Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Nowoursynowska 159 02-776 Warszawa <u>za pośrednictwem:</u> Rady Doskonałości Naukowej pl. Defilad 1 00-901 Warszawa (Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Dr Mateusz Wierzbicki

Katedra Nanobiotechnologii Instytut Biologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Nowoursynowska 159 02-776 Warszawa

Wniosek

z dnia 21.12.2020

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie¹ nauki biologiczne.

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl pięciu, powiązanych tematycznie oryginalnych prac naukowych pod tytułem: "Modulacja wybranych elementów mikrośrodowiska komórkowego przez nanostruktury odmian alotropowych węgla, ze szczególnym uwzględnieniem efektu antynowotworowego."

Wnioskuję – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **tajnym/jawnym***²

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl , tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu. Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art. 232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html

Blen Willy

(podpis wnioskodawcy)

¹ Klasyfikacja dziedzin i dyscyplin wg. rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1818).

² * Niepotrzebne skreślić.

Załączniki:

- 1. Kopia dyplomu doktora
- 2. Dane wnioskodawcy
- 3. Autoreferat
- Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny
- 5. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia
- 6. Oświadczenia współautorów
- 7. Dwa pendrive'y z kopią wymaganych dokumentów

AUTOREFERAT

dr Mateusz Wierzbicki

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2020

Spis treści

1.	Imię i nazwisko	3
2.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne - z podaniem podmiotu	
	nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
3.	Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub	
	artystycznych	3
4.	Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy	4
5.	Zestawienie dorobku publikacyjnego	25
6.	Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną	
	realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w	
	szczególności zagranicznej	26
7.	Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących	
	naukę lub sztukę	35
8.	Nagrody i wyróżnienia	39

1. Imię i nazwisko

Mateusz Wierzbicki Nr ORCID: 0000-0003-3623-8929

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne - z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2010 - 2014 doktor nauk rolniczych

Studia doktoranckie zakończone obroną pracy doktorskiej na Wydziale Nauk o Zwierzętach SGGW.

Rozprawa doktorska "Nanocząstki alotropowych form węgla jako czynniki modulujące mechanizmy rozwoju naczyń krwionośnych" realizowana pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Sawosz Chwalibóg oraz dr hab. Marty Grodzik, prof. SGGW (promotor pomocniczy) w Katedrze Żywienia i Biotechnologii Zwierząt Wydziału Nauk o Zwierzętach.

- 2008 2010 Studia magisterskie na Wydziale Rolnictwa i Biologii, SGGW, kierunek biologia, specjalizacja: biologia mikroorganizmów. Temat pracy magisterskiej: Supresja wrażliwości na niskie pH mutanta *lcb1-100* z defektywną palmitoilotransferazą serynową. Praca wykonana pod kierunkiem dr hab. Joanny Kamińskiej w zakładzie Genetyki Instytutu Biologii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Data obrony pracy magisterskiej: 26 lipca 2010 r.
- 2005 2008 Studia licencjackie na Wydziale Rolnictwa i Biologii, SGGW, kierunek biologia. Temat pracy licencjackiej: Rola tlenku azotu w odpowiedzi roślin na stres niedoboru tlenu. Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej. Data obrony pracy licencjackiej: 02 sierpnia 2008 r.

Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

01-10-2019 – obecnie Adiunkt – Katedra Nanobiotechnologii (wcześniej Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej), Instytut Biologii, SGGW

01.10.2014 - 01-10-2019	Adiunkt – Katedra Żywienia i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Nauk o
	Zwierzętach, SGGW
01.10.2013 - 30.09.2014	Asystent – Katedra Żywienia i Gospodarki Paszowej, Wydział Nauk o
	Zwierzętach, SGGW

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

4.1 Tytuł osiągnięcia

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl pięciu, powiązanych tematycznie oryginalnych prac naukowych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports o łącznym IF 19,575 i punktacji MNiSW: 355 pkt. (115 pkt. według listy MNiSW z 2017 r. i 240 pkt. według listy MNiSW z 2019 r.) pod tytułem:

"Modulacja wybranych elementów mikrośrodowiska komórkowego przez nanostruktury odmian alotropowych węgla, ze szczególnym uwzględnieniem efektu antynowotworowego."

Lp.	Autorzy publikacji, tytuł publikacji	Czasopismo, rok wydania, tom, strona	IF	Punkty MNiSW		
P1	Zakrzewska KE, Samluk A, Wierzbicki	PloS One 2015, 10,	3,057	40 pkt.		
	M , Jaworski S, Kutwin M, Sawosz E,	e0122579		wg listy		
	Chwalibog A, Pijanowska DG, Pluta KD.			czasopism z		
	Analysis of the cytotoxicity of carbon-			2017		
	based nanoparticles, diamond and					
	graphite, in human glioblastoma and					
	hepatoma cell lines					
	Mój wkład w powstanie tej pracy poleg	ał na tworzeniu koncepo	cji badań, p	rzeprowadzeniu		
	badań toksyczności <i>in vitro</i> , współudziale w opracowaniu wyników i analizie statystycznej.					
	Mój udział w publikacji szacuję na 15%					
P2	Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M,	International Journal	4,370	35 pkt.		
	Grodzik M, Strojny B, Kurantowicz N,	of Nanomedicine		wg listy		
	Zdunek K, Chodun R, Chwalibog A,	2017, 12, 7241		czasopism z		
	Sawosz E.			2017		
	Diamond, graphite, and graphene					

4.2 Wykaz prac stanowiących osiągnięcie naukowe

	oxide nanoparticles decrease						
	migration and invasiveness in						
	glioblastoma cell lines by impairing						
	extracellular adhesion						
	Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzany						
	badań, opracowaniu metodyki, przepro	wadzeniu doświadczeń	<i>in vitro,</i> p	rzeprowadzeniu			
	analiz Western blot i obrazowania i	fluorescencyjnego, wsp	ółudziale	w opracowaniu			
	wyników i wykonaniu analizy statystyczr	nej, przygotowaniu tekst	u do druku				
	Mój udział w publikacji szacuję na 80%						
P3	Wierzbicki M, Sawosz E, Strojny B,	Scientific Reports	4,011	40 pkt.			
	Jaworski S, Grodzik M, Chwalibog A.	2018, 8, 14733		wg listy			
	NF-κB-related decrease of glioma			czasopism z			
	angiogenic potential by graphite			2017			
	nanoparticles and graphene oxide						
	nanoplatelets						
	Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył opracowania koncepcji przeprowadzonych badań,						
	opracowania metodyki, przeprowadzenia doświadczeń, analizy aktywności szlaków						
	komórkowych, analizy aktywności angiogennej, opracowania wyników i wykonaniu analizy						
	statystycznej, przygotowania tekstu do druku, korespondowania z redakcją czasopisma.						
	Mój udział w publikacji szacuję na 85%						
P4	Wierzbicki M, Jaworski S, Sawosz E,	Nanoscale Research	3,581	100 pkt.			
	Jung A, Gielerak G, Jaremek H,	Letters, 2019, 14, 1–		wg listy			
	Łojkowski W, Woźniak B, Stobiński L,	11		czasopism z			
	Małolepszy A, Chwalibog A.			2019			
	Graphene Oxide in a Composite with						
	Silver Nanoparticles Reduces the						
	Fibroblast and Endothelial Cell						
	Cytotoxicity of an Antibacterial						
	Nanoplatform						
	Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył tworzenia dotyczył opracowania koncepcji						
	przeprowadzonych badań, opracowania metodyki badań, badania odpowiedzi zapalnej z						
	wykorzystaniem membran antygenowych, udziału w przeprowadzeniu doświadczeń						

	dotyczących toksyczności nanomateriałów in vitro, badania wpływu nanomateriałów na						
	błonę kosmówkowo-omoczniową zarodka kury, analizie i opracowaniu wyników, wykonaniu						
	analizy statystycznej, przygotowania tekstu do druku, korespondowania z redakcją						
	czasopisma.						
	Mój udział w publikacji szacuję na 65%						
P5	Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M,	International Journal	4,556	140 pkt.			
	Jaworski S, Bałaban J, Sosnowska M,	of Molecular		wg listy			
	Wójcik B, Wędzińska A, Chwalibog A,	Sciences 2020, 21,		czasopism z			
	Sawosz E. Graphene Oxide Scaffold	4173.		2019			
	Stimulates Differentiation and						
	Proangiogenic Activities of Myogenic						
	Progenitor Cells						
	Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył tworzenia koncepcji przeprowadzonych badań,						
	opracowania metodyki, obrazowania time-lapse, analizy aktywności angiogennej, analizy						
	opracowania wyników i wykonania analizy statystycznej, przygotowania tekstu do druku,						
	korespondowaniu z redakcją czasopisma.						
	Mój udział w publikacji szacuję na 80%						

Oświadczenia współautorów zawierające procentowy udział oraz opis wkładu w powstanie prac znajduje się w Załączniku 6.

4.3 Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników prac stanowiących osiągnięcie naukowe4.3.1 Uzasadnienie badań

Choroby nowotworowe stanowią jeden z najpoważniejszych problemów zdrowotnych współczesnego społeczeństwa. Glejak IV stopnia jest najczęstszym nowotworem centralnego układu nerwowego (Ohgaki et al., 2004). Charakteryzuje się wysoką złośliwością, inwazyjnym fenotypem oraz brakiem efektywnej terapii. Obiecującą i intensywnie rozwijaną metodą jest zastosowanie nanomateriałów węglowych w nisko toksycznej i wysoko specyficznej terapii antynowotworowej (Wu et al., 2015). W rozwoju strategii antynowotworowych terapie celowane oraz specyficzne systemy dostarczania leków są postrzegane jako szansa na zmniejszenie toksyczności oraz zwiększenie efektywności leczenia (Charlton and Spicer, 2016). Wśród strategii antynowotworowych intensywnie badane jest zastosowanie nanomateriałów, które mogą służyć do modyfikacji fizjologii komórek poprzez regulację komórkowych szlaków sygnałowych i odpowiedzi na środowisko zewnątrzkomórkowe.

Załącznik 3

4.3.2 Wprowadzenie i cel naukowy

Nanomateriały są to materiały posiadające przynajmniej w jednej płaszczyźnie rozmiar mniejszy niż 100 nm. Materiały o takim rozmiarze posiadają zwiększoną powierzchnię w przeliczeniu na masę, zwiększoną gęstość elektronową oraz reaktywność powierzchniowych atomów. Drugim, poza rozmiarem, czynnikiem decydującym o ich właściwościach fizykochemicznych jest materiał, z którego zostały wytworzone. Wśród nanomateriałów, które mogą zdobyć zastosowanie w naukach biologicznych wyróżniającą się grupą są nanomateriały posiadające strukturę zbudowaną z atomów wegla, a w szczególności nanocząstki diamentu, grafitu oraz tlenek grafenu. Wymienione nanomateriały weglowe charakteryzują się wysoką biozgodnością materiału, jednak podobnie jak inne nanomateriały zachowują wysoką reaktywność. Ponadto nie obserwuje się rozpuszczania i tworzenia reaktywnych związków chemicznych, jak to się dzieje między innymi w przypadku nanomateriałów zbudowanych z atomów metali. W związku z tym oddziaływanie nanomateriałów węglowych na komórki i tkanki odbywa się na zasadzie bezpośredniej interakcji z błoną komórkową, interakcji z receptorami powierzchniowymi oraz białkami wewnątrzkomórkowymi po wcześniejszej endocytozie. Dodatkowo szczególnie utlenione nanomateriały weglowe, do których należą nanocząstki diamentu, grafitu oraz tlenek grafenu posiadają na powierzchni grupy funkcyjne zawierające tlen (takie jak grupy hydroksylowe, epoksydowe, karbonylowe czy karboksylowe) mogą funkcjonować jako reduktory i wpływać na równowagę oksydoredukcyjną. Wynika to z bliskiej obecności grup funkcyjnych zawierających tlen, co prowadzi do wytworzenia zdelokalizowanych orbitali π (Holt, 2010).

Nanomateriały węglowe różnią się od siebie nie tylko stopniem utlenienia, ale także morfologią oraz odmianą alotropową. Nanocząstki diamentu charakteryzują się unikalną wśród nanomateriałów węglowych hybrydyzację sp³ i najczęściej posiadają morfologię sferyczną. Podobnie jak w przypadku nanocząstek grafitu ich średnica wynosi około kilku nanometrów, w związku z tym łatwo wchodzą w interakcję z strukturami biologicznymi. Nanocząstki grafitu oraz tlenek grafenu charakteryzują się, tak jak większość nanomateriałów węglowych, hybrydyzacją sp². Tlenek grafenu w zależności od materiału wyjściowego, z którego zostanie wytworzony, posiada morfologię dużych (kilka µm) lub małych (kilka nm) płatków, złożonych z pojedynczych warstw grafitowych. Wykorzystanie tych trzech materiałów węglowych pozwala na zrozumienie odziaływania materiału na komórkę w zależności od struktury fizykochemicznej i morfologii.

Mikrośrodowisko komórkowe jest to lokalne środowisko otaczające komórkę, zawierające sygnały fizyczne i chemiczne, które mogą wpływać na fizjologię komórki (Gattazzo et al., 2014; Bogdanowicz and Liu 2017). Do elementów kształtujących mikrośrodowisko komórkowe zalicza się między innymi cytokiny i inne czynniki regulujące aktywność komórkowych szlaków sygnałowych, macierz zewnątrzkomórkową, pH, tlen, reaktywne formy tlenu, reaktywne formy azotu.

Mikrośrodowisko nowotworowe jest jednym z krytycznych elementów wpływających na przebieg choroby nowotworowej. Przyczyną niejednorodności, chemooporności i przeżutowania guzów nowotworowych są nie tylko zmiany genetyczne w komórkach nowotworowych, ale także wytwarzanie przez komórki guza nowotworowego specyficznego mikrośrodowiska nowotworowego (Senthebane et al., 2017). Mikrośrodowisko guzów nowotworowych charakteryzuję się: utrzymywaniem niskiego pH (poprzez aktywność izoformy A dehydrogenazy mleczanowej, która zamienia akumulujący się kwas pirogronowy w kwas mlekowy), cykliczną hipoksją i zaburzonym środowiskiem redoks, w którym istotną rolę odgrywają reaktywne formy tlenu i reaktywne formy azotu (Wu and Dai, 2017). Dwa główne źródła reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych to mitochondria i rodzina oksydaz NADPH (Holmström and Finkel, 2014). Jednym z najważniejszych efektorów zmian w poziomie reaktywnych form tlenu w środowisku zewnątrzkomórkowych jest komórkowy szlak sygnalizacyjny zależny od jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-кВ. W warunkach czynników prozapalnych oraz reaktywnych form tlenu białka z rodziny czynnik transkrypcyjnych NF-κB odpowiedzialnych regulują ekspresje genów, za proliferację, apoptozę, komunikację międzykomórkową i syntezę cytokin. W przypadku nowotworów aktywność szlaku sygnalizacyjnego zależnego od jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB, jego mutacje i współdziałanie z efektami mutacji w innych kluczowych genach (między innymi p53) jest jedną z przyczyn agresywnego przebiegu choroby nowotworowej (Hoesel and Schmid, 2013).

Mikrośrodowisko guza nowotworowego odpowiedzialne jest za regulację szlaków sygnałowych prowadzących do intensywnej syntezy czynników proangiogennych i prozapalnych (Dudley, 2012). W warunkach fizjologicznych procesy angiogenezy są zahamowane poprzez utrzymującą się równowagę czynników nasilających (proangiogennych) i hamujących angiogenzę (antyangiogennych). Proces angiogenezy uczestniczy między innymi w procesie embriogenezy, regeneracji zranień, złamań oraz naczyń śluzówki macicy i w czasie przebudowy tkanek. Natomiast niekontrolowana angiogeneza towarzyszy niektórym stanom chorobowym takim jak przewlekłe zapalenia oraz jest jednym z najważniejszych procesów podczas progresji guzów nowotworowych (Ferrara et al., 2003). Synteza proangiogennych i prozapalnych cytokin przez komórki nowotworowe doprowadza do silnego unaczynienia guzów nowotworowych. Glejaki rozwijają rozbudowaną sieć naczyń krwionośnych charakteryzującą się patologiami takimi jak hiperproliferacja naczyń oraz krwotoki spowodowane rozpadem wewnątrznowotworowej bariery krew-mózg. Wytworzone naczynia krwionośne są nieszczelne przez osłabienie połączeń międzykomórkowych zależnych od VEkadhedryny, nierównomiernie rozmieszczone oraz posiadają cykliczny przepływ krwi (Gilbertson and Rich, 2007). Prowadzi to do zmniejszenia skuteczności dostarczania leków do nowotworów ale także skutkuje cykliczną hipoksją, która zwiększa złośliwość nowotworu. Hipoksja prowadzi do aktywacji czynnika HIF-1 α , który aktywuje genów docelowych pozwalające na przetrwanie w warunkach

niedoboru tlenu, między innymi aktywuje szlak przemian glikolitycznych, angiogenezę oraz migracje komórek (Muz et al., 2015; Jaakkola et al., 2001). Proces cyklicznej hipoksji wynikający z występowania dysfunkcyjnej sieci naczyń krwionośnych pozwala na wydłużenie i nasilenie odpowiedzi na niedobór tlenu. Jedną ze strategii walki z nowotworami charakteryzującymi się intensywną angiogenezą jest regulacja nowotworowej sieci naczyń krwionośnych. Obecnie tworzone terapie antyangiogenne w walce z nowotworami polegają na: normalizacji sieci naczyń krwionośnych nowotworu w celu zmniejszenia hipoksji, zwiększeniu perfuzji, która umożliwia skuteczne podawanie leków antynowotworowych lub zahamowaniu rozwoju naczyń krwionośnych przez działanie dużymi dawkami leków antyangiogennych z jednoczesnym hamowaniem odpowiedzi komórek nowotworowych na zwiększenie hipoksji (De Falco, 2014; El Alaoui-Lasmaili and Faivre, 2018). Minusem tej strategii jest konieczność skutecznego zahamowania odpowiedzi komórek nowotworowych na hipoksję, bez której istnieje duża szansa na nasilanie wzrostu komórek nowotworowych (Uldry et al., 2017).

Nanomateriały mogą wpływać na odpowiedz komórek na mikrośrodowisko oraz prowadzić do zmian niektórych parametrów mikrośrodowiska, takich jak właściwości macierzy zewnątrzkomórkowej, dostępność tlenu, pH, reaktywne formy tlenu czy stężenie cytokin. Powszechnie wiadomo, że zmiany w mikrośrodowisku i macierzy zewnątrzkomórkowej otaczającej komórki mogą silnie wpływać na transdukcję sygnału w komórkach. Interakcja macierzy zewnątrzkomórkowej z nanocząstkami może przebiegać poprzez bezpośrednią interakcję nanocząstek z włóknami, oddziaływania hydrodynamiczne, oraz w przypadku cząstek naładowanych oddziaływania elektrostatyczne z naładowanymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (Stylianopoulos et al., 2010). Interakcje macierzy zewnątrzkomórkowej z nanomateriałami zależą od cech morfologicznych macierzy międzykomórkowej oraz od charakterystyki fizykochemicznej nanomateriałów i mogą być szkodliwe lub korzystne. Modyfikacje macierzy zewnątrzkomórkowej przez nanomateriały mogą zostać zastosowane w inżynierii tkankowej, stymulacji odpowiedzi immunologicznej lub regulacji angiogenezy i waskulogenezy (Engin et al., 2017; Kalluri, 2003).

Wykazano, że różne nanomateriały węglowe, między innymi fulereny, nanorurki węglowe oraz grafen wywołują stres oksydacyjny oraz zmieniają równowagę oksydoredukcyjne (Bonner, 2007; Jaworski et al., 2019; Vallyathan V and Shi X, 1997). Rozmiar nanostruktur związany jest z defektami strukturalnymi i zmienionymi właściwościami elektronowymi na powierzchni cząstek, tworząc grupy reaktywne grupy powierzchniowe, które oddziaływają z cząsteczkowym tlenem tworząc reaktywne formy tlenu poprzez reakcję Fentona (Oberdörster et al., 2005). Ponadto nanomateriały mogą wchodzić w bezpośrednie interakcje z białkami np. oksydazą NADPH, syntazą tlenku azotu i mitochondriami doprowadzając do zmian w syntezie reaktywnych form tlenu i azotu. Nanomateriały po uzyskaniu dostęp do mitochondriów lub ich bezpośredniej okolicy mogą stymulować

syntezę reaktywnych form tlenu poprzez upośledzenie łańcuchu transportu elektronów, uszkodzenie strukturalne, aktywację układów enzymatycznych i depolaryzację błony mitochondrialnej (Cao, 2018; Xia et al., 2006)

Istotną właściwością nanomateriałów węglowych ze względu na zdolność odziaływania na mikrośrodowisko komórkowe jest możliwość regulacji komórkowych szlaków sygnałowych. Oprócz oddziaływania na szlaki sygnałowe poprzez generowanie reaktywnych form tlenu nanomateriały mogą regulować szlak sygnałowe także niezależnie od stresu oksydacyjnego. Regulacja może odbywać się poprzez regulowanie stanu zapalnego, sygnalizację wapniową, stres retikulum endoplazmatycznego, mechanizmy pobierania nanomateriałów, oraz poprzez bezpośrednie odziaływanie z białkami w szczególności znajdującymi się na błonach komórkowych (Hussain et al., 2014). Wiązanie białek z nanomateriałami może upośledzać funkcje białek poprzez zmianę ich struktury. Ponadto zmiany w strukturze białka mogą prowadzić do odsłonięcia regionów aminokwasów, które normalnie nie są dostępne dla epitopów. Te nowo odsłonięte regiony mogą oddziaływać z innymi makrocząsteczkami, takimi jak receptory na powierzchni komórki, a tym samym wpływać na pobieranie nanomateriałów, biodystrybucję, aktywację receptorów i sygnalizację (Deng et al., 2011). Efektem odziaływania nanomateriałów może być więc zmiana aktywności różnych szlaków sygnałowych takich jak szlak AKT/mTOR, szlaków aktywowanych przez EGFR, VEGF czy w ścieżkach zależnych od reaktywnych form tlenu aktywność szlaków MAPK oraz NF-κB (Deng et al., 2011; Peuschel et al., 2012; Sen et al., 2002).

Na podstawie przeglądu literatury oraz badań wstępnych realizowałem doświadczenia, których celem było określenie wpływu nanomateriałów wybranych odmian alotropowych węgla (nanocząstki diamentu, nanocząstki grafitu, tlenek grafenu) na stan środowiska zewnątrzkomórkowego oraz związaną z nim fizjologię komórek. Dodatkowym celem pracy była ocena mechanizmów działania wybranych nanomateriałów oraz zweryfikowanie możliwości wykorzystania nanomateriałów odmian alotropowych węgla w terapiach antynowotworowych i innych zastosowaniach biomedycznych.

Cele szczegółowe badań:

- Ocena toksyczności oraz interakcji biologicznych wybranych nanomateriałów węglowych w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem komórek prawidłowych (HUVEC – komórki śródbłonka z żyły pępowinowej; ludzkie fibroblasty; komórki pierwotne zarodka kury) oraz nowotworowych (C3A – rak wątrobokomórkowy; U87, U118 – glejak IV stopnia) oraz błony kosmówkowoomoczniowej zarodka kury
- 2. Ocena wpływu modyfikacji środowiska wzrostu komórek przez nanocząstki węglowe na morfologię oraz fizjologię komórek z uwzględnieniem adhezji komórkowej oraz migracji w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem glejaka IV stopnia linii U87 i U118 oraz komórek progenitorowych zarodka kury.

- 3. Ocena wpływu nanomateriałów na syntezę czynników proangiogennych oraz efektywność promowania nowych naczyń krwionośnych przez komórki glejaka IV stopnia linii U87 i U118 oraz komórki progenitorowe zarodka kury.
- 4. Ocena mechanizmu działania nanomateriałów węglowych na regulację wybranych komórkowych szlaków sygnałowych komórek glejaka IV stopnia linii U87 i U118 oraz komórek progenitorowych zarodka kury.

4.3.3 Materiały i metody

Nanomateriały

W badaniach wykorzystano następujące nanomateriały: nanocząstki diamentu (ND), nanocząstki grafitu (NG), nanopłatki tlenku grafenu (nGO) płatki tlenku grafenu (GO). ND i NG zostały kupione w firmie Skyspring Nanomaterials (Houston, Stany Zjednoczone). nGO zostały wytworzone w Instytucie Technologii Materiałów Elektronicznych zmodyfikowaną metodą Hummersa z wykorzystaniem NG. GO zostało wytworzone przez Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej lub zakupione w firmie Nanopoz (Pozn, Polska). Wszystkie nanomateriały miały formę proszku, z którego przygotowano hydrokoloid w demineralizowanej wodzie o przewodności 18,3 M Ω × cm (mierzonej w temperaturze 25 °C).

Podstawowe właściwości fizykochemiczne zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie właściwości fizycznych nanomateriałów węglowych zastosowanych w badaniach.

	Nanocząstki grafitu (NG)	Nanocząstki diamentu (ND)	Nanopłatki tlenku grafenu (nGO)	Tlenek grafenu (GO)	
Morfologia	sferyczna	sferyczna	nanopłatek	płatek	
	nanocząstka	nanocząstka		P	
Wielkość	2-10 nm	2-10 nm	250 nm – 2 μm	2-8 nm	
Konfiguracja	sn ²	sn ³	sn ²	sn ²	
atomów	52	52		45	
Potencjał	40.6 mV	21.1 mV	19.4	- 31 1	
Zeta	-0,0 111	21,1 IIIV	±3,7	51.1	
Czystość	>99%	>99%	>99%	>99%	
Matada			zmodyfikowna	zmodyfikowana	
produkcij	detonacja	detonacja	metoda	metoda	
produkcji			Hummersa	Hummersa	

Modele badawcze

Linie komórkowe in vitro

Badania przeprowadzona na liniach komórek prawidłowych (HUVEC – komórki śródbłonka z żyły pępowinowej; ludzkie fibroblasty; komórki pierwotne zarodka kury) oraz nowotworowych (C3A – rak wątrobokomórkowy; U87, U118 – glejak IV stopnia). Komórki hodowano w zalecanych płynach hodowlanych, wzbogaconych surowicą bydlęcą (Thermo Fisher Scientific, USA), 1% penicylny i streptomycyny (Thermo Fisher Scientific) oraz jeżeli było to wymagane dodatkowymi suplementami. Hodowle prowadzono w inkubatorze INCOMED153 (Mammert GmbH & Co, Niemcy) w temperaturze 37^oC w powietrzu wzbogaconym 5% CO₂.

Błona kosmówkowo-omoczniowa zarodka kury

Błona kosmówkowo omoczniowa zarodka kury była stosowana do oceny toksyczności oraz angiogenezy po traktowaniu nanomateriałami. Zapłodnione jaja kur ROS 308 dezynfekowano 0,05% roztworem nadmanganianu potasu a następnie traktowano światłem UVC przez 2 min. Następnie jaja były inkubowane w warunkach standardowych (temperatura 37,0 ^oC, wilgotność 60%, obrót raz na godzinę). W 8 dniu rozwoju embrionalnego, wykonywano małe otwory w skorupce nad komorą powietrzną i umieszczano badane nanomateriały na błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury. Następnie zarodki inkubowano przez następne 48 godzin, po czym analizowano unaczynienie błony kosmówkowo-omoczniowej miejącej kontakt z nanomateriałami wykonując zdjęcia za pomocą mikroskopu stereoskopowego (SZX10, Olympus Corporation).

Metody analityczne

- Analiza potencjału Zeta nanomateriałów okreslono przy użyciu Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Wielka Brytania).
- Wielkość oraz kształt nanocząstek oraz endocytoza nanocząstek określono poprzez wizualizację z zastosowaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (JOEL Ltd., Tokio, Japonia), skaningowego mikroskopu elektronowego (FEI, Hillsbro, USA) lub mikroskopu sił atomowych (Asylum MFP-3D Bio AFM, Oxford Instruments, USA).
- Analizę spektrum Ramana nanomateriałów przeprowadzono przy użyciu spektrometru Renishaw inVia (Wotton-under-Edge, Wielka Brytania).
- Analiza toksyczności okreslono przy użyciu testów MTT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), XTT(Thermo Fisher Scientific), LDH (Thermo Fisher Scientific), BrdU (Roche Diagnostics GmbH, Germany), PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific). Dodatkowo wykonono test adhezji, analizę całkowitego poziomu reaktywnych form tlenu CellROX (Thermo Fisher Scientific), syntezę

mitochondrialnych ponadtlenków MitoSOX (Thermo Fisher Scientific), aktywności syntazy tlenku azotu (Sigma-Aldrich). Wyniki analiz odczytywano przy użyciu spektrometru płytkowego Infinite M200; Tecan Group AG, Männedorf, Germay).

- Analizę morfologii i rozwoju naczyń krwionośnych błony kosmówkowo omoczniowej przeprowadzono z użyciem mikroskopu stereoskopowego stereoskopowego SZX10 i (Olympus Corporation Tokio, Japonia).
- Analizę modelu angiogenezy komórek śródbłonka naczyń pobranych z pępowiny (HUVEC) wykonano przy analizy zdjęć mikroskopowych programem ImageJ i makrem Angiogeneis Analyser.
- Analizę fluorescencji sond przeprowadzono z użyciem mikroskopu konfokalnego FV-1000 (Olympus Corporation).
- Analiza syntezy białek przeprowadzono z zastosowaniem metody Western blot użuwając systemu Mini Protean Gel; (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany), macierzy przeciwciał (Abcam, Cambridge, United Kingdom), metody ELISA. Aktywności wiązania się podjednostek szlaku Nf-kB z promotorami DNA oznaczono z użyciem testów NF-κB p65 and p50 Transcription Factor Assay Kit (Abcam). Wynik testu odczytywano przy użyciu spektrometru płytkowego Infinite M200 (Tecan Group AG).
- Analiza ekspresji mRNA wykonano z użyciem systemu LightCycler 480 real-time PCR system (Roche Applied Science, Penzberg, Germany).
- Analiza statystyczna wykonana przy użyciu programów GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) oraz Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, USA).

4.3.4 Przedstawianie głównych wyników pracy

Ocena toksyczności wybranych nanomateriałów węglowych

Ocena toksyczności nanomateriałów pozwala na ocenę ich przydatności w badaniach biomedycznych oraz pozwala na prawidłową interpretację interakcji nanomateriałów z komórkami. Testy toksyczności i analiza interakcji nanomateriałów z komórkami przeprowadzono w **pracach P1-P7**. W najwcześniej opublikowanej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia (**P1**) porównano działanie cytotoksyczne dwóch nanocząstek węglowych, diamentu (ND) i grafitu (NG), na linie komórkowe glejaka IV stopnia U87 i raka wątrobowokomórkowego C3A. W pracy stwierdzono, że ND nie wykazują toksyczności mierzonej testem MTT, BrdU oraz przyżyciowym analizatorem xCELLigence RTCA SP cell analyzer (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA) w stosunku do badanych linii komórkowych. Nanocząstki grafitu natomiast wykazywały działanie toksyczne w stosunku do linii U87, ale nie C3A. Badania nad toksycznością ND i NG oraz dodatkowo nanopłatkami tlenku grafenu (nGO) kontynuowano w **pracach P2** oraz **P3** gdzie potwierdzono wykorzystując testy LDH oraz XTT, że nanocząstki diamentu nie wykazują działania toksycznego przy stężeniach do 50 mg/l. Przy wyższych stężeniach (100 oraz 20 mg/l) zaobserwowano zmniejszenie żywotności o około 30%.



Ryc.1 Ultrastruktura komórek glejaka U87 i U118 po traktowaniu nanocząstkami diamentu (ND), grafitu (NG) oraz nanopłatkami tlenku grafenu (nGO). Skala 1 μm. Skróty: AP, autofagosom; EV, pęcherzyk endocytarny; Mi, mitochondrium; MVB, ciało wielopęcherzykowe; N, jądro; PMF, fałd błony komórkowej. Źródło: **praca P2.**

W badaniach stwierdzono również, że inna linia komórkowa glejaka IV stopnia – U118 wykazuje niższą wrażliwość na NG i ND. Dodatkowo zbadano toksyczność nanopłatków tlenku grafenu (nGO) na linie U87 oraz U118. Wykazano obniżenie żywotności komórek linii U87 i U118 o odpowiednio 25% i 15%, oraz zwiększeniu współczynnika perforacji błon o około 60 % i 10% przy stężeniu 50 mg/l. W przypadku żadnych z analizowanych nanomateriałów nie zaobserwowano istotnych zmian w morfologii komórek. W celu sprawdzenia czy nanocząstki pobierane są przez komórki wykonano analizę preparatów w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (Ryc 1.). Komórki glejaka linii U87 oraz U118 inkubowane były z ND, NG oraz nGO o stężeniu 20 mg/l przez 24 godziny. Wykazano, że ND są najintensywniej pobierane przez komórki glejaka zarówno w przypadku linii U87 jak i U118. Ponadto ND, NG oraz nGO lokalizowane by przede wszystkim w pęcherzykach endocytarnych oraz w cytoplazmie.

W następnych badaniach analizowano wpływ pokrycia powierzchni wzrostu komórek nanomateriałami na fibroblasty, komórki śródbłonka z sznura pępowinowego (HUVEC) (praca P4) oraz mezenchymalne komórki zarodka kury wyizolowane z kończyny tylnej (PMC), serca (PHC), mózgu (PNC), oka (PEC) i naczyń krwionośnych z błony kosmówkowo-omoczniowej (PVC) (praca P5). W pracy P4 wykazano możliwość zastosowania tlenku grafenu (GO) w celu zmniejszenia toksyczności nanocząstek srebra powlekających folie poliuretanowe. Cytotoksyczność analizowano poprzez analize żywotności testem PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific) i morfologii ludzkich fibroblastów, HUVEC i błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kurzego. Folia pokryta GO nie wykazywała toksyczności, natomiast pokryta nanocząstkami srebra prowadziła do zmniejszenia żywotności fibroblastów o 50% i HUVEC o 25% oraz prowadziła do zaburzeń w rozwoju błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury. Pokrycie folii kompozytem nanocząstek srebra i GO pozwoliła na ograniczenie cytotoksyczność dzięki zwiększaniu stabilności nanocząstek srebra w folii. W pracy P5 zbadano dodatkowo wpływ toksyczności powierzchni wzrostu pokrytego GO na komórki mezenychymalne zarodka kury wyizolowane z różnych tkanek w celu porównania interakcji komórek z GO. Analiza żywotności komórek na podłożu pokrytym GO wykonana testem PrestoBlue wykazała, że GO zwiększył żywotność PMC i PEC, ale zmniejszył żywotność PVC i nie wpłyną na żywotność PNC i PHC. W celu oceny preferencji komórek do zasiedlania powierzchni pokrytej GO, wykonano na powierzchni dołka płytki sześciodołkowej dziesięć obszarów pokrytych GO o średnicy 3 mm każda. PMC, w przeciwieństwie do innych obserwowanych komórek, lokalizowały się preferencyjnie na wyspach GO. Komórki PHC, PNC, PEC i PVC nie unikały powierzchni GO, jednak nie zaobserwowano preferencji lokalizowania się na GO.

W badaniach wykazano, że badane nanomateriały węglowe różnią się między sobą toksycznością. Badane nanomateriały nie wykazywały toksyczności lub wykazywały ją jedynie przy stosowaniu wyższych stężeń. Zaobserwowano istotne różnice we wrażliwości na nanomateriały u różnych linii komórkowych lub komórek izolowanych z różnych tkanek organizmu. Badania pozwoliły

na wybranie stężeń nanomateriałów, które nie doprowadzają do znacznej toksyczności do dalszych badań oraz potwierdzają potrzebę dokładnego kontrolowania wrażliwości komórek na nanomateriały.

Ocena wpływu modyfikacji środowiska wzrostu komórek przez nanomateriały węglowe na migrację komórek.

Proces migracji komórek jest jedną z podstawowych aktywności fizjologicznych komórek. Szczególne znaczenie ma w przypadku komórek nowotworowych, ponieważ odpowiada za przebieg choroby oraz przerzutowanie. W przypadku komórek nienowotworowych proces migracji komórek jest zaangażowany między innymi w procesach rozwoju embrionalnego, odporności, regeneracji oraz angiogenezy. Migracje komórek analizowano w pracach P2 oraz P5. W pracy P2 badany był wpływ ND, NG oraz nGO na proces migracji, adhezji oraz inwazyjności dwóch linii komórkowych glejaka IV stopnia, U87 i U118. Glejak cechuję się inwazyjnym charakterem wzrostu co stanowi jeden z podstawowych problemów dotyczących leczenia tego nowotworu. Aby zbadać, czy nanocząstki mogą osłabiać zdolność komórek glejaka do przylegania do macierzy zewnątrzkomórkowej i migracji, przeprowadzony został test adhezji, dwuwymiarowy test migracji i trójwymiarowy test inwazji. Test adhezji przeprowadzono w czterech punktach czasowych (15, 30, 60 i 120 minut). Traktowanie ND, NG lub nGO zmniejszyło adhezję obu linii komórkowych glejaka - U87 miał istotnie statystycznie zmniejszoną adhezję zaczynając w 30 minucie testu, natomiast U118 już w 15 minucie testu. Dwuwymiarowy test migracji dostarcza informacji o zdolności komórek nowotworowych do poruszania się w obszarze wolnym od komórek. Traktowanie komórek ND, NG lub nGO o stężeniu 50 mg/l zmniejszyło dwuwymiarową migrację komórek glejaka U87 i U118 około dwukrotnie. Najsilniejsze hamowanie obserwowano po zastosowaniu ND. Trójwymiarowy test inwazji zastosowano do oceny, czy komórki nowotworowe mogą przechodzić przez pory pokryte kolagenem do pożywki zawierającej chemoatraktant. W obu liniach komórkowych zdolności inwazyjne były znacznie zmniejszone po traktowaniu ND, NG lub nGO w stężeniu 50 mg/l. Najsilniejsze hamowanie obserwowano po traktowaniu nGO i NG. Nie stwierdzono istotnych różnic między inwazyjnością linii komórkowych glejaka wielopostaciowego U87 i U118.

W celu zbadania przyczyn redukcji migracji komórek sprawdzono, czy nanomateriały przyłączają się do błony komórkowej oraz czy są pobierane przez komórki. Zdjęcia wykonane skaningowym mikroskopem elektronowym wykazały, że nanocząstki były obecne na powierzchni komórek. W celu ustalenia, czy badane nanocząstki zostały pobrane przez komórki glejaka, przeprowadzono dalsze badania mikroskopowe z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Badanie ultrastruktury komórek glejaka po inkubacji z ND, NG i nGO o stężeniu 20mg/l przez 24 godziny były wykazały, że nanomateriały były zlokalizowane wewnątrz komórek, wewnątrz wakuoli oraz w cytoplazmie. ND były skuteczniej pobierane przez komórki, podczas gdy nGO silnie

oddziaływał z powierzchnią komórki. Analiza cytoszkieletu aktynowego wykazała, że traktowanie nanocząstkami doprowadziło do przebudowy aktyny w komórkach, zmniejszając ilość włókien stresowych w cytoplazmie (Ryc.2) Ponadto komórki traktowane nanocząstkami i wykazywały intensywne tworzenie F-aktyny w korze komórkowej, co sugeruje potrzebę stabilizacji adhezji komórek. Nanocząstki ND, NG i NGO zmniejszają adhezję komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej wykazujący podobny efekt do macierzy zewnątrzkomórkowej o małej sztywności mechanicznej. Traktowanie nanocząstkami nie zmieniało poziomu syntezy winkuliny, N-kadheryny i pan-kadheryny w białkach. Sugeruje to, że nanocząstki zmieniają migrację komórek, utrudniając połączenie między komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową.



Ryc. 2 Zdjęcia cytoszkieletu aktynowego komórek U87 i U118 wykonane mikroskopem konforkalnym. Komórki hodowano na macierzy zewnątrzkomórkowej przez 24 godziny a następnie traktowano nanocząstkami diamentu, grafitu lub tlenku grafenu o stężeniu 20 μg / ml przez 24 godziny. F-aktynę wybarwiono falloidyną skoniugowaną z Atto 633. Skróty: C – Kontrola; NG – nanocząstki grafitu, ND – nanocząstki diamentu, nGO – nanopłatki tlenku grafenu. Źródło: **praca P2**.

W **pracy P5** analizowano wpływ GO na proces regeneracji mięśni. Fizjologiczny proces regeneracji mięśni jest dość ograniczony ze względu na małą ilość komórek satelitarnych, a także brak możliwości regeneracji i odbudowy tkanki niszowej. Celem pracy było zbadanie czy powierzchnia z GO jest w stanie stymulować proliferację miogennych komórek progenitorowych oraz funkcje endokrynologiczne komórek różnicujących, a tym samym ich aktywny udział w budowie tkanki mięśniowej. Powierzchnia z GO było łatwo skolonizowane przez miogenne komórki progenitorowe, a komórki wypreparowane z serca, mózgu, oka i naczyń krwionośnych nie omijały GO. Podłoże silnie indukowało szlaki sygnałowe miogennych komórek progenitorowych. W celu oceny preferencji

powierzchni PMC, przeanalizowano szybkość migracji komórek na kontrolnym polistyrenie i polistyrenie pokrytym GO. Analizę migracji rozpoczęto, gdy komórki dotarły do krawędzi obszaru pokrytego GO. Komórki w grupie kontrolnej migrowały na powierzchni polistyrenu podczas 18godzinnego okresu obrazowania poklatkowego prawie dwa razy wolniej niż komórki, które migrowały na GO.

W pracach wykazano, że w zależności od materiału i sposobu ekspozycji nanomateriały różnią wpływem na migrację komórek. Wyniki sugerują, że GO przytwierdzone do podłoża mogą pozytywnie oddziaływać na migracje komórek nienowotworowych. Podczas gdy w przypadku próby zablokowania procesu migracji możliwa jest blokowanie adhezji komórek nowotworowych przez nanocząstki ND, NG oraz nGO.

Ocena wpływu nanomateriałów węglowych na syntezę czynników proangiogennych oraz efektywność wzrostu naczyń krwionośnych

Synteza czynników proangiogennych jest podstawowym sposobem wpływu komórek na regulację procesu rozwoju naczyń krwionośnych, zarówno w procesach fizjologicznych takich jak procesy regeneracji praz patologicznych jak w przypadku chorób nowotworowych. W pracach P3 oraz P5 zbadano wpływ nanomateriałów węglowych na syntezę czynników proangiogennych oraz efektywność rozwoju nowych naczyń krwionośnych. W pracy P3 zastosowano model tworzenia tub przez komórek śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC) na macierzy zewnątrzkomórkowej w obecności czynników wzrostu. Wykonano współhodowlę komórek glejaka linii U87 i U118 z komórkami HUVEC. Traktowanie komórek linii U87 nanocząstkami NG lub nGO doprowadziło do zmniejszenia się tub w modelu angiogenezy HUVEC. Tego efektu nie zaobserwowano po traktowaniu komórek linii U118, które różnią się od linii U87 mutacją w genie kodującym białko p53. Liczbę połączeń i całkowitą długość tub HUVEC analizowano za pomocą oprogramowania ImageJ i makra Angiogenesis Analyzer. Aby zrozumieć zjawisko zmniejszonej aktywności angiogennej linii komórkowej glejaka U87 po traktowaniu NG i NGO, przeanalizowano syntezę 20 cytokin ważnych w procesie angiogenezy. W przypadku komórek linii U87 nanocząstki nie wpływały na poziomy najsilniejszych czynników proangiogennych (tj. VEGF-A i bFGF), ale zmniejszały syntezę interleukiny 6 i 8, GRO α (CXCL1) i białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP-1). Interleukiny 6 oraz 8 oprócz działania prozapalnego aktywują również proces angiogenezy, natomiast GROα, i MCP-1 wzmagają ten proces. Linia komórkowa U118 po traktowaniu NG i nGO wykazała tylko niewielki wzrost syntezy IL-8.

W **pracy P5** zbadano wpływ skafoldu z tlenku grafenu (GO) na syntezę czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF) przez miogennych komórki progenitorowe zarodka kury (PMC) w celu zbadania możliwości stymulacji procesów regeneracyjnych mięśni poprzecznie prążkowanych. Analiza

wykazała, że ekspresja gen kodujący białko VEGF-A wzrosła po zastosowaniu powierzchni wzrostu z GO.



Ryc 3. Zdjęcia modelu angiogenezy – tworzenia tub przez komórki śródbłonka pobranych z pępowiny (HUVEC). NG i nGO zmniejszają angiogenne właściwości komórek glejaka U87, ale nie U118. Skróty: N – Kontrola negatywna bez współhodowli z komórkami glejaka; C – Kontrola; NG – nanocząstki grafitu, nGO – nanopłatki tlenku grafenu. Źródło: **praca P3**.

W celu analizy wydzielania przez komórki białka VEGF-A oceniono stężenie białka VEGF-A w płynie hodowlanym. Stężenie VEGF-A w pożywce hodowlanej inkubowanej na powierzchni GO wzrosło w porównaniu z kontrolą. Aby potwierdzić uwalnianie VEGF-A, oceniano wpływ miogennych komórki progenitorowe na angiogenezę wykorzystując dwa modele badawcze. Pierwszym modelem była analiza formowania się tub przez komórki HUVEC po suplementowaniu płynu hodowlanego płynem z hodowli PMC oraz PMC na GO. Dodatkowo świeży płyn, niepochodzący z hodowli komórek PMC zastosowano jako kontrolę negatywną. Liczba połączeń powstałych po ekspozycji na grupę eksperymentalną pochodzącą z hodowli na GO była statystycznie wyższa niż w grupie kontrolnej i negatywnej. Dodatkowo sprawdzono właściwości proangiogenne pożywki przy użyciu implantu zawierającego naczynia krwionośne pobranego z błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury. Po 3 dniach inkubacji implant inkubowany w obecności pożywki z PMC hodowanego na GO wykazywał zmiany morfologiczne sugerujące silna migracje komórek.

Badania wykazały, że w zależności od sposobu zastosowania nanomateriałów, typu nanomateriałów i rodzajów komórek możliwa jest zmiana syntezy czynników proangiogennych, prowadzących do zmian w szybkości wzrostu naczyń krwionośnych.

Ocena mechanizmu działania nanomateriałów węglowych na regulację wybranych komórkowych szlaków sygnałowych



Ryc. 4. (A) Analiza Western blot Nkadhervny, pan-kadheryny, winkuliny, p-EGFR i EGFR. Jako kontrole ładowania użyto GAPDH. (B) Analiza Western blot frakcji białek jądrowych i cytoplazmatycznych stosowanych do oznaczania poziomu białka βkateniny. PCNA i β-tubuline zastosowano iako kontrole ładowania odpowiednio dla frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej. (C) Analiza ELISA fosforylacji AKT i mTOR w porównaniu z kontrolą. Skróty: C kontrola; ND nanocząstki diamentu; NG, nanocząstki grafitu; nGO, nanopłatki tlenku grafenu. Źródło: praca P2.

W celu zrozumienia mechanizmów zmian w fizjologii oraz morfologii komórek przeprowadzono analizę regulacji wybranych komórkowych szlaków sygnalnych. Analizę mechanizmów działania wybranych nanomateriałów węglowych przeprowadzono w **pracach P2, P3, P5.**

Aby oznaczyć konsekwencje zmniejszenia zdolności adhezji komórek glejaka linii U87 i U118 przez traktowanie ND, NG i nGO zbadano aktywność szlaku sygnałowego EGFR / AKT / mTOR i β-kateniny (**P2**). Szlak analizowano przez ocenę poziomów fosforylacji białka EGFR, AKT i mTOR. Traktowanie ND, NG, a zwłaszcza nGO obniżyło poziom p-EGFR (pTyr1173), podczas gdy nie zmieniło całkowitego poziomu białka EGFR. Nanocząstki zmniejszyły również aktywację białek podrzędnych EGFR w szlaku sygnałowym AKT i mTOR. Adhezja komórek z macierzą zewnątrzkomórkową prowadzi do niezależnej od ligandów aktywacji EGFR. Integriny indukują fosforylację receptora EGF na resztach tyrozyny 845, 1068, 1086 i 1173, ale nie na reszcie 1148, głównym miejscu fosforylacji w odpowiedzi do EGF. Traktowanie komórek glejaka ND, NG i nGO obniżyło poziom p-EGFR (pTyr1173) prawdopodobnie przez zmniejszenie adhezji komórek glejaka. Sygnalizację β-kateniny analizowano poprzez ocenę poziomu β-kateniny we frakcjach jądrowych i cytoplazmatycznych. NG i nGO

doprowadziły do spadku poziomu β-kateniny we frakcji jądrowej. ND wpływał na aktywność β-kateniny jedynie w przypadku linii komórkowej U87. β-katenina jest istotna w procesie adhezji zależnej od kadheryn a jednocześnie jest aktywatorem kanonicznego szlaku Wnt. Zmniejszenie poziomu jądrowego β-kateniny bez zmian w poziomie białka kadheryny sugeruje, że traktowanie nanocząstkami prowadzi do stabilizacji puli β-kateniny związanej z kadheryną. Powinowactwo między kadheryną i β-kateniną jest zwiększone w przypadku hamowanie receptorów kinaz tyrozynowych, w tym EGFR. NG i nGO, które zahamowały fosforylację EGFR w większym stopniu niż ND, doprowadziły również do spadku poziomu jądrowego β-kateniny.

Analiza wpływu NG i nGO na komórki glejaka była dokładniej badana w pracy P3. W celu wykazania przyczyn zmian w syntezie czynników proangiogennych i w konsekwencji zmniejszenia aktywności angiogennnej komórek glejaka linii U87 i U118 po traktowaniu NG i nGO zbadano aktywność szlaku NF-κB. Szlak NF-κB jest częstym regulatorem interleukin 6 i 8, GROα i MCP-1, których synteza uległa zmianie po traktowaniu nanocząstkami. Oceniano aktywność podjednostek p50 i p65 NF-KB. Aktywność podjednostki p65 po potraktowaniu nanocząstkami komórek U87 była znacznie zmniejszona. Ponadto wzrosła również aktywność podjednostki p50 (która po utworzeniu homodimer hamuje szlak NF-κB). Nanocząsteczki nie wpływały na podjednostkę p65 w komórkach U118, ale zmniejszały aktywność wiązania podjednostki p50. Aby zrozumieć przyczynę obniżonej sygnalizacji NFκB w komórkach glejaka U87 traktowanych NG i nGO zbadano wewnątrzkomórkowy poziom reaktywnych form tlenu (RFT) i tlenku azotu. Traktowanie komórek glejaka U87 NG i nGO zmniejszyło całkowity RFT i w większym stopniu, mitochondrialny poziom ponadtlenków a także zmniejszył się poziom tlenku azotu (ryc. 5D). Podobne wyniki uzyskano dla linii komórkowej U118, pokazując tym samym, że różnice w działaniu NG i nGO na potencjał angiogenny nie były związane z poziomem RFT lub tlenku azotu, ale z aktywnością szlaku sygnałowego NF-κB, którego aktywność była zależna od mutacji w genie kodującym p53 (linia U118) lub braku tej mutacji (linia U87).

W **pracy P5** aby wyjaśnić mechanizm zmian w fizjologii miogennych komórek progenitorowych PMC z podłożem z GO oceniono poziomy ekspresji mRNA kluczowych genów odpowiedzialnych za różnicowanie i proliferację. Podłoże z GO wpłynęło na zwiększenie ekspresji *MyoD1*, który jest genem odpowiedzialnym za różnicowanie miogennych komórek progenitorowych. Ponadto hodowla komórek PMC na GO spowodowała zmniejszenie ekspresji antygenu jądrowego komórek proliferujących (*PCNA*), zaangażowanego w proces proliferacji komórek oraz wzrost syntezy VEGF odpowiedzialnego za stymulację angiogenezy. Różnicowanie mioblastów związane jest zazwyczaj ze zmniejszoną ekspresją *PCNA* oraz aktywnością proangiogenną. Uzyskane wyniki wykazują, że GO ma działanie wzmagające różnicowanie komórek PMC.

W pracach wykazano, możliwość regulacji aktywności wybranych szlaków sygnałowych przez nanomateriały węglowe. Po raz pierwszy wykazano zależność między działaniem nanomateriałów węglowych a mutacjami w genie p53, które wpływają na reaktywność szlaku sygnałowego NF-κB.

4.3.5 Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że:

- 1. Nanomateriały węglowe charakteryzują się różną toksycznością zależną od struktury, budowy fizykochemicznej oraz komórek z którymi wchodzą w interakcje. W badaniach wykazano, że w przypadku badań z wykorzystaniem linii glejaka U87 i U118 oraz raka wątrobowokomórkowego C3A najniższą toksycznością charakteryzują się ND. NG szczególnie w wyższych stężeniach wykazuje istotna toksyczność. nGO w badaniach z wykorzystaniem linii glejaka U87 i U118 wykorzystaniem linii
- 2. GO może być wykorzystywany do zmniejszenia toksyczności nanomateriałów o większej toksyczności, jak nanocząstki srebra, co najprawdopodobniej jest związane ze zwiększeniem stabilności oraz zmniejszeniem ruchliwości nanocząstek. Podłoże z GO posiada wpływ zależny od typu komórki. W przypadku komórek izolowanych z zarodka kury GO zwiększył żywotność PMC i PEC, ale zmniejszył żywotność PVC i nie wpłynęła na żywotność PNC i PHC
- 3. ND, NG, nGO są pobierane przez komórki glejaka linii U87 oraz U118 i odkładane są przede wszystkim w pęcherzykach endocytarnych oraz cytoplazmie.
- 4. ND, NG oraz nGO ograniczają adhezję komórkową komórek glejaka linii U87 i U118, zmniejszając również migracje komórek. Modyfikacja macierzy zewnątrzkomórkowej nanocząstkami prowadzi do obniżenia inwazyjności komórek glejaka linii U87 i U118. Natomiast GO przytwierdzone do podłoża zwiększa szybkość migracji komórek nienowotworowych - PMC.
- 5. Interakcja komórek glejaka z nanocząstkami NG lub nGO może doprowadzić do zmniejszenia ich potencjału angiogennego. Traktowanie komórek linii U87 lecz nie U118 NG lub nGO doprowadziło do zmniejszenia potencjału angiogennego komórkek. Podłoże pokryte GO posiada właściwości wzmagające różnicowanie, właściwości antyproliferacyjne oraz proangiogenne w stosunku do komórek PMC.
- 6. ND, NG oraz nGO mogą bez bezpośredniego działania toksycznego wpływać na aktywność szlaków EGFR / AKT / mTOR, Wnt, szlak NF-κB w komórkach glejaka. Wpływ NG oraz nGO na komórki glejaka jest zależny od mutacji w genie kodującym białko p53, która wpływa na reaktywność szlaku sygnałowego NF-κB.
- Badane nanomateriały węglowe oddziaływają na komórki poprzez bezpośrednią interakcję z błoną komórkową, zmianę możliwości wiązania się receptorów z macierzą

zewnątrzkomórkową, interakcję z organellami, zmianę środowiska oksydoredukcyjnego oraz regulacje aktywności szlaków sygnałowych i syntezy cytokin wydzielanych do środowiska zewnątrzkomórkowego.

4.3.6 Piśmiennictwo

Bogdanowicz DR, Lu HH. Designing the stem cell microenvironment for guided connective tissue regeneration. Ann N Y Acad Sci. 2017 1410(1):3-25.

Bonner JC. Lung Fibrotic Responses to Particle Exposure. Toxicol. Pathol. 2007 35:148–153.

Cao Y. The Toxicity of Nanoparticles to Human Endothelial Cells. Adv. Exp. Med. Biol. 2018 1048:59–69.

Charlton P, Spicer J. Targeted therapy in cancer. Medicine (Baltimore) 2016 44:34–38.

De Falco S. Antiangiogenesis therapy: an update after the first decade. Korean J Intern Med. 2014, 29(1):1-11.

Deng ZJ, Liang M, Monteiro M, Toth I, Minchin RF. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. Nat. Nanotechnol. 2011 6:39–44.

Dudley AC. Tumor Endothelial Cells. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2012 2.

El Alaoui-Lasmaili K, Faivre B. Antiangiogenic therapy: Markers of response, "normalization" and resistance. Crit Rev Oncol Hematol. 2018 128:118-129.

Engin AB, Nikitovic D, Neagu M, Henrich-Noack P, Docea AO, Shtilman MI, Golokhvast K, Tsatsakis AM. Mechanistic understanding of nanoparticles' interactions with extracellular matrix: the cell and immune system. Part. Fibre Toxicol. 2017 14.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nature Med. 2003, 9:669–676.

Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. Biochim Biophys Acta. 2014 1840(8):2506-19.

Gilbertson RJ, Rich JN. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. Nat. Rev. Cancer 2007 7:733–736.

Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. Mol Cancer. 2013 2;12:86.

Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2014 15:411–421.

Holt KB. Undoped diamond nanoparticles: origins of surface redox chemistry. Phys. Chem. Chem. Phys. 2010 12:2048–2058.

Hussain S, Garantziotis S, Rodrigues-Lima F, Dupret J-M, Baeza-Squiban A, Boland S. Intracellular Signal Modulation by Nanomaterials. Adv. Exp. Med. Biol. 2014 811:111–134.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. Science 2001 292:468–472.

Jaworski S, Strojny B, Sawosz E, Wierzbicki M, Grodzik M, Kutwin M, Daniluk K, Chwalibog A. Degradation of Mitochondria and Oxidative Stress as the Main Mechanism of Toxicity of Pristine Graphene on U87 Glioblastoma Cells and Tumors and HS-5 Cells. Int. J. Mol. Sci. 2019 20, 650.

Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. Nat. Rev. Cancer 2003 3:422–433.

Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. Hypoxia 2015 3:83–92.

Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part. Fibre Toxicol. 2005 2, 8.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. Cancer Res. 2004 64:6892–6899.

Peuschel H, Sydlik U, Grether-Beck S, Felsner I, Stöckmann D, Jakob S, Kroker M, Haendeler J, Gotić M, Bieschke C, et al. Carbon nanoparticles induce ceramide- and lipid raft-dependent signalling in lung epithelial cells: a target for a preventive strategy against environmentally-induced lung inflammation. Part. Fibre Toxicol. 2012 9, 48.

Sen CK, Khanna S, Venojarvi M, Trikha P, Ellison EC, Hunt TK, Roy S. Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2002 282: H1821-1827.

Senthebane DA, Rowe A, Thomford NE, Shipanga H, Munro D, Al Mazeedi MAM, Almazyadi HAM, Kallmeyer K, Dandara C, Pepper MS, et al. The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: To Survive, Keep Your Enemies Closer. Int. J. Mol. Sci. 2017 18.

Stylianopoulos T, Poh M-Z, Insin N, Bawendi MG, Fukumura D, Munn LL, Jain RK. Diffusion of particles in the extracellular matrix: the effect of repulsive electrostatic interactions. Biophys. J. 2010 99:1342–1349.

Uldry E, Faes S, Demartines N, Dormond O. Fine-Tuning Tumor Endothelial Cells to Selectively Kill Cancer. Int. J. Mol. Sci. 2017 18.

Vallyathan V, Shi X. The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. Environ. Health Perspect. 1997 105:165–177. Wu S-Y, An SSA, Hulme J. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. Int. J. Nanomedicine 2015 10:9–24.

Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. Cancer Lett. 2017 Feb 28;387:61-68.

Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. Nano Lett. 2006 6:1794–1807.

5. Zestawienie dorobku publikacyjnego

Lp.	Rodzaj publikacji	Liczba prac	Punkty MNiSW*	Sumaryczny IF*
1	Publikacje naukowe z listy A	50	2755	147,135
2	Publikacje naukowe z listy B	8	45	-
	MNISW			
Łącznie		58	2800	147,135

Tabela 2. Sumaryczne zestawienie całkowitego dorobku publikacyjnego

*Punkty MNiSW oraz Sumaryczny IF liczony zgodnie z datą publikacji

Lp.		Dorobek publikacyjny przed			Dorobek publikacyjny po uzyskaniu		
	Rodzaj	uzyskaniem stopnia doktora		stopnia doktora			
	publikacji	Liczba	Punkty	Sumaryczny	Liczba	Punkty	Sumaryczny
		prac	MNiSW*	IF*	prac	MNiSW*	IF*
1	Publikacje	16	485	39,495	34	2270	107,64
	naukowe z listy						
	A MNISW						
2	Publikacje	3	14	-	5	31	-
	naukowe z listy						
	B MNISW						
Łącznie		19	499	39,495	39	2301	107,64

*Punkty MNiSW oraz Sumaryczny IF liczony zgodnie z datą publikacji

Informacje naukometryczne wg Web of Science (stan na dzień 27.11.2020) Liczba cytowań: 875 Liczba cytowań bez autocytowań: 724 Indeks H: 17

 Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

W okresie przed uzyskaniem stopnia doktora moim pierwszym doświadczeniem w zakresie aktywności naukowej była realizacja pracy licencjackiej na kierunku biologia na Wydziale Rolnictwa i Biologii, SGGW. Praca pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej dotyczyła roli tlenku azotu w odpowiedzi roślin na stres niedoboru tlenu. Następnie w ramach pracy magisterskiej realizowałem badania z zakresu genetyki z wykorzystaniem modelu Saccharomyces cerevisiae. Praca realizowana po pod kierunkiem dr hab. Joanny Kamińskiej w zakładzie Genetyki Instytutu Biologii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk dotyczyła supresji wrażliwości na niskie pH mutanta lcb1-100 z defektywną palmitoilotransferazą serynową. Wraz z początkiem realizacji studiów doktoranckich rozpocząłem współpracę z prof. dr hab. Ewą Sawosz Chwalibóg, która trwa nadal. W ramach pracy doktorskiej realizowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Sawosz Chwalibóg oraz dr hab. Marty Grodzik, prof. SGGW (promotor pomocniczy) w Katedrze Żywienia i Biotechnologii Zwierząt, Wydziału Nauk o Zwierzętach, SGGW badałem wpływ nanocząstek węglowych na proces rozwoju naczyń krwionośnych. Wyniki badań pozwalały stwierdzić, że nanocząstki diamentu, nanocząstki grafitu oraz nanorurki hamują rozwój nowych naczyń krwionośnych. W badaniach wykazano, że nanocząstki diamentu zmniejszają unaczynienie serca zarodka kury i obniżają syntezę białka bFGF. Wyniki badań pozwalają sądzić, że nanocząstki węgla, a szczególnie nanocząstki diamentu mogą stanowić skuteczny czynnik antyangiogenny nie powodujący znacznej toksyczności.

Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej opublikowane zostały w następujących publikacjach:

- Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M, Kutwin M, Jaworski S, Chwalibog A. Comparison of antiangiogenic properties of pristine carbon nanoparticles. Nanoscale Research Letters 2013 8:195.
- Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M. Caveolin-1 localization in chicken embryo chorioallantoic membrane treated with diamond and graphite nanoparticles. Annals of Warsaw University of Life Sciences – SGGW 2012 51:133-138.
- Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M, Hotowy A, Kutwin M, Jaworski S, Sawosz F, Chwalibog A.
 Carbon nanoparticles downregulate expression of basic fibroblast growth factor in the heart during embryogenesis. International Journal of Nanomedicine 2013 8:3427-35.

Oprócz głównego zadania badawczego w okresie studiów doktoranckich współpracowałem z prof. dr hab. Ewą Sawosz Chwalibóg i dr hab. Martą Grodzik, prof. SGGW w badaniach dotyczących wpływu wybranych nanomateriałów na glejaka IV stopnia badanego na modelach *in vitro* oraz na modelu *in ovo* guza hodowanego na powierzchni błony kosmówkowo-omoczniowej. Część badań dotyczących analizy morfologicznej była realizowana w ramach współpracy z Zakładem Histologii i Embriologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW z prof. dr hab. Pawłem Sysą, dr hab. Maciejem Szmidtem oraz dr Kają Urbańską. Dodatkowo w okresie studiów doktoranckich współpracowałem z prof. dr hab. Ewą Sawosz Chwalibóg oraz prof. dr hab. André Chwalibogiem z Uniwersytetu w Kopenhadze w badaniach dotyczących możliwości optymalizowania wzrostu i rozwoju mięśni piersiowych u zarodka kury wykorzystując nanocząstki złota. Założeniem badań był fakt, że wzbogacenie organizmu zarodka w siarczan heparanu lub taurynę, które decydują o aktywacji kluczowych w rozwoju mięśni czynników transkrypcyjnych w połączeniu z ich aktywnym transporterem przez nanocząstki złota może wpływać na zwiększenie ekspresji czynników promujących wzrost, co może zwiększyć liczbę komórek mięśniowych przed wykluciem.

W ramach współpracy opublikowane zostały następujące publikacje:

- Grodzik M, Sawosz E, Wierzbicki M, Orlowski P, Hotowy A, Niemiec T, Szmidt M, Mitura K, Chwalibog A. Nanoparticles of carbon allotropes inhibit glioblastoma multiforme angiogenesis in ovo. International Journal of Nanomedicine 2011 6:3041–3048.
- Zielinska M, Sawosz E, Grodzik M, Wierzbicki M, Gromadka M, Hotowy A, Sawosz F, Lozicki A, Chwalibog A. Effect of heparan sulfate and gold nanoparticles on muscle development during embryogenesis. International Journal of Nanomedicine 2011 6:3163-72
- Szmidt M, Urbańska K, Grodzik M, Orłowski P, Sawosz E, Wierzbicki M, Sysa P. Morphology of human glioblastoma model cultured in ovo. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2012 56(2):261–266.
- Zielinska M, Sawosz E, Grodzik M, Balcerak M, Wierzbicki M, Skomial J, Sawosz F, Chwalibog A.
 Effect of taurine and gold nanoparticles on the morphological and molecular characteristics of muscle development during chicken embryogenesis. Archives of Animal Nutrition 2012 66(1):1-13.
- Grodzik M, Sawosz F, Sawosz E, Hotowy A, Wierzbicki M, Kutwin M, Jaworski S, Chwalibog A. Nano-nutrition of chicken embryos. The effect of in ovo administration of diamond nanoparticles and l-glutamine on molecular responses in chicken embryo pectoral muscles. International Journal of Molecular Sciences 2013 14(11):23033–23044.

- Jaworski S, Sawosz E, Grodzik M, Winnicka A, Kutwin M, Wierzbicki M, Chwalibog A. In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells. International Journal of Nanomedicine 2013 8:413–420.
- Jaworski S, Sawosz E, Grodzik M, Kutwin M, Wierzbicki M, Włodyga K, Jasik A, Reichert M, Chwalibog A. Comparison of tumour morphology and structure from U87 and U118 glioma cells cultured on chicken embryo chorioallantoic membrane. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2013 57:593–598.

W okresie po uzyskaniu stopnia doktora współpracowałem z naukowcami z następujących jednostek naukowych:

Uniwersytet w Kopenhadze - prof. dr hab. André Chwalibog, prof. Dan Arne Klærke.

Badania we współpracy z Uniwersytetem w Kopenhadze realizowane były zarówno w Katedrze Biotechnologii i Żywienia Zwierząt, SGGW pod kierownictwem prof. Ewy Sawosz Chwalibóg jak i w Uniwersytecie w Kopenhadze w ramach trzymiesięcznego wyjazdu stażowego. Badania dotyczyły określenie toksyczności i interakcji wybranych nanomateriałów. W ramach badań we współpracy z Uniwersytetem w Kopenhadze badane były różne reakcje biologiczne na interakcję z nanocząstkami. Zasadniczą właściwością, która umożliwia szerokie zastosowanie nanocząstek w biomedycynie jest, oprócz ich małego rozmiaru, możliwość dołączenia do nich różnych substancji, w celu zastosowania jako nośnika. Nanomateriały istotnie różnią się między sobą biozgodnością, dlatego każdy materiał i każda funkcjonalizacja nanomateriału wymaga zbadania interakcji z docelowymi komórkami lub modelami biologicznymi. Badania prowadzone we współpracy z Uniwersytetem w Kopenhadze obejmowały analizę ekspresji wybranych genów komórek po inkubacji z różnymi nanomateriałami, między innymi nanocząstki srebra, miedzi, złota, nanomateriały węglowe. Badania odejmowały analizę toksyczności nanomateriałów - żywotności, proliferacji, analizę markerów śmierci komórki. Wykazano dawkozależny toksyczny efekt nanocząstek węgla oraz metali w stosunku do wybranych linii komórkowych. W ramach wyjazdu stażowego do Uniwersytetu w Kopenhadze oznaczona została także zmiana potencjału elektrycznego błony komórkowej pod wpływem nanocząstek diamentu, grafitu, grafenu, nanorurek węglowych, nanocząstek miedzi, srebra oraz żelaza. Badania zostały przeprowadzone na modelu oocytów Xenopus laevis. Ponadto zmierzona została aktywność kanałów potasowych hERG K+, Slick. Kanały te odgrywają zasadniczą rolę w regulacji potencjału błonowego komórek. Dodatkowo kanały Slick, które występują między innymi w zdrowych i zmienionych nowotworowo komórkach układu nerwowego, regulują objętość komórki zmienianej w trakcie proliferacji, migracji, transporcie jonów i wody. Kanały hERG natomiast uczestniczą w procesie repolaryzacji kardiomiocytów komorowych. Ich blokada prowadzi do wydłużenia czasu trwania

potencjału czynnościowego, co objawia się w EKG wydłużeniem odstępu Q, przez co pozwalają stwierdzić czy badana nanocząstka w organizmie nie będzie doprowadzać do niebezpiecznych zmian w działaniu serca. Doświadczenia wykazały, że nanocząstki węglowe nie wpływają na aktywność kanałów hERG, natomiast mogą zmieniać aktywność kanałów Slick. W ramach współpracy opublikowane zostały następujące publikacje:

- Bałaban J, Wierzbicki M, Zielińska-Górska M, Szczepaniak J, Sosnowska M, Daniluk K, Cysewski D, Koczoń P, Chwalibog A, Sawosz E. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. Molecules 2020 25(8):1-21.
- Daniluk K, Kutwin M, Grodzik M, Wierzbicki M, Strojny B, Szczepaniak J, Bałaban J, Sosnowska M, Chwalibog A, Sawosz E, Jaworski S. Use of selected carbon nanoparticles as melittin carriers for MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. Materials 2020 13(1):1-20.
- Zielińska-Górska M, Hotowy A, Wierzbicki M, Bałaban J, Sosnowska M, Jaworski S, Strojny B, Chwalibog A, Sawosz E. Graphene oxide nanofilm and the addition of I-glutamine can promote development of embryonic muscle cells. Journal of Nanobiotechnology 2020 18:1-17.
- Grodzik M, Szczepaniak J, Strojny B, Hotowy A, Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Soltan E, Mandat T, Lewicka A, Chwalibog A. Diamond nanoparticles downregulate expression of CycD and CycE in glioma cells. Molecules 2019 24(8):1-16.
- Kutwin M, Sawosz E, Jaworski S, Wierzbicki M, Strojny B, Grodzik M, Sosnowska M, Trzaskowski M, Chwalibog A. Nanocomplexes of graphene oxide and platinum nanoparticles against colorectal cancer Colo205, HT-29, HTC-116, SW480, liver cancer HepG2, human breast cancer MCF-7, and adenocarcinoma LNCaP and human cervical Hela B cell lines. Materials 2019 12(6):1-17.
- Sekretarska J, Szczepaniak J, Sosnowska M, Grodzik M, Kutwin M, Wierzbicki M, Jaworski S, Bałaban J, Daniluk K, Sawosz E, Chwalibog A, Strojny B. Influence of selected carbon nanostructures on the CYP2C9 enzyme of the P450 cytochrome. Materials 2019 12(24):1-14.
- Sosnowska M, Kutwin M, Jaworski S, Strojny B, Wierzbicki M, Szczepaniak J, Łojkowski M, Święszkowski W, Bałaban J, Chwalibog A, Sawosz E. Mechano-signalling, induced by fullerene C60 nanofilms, arrests the cell cycle in the G2/M phase and decreases proliferation of liver cancer cells. International Journal of Nanomedicine 2019 14:6197-6215,
- Szmidt M, Stankiewicz A, Urbańska K, Jaworski S, Kutwin M, Wierzbicki M, Grodzik M, Burzyńska B, Góra M, Chwalibog A, Sawosz E. Graphene oxide down-regulates genes of the oxidative phosphorylation complexes in a glioblastoma. BMC Molecular Biology 2019 20(1)1-9.
- Szczepaniak J, Strojny B, Sawosz E, Jaworski S, Jagiello J, Winkowska M, Szmidt M, Wierzbicki M, Sosnowska M, Balaban J, Winnicka A, Lipinska L, Witkowska-Piłaszewicz O, Grodzik M. Effects of

Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. International Journal of Molecular Sciences 2018 19(12):3939-3939.

- Hotowy A, Sawosz E, Grodzik M, Wierzbicki M, Kutwin M, Jaworski S, Chwalibog A. Development and optimization of myocardial tissue culture in ovo. Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów 2017 143:54.
- Kutwin M, Sawosz E, Jaworski S, Wierzbicki M, Strojny B, Grodzik M, Chwalibog A. Assessment of the proliferation status of glioblastoma cell and tumour tissue after nanoplatinum treatment. PLoS ONE 2017 12(5):1-14.
- Kutwin M, Sawosz E, Jaworski S, Hinzmann M, Wierzbicki M, Hotowy A, Grodzik M, Winnicka A, Chwalibog A. Investigation of platinum nanoparticle properties against U87 glioblastoma multiforme. Archives of Medical Science 2017 6:1322–1334.
- Sawosz E, Hotowy A, Bakowicz-Mitura K, Grodzik M, Wierzbicki M, Kutwin M, Jaworski S, Chwalibog A. Carbon allotropes for muscle regeneration. Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów 2017 143:49.
- Strojