmuir*. 2012;28:15392–15401.
- da Rocha EL, Caramoni GF, Rambo CR. Nanoparticle translocation through a lipid bilayer tuned by surface chemistry. *Phys Chem Chem Phys*. 2013;15:2282–2290.
- Stark WJ. Nanoparticles in biological systems. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50:1242–1258.
- Singh N, Jenkins G, Asadi R. Potential toxicity of supermagnetic iron oxide. *Nano Rev*. 2010;1:538–553.
- Haruhs-Frenkel O, Debotton N, Benita S, Altschuler Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;353:26–32.
- Kralj S, Rojnik M. Effect of surface charge on the cellular uptake of fluorescent magnetic nanoparticles. *J Nanopart Res*. 2012;14(10):1–14.
- Jo JI, Aoki I, Tabata Y. Design of iron oxide nanoparticles with different sizes and surface charges for simple and efficient labeling of mesenchymal stem cells. *J Control Release*. 2010;142(3):465–473.
- Bhattarai SR, Kim SY, Jang K. Laboratory formulated magnetic nanoparticles for enhancement of viral gene expression in suspension cell line. *J Virol Methods*. 2008;147(2):213–218.
- Pradhan P, Giri J, Banerjee R. Cellular interactions of lauric acid and dextran-coated magnetite nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. 2007;311(1):282–287.
- Luciani N, Gazeau F, Wilhelm C. Reactivity of the monocyte/macrophage system to superparamagnetic anionic nanoparticles. *J Mater Chem*. 2009;19(35):6373–6380.
- Wilhelm C, Gazeau F, Roger J, et al. Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: kinetic analysis of membrane adsorption and subsequent internalization. *Langmuir*. 2002;18:8148–8155.
- Golovko DM, Henning T, Bauer JS, et al. Accelerated stem cell labeling with ferucarbotran and protamine. *Eur Radiol*. 2010;20:640–648.

Supplementary materials

Preparation of stem cells for SEM and AFM microscopy

For microscopy imaging of superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled stem cells, soda-lime glass slides with a fluorine-doped tin oxide (SnO_2 :F) layer (FTO glass slides)

were used. The human mesenchymal stromal cells (hMSCs) were incubated for 48 hours with surface-active maghemite nanoparticles (SAMNs) ($50 \mu\text{g Fe/mL}$) in 24-well plates, where a special matrix consisting of the FTO slides was inserted. Adherent SPIO-labeled cells were fixed on this surface in 3% glutaraldehyde (dissolved in phosphate

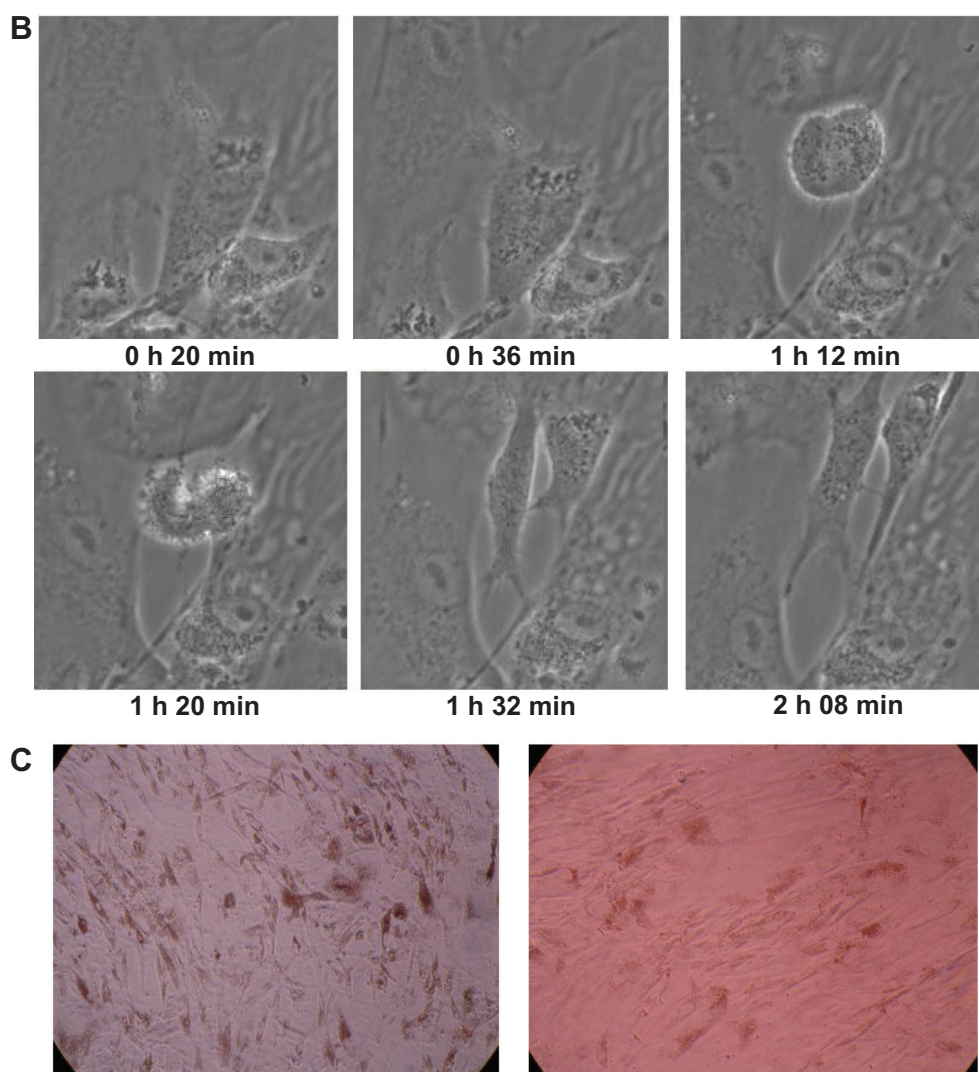
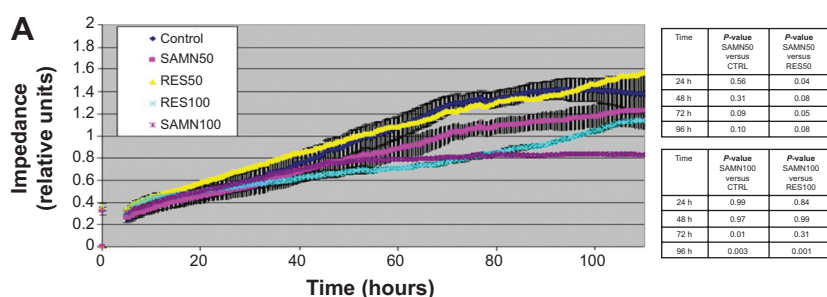


Figure S1 Additional long-term experiments.

Notes: (A) Growth curve generated by the xCELLigence setup. MSCs are exposed to ferumoxide for an extra long time (in contrast with standard exposure of 48 hours). The medium contained $50 \mu\text{g}$ or $110 \mu\text{g}$ ferumoxides per mL. The table shows the statistical difference between SAMN and CTRL and SAMN and Resovist. (B) Example of MSC dividing after labeling with SAMN 48 hours incubation. (C) Morphology of MSC labeled by SAMN after 3 and 6 weeks of cultivation (left and right, respectively). No atypical cell growth or malformation of cells is visible; viability is similar to that of control cells without labeling. SAMNs are concentrated at the brown visible areas inside the cells.

Abbreviations: MSC, mesenchymal stromal cell; SAMN, surface-active maghemite nanoparticle; CTRL, control; RES50, Resovist $50 \mu\text{g/mL}$; RES100, Resovist $100 \mu\text{g/mL}$; h, hours; min, minutes.

buffer) and washed two times with 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2). The cells were then dehydrated using an ethanol series and dried overnight at room temperature. Samples were observed using scanning electron and atomic force microscopy.

Scanning electron microscopy

The distribution and localization of nanoparticles adsorbed or internalized within the stem cells were observed using a scanning electron microscope (Hitachi SU6600) at an acceleration voltage of 15 kV. The presence of iron oxide nanoparticles was confirmed by energy dispersive X-ray spectroscopy.

Atomic force microscopy

The morphology, shape, and visualization of individual nanoparticles on the cellular surface of the fixed and labeled

cells on FTO were observed by using an AFM (INTEGRA Aura). The measurements were taken in semicontact mode with a scanning range of 100 μm .

Relaxivity measurement

Measurements were performed with a clinical 3T whole-body magnetic resonance (MR) scanner (Siemens Skyra, Erlangen, Germany). For all measurements, a circularly polarized coil (animal coil) with an inner diameter of 7.5 cm (RAPID, Biomedical GmbH, Rimpf, Germany) was used to obtain a high signal-to-noise ratio.

All complexes were diluted in agarose. A dilution series starting from 0.5 mM Fe to 0.031 mM Fe was filled into 2 mL Eppendorf tubes.

R2 relaxometry measurements were realized with a two-dimensional Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) sequence with an echo spacing of 8 ms and 20 echoes.

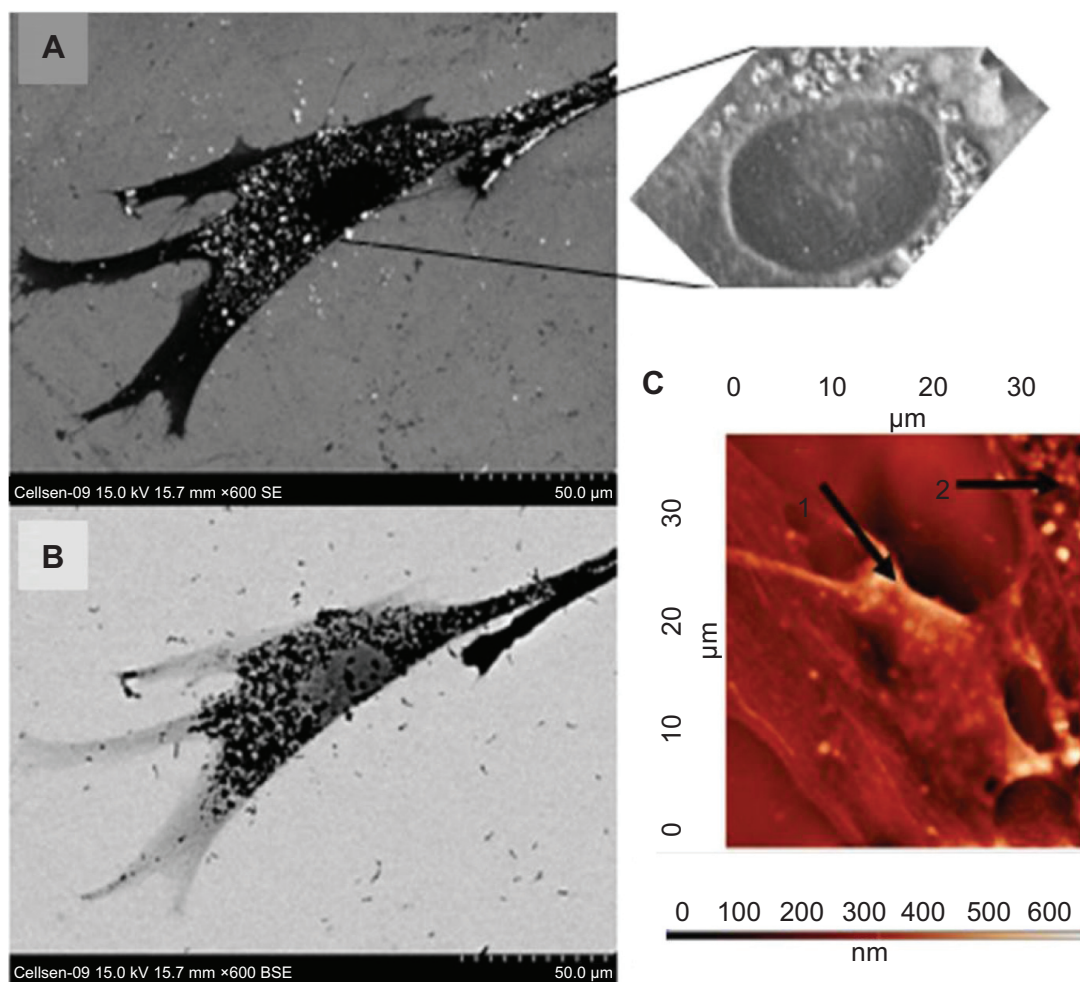


Figure S2 SEM and AFM images of cells incubated with SAMN nanoparticles.

Notes: (A) Nanoparticles (white dots) on the surface, later internalized to the cell as depicted by using secondary electrons (SE). The zoomed figure shows nanoparticle aggregates situated around the nucleus, where lysosomes should be largely and mostly situated. (B) The same cell imaged by the backscattered electron mode (iron nanoparticles are shown as black dots). (C) AFM image of labeled MSCs. Fuzzy shaped SAMNs (arrow 1) internalized within the cell body (arrow 2).

Abbreviations: SEM, scanning electron microscopy; AFM, atomic force microscopy; MSC, mesenchymal stromal cell; SAMN, surface-active maghemite nanoparticle; BSE, backscatter electron mode.

TR =6,000 ms; FOV =120×49 mm; matrix =192×156; single 5 mm slice.

R2* was measured based on a unipolar multiecho two-dimensional gradient-echo (GRE) sequence with an inter echo spacing of 3.31 ms and 12 echoes; TR =500 ms; $\alpha=30^\circ$; NEX=4; FOV =120×71 mm; matrix =192×114; slice thickness =1.5 mm.

R1 was measured by employing an inversion–recovery fast spin echo (IRFSE) and six different inversion times (50, 100, 200, 400, 800, 1,600, 3,200 ms), at a temperature of 23.2°C, a turbo factor of 3, TR =5,000 ms, TE =7.7 ms,

FOV =115×93 mm, matrix =192×156 at 5 mm slice thickness. Transverse and longitudinal relaxation times were calculated using a self-written program (IDL, Exelis Inc., McLean, VA, USA). T2 and T2* were determined with a linear fit of the logarithmized signal intensity over echo time (for all used TEs the SNR was >5), whereas the first echo of the T2 dataset was ignored. T1 was calculated using a three-parameter fit of the IR-FSE dataset according to the signal equation.

Finally, r_1 , r_2 , and r_2^* were computed as the slope of the linear regression between R1, R2, and R2* and the Fe concentration in mM.

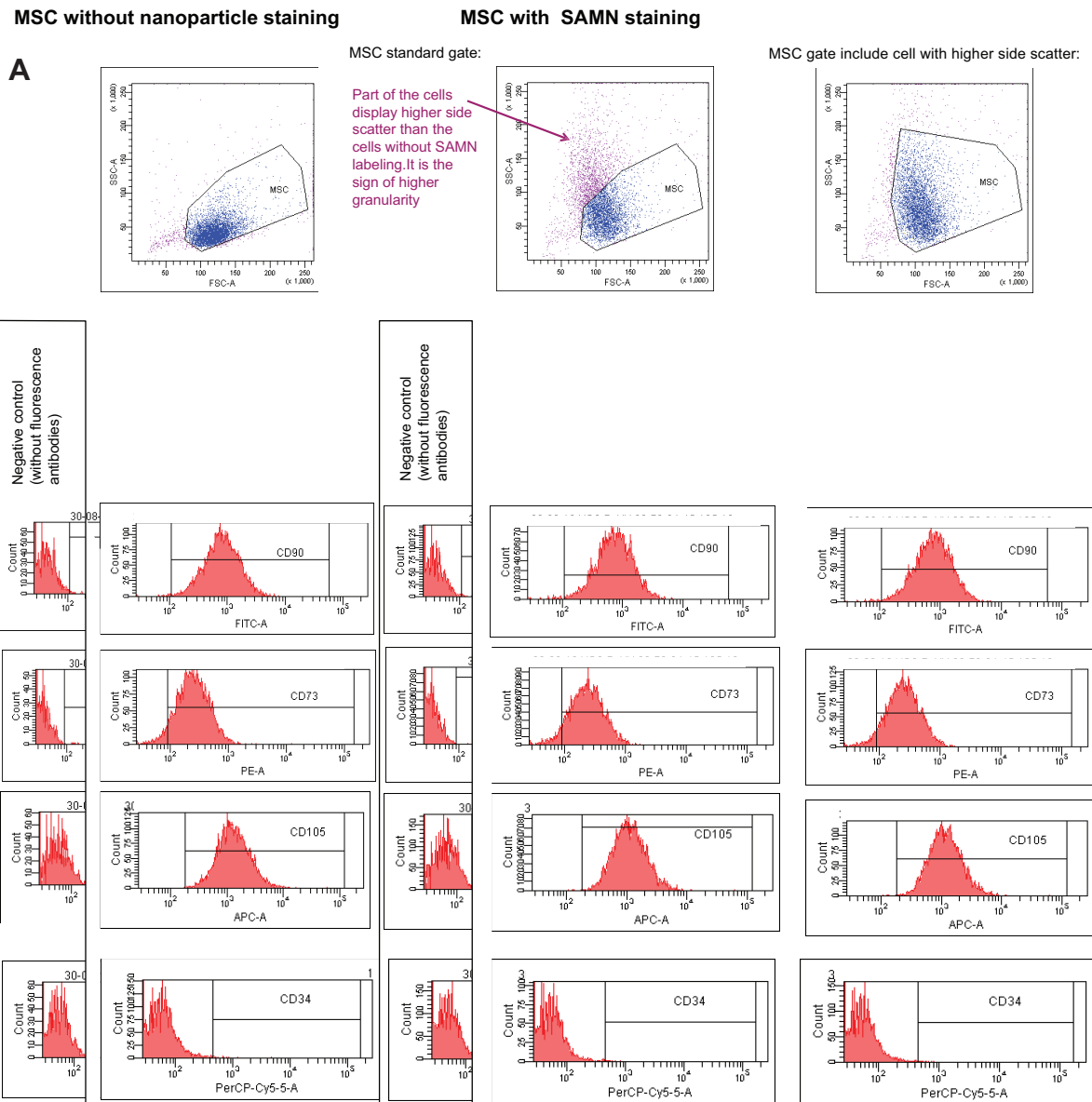


Figure S3 (Continued)

B MSC with resovist staining

MSC standard gate:

MSC gate include cell with higher side scatter:

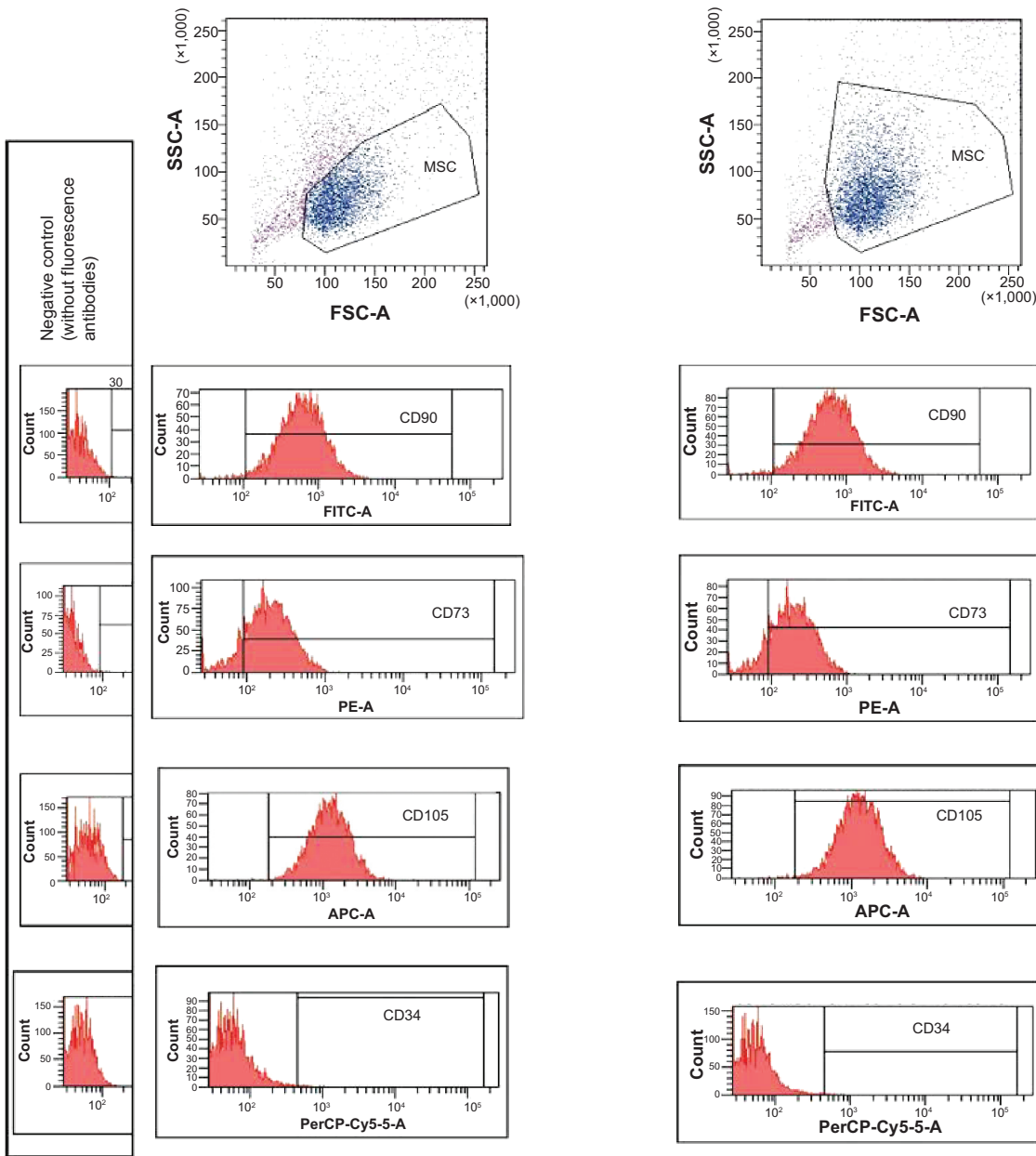


Figure S3 Flow-cytometry analysis of hMSC: side scatter, forward scatter, CD90 positivity, CD73 positivity, CD105 positivity, and CD34 negativity.

Notes: (A) MSC without nanoparticle staining and MSC with SAMN staining. MSC standard gate: MSC gate includes cell with higher side scatter: Part of the cells displays higher side scatter than cells without SAMN labeling. It is the sign of higher granularity. (B) MSC with Resovist staining. MSC standard gate: MSC gate includes cell with higher side scatter.

Abbreviations: SAMN, surface-active maghemite nanoparticle; MSC, mesenchymal stromal cell; h, human; SSC-A, side scatter; FSC-A, forward scatter; FITC-A, relative intensity of fluorescein fluorescence; PE-A, relative intensity of phycoerythrin fluorescence; APC-A, relative intensity of allophycocyanin fluorescence; PerCP-Cy5-5-A, relative intensity of peridinin chlorophyll protein – Cy5 conjugate fluorescence.

International Journal of Nanomedicine downloaded from https://www.dovepress.com/ by 158.194.116.32 on 25-Mar-2017 For personal use only.

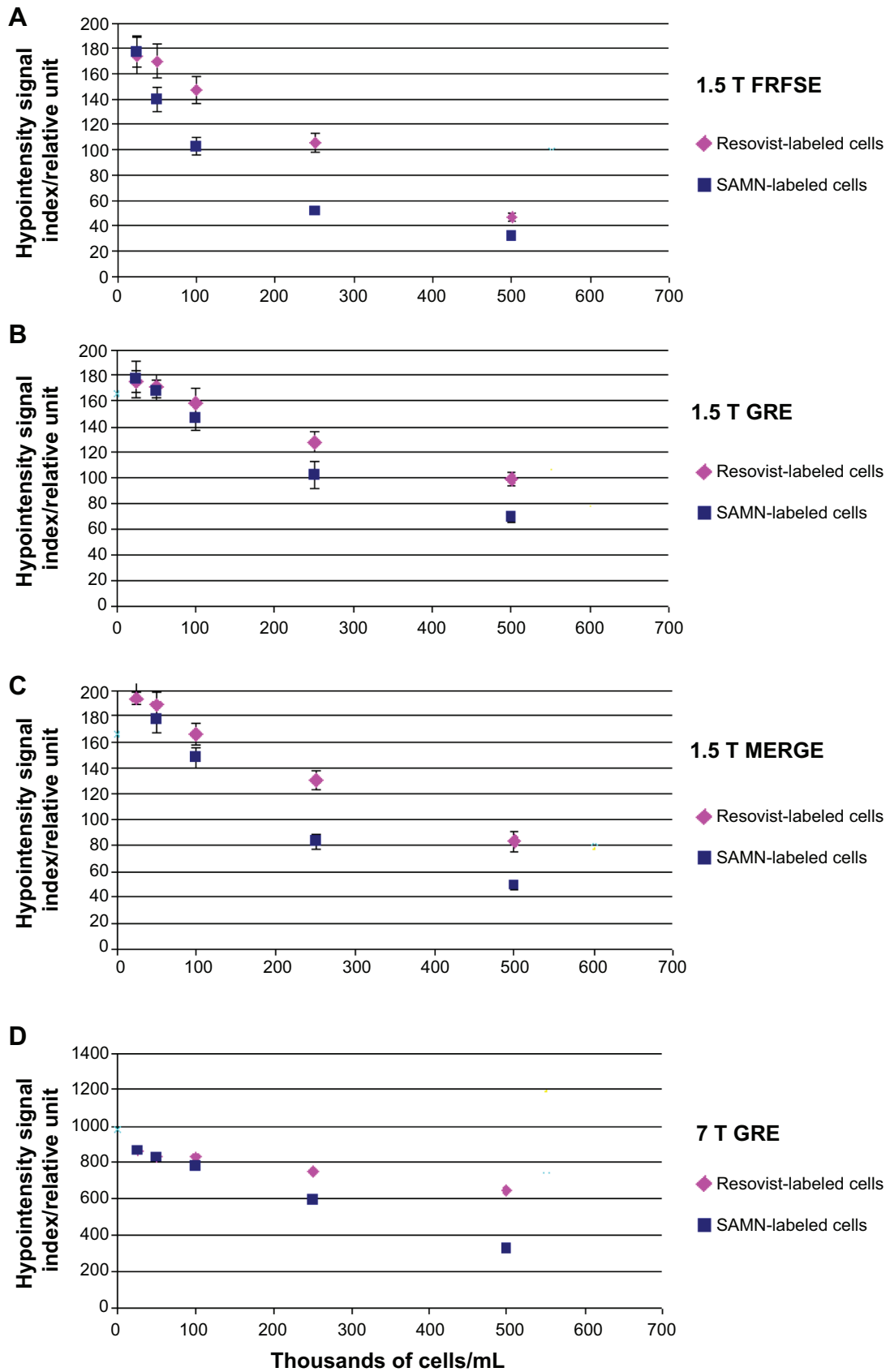


Figure S4 Contrast of SAMN and Resovist cell samples under different scanning modes.
Notes: Intensity signal index is significantly different for SAMN and Resovist when the cell concentration is $>50 \times 10^3$ in all scanning modes. 1.5 T machine was used in **A–C** and a 7 T machine (Magnetom 7 T Siemens) was used in **D**.
Abbreviations: SAMN, surface-active maghemite nanoparticle; MSC, mesenchymal stromal cell; FRFSE, fast-recovery fast spin echo; GRE, gradient echo.

Video S1

Labeled MSCs by ferrous nanoparticles display very good contrast under light microscopy. Nanoparticle clusters are visible as brown dots inside the cytoplasm.

International Journal of Nanomedicine

Dovepress

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Quaternized carbon dot-modified graphene oxide for selective cell labelling – controlled nucleus and cytoplasm imaging†

Cite this: DOI: 10.1039/c4cc02637c

Received 10th April 2014,
Accepted 13th June 2014

DOI: 10.1039/c4cc02637c

www.rsc.org/chemcomm

K. K. R. Datta,^a O. Kozák,^a V. Ranc,^a M. Havrdová,^a A. B. Bourlinos,^a K. Šafářová,^a K. Holá,^a K. Tománková,^b G. Zoppellaro,^a M. Otyepka^a and R. Zboril^{*a}

Cationic quaternized carbon dots (QCDs) and anionic graphene oxide sheets (GO) are combined via non-covalent interactions following a self-assembly pathway to form highly biocompatible and fluorescent hybrid materials. These hybrids act as selective probes with controlled labelling of the cell nucleus or cytoplasm depending on the QCD loading.

Carbon dots (CDs) are a new class of fluorescent nanomaterials attracting considerable attention since their discovery.¹ The main advantages of CDs are viewed in their excellent biocompatibility and minimum health risk compared to traditional fluorescent semiconductor quantum dots based on metal chalcogenides including CdSe.² Nevertheless, CDs offer other benefits such as chemical inertness, a wide excitation band and excellent photostability, making them a promising material for optical cell imaging, cell tracking or for *in vivo* imaging.³ Moreover, several studies demonstrated that CDs can act as photosensitizers in photodynamic therapy.⁴ Hence, CDs exhibit a high potential as a new theranostic agent.

One of the most challenging tasks in various therapeutic treatments is to get the agent very close to and/or inside the nucleus of the cells to increase apoptosis.⁵ Up to now, there is no evidence or report regarding the cell uptake of CDs into the nucleus.⁶ In many cell imaging experiments the CDs were located mostly in the cytoplasm and rarely in the cell membrane.⁶ Generally, the internalization of the material into the cell is dependent mainly on the size and the surface chemistry (charge) of the material.⁷ CDs can be internalized into the cytoplasm quite easily thanks to their small size up to 10 nm.⁸ However, they are mainly negatively-charged because of carboxylate groups on their surface, and thus cannot enter the cell nucleus because of opposing like charges. This difficulty in entering

the nucleus can be overcome *e.g.* by bioconjugation with neuro-peptides as demonstrated for traditional chalcogenide-based quantum dots.⁵ Recently, Yang *et al.* prepared amino functionalized CDs derived from chitosan which penetrated into the cell membrane but did not enter the nuclei, although explanation for such behaviour was not reported.⁹ However, the strong electrostatic interaction can be similarly used as a driving force for nucleus labelling and positioning as we demonstrate in this work. Here we report, for the first time, the uptake of CDs into the cell nucleus. CDs entered the nucleus due to their strong positive charge originating from the precursor with quaternary ammonium (betaine) combined with their small sizes. The synthesis of these quaternized CDs (QCDs) was reported previously.¹⁰ However, the uptake into the nucleus might not be always desirable. For this reason, we have prepared a series of composite materials combining negatively charged graphene oxide (GO) with electrostatically attached QCDs for selective nucleus/cytoplasm labelling prepared by a self-assembly process (Fig. 1a).

A flow chart describing in detail the synthetic steps undertaken for the preparation of these fluorescent composite materials is given as Scheme S1 in the ESI.† GO exhibits a negative surface charge (−32 mV) and has an interlayer spacing of ~0.7 nm (ESI,† Fig. S1). In contrast, the presence of quaternary ammonium groups on QCDs makes them highly dispersible in water, with a surface charge of +53 mV. Two fluorescent hybrids

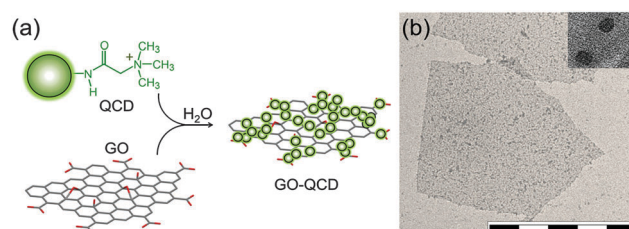


Fig. 1 (a) Schematic representation of the self-assembly process of GO–QCD hybrid materials in water. (b) The TEM image of the hybrid material GO250QCD500. The scale bar in (b) corresponds to 1 μm, the inset (top right) shows the HRTEM image.

^a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, Slechtitelu 11, 78371 Olomouc, Czech Republic. E-mail: radek.zboril@upol.cz

^b Department of Medical Biophysics, Faculty of Medicine and Dentistry, Institute of Translation Medicine, Palacky University in Olomouc, Hnevotinska 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental details, characterization techniques, cytotoxicity data. See DOI: 10.1039/c4cc02637c

were assembled by changing the weight ratio between GO and QCDs (thereafter coded as GO250QCD500 and GO500QCD500). The mass ratios between GO and QCDs were varied from 0.125 to 0.5, respectively. As expected, the positive charge on hybrids gradually decreased upon increasing the amount of GO in the composite. The amount of QCDs was intentionally taken larger than GO, in order to preserve the high fluorescence output of the hybrids (*vide infra*) and to allow nearly homogeneous coverage of the GO surface, as shown, for example, in the TEM micrograph and the AFM image of GO250QCD500 (Fig. 1b, Fig. S2 and S3, ESI[†] respectively). Due to the QCD overloaded hybrid systems and their dispersion over GO sheets, the final zeta potential of both studied systems is still positive (40–45 mV). Therefore, the non-covalent pathway pursued in this work provides several advantages compared to the covalent linkage¹¹ of CDs to GO such as (i) an easy access to a variety of robust hybrid materials as validated in the biological screening (*vide infra*), (ii) the ability to retain fluorescence properties, and (iii) the possibility to finely tune the overall zeta-potential (charge) of the hybrids by a simple change in the relative ratio of the two building components (QCDs and GO), which is finally reflected in selective cell labelling as discussed below. From the AFM micrographs, the lateral dimensions of GO nanosheets has been found to range from few hundred nanometers to less than two micrometres, with occasional folds and wrinkles (Fig. 2a). The topographic height distribution of a single GO nanosheet measured by using the cross-sectional height profile (Fig. 2c) has been found to fall at ~ 0.78 nm, a value that is commensurate with the *d*-spacing obtained from X-ray powder diffraction analysis (XRD, ESI[†] Fig. S1) and is in full agreement with the characteristic value reported in the literature.¹² The increase in thickness (~ 4 –5 nm) and surface roughness going from GO to GO250QCD500 and GO500QCD500 well harmonizes with the coverage of QCDs onto

GO layers (Fig. 2b and d and ESI[†] in Fig. S3). The height profile is, indeed, indicative of GO modification.

The UV-vis absorption–emission spectra of GO250QCD500 and GO500QCD500 in water are given in Fig. 3. Although we did not witness any significant change in the position of the emission maximum for the hybrids as compared to that characterizing pure QCDs in water solution, only a minor reduction in the fluorescence intensity was observed, suggesting their high potential to act as optical markers for cell labelling. When excited at 360, 420, and 480 nm, both GO250QCD500 and GO500QCD500 did not exhibit a considerable shift in the emission maximum (λ_{max}) compared to that of the QCDs. However, it is important to note here that the fluorescence intensity of the GO500QCD500 hybrid was found to be slightly lower than that witnessed for GO250QCD500. Hence, fluorescence decreased upon increasing the GO amount with respect to QCDs as expected (ESI[†] Fig. S4). However, the system still exhibits excellent PL properties for cell imaging. The minor quenching effect can result from the energy transfer (ET) processes from photoexcited QCDs to the aromatic GO lattice (also through the mutual overlap of their π -clouds: ESI[†] Scheme S2) but could also arise from the exposure of an increased number of graphenic domains having enhanced lateral dimensions¹⁰ in response to the increased GO amounts.

In order to probe the effectiveness of these QCD materials to act as optical markers in biological environments, we tested their stability at a pH close to that witnessed in phagolysosomes (pH < 6) and at a high ionic strength. The results revealed no significant changes in the PL properties of the QCD and GOQCD hybrids (ESI[†] Fig. S5). Also, toxicity impacts were tested through cytological MTT assay using mouse fibroblast (NIH/3T3) cells. The results obtained were expressed in terms of cell viability. The experimental set-up and detailed cytotoxicity diagrams have been included in the ESI[†] (Fig. S6). The analyses revealed that QCDs and also the prepared hybrids did not exhibit any viability changes at the concentration needed for fluorescence cell imaging ($\sim 100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Another important factor associated with the implementation of these systems in real diagnostic/therapeutic applications is their ability to cross the cell's nucleolemma and enter the nucleus, where they can label/interact with the genomic material (DNA). Up to now, there is no report describing this applicability for any type of CDs. Transport of QCDs inside the nucleus is strongly dictated by both the particle size and surface chemistry of CDs. These factors also influence the escape of

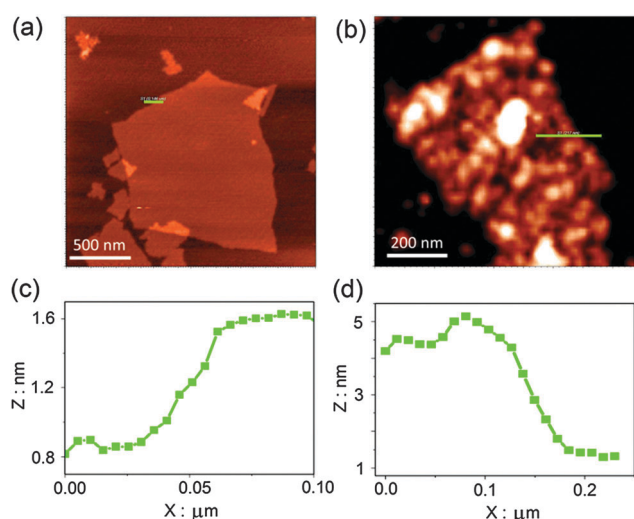


Fig. 2 Semi-contact topographic AFM images of (a) GO and the self-assembled hybrid (b) GO500QCD500 deposited on mica showing the corresponding height profiles (green line, *z* vs. *x*, panel (c) for GO and panel (d) for GO500QCD500).

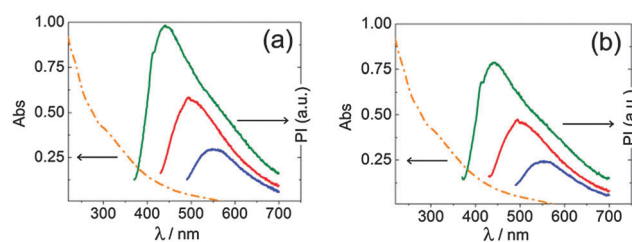


Fig. 3 The UV/Vis absorption (orange line) and excitation wavelength dependent emission spectra in water of (a) GO250QCD500 and (b) GO500QCD500 hybrids, corresponding to emission for excitations @ 360 nm (green line), 420 nm (red line), and 480 nm (blue line).

CDs from their entrapment in endosome/lysosome domains and initiate their interaction with the nuclear pore complexes. Usually, positively charged nanosystems (such as QCDs and potentially GO-QCD) more easily undergo cell internalization, because the process of endocytosis is favoured and driven by electrostatic interactions with negatively charged components of the lipid membrane. The nuclear pore complexes have dimensions in the range of 20–50 nm,¹³ and this feature represents an additional barrier to foreign materials crossing the nuclear membrane. Since our QCDs encoded highly positive charge on the nanoparticle surfaces and have small dimensions (few nm), it was anticipated that the crossing process and their interaction with nuclear DNA should be fast and efficient. On the other hand, the dimensions of GO sheets (several nm to μm size) prevent their cell internalization; thus, they could ultimately act as a vector for QCDs, while the total charge of the hybrid and the presence of electrostatic interactions between GO and QCDs (QCDs overloading) can provide a practical tool to achieve better modulation of the QCD localization in the cell. The ability of GO-QCD systems to efficiently intercept this phenomenon was tested against the same cell lines used for the MTT assay (NIH/3T3). In order to study such interactions between the nuclear membranes and GO500QCD500 and GO250QCD500, we employed the same concentration for the hybrids below the lowest IC₅₀ ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). The behaviour witnessed for the fluorescent quantum hybrids was then compared to that featured by pure QCDs. Fig. 4 shows the fluorescence images of NIH/3T3 cells obtained by optical microscopy after 24 h incubation in the presence of pure QCDs (Fig. 4a and Fig. S7, ESI[†]), GO250QCD500 (Fig. 4b) and GO500QCD500 (Fig. 4c). As anticipated, when pure QCDs were employed, a fast endocytosis of QCDs occurred, followed by an efficient crossing of the nucleolemma with large concentration of QCDs into the nuclei. In contrast, when GO-QCDs were used, a clear modulation in the cell labelling was registered: from combined labelling for GO250QCD500 (Fig. 4b) with localization of fluorescent probes in both nuclei and cytoplasm to nearly complete inhibition of the hybrid penetration into the cell nuclei for GO500QCD500 (Fig. 4c). The small size, positive charge of QCDs, and probably the fewer proclivities to interact with small molecules present in the cytosol can statistically allow their entrance into cell nuclei. At the present stage, we do not know the exact mechanism of the internalization. However this phenomenon appears intimately linked with (i) the robust electrostatic interactions between QCDs and GO and (ii) the subtle difference in the overall zeta-potential of the two hybrids (considerably more QCDs overloaded hybrid GO250QCD500 than GO500QCD500). Such behaviour provides the experimental ground that may ease the design of novel biocompatible quantum dot materials in which GO acts as a vector that modulates the character of the fluorescent probes, upon careful tuning of the effective hybrid size and charge.

In conclusion, we illustrated a straightforward synthetic route towards assembly of fluorescent and biocompatible hybrids made by judicious assembly of positively charged QCDs and negatively charged GO. This method simply exploits the electrostatic interactions between these two building components. In this way, the QCDs were uniformly embedded over the two-dimensional GO scaffolds without severe fluorescence

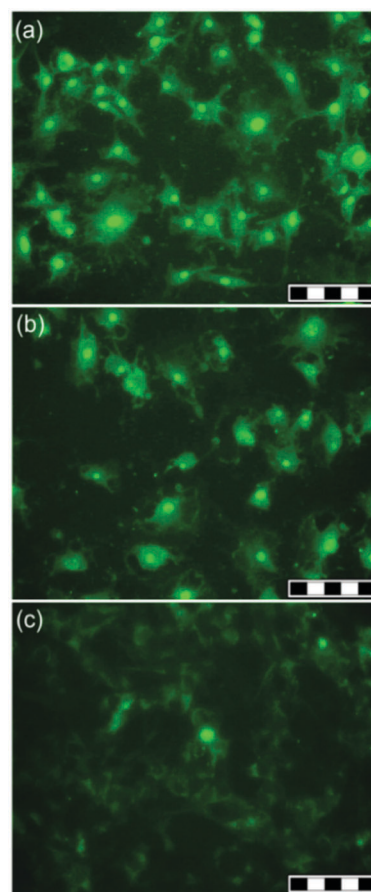


Fig. 4 Fluorescence images of mouse fibroblast NIH/3T3 cells containing (a) QCDs, (b) GO250QCD500, and (c) GO500QCD500. Concentration used: $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, time of incubation with cells: 1 day. Scale bars: 200 μm .

quenching. The cytotoxic behaviours of GO, QCDs, and GO-QCD hybrids were tested against mouse fibroblast NIH/3T3 cells, showing the low impact of the hybrids on altering the healthy cell metabolism. Furthermore, we reported, for the first time, internalization of CDs into the cell nucleus. This property of QCDs offered a unique possibility of selective cell labelling (nucleus vs. cytoplasm) thanks to electrostatic interactions between prepared GO-QCD hybrids. The phenomenon was connected to the relative QCD loading onto GO (the GO-to-QCDs ratio). We envisage a potential application of QCDs and QCD-GO hybrids as a general methodology to construct hybrid fluorescent systems for selective bio-labelling with the clear applicability also in recently described therapeutic applications of CDs.

The work was supported by the Operational Program Research and Development for Innovations – the European Regional Development Fund (CZ.1.05/2.1.00/03.0058) and by the Operational Program Education for Competitiveness – the European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/20.0155). K.K.R.D. acknowledges financial support from the Operational Program Education for Competitiveness – the European Social Fund (project CZ.1.07/2.3.00/30.0004 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic) and by the Fund of Ministry of Health IGA MZCR NT 14060-3/2013. This work was further supported Czech Grant Agency (P208/12/G016) and by

Student Projects IGA_PrF_2014023, IGA_PrF_2014017 and IGA LF 2014_003 of Palacky University.

Notes and references

- 1 (a) X. Xu, R. Ray, Y. Gu, H. J. Ploehn, L. Gearheart, K. Raker and W. A. Scrivens, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 12736; (b) S. Baker and G. Baker, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 6726.
- 2 (a) Q.-L. Zhao, Z.-L. Zhang, B.-H. Huang, J. Peng, M. Zhang and D.-W. Pang, *Chem. Commun.*, 2008, 5116; (b) K. Wang, Z. Gao, G. Gao, Y. Wo, Y. Wang, G. Shen and D. Cui, *Nanoscale Res. Lett.*, 2013, **8**, 122.
- 3 C. Ding, A. Zhu and Y. Tian, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 20.
- 4 (a) I. L. Christensen, Y.-P. Sun and P. Juzenas, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2011, **7**, 667; (b) Z. M. Markovic, B. Z. Ristic, K. M. Arslan, D. G. Klisic, L. M. Harhaji-Trajkovic, B. M. Todorovic-Markovic, D. P. Kopic, T. K. Kravic-Stevovic, S. P. Jovanovic, M. M. Milenkovic, D. D. Milivojevic, V. Z. Bumbasirevic, M. D. Dramicanin and V. S. Trajkovic, *Biomaterials*, 2012, **33**, 7084.
- 5 V. Biju, D. Muraleedharan, K. Nakayama, Y. Shinohara, T. Itoh, Y. Baba and M. Ishikawa, *Langmuir*, 2007, **23**, 10254.
- 6 P. G. Luo, F. Yang, S.-T. Yang, S. K. Sonkar, L. Yang, J. J. Broglie, Y. Liu and Y.-P. Sun, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 10791.
- 7 V. Biju, T. Itoh and M. Ishikawa, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 3031.
- 8 N. Li, X. Liang, L. Wang, Z. Li, P. Li, Y. Zhu and J. Song, *J. Nanopart. Res.*, 2012, **14**, 1177.
- 9 Y. Yang, J. Cui, M. Zheng, C. Hu, S. Tan, Y. Xiao, Q. Yang and Y. Liu, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 380.
- 10 A. B. Bourlinos, R. Zboril, J. Petr, A. Bakandritsos, M. Krysmann and E. P. Giannelis, *Chem. Mater.*, 2012, **24**, 6.
- 11 X. Qin, A. M. Asiri, K. A. Alamry, A. O. Al-Youbi and X. Sun, *Electrochim. Acta*, 2013, **95**, 260.
- 12 S. Park and R. S. Ruoff, *Nat. Nanotechnol.*, 2009, **4**, 217.
- 13 B. Fahrenkrog and U. Aebi, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, **4**, 757.



Toxicity of carbon dots – Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle



Marketa Havrdova^a, Katerina Hola^a, Josef Skopalik^b, Katerina Tomankova^c,
Martin Petr^a, Klara Cepe^a, Katerina Polakova^a, Jiri Tucek^a, Athanasios B. Bourlinos^{a,d},
Radek Zboril^{a,*}

^a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Departments of Experimental Physics and Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 1192/12, 771 46, Olomouc, Czech Republic

^b International Clinical Research Center – Center of Biomedical Engineering, St. Anne's University Hospital, Pekarska 53, Brno, 625 00, Czech Republic

^c Department of Medical Biophysics, Faculty of Medicine and Dentistry, Institute of Molecular and Translation Medicine, Palacky University, Hnevotinska 3, 775 15, Olomouc, Czech Republic

^d Physics Department, University of Ioannina, Ioannina, 45110, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 July 2015

Received in revised form

9 December 2015

Accepted 10 December 2015

Available online 13 December 2015

ABSTRACT

Carbon dots (CDs) are fluorescent nanoprobes offering a great potential in biological and medical applications due to their superior biocompatibility compared to metal chalcogenide quantum dots (e.g., CdSe). Key factors determining their cytotoxicity and cellular/intracellular tracking involve chemical nature and charge of surface functional groups. For the first time, we present a comprehensive cytotoxic study including cell cycle analysis of carbon dots differing in surface functionalization, namely pristine CDs (CDs-Pri) with negative charge due to carboxylic groups, polyethyleneglycol modified dots with neutral charge (CDs-PEG), and polyethylenimine coated dots with a positive charge (CDs-PEI). The CDs *in vitro* toxicity was studied on standard mouse fibroblasts (NIH/3T3). The results suggest that neutral CDs-PEG are the most promising for biological applications as they do not induce any abnormalities in cell morphology, intracellular trafficking, and cell cycle up to concentrations of 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Negatively charged CDs-Pri arrested the G2/M phase of the cell cycle, stimulated proliferation and led to higher oxidative stress, however they did not enter the cell nucleus. In contrast, positively charged CDs-PEI are the most cytotoxic, entering into the cell nucleus and inducing the largest changes in G0/G1 phase of cell cycle, even at concentrations of around 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Carbon dots (CDs) have been demonstrated as a new class of fluorescent nanomaterials, already competitive in many respects to conventional metal chalcogenide based quantum dots (QDs) [1–3]. Unlike conventional semiconducting QDs containing cadmium or other heavy metals, carbon quantum dots do not cause any serious health or environmental concerns [3–6]. Due to their fluorescence brightness, high photostability and good biocompatibility, CDs have been developed as fluorescent nanoprobes for optical bioimaging applications [5,7–10] and shown promise for clinical translation [11].

* Corresponding author.

E-mail address: radek.zboril@upol.cz (R. Zboril).

One of the most important properties affecting biological applications of nanomaterials is their surface functionalization [12,13] as it can determine the pathway of cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity [13]. Polyethylene glycol (PEG) is biocompatible and biodegradable polymer [6,14,15], mainly used for passivation of nanomaterials to obtain neutral surface charge which prevents nonspecific protein absorption, immunological reaction and accumulation in the reticuloendothelial system [16]. Polyethylene imine (PEI) is a cationic macromolecule commonly used in gene transfer therapy because provides high transfection efficiency [17]. PEI molecules interact with negatively charged proteins in cytoskeleton (such as actin and beta-tubulin) [18] and modify membrane integrity. From this reason, PEI is often used for surface functionalization of nanomaterials to obtain positive charge and improve permeabilization of plasma membrane. PEI destabilizes endosomal membranes [17], is able to escape from

endosomes via the so-called “proton sponge” mechanism and binds to DNA [19,20]. Hence, CDs attached to PEI may exhibit thermo- and pH-responsive properties particularly suited for stimuli drug release, as previously reported [21].

Many cytotoxicity studies have demonstrated that CDs (with or without surface passivation) exhibit very low toxicity and can be easily internalized into cells for imaging [22,23]. The cytotoxicity effects (viability, mortality, proliferation) of CDs have been tested on various types of cell line, at various concentrations and with different surface coverages. A brief overview of the parameters determining the cytotoxicity is given in Table 1. In almost all of the cytotoxicity studies performed to date, CDs have been demonstrated to cause negligible loss in cell viability at concentrations sufficient for cell labeling (approximately 10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) [24].

In this study, for the first time, we examined differences in the cell cycle, ROS generation and cytotoxicity for three most commonly used CDs differing in surface coverages. As a result, we identified principal differences in toxicity of CDs on the cellular level depending on their surface chemistry. The presented study offers a new view on the toxicity of CDs, which cannot be evaluated simply on cell viability measurements but other phenomena including proliferation, entering the cell nucleus, and changes in the cell cycle should also be taken into account. Thus, this study could help improve our understanding of the carbon dot toxic profile.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Polyethylenimine (PEI, 50% solution, Mw ~1300) was purchased from Sigma Aldrich, whereas polyethyleneglycol (α,ω -Bis-amino PEGs, Mw~2000) was bought from RAPP Polymere GmbH. A paraffin candle was used for collecting the candle soot. Nitric acid was obtained from Penta, Czech Republic. Dialysis tubing (benzoylated, 2000 kDa cut-off) was obtained from Sigma Aldrich. All the chemicals were used as received without further purification.

2.2. CDs preparation

CDs were derived from candle soot according to a standard procedure reported previously [27]. The collected candle soot (400 mg) was refluxed in 200 mL of 5 M HNO_3 for 36 h. Afterwards, the solution was centrifuged at 8000 \times g to remove the insoluble

fraction. The excess of acid was removed from the obtained solution of CDs using a rotary evaporator. The pH of the concentrated solution was neutralized using NaOH and then the solution was dialyzed (2 kDa cut-off membrane) against deionized water for 5 days. The prepared CDs were passed through a 200 nm Millipore filter and labeled CDs-Pri. Surface coverage of the prepared CDs with PEG2000N and PEI1200 was reproduced according to the literature [28]. Typically, 100 mg of polymer was mixed with 20 ml of CDs (concentration of 1 mg mL^{-1}) and the mixture was refluxed in the water under atmospheric conditions for 3 days. The resulting solution was dialyzed against water (2 kDa cut-off) to remove unattached polymer and then passed through a 200 nm Millipore filter to remove possible agglomerates and microorganism contamination. The latter CDs were labeled as CDs-PEI and CDs-PEG. The amount of polymer conjugated to the particles was calculated as a difference between the total solid mass (CDs + polymer) determined after drying the sample at microbalances in mass spectrometer and CDs mass (without polymer) determined from absorption of the solution at 280 nm (the details are given in Supplementary Information).

2.3. Material characterization

Fluorescence spectra of the CDs were recorded using QuantaMaster 40 and LaserStrobe spectrofluorometers (PTI, USA). High resolution–transmission electron microscopy (HR-TEM) images were obtained using a FEI Titan electron microscope operating at 80 kV. The size distribution (the histogram) was obtained from HR-TEM images by collecting 250 diameter counts by the ImageJ software. XPS measurements were carried out with a PHI VersaProbe II (Physical Electronics) spectrometer using an Al K_{α} source (15 kV, 50 W). All the spectra were measured in a vacuum of 1.4×10^{-7} Pa and at room temperature. XPS spectra were evaluated with the MultiPak (Ulvac - PHI, Inc.) software. All binding energy (BE) values were referenced to the C1s peak at 284.80 eV. Fourier transform infrared (FT-IR) spectra were recorded on an iS5 Thermo Nicolet FT-IR spectrometer using the Smart Orbit ZnSe ATR technique. The zeta potential of CDs was determined at pH = 7 (concentration of CDs equal to 0.1 mg mL^{-1}) using a Zetasizer NanoZS instrument (Malvern, UK).

2.4. Cell cultivation

NIH/3T3 cells were purchased from American-type Culture

Table 1

Toxic doses observed for variously functionalized CDs on different types of cells.

Cell line	Type of CDs	Surface coverage	Toxic dose [mg mL^{-1}]	Ref.	
Human kidney cells 293T	Electrooxidation of graphite	Pristine	4	[25]	
Human liver hepatocellular cells HepG2	Nitric acid oxidation of carbon soot	Pristine	1	[24]	
Human primary glioblastoma cells U87	Hydrothermal treatment of spider silk	Pristine	2	[26]	
Human breast cancer cells MCF-7	Nitric acid oxidation of carbon soot	Pristine	0.2	[6]	
	Nitric acid oxidation of carbon soot	PEG1500	0.2	[6]	
	Carbonization of polymeric NPs	PEG1500	0.2	[3]	
	Carbonization of polymeric NPs	PEI	0.015	[3]	
	Carbonization of polymeric NPs	PPEI-EI	0.03*	[3]	
	Carbonization of polymeric NPs	PPEI-EI	0.08**	[12]	
	Nitric acid oxidation of carbon soot	PPEI-EI	0.8	[12]	
	Human colorectal adenocarcinoma cells HT-29	Nitric acid oxidation of carbon soot	Pristine	0.2	[6]
		Carbonization of polymeric NPs	PEG1500	0.2	[6]
		Carbonization of polymeric NPs	PEG1500	0.2	[3]
		Laser ablation	PEG1500	0.05*	[3]
		Carbonization of polymeric NPs	PPEI-EI	0.05	[3]
		Carbonization of polymeric NPs	PEI	0.015	[3]
Nitric acid oxidation of carbon nanopowder		PPEI-EI	0.8 [#]	[12]	

Notes: toxic dose = viability lower than 50%, * higher doses were not tested, # MTT did not work.

Collection (ATCC, USA) and cultivated in low glucose Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, Life Technologies) at 37 °C and under a 5% CO₂ enriched atmosphere.

2.5. MTT analysis to determine the cell viability

The viability of NIH/3T3 cells (ATCC, USA) was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma Aldrich). Cells were seeded in a 96-well plate (TPP, Biotech) at a density of 2×10^4 cells per well. After spreading (4 h) cells were treated with the CDs at a concentration of 5–400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and incubated in a fully-humidified incubator at 37 °C under a 5% CO₂ enriched atmosphere. After treatment with CDs (24 h), 20 μl of an MTT solution (concentration of 5 mg/ml) was added into the each well. After incubation (4 h), the MTT solution was gently removed and dimethylsulfoxide (100 μl) was added to dissolve formazan crystals (live cells synthesize high amounts of purple formazan crystals by reduction of MTT in mitochondria, resulting in higher absorbance values compared to dead cells). Absorbance was measured at 570 nm using an Infinite PRO M200 multiplate reader (Tecan, Austria). Survival rate was calculated from a relation of absorbance, i.e., $(A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$ and plotted as a percentage of viability. The concentration of CDs that caused 50% reduction of cell viability compared to the untreated control cells was defined as the 50% inhibitory concentration (IC50). Each tested concentration was repeated three times and all experiments were carried out in duplicate.

2.6. Reactive oxygen studies

Oxidative stress caused by CDs was investigated by using two different types of ROS analysis. Firstly, ROS production was measured in parallel to the MTT assay. NIH/3T3 cells were treated with 5–400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of CDs-Pri, CDs-PEI, and CDs-PEG and incubated for 24 h. After incubation, the growth medium (DMEM) containing CDs was removed from the plate and replaced by PBS solution (20 μl per well) containing the fluorescent ROS probe (General Oxidative Stress Indicator CM-H₂DCFDA, Life Technologies), which was pre-dissolved in DMSO (500 mmol.L⁻¹) [29]. The plate was placed in a CO₂ incubator for 20 min and the fluorescent signal was measured using an Infinite PRO M200 microplate reader (Tecan, Austria) with excitation/emission wavelength of 505/529 nm. Secondly, ROS generation was observed in a ROS kinetic study. Cultivated cells were treated with same concentration of CDs as used before but 2 μl of ROS probe was added to each well immediately after the treatment. The amount of oxygen radicals was measured every hour or 30 min during the first 4 h of a 24 h incubation. The measurements were performed three times for every concentration of CDs in two independent experiments.

2.7. Flow cytometry – cell cycle analysis

NIH/3T3 cells were seeded in 6-well plates (7×10^5 cells/well) and, after spreading (4 h), were labeled with PEG-, PEI- and pristine CDs (concentration of 50, 100, and 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Following 24 h incubation, cells were harvested by trypsin (0.25% in EDTA, Sigma Aldrich). Next, the sample was centrifuged (1000 \times g for 5 min, 4 °C), the supernatant was removed and cells were resuspended in 1 ml of PBS (0.1 M, pH = 7.4); this step was performed twice. After the last centrifugation, samples were kept on ice and 100 μl of cold PBS was added. Subsequently, cold 70% ethanol (1 ml) was added dropwise to the samples coupled with vortex shaking. Finally, samples were kept on ice for a further 30 min and then stored in a freezer (–20 °C) until measurement. Prior to the flow cytometry analysis, cells were subjected to centrifugation (1000 \times g, 5 min,

4 °C), the supernatant removed and the resulting pellet washed with 1 ml of PBS (all steps were carried out twice). Next, 20 μl of RNase solution (final concentration of 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and 10 μl of propidium iodide solution (Sigma Aldrich, P4864-10ML; final concentration of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were added to the re-suspended cells in PBS. Cells were kept for 30 min in darkness at 4 °C. Afterwards, samples were transferred to special tubes for flow cytometry analysis, which was carried out using a BD FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, U.S.A.). The experiment was performed three times; the differences are plotted as an error bars.

3. Results and discussion

3.1. Chemical, structural and microscopic characterization of CDs-Pri, CDs-PEG, and CDs-PEI

CDs derived from candle soot were chosen as a typical example of the fluorescent carbon dot family for testing cytotoxicity. They exhibit a spherical shape, good crystallinity (Fig. 1) and their toxicity is not affected by unremoved/attached precursor from the synthesis. Furthermore, this type of CDs has already been evaluated in terms of its in vivo toxicity, subacute toxicity or immunological response in mice [30,31]. A study from Gao et al. [30] also demonstrated increased production of Th1 and Tc lymphocytes in mice after injection of high doses of CDs (no surface coverage) but without any morphological change of the immune organs. Therefore, CDs derived from soot prepared by oxidative treatment in nitric acid offer a good candidate for consequent functionalization and cytotoxicity testing.

CDs derived directly from candle soot exhibited a negative surface charge (Zeta potential: –28 mV at pH = 7) and were labeled as CDs pristine (CDs-Pri). The negative charge was most likely due to the presence of carboxylic and nitro groups originating from the oxidative treatment in nitric acid. The presence of these groups was confirmed by XPS analysis (Fig. 2) and FT-IR (Supplementary Figs. S1 and S2). The surface of CDs was also modified with PEI and PEG to modulate the surface charge. The materials after modification and dialysis purification exhibited an almost neutral charge for CDs-PEG (Zeta potential: –6 mV at pH = 7) and strongly positive charge for CDs-PEI (Zeta potential: +53 mV at pH = 7).

The successful attachment of the polymers onto the surface of CDs was confirmed by XPS analysis (Fig. 2, Supplementary Fig. S1 and Supplementary Table S1). Only three dominant peaks corresponding to carbon binding energy (–285 eV), oxygen (534 eV) and nitrogen (402 eV) were apparent in the CDs XPS spectra. The XPS O/C ratio for CDs-Pri was 0.18 and the N/C ratio was 0.023. C–N bonds and O–C=O bonds were also apparent in the high-resolution C 1s spectra of CDs-Pri (Fig. 2), clearly showing the presence of carboxylic and nitric groups on the surface. After attachment of PEG onto the surface, the O/C ratio increased to 0.21 and the relative content of C–O bonds involved in the PEG structure also increased. The amount of the PEG polymer conjugated to the surface was 8% (w/w). In the case of the CDs-PEI, the amount of the bound polymer is 10% (w/w); the N/C ratio increased to 0.11. Similarly, the relative content of C–N in the high-resolution C 1s XPS spectra increased significantly. A detailed quantitative comparison of the composition of the prepared CDs according XPS is given in Supplementary Table S1. The presence of carboxyl groups on the surface of CDs-Pri was also apparent in the FT-IR spectra in the region of 1713 cm⁻¹ (C=O stretching in Fig. S2 in Supplementary Information). The CDs-PEG sample displayed significant peaks at about 2880 cm⁻¹ and 1105 cm⁻¹ corresponding to typical C–H and C–O stretching in PEG chains. CDs-PEI exhibited a significant peak at about 1660 cm⁻¹ corresponding to N–H bonding of PEI. The peaks associated with C=O bonds in the CDs-PEG and CDs-PEI spectra

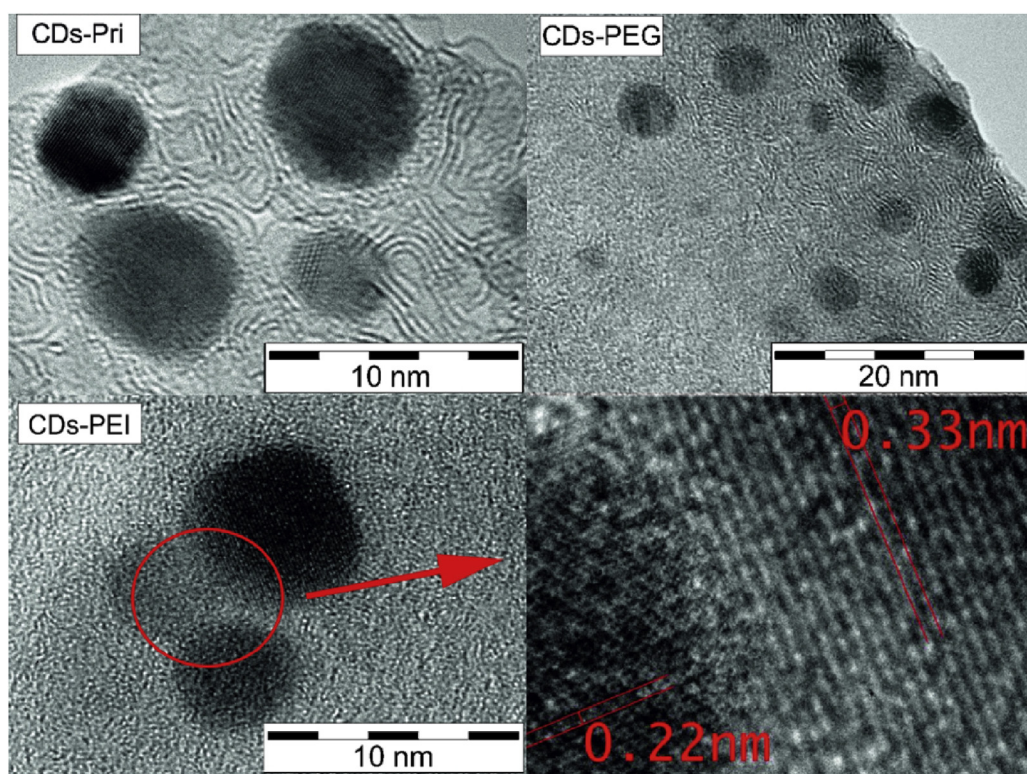


Fig. 1. HR-TEM images of prepared CDs-Pri, CDs-PEG, and CDs-PEI. The red arrow indicates a magnified image of the labeled area in the CDs-PEI sample. (A color version of this figure can be viewed online).

were also diminished because of attachment of the amino groups of the polymers to the carboxylic groups of CDs. Clearly, the XPS and FT-IR data showed successful surface modifications of pristine CDs, providing differently charged samples suitable for cytotoxicity testing.

According to HR-TEM, the size of the prepared CDs ranged from 4 to 7 nm (the main diameter was 5.5 nm according the histogram in Fig. S3 in Supplementary Information). The particles exhibited a spherical shape with good crystallinity and typical graphite lattice spacing (Fig. 1). The magnification of the red-labeled area in Fig. 1

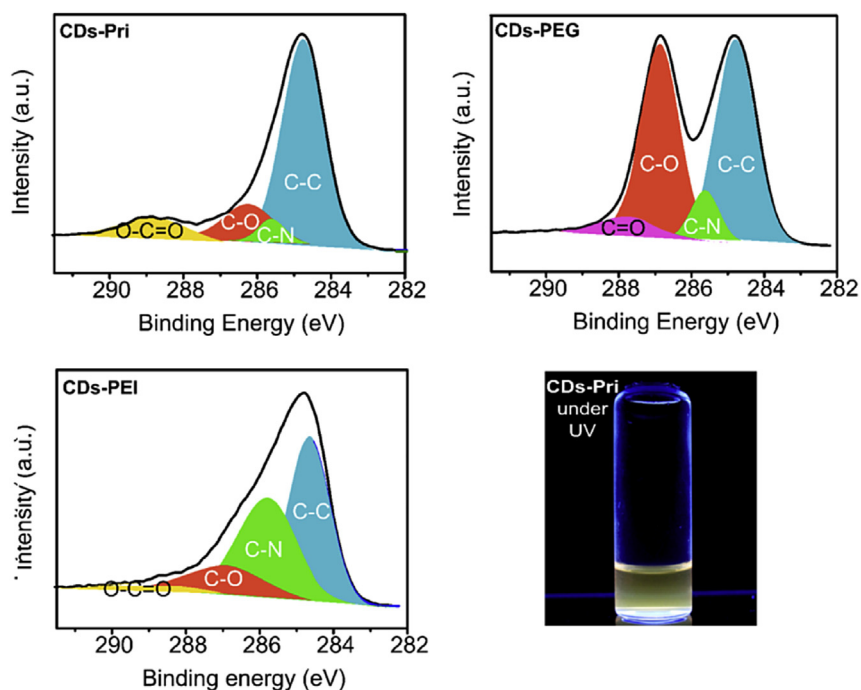


Fig. 2. High-resolution C 1s spectra of the prepared CDs and photograph of CDs-Pri obtained under a UV-lamp. (A color version of this figure can be viewed online).

shows two CDs covered with PEI (association is the effect of the polymer), which exhibited two types of lattice spacing (hexagonal pattern with 2.2 Å spacing and graphitic layers with 3.3 Å spacing), typical of graphitic carbon [32,33]. All of the prepared CDs exhibited yellow fluorescence with typical excitation wavelength dependent emission (Fig. 2). In contrast to conventional blue or green fluorescent CDs, the main emission of the prepared samples was probably red-shifted to the yellow region because of the larger size of the particles and more extensive π -conjugation and associated quantum confinement to energetic levels. The fluorescence emission spectra of CDs-PEG and CDs-PEI were broader than the spectra of CDs-Pri (Fig. S1 in Supplementary Information), most likely due to surface conjugation with the polymer chains.

3.2. Cellular uptake and morphology

Light microscopy observations of cells incubated for 24 h with various carbon dot concentrations are shown in Supplementary Fig. S4. Microscope images of NIH/3T3 cells labeled with CDs-PEG (neutral surface charge) did not indicate any morphological changes until a concentration of 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, when some of them died (Supplementary Fig. S4: 1a-d). In contrast, cells treated with CDs-PEI (positive surface charge) showed the first signs of toxicity already at a concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the toxic effect increased with increasing concentration. Indeed, at high concentrations of CDs-PEI (200–400 $\mu\text{g mL}^{-1}$), large vesicles were observed in the cytosol (see white arrow in Fig. 3b). In addition, owing to their positive charge, CDs-PEI entered the nucleus (Fig. 3b) at concentrations above 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, similar to the behavior we reported previously for quaternized CDs [34,35]. The cells labeled with CDs-Pri (negative surface charge) showed a common morphology when the concentration was lower than 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

The first indications of morphological abnormalities were observed at concentrations over 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 3c, Fig. S4: 3c in Supplementary Information), whereupon cells started to change their shape. Uncharged CDs-PEG did not cause morphology changes and did not enter the nucleus even at high concentrations of up to 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

It should be mentioned that many different types of nano-materials are known to affect cellular morphology [36,37]. Some studies have suggested that ROS formation disrupts the actin cytoskeleton and changes the cell elastic modulus [38], both of which are important for the shape of cells. The cytoskeleton also determines endocytic uptake and is involved in many intracellular signaling pathways [39]. Our results show that the cellular morphology was affected most by the positively charged CDs-PEI and less so by the negatively charged CDs-Pri. In contrast, CDs-PEG did not cause any morphological changes. Moreover, we did not detect reduced uptake of these particles with increasing concentration (Fig. S5 in Supplementary Information). CDs-PEG were probably gradually taken up by cells. Conversely, charged CDs would strongly interact with the cellular membrane via electrostatic interactions, dramatically affecting their uptake.

3.3. Viability of cells and ROS analysis after 24 h' uptake

The cytotoxicity of the prepared CDs was tested on NIH/3T3 fibroblasts by colorimetric MTT assay. Cells were treated with concentrations of 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, and 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for each sample (CDs-PEG, CDs-Pri, CDs-PEI). For comparison, cells were also labeled with free polymers (PEG, PEI) in concentrations corresponding to the amount of conjugated polymer in each individual dose of CDs-PEG (8% of PEG bound to the surface) and CDs-PEI (10% of PEI). Therefore, the used concentrations were 0.4, 0.8, 2, 4, 8, 16,

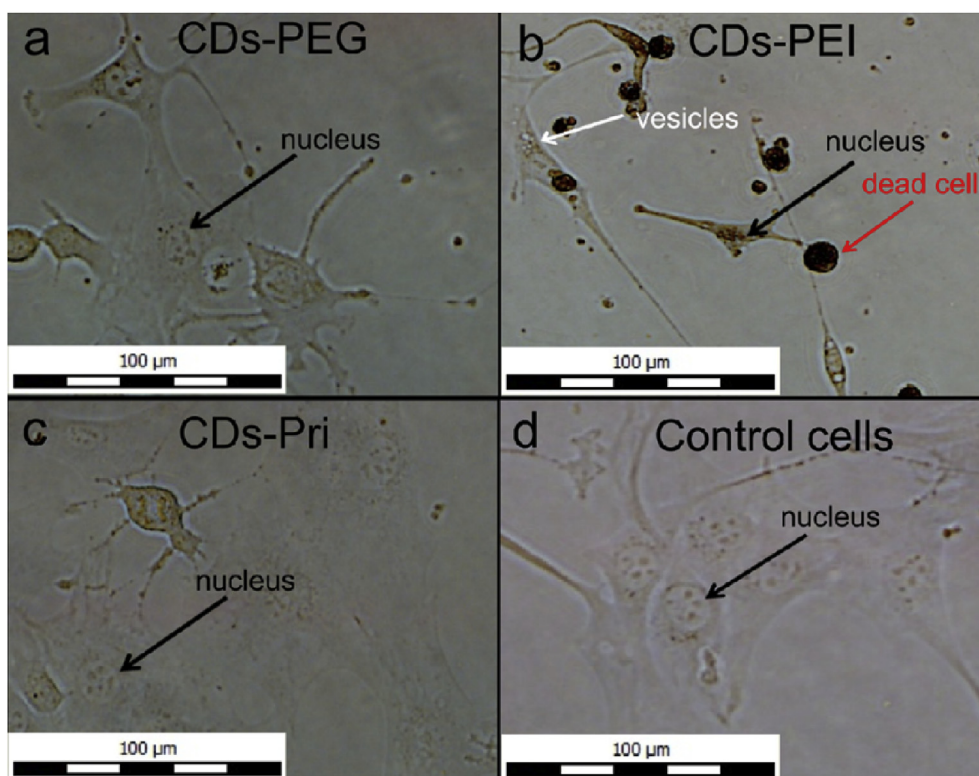


Fig. 3. Morphology of cells labeled with different CDs (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in comparison to unlabeled (control) cells. CDs-PEG did not cause morphology changes and did not enter the nucleus; CDs-PEI entered the nucleus; CDs-Pri affect the cell morphology. (A color version of this figure can be viewed online).

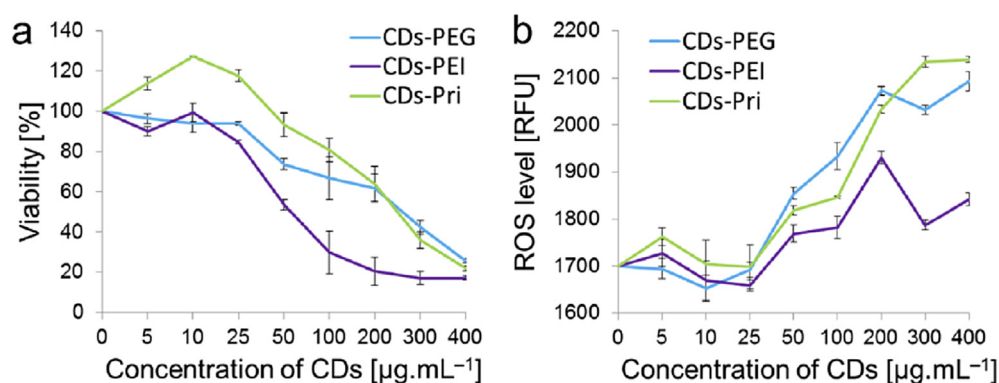


Fig. 4. (a) Viability and (b) ROS levels as a function of carbon dot concentration after 24 h of incubation; RFU – relative fluorescence units. (A color version of this figure can be viewed online).

24, and $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ for PEG and 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, and $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ for PEI.

After 24 h' labeling, the viability of the fibroblasts was measured by MTT assay and oxidative stress was characterized by ROS analysis. NIH/3T3 cells labeled with CDs-PEG carrying neutral charge showed dose-dependent toxicity (Fig. 4a) with IC50 value of $300 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cells treated with positively charged CDs-PEI exhibited a significant reduction in viability with increasing dose and an IC50 value 6 times lower (at around $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) than that for CDs-PEG (Fig. 4a). Cytotoxicity of free coating polymers was tested for comparison to see how the polymer coating affects the viability of CDs-PEG and CDs-PEI. Viability of the cells labeled with

free PEG molecules was slightly decreasing up to highest doses (Fig. S6a in Supplementary Information) but the value of IC50 was not reached in the studied concentration range; the fact evidencing for a good biocompatibility of PEG. Oppositely, cytotoxicity of free PEI molecules increased sharply and IC50 value was found at concentration of $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. S6b in Supplementary Information). This indicates that PEI contributes significantly to toxicity of CDs-PEI.

CDs-Pri stimulated proliferation at a very low concentration ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) up to $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, after which viability declined with increasing concentration. IC50 of CDs-Pri was identical to that of CDs-PEG ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$). The apparent low toxicity of CDs-Pri is

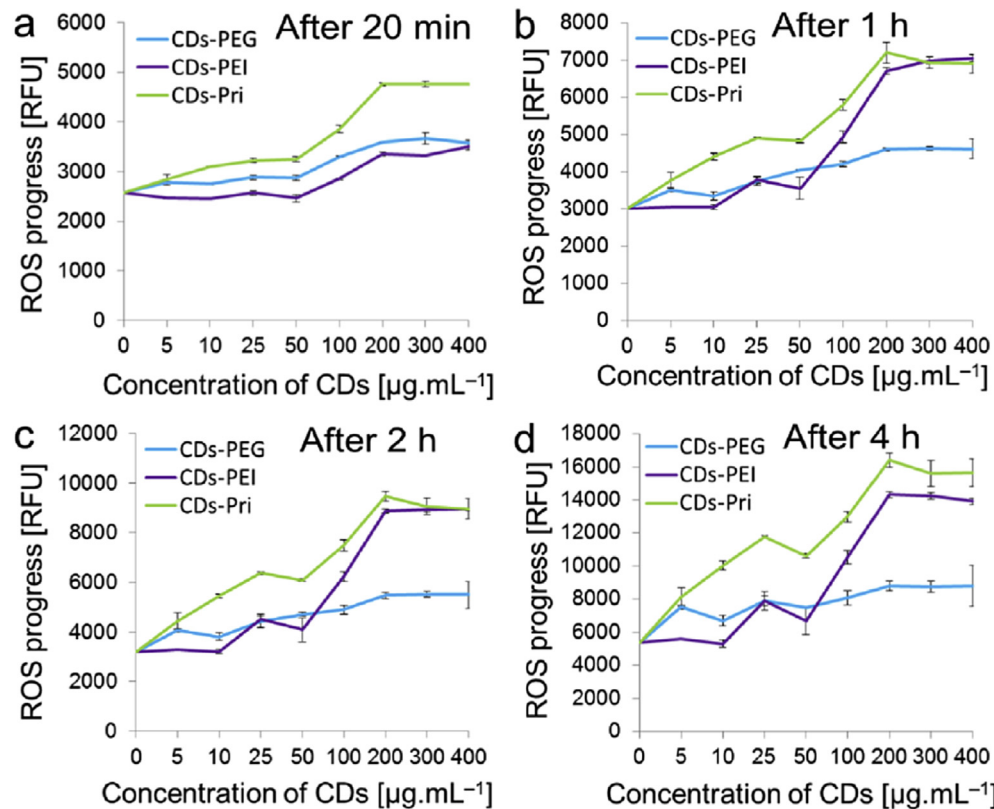


Fig. 5. ROS kinetics of first 4 h during 24 h' incubation: (a) 20 min, (b) 1 h, (c) 2 h, and (d) 4 h after treatment. ROS value of control cells is a starting point on Y-axis (Fig. 5 a–c: 3000 RFU, Fig. 5 d: 6000 RFU). Plots show ROS production as a function of carbon dot concentration. Treatment with CDs-Pri caused the strongest increase for each dose. Oxidative stress induced by CDs-PEI rose slightly up to $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, then it was comparable to CDs-Pri. ROS production in the presence of CDs-PEG increased almost linearly with increasing concentration and was similar to that of control cells. (A color version of this figure can be viewed online).

consistent with previous studies, showing CDs synthesized from carbon soot exhibit IC50 values from 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ up to 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [6,24]. Nevertheless, stimulation of proliferation caused by pristine carbon dots (occurred in a concentration range of 5–50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) has never been described before. In addition, increased amounts of ROS can lead to uncontrolled cell proliferation and cause cancer [40] or other diseases [41]. In the case of CDs-PEI, the highest toxicity and related decrease in viability was expected because of the positively charged surface and transfection properties of PEI [3,42]. However, compared to other studies of PEI coated CDs [3] our data show toxicity at quite high concentrations (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The PEG modified CDs (neutral charge) exhibited the lowest toxicity, evidently related to PEG biocompatibility [43–45].

Oxidative stress is the main cytotoxic mechanism initiated by nanomaterials [36,46] and various cell types show different antioxidative capacity [47,48]. Low ROS levels are regulated by normal cell functions. However, high ROS formation leads to oxidative damage of cells and death [38,43,47]. Thus, evaluation of ROS generation is important to accurately define the maximum ROS levels occurring after a sufficiently long time of uptake (24 h), enabling an assessment of whether the toxic effect is only transient or persistent [39]. Nevertheless, one of the most important properties of CDs is their photosensitizing activity after light irradiation [49]. This property is useful for their therapeutic applications but not for the determination of oxidative stress. For this reason, all the experiments were performed in the dark to prevent a photo-response due to light.

Oxidative stress was measured in parallel to the MTT assay (after 24 h' incubation with the samples). ROS production was slightly increased with increasing carbon dot concentration for all the samples. However, a considerable increase occurred for doses from 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ up to 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 4b). It seems that critical changes in cells were induced from concentrations as low as 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ because the viability rapidly declined (Fig. 4a) and ROS generation burgeoned (Fig. 4b). Moreover, the same effect was observed during the ROS kinetic analysis (see below). Oxidative stress decreased at concentrations higher than 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$

because this dose was close to the IC50 value (i.e., fewer live cells were present to generate radicals). The results from the viability and ROS studies were consistent as generation of ROS is associated with decreasing viability.

CDs-PEG displayed a standard viability dose–response curve relating to the magnitude of the stress factor (carbon dot concentration) and corresponding ROS generation, which increased considerably with dose. Compared to CDs-PEG and CDs-PEI, CDs-Pri induced higher oxidative stress for concentrations up to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. This surprising phenomenon probably explains why this sample stimulated proliferation at such low concentrations. However, the relation between ROS levels and cytotoxic effects is still unclear [39]. A remarkable decrease in ROS generation was registered in the CDs-PEI sample because of very low viability at high concentrations. Importantly, free PEG and PEI molecules did not evoke any high ROS progress. Both polymers incubated for 24 h caused just slight ROS increase with the dose of polymers, but no significant deviation occurred (see Fig. S7 in Supplementary Information). These data show that the contribution of the ROS generation to the complex toxicity of CDs is dominantly related to the property of the nanomaterial itself, not to the properties of coating polymers.

3.4. Kinetic development of ROS

To obtain detailed information about oxidative stress, the kinetics of ROS generation was studied. ROS production was measured every hour for the first 4 h of incubation and the time dependences were plotted separately for each concentration, together with values for the control (Fig. S8 in Supplementary Information). First indications of ROS production were registered immediately after fluorescent ROS probe activation (20 min) (Fig. 5a). After 1 h's exposure, the ROS dependence on concentration changed markedly, especially in the case of CDs-PEI (Fig. 5b). In subsequent hours, the concentration curves of CDs-PEI showed similar trends but the RFU values continued to increase strongly (Fig. 5c). After 4 h, the ROS level of CDs-PEI started

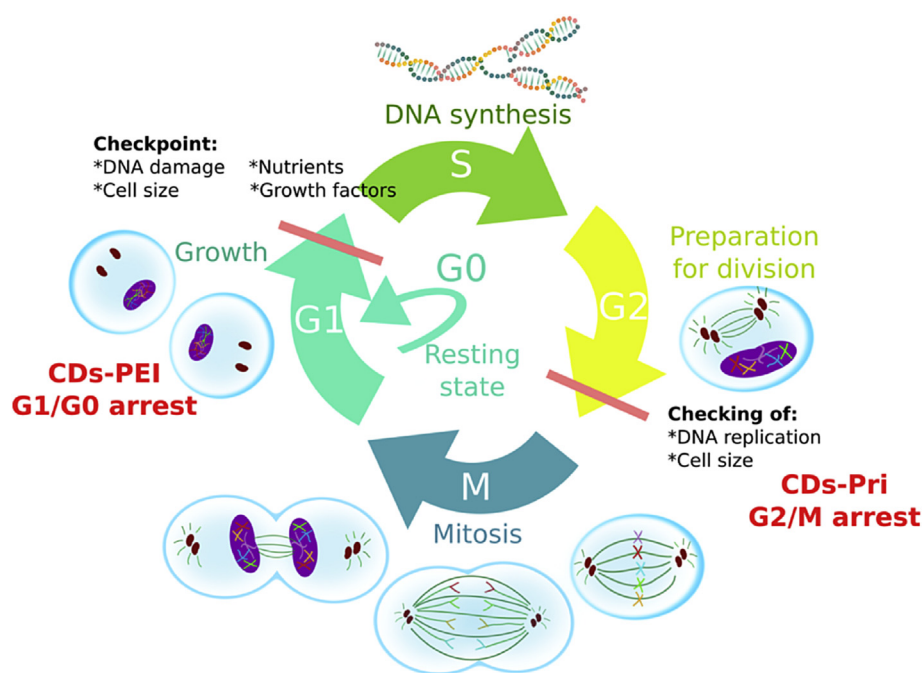


Fig. 6. Schematic representation of the cell cycle, highlighting arrest in the cycle caused by charged CDs. (A color version of this figure can be viewed online).

to decrease at toxic concentrations above $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 5d), similar to described above (Fig. 4). The most remarkable changes in ROS generation with concentration (Fig. 5b–d) were observed for the charged particles, CDs-Pri and CDs-PEI, at a concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. This concentration seems to be significant threshold, enabling entry of the charged carbon dot nanoparticles into the cells. This is probably related to the considerably faster uptake of charged nanoparticles compared to CDs-PEG (see Section 3.2). Indeed, the ROS generation of CDs-PEG increased steadily with concentration (Fig. 5). Moreover, the time dependence of ROS generation (see Fig. S8 in Supplementary Information) was similar to that of the control even for high concentrations of CDs-PEG. Oxidative stress in the cells labeled with the free PEG and PEI molecules grew differently. PEG polymer exhibited the

biocompatible behavior and the ROS trend increasing in parallel with the control untreated cells (Fig. S9a–h in Supplementary Information). PEI polymer caused higher ROS generation in all concentrations, but did not reach the ROS level produced by CDs-PEI. More specifically, free PEI induced a maximum value of fluorescent intensity of 4500 RFU (Fig. S9a–h in Supplementary Information), in contrast to CDs-PEI which evoked much higher ROS values around 12 000 RFU (Fig. S8a–h in Supplementary Information). From these results it is obvious that the main oxidative stress is dominantly caused by CDs nanoparticles, while the polymers contribute to ROS generation in much lesser extent (PEI) or even marginally (PEG).

3.5. Flow cytometry – cell cycle profile

The cell cycle profile of the fibroblast population was investigated by flow cytometric analysis to provide a comprehensive cytotoxic study of studied carbon dots with different surface chemistry. Generally, the cell cycle proceeds through an interphase

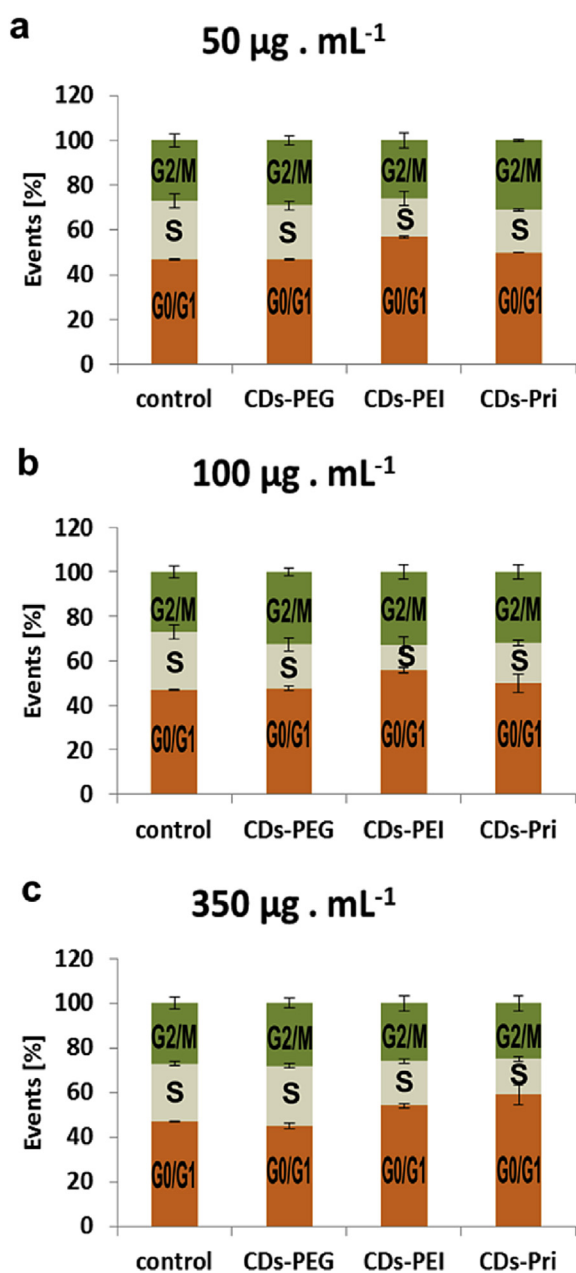


Fig. 7. Flow cytometric analysis of the cell cycle of NIH/3T3 fibroblasts treated with PEG-, PEI-modified and pristine CDs at concentrations of (a) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, and (c) $350 \mu\text{g mL}^{-1}$. (A color version of this figure can be viewed online).

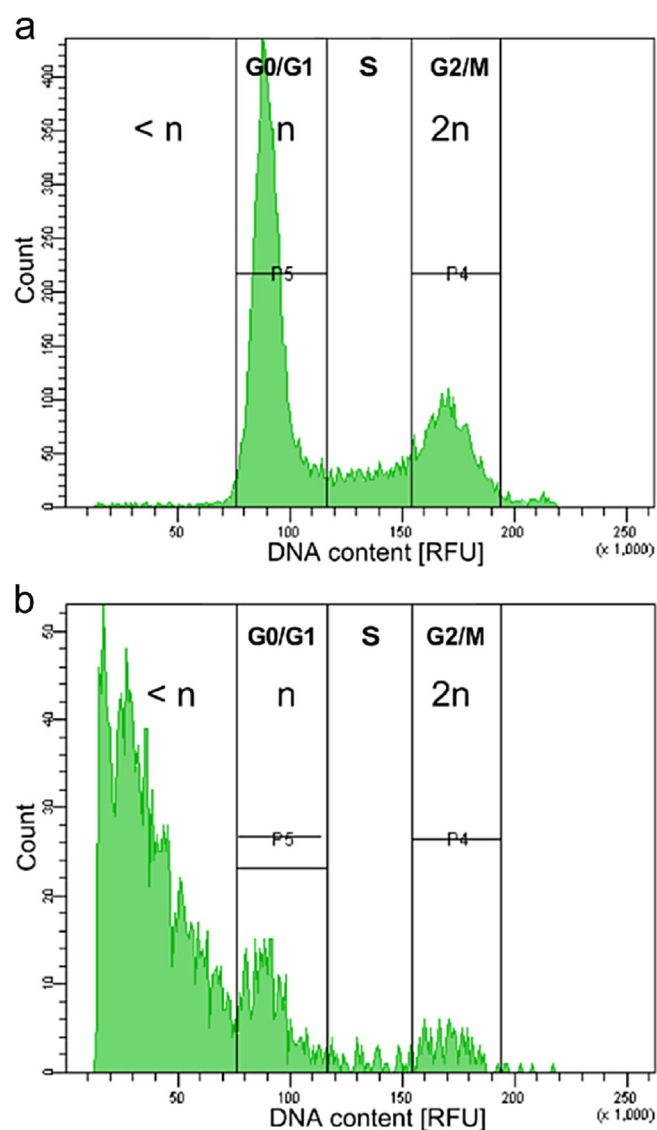


Fig. 8. Cytometric analysis – comparison of DNA content in control cells (a) versus DNA content in cells labeled with $350 \mu\text{g mL}^{-1}$ of CDs-PEI (b). (A color version of this figure can be viewed online).

(gap 1 (G1)) phase, DNA synthesis (S) phase, and gap 2 (G2) phase [40], followed by mitosis and cytoplasmic division (cytokinesis) in coordinated succession [50] as depicted in Fig. 6. When cells in the G1 phase grow to a sufficient size (double their mass), they enter the S phase [51]. If the cells do not grow, they remain in the G1 phase (referred to as the G0 phase in this case) or die by apoptosis.

In the S phase, DNA is replicated and the cell cycle continues to the final G2 phase, in which the cell prepares to begin mitosis. The boundaries between the G1 – S phase and S – G2 phase are checkpoints controlling the “quality” of DNA. If DNA is damaged or abnormally structured, the cell cycle is delayed to allow DNA repair, chromatin remodeling and other metabolic adjustment or cellular death [52]. In general, nanomaterials can cause differences in some of the cell cycle stages [53]. In our case, the number of cells and their percentage ratio in different cell cycle phases (G0/G1, S, G2/M) after treatment with CDs were quantified by flow cytometry and visualized in two-dimensional histogram, i.e., cells number versus DNA content (PI intensity).

The results showed that CDs-PEG did not cause any significant changes in the proportion of the cell cycle phases compared to untreated control cells (Fig. 7a–c). As expected, the control experiments performed on cells treated with free PEG molecules (Fig. S10 in Supplementary Information) did not show any cell cycle abnormalities.

Pristine CDs did not affect the cell cycle significantly at the lowest concentrations. However, the G2/M phase was slightly delayed at a concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (event of labeled cells was 5% higher than event of control cells, Fig. 7b). At high concentrations (above the IC50 value), G0/G1 arrest occurred and fewer cells crossed the checkpoint and entered the S phase (Fig. 7c). In this case, the cells probably entered the non-proliferation stage (the G0 phase) or died by apoptosis.

Positively charged CDs-PEI inhibited cellular proliferation via G0/G1 arrest at concentrations of 50 and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 7a, b). Additionally, at a concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, the G2/M phase became relatively more populated than the S phase (ratio between S and G2/M was 11:33, compared to 26:27 for control cells). Therefore, cells labeled with this toxic dose ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) seemed to exhibit prolonged G1 and also G2 phases, which led to cellular death. Importantly, the cell cycle profile of the cells treated with free PEI molecules (in concentration corresponding to the polymer

content in CDs-PEI) was also changed. The G0/G1 arrest occurred for PEI concentrations of 10 and $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. S10e, f in Supplementary Information). These data reflect that PEI polymer itself influences a G0/G1 phase and would be significantly responsible for G0/G1 arrest also in the case of CDs-PEI. The similar G0/G1 arrest caused by PEI molecules was demonstrated also on HepG2 cells in a study by Paul et al. [54]. This phenomenon might be explained by the different uptake mechanism of free PEI molecules, which cross the cellular membrane by diffusion unlike carbon dots, which enter into the cells by endocytosis. Subsequently, the free PEI molecules occur directly in cytoplasm, interact with nuclear membrane and bind to DNA. However, CDs-PEI trapped in endosomes/lysosomes have to escape via “proton sponge” mechanism and afterwards interact with the nucleus. This mechanism affects the cell morphology, which can lead to other cell damages or cell death.

This quantification of cell population in G0/G1, S, and G2/M phases was generated from “basic gate”, which includes cells in G1 phase with normal content of DNA (n), cells in G2/M phase with duplicated amount of DNA (2n) and also cells in the S phase, which have DNA content in the interval between n and 2n (Fig. 8a). Generally, this “basic gate” model represented around 90% of all events, i.e., all the cells and other particles detected by flow cytometry, whereas only 10% were ruined cells and small debris. However, in the case of CDs-PEI at a concentration of $350 \mu\text{g mL}^{-1}$, this basic gate model represented only around 20% of all the events, and most of the events displayed smaller than standard content of DNA (Fig. 8b). Hence, most of the cells treated with CDs-PEI ($350 \mu\text{g mL}^{-1}$) were broken and undergoing cell death. Such indications of cellular damage were also in accord with images of cells captured by light microscopy (Fig. S5: 2d in Supplementary Information). Detailed cytometric data of all the samples are included in Fig. S11 in Supplementary Information. An overview of the toxic effects caused by CDs is provided in Fig. 9.

4. Conclusions

In this study, CDs with various surface coverages were prepared and their cytotoxicity was compared to the toxicity of coating polymers (PEG, PEI), which were used for the surface functionalization of CDs. For the first time, cytotoxicity was investigated comprehensively, based on the measurements of viability, ROS

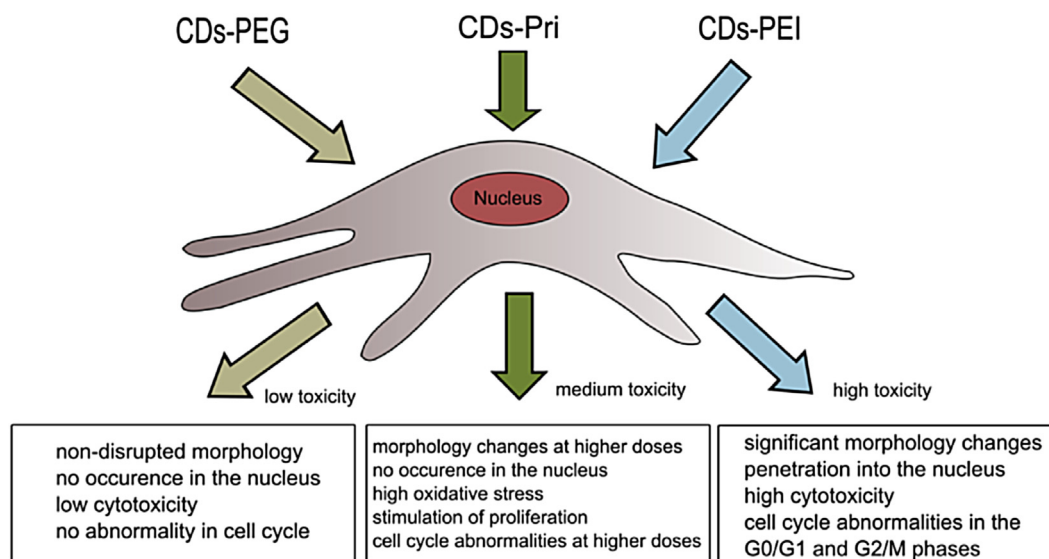


Fig. 9. Toxic effects of carbon dots with different surface chemistry. (A color version of this figure can be viewed online).

analysis and flow cytometry. As a result, we found significant differences in toxicity of CDs depending on their (negative, neutral or positive) surface charge. Positively charged CDs-PEI entered into the nucleus and induced G0/G1 and also G2/M arrest. They also caused significant changes in cell morphology and exhibited the highest toxicity, as reflected in the lowest IC50 value. We also recognized that G0/G1 arrest in the cell cycle profile of the cells treated with CDs-PEI is dominantly induced by PEI polymer onto the nanoparticle surface. Bare carbon dots (CDs-Pri) with negative surface charge (COO⁻), despite the fact that exhibited a similar IC50 as CDs-PEG (300 µg mL⁻¹), stimulated proliferation, evoked oxidative stress and induced abnormalities in the cell cycle (G2/M arrest). This behavior was pronounced even at relatively low concentrations of CDs-Pri (50 µg mL⁻¹), which would have implications for their biological applications.

Finally, CDs modified with PEG with neutral surface charge were found to be the most promising particles for cell labeling because they did not disrupt cellular morphology, toxic dose occurred at very high IC50 value (300 µg mL⁻¹) and oxidative stress increased similarly like in the control.

The results of this study provide direct insight into the toxicity effect of CDs and their most often used coatings. CDs functionalized with polymers containing the neutral surface charge like PEG seem to be the best choice for cell labeling without affecting cellular processes and, as such, would be an appropriate method for in vivo imaging. Oppositely, often used CDs stabilized with negatively charged COO⁻ groups should be considered with a great care mainly due to the induced proliferation at low concentrations and abnormalities in the cell cycle at higher concentrations.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the support by the project LO1305 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and the Operational Program “Education for Competitiveness – European Social Fund” CZ.1.07/2.3.00/20.0155 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. The Student Projects, IGA_PrF_2015_017 and IGA_PrF_2015_027 of the Palacky University in Olomouc, Czech Republic, and Project No. NS9670-4 by the Ministry of Health of the Czech Republic are also gratefully acknowledged. This work was further supported by Grant Project GAČR 15-22248S and LO1304. JS would like to also acknowledge the support by the European Regional Development Fund, Contract Grant (Project) FNUSA-ICRC, CZ.1.05/1.1.00/02.0123. The authors also thank Dr. Ondrej Kozak (Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, Czech Republic) for PL measurements.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2015.12.027>.

References

- [1] Q. Li, T.Y. Ohulchanskyy, R. Liu, K. Koynov, D. Wu, A. Best, et al., Photoluminescent carbon dots as biocompatible nanoprobes for targeting cancer cells, *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 12062–12068.
- [2] P.G. Luo, S. Sahu, S.-T. Yang, S.K. Sonkar, J. Wang, H. Wang, et al., Carbon “quantum” dots for optical bioimaging, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 2116–2117.
- [3] Y. Wang, P. Anilkumar, L. Cao, J.-H. Liu, P.G. Luo, K.N. Tackett, et al., Carbon dots of different composition and surface functionalization: cytotoxicity issues relevant to fluorescence cell imaging, *Exp. Biol. Med.* 236 (2011) 1231–1238.
- [4] S.-T. Yang, L. Cao, P.G. Luo, F. Lu, X. Wang, H. Wang, et al., Carbon dots for optical imaging in vivo, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 11308–11309.
- [5] L. Cao, X. Wang, M.J. Meziani, F. Lu, H. Wang, P.G. Luo, et al., Carbon dots for multiphoton bioimaging, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 11318–11319.
- [6] S.-T. Yang, X. Wang, H. Wang, F. Lu, P.G. Luo, L. Cao, et al., Carbon dots as nontoxic and high-performance fluorescence imaging agents, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 18110–18114.
- [7] J.C.G. Esteves da Silva, H.M.R. Gonçalves, Analytical and bioanalytical applications of carbon dots, *Rends Anal. Chem.* 30 (2011) 1327–1336.
- [8] C. Ding, A. Zhu, Y. Tian, Functional surface engineering of C-dots for fluorescent biosensing and in vivo bioimaging, *Acc. Chem. Res.* 47 (2014) 20–30.
- [9] L. Wu, M. Luderer, X. Yang, C. Swain, H. Zhang, K. Nelson, et al., Surface passivation of carbon nanoparticles with branched macromolecules influences near infrared bioimaging, *Theranostics* 3 (2013) 677–686.
- [10] K. Hola, Y. Zhang, Y. Wang, E.P. Giannelis, R. Zboril, A.L. Rogach, Carbon dots—emerging light emitters for bioimaging, cancer therapy and optoelectronics, *Nano Today* 9 (2014) 590–603.
- [11] X. Huang, F. Zhang, L. Zhu, K.Y. Choi, N. Guo, J. Guo, et al., Effect of injection routes on the tumor uptake of carbon dots, *ACS Nano* 7 (2013) 5684–5693.
- [12] J.-H. Liu, P. Anilkumar, L. Cao, X. Wang, S.-T. Yang, P.G. Luo, et al., Cytotoxicity evaluations of fluorescent carbon nanoparticles, *Nano Life* 01 (2010) 153–161.
- [13] F. Zhao, Y. Zhao, Y. Liu, X. Chang, C. Chen, Y. Zhao, Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials, *Small* 7 (2011) 1322–1337.
- [14] N. a Alcantar, E.S. Aydil, J.N. Israelachvili, Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 343–351.
- [15] K.B. Bjugstad, K. Lampe, D.S. Kern, M. Mahoney, Biocompatibility of poly(ethylene glycol)-based hydrogels in the brain: an analysis of the glial response across space and time, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 95A (2010) 79–91.
- [16] S. Nie, Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine, *Nanomedicine* 5 (2010) 523–528.
- [17] S. Moghimi, P. Symonds, J. Murray, a Hunter, G. Debska, A. Szewczyk, A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy, *Mol. Ther.* 11 (2005) 990–995.
- [18] T. Iida, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Overall interaction of cytosolic proteins with the PEI/DNA complex, *J. Control Release* 118 (2007) 364–369.
- [19] R. Kircheis, L. Wightman, E. Wagner, Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53 (2001) 341–358.
- [20] P. Pierrat, R. Wang, D. Kereselidze, M. Lux, P. Didier, A. Kichler, et al., Efficient in vitro and in vivo pulmonary delivery of nucleic acid by carbon dot-based nanocarriers, *Biomaterials* 51 (2015) 290–302.
- [21] J.-Y. Yin, H.-J. Liu, S. Jiang, Y. Chen, Y. Yao, Hyperbranched polymer functionalized carbon dots with multistimuli-responsive property, *ACS Macro Lett.* 2 (2013) 1033–1037.
- [22] N. Li, X. Liang, L. Wang, Z. Li, P. Li, Y. Zhu, et al., Biodistribution study of carbonogenic dots in cells and in vivo for optical imaging, *J. Nanopart. Res.* 14 (2012) 1177.
- [23] K. Hola, A.B. Bourlinos, O. Kozak, K. Berka, K.M. Siskova, M. Havrdova, et al., Photoluminescence effects of graphitic core size and surface functional groups in carbon dots: COO⁻ induced red-shift emission, *Carbon N. Y.* 70 (2014) 279–286.
- [24] S.C. Ray, A. Saha, N.R. Jana, R. Sarkar, Fluorescent carbon nanoparticles: synthesis, characterization, and bioimaging application, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 18546–18551.
- [25] Q.-L. Zhao, Z.-L. Zhang, B.-H. Huang, J. Peng, M. Zhang, D.-W. Pang, Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electro-oxidation of graphite, *Chem. Commun.* 41 (2008) 5116–5118.
- [26] S. Ruan, B. Zhu, H. Zhang, J. Chen, S. Shen, J. Qian, et al., A simple one-step method for preparation of fluorescent carbon nanospheres and the potential application in cell organelles imaging, *J. Colloid Interface Sci.* 422 (2014) 25–29.
- [27] H. Liu, T. Ye, C. Mao, Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 6473–6475.
- [28] Y.-P. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K.A.S. Fernando, P. Pathak, et al., Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 7756–7757.
- [29] K. Tomankova, H. Kolarova, R. Bajgar, D. Jirova, K. Kejlova, J. Mosinger, Study of the photodynamic effect on the A549 cell line by atomic force microscopy and the influence of green tea extract on the production of reactive oxygen species, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1171 (2009) 549–558.
- [30] Z. Gao, G. Shen, X. Zhao, N. Dong, P. Jia, J. Wu, et al., Carbon dots: a safe nanoscale substance for the immunologic system of mice, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 276.
- [31] K. Wang, Z. Gao, G. Gao, Y. Wo, Y. Wang, G. Shen, et al., Systematic safety evaluation on photoluminescent carbon dots, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 122.
- [32] S.H. Jin, D.H. Kim, G.H. Jun, S.H. Hong, S. Jeon, Tuning the photoluminescence of graphene quantum dots through the charge transfer effect of functional groups, *ACS Nano* 7 (2013) 1239–1245.
- [33] H. Li, X. He, Z. Kang, H. Huang, Y. Liu, J. Liu, et al., Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 4430–4434.
- [34] K.K.R. Datta, O. Kozak, V. Ranc, M. Havrdova, A.B. Bourlinos, K. Safarova, et al., Quaternized carbon dots modified graphene oxide for selective cell labelling – controlled nucleus and cytoplasm imaging, *Chem. Commun.* 50 (2014) 10782–10785.
- [35] A.B. Bourlinos, R. Zboril, J. Petr, A. Bakandritsos, M. Krysmann, E.P. Giannelis, Luminescent surface quaternized carbon dots, *Chem. Mater.* 24 (2012) 6–8.
- [36] S.J. Soenen, B.B. Manshian, U. Himmelreich, J. Demester, K. Braeckmans, S.C. De Smedt, The performance of gradient alloy quantum dots in cell

- labeling, *Biomaterials* 35 (2014) 7249–7258.
- [37] A. Magrez, S. Kasas, N. Pasquier, Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials, *Nano Lett.* 6 (2006) 1121–1125.
- [38] K. Buyukhatipoglu, A.M. Clyne, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation, *J. Biomed. Mater. Res. A* 96 (2011) 186–195.
- [39] S.J. Soenen, P. Rivera-Gil, J.-M. Montenegro, W.J. Parak, S.C. De Smedt, K. Braeckmans, Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation, *Nano Today* 6 (2011) 446–465.
- [40] E.H. Verbon, J.A. Post, J. Boonstra, The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells, *Gene* 511 (2012) 1–6.
- [41] P.G. Wells, G.P. McCallum, C.S. Chen, J.T. Henderson, C.J.J. Lee, J. Perstin, et al., Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer, *Toxicol. Sci.* 108 (2009) 4–18.
- [42] Y. Lim, S. Kim, H. Suh, J. Park, Biodegradable endosome disruptive cationic network-type polymer as a highly efficient and nontoxic gene delivery carrier, *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 952–957.
- [43] L. Ju, G. Zhang, C. Zhang, L. Sun, Y. Jiang, C. Yan, et al., Quantum dot-related genotoxicity perturbation can be attenuated by PEG encapsulation, *Mutat. Res.* 753 (2013) 54–64.
- [44] E. Peng, E.S.G. Choo, C.S.H. Tan, X. Tang, Y. Sheng, J. Xue, Multifunctional PEGylated nanoclusters for biomedical applications, *Nanoscale* 5 (2013) 5994–6005.
- [45] D. Wang, Y. Tong, Y. Li, Z. Tian, R. Cao, B. Yang, PEGylated nanodiamond for chemotherapeutic drug delivery, *Diam. Relat. Mater.* 36 (2013) 26–34.
- [46] N. Chen, Y. He, Y. Su, X. Li, Q. Huang, H. Wang, et al., The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots, *Biomaterials* 33 (2012) 1238–1244.
- [47] Y. Liu, P. Wang, Y. Wang, Z. Zhu, F. Lao, X. Liu, et al., The influence on cell cycle and cell division by various cadmium-containing quantum dots, *Small* 9 (2013) 2440–2451.
- [48] S.J. Soenen, B.B. Manshian, T. Aubert, U. Himmelreich, J. Demeester, Smedt S.C. De, et al., Cytotoxicity of cadmium-free quantum dots and their use in cell bioimaging, *Chem. Res. Toxicol.* 27 (2014) 1050–1059.
- [49] I.L. Christensen, Y.-P. Sun, P. Juzenas, Carbon dots as antioxidants and prooxidants, *J. Biomed. Nanotechnol.* 7 (2011) 667–676.
- [50] S.L. Wolfe, Introduction in Cell and Molecular Biology, first ed., Brooks Cole, 1995.
- [51] K. Collins, T. Jacks, N.P. Pavletich, The cell cycle and cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 2776–2778.
- [52] J. Lukas, C. Lukas, J. Bartek, Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time, *DNA Repair (Amst)* 3 (2004) 997–1007.
- [53] D. Cui, F. Tian, C.S. Ozkan, M. Wang, H. Gao, Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells, *Toxicol. Lett.* 155 (2005) 73–85.
- [54] A. Paul, Eun Chj, J.M. Song, Cytotoxicity mechanism of non-viral carriers polyethylenimine and poly-L-lysine using real time high-content cellular assay, *Polymer* 55 (2014) 5178–5188.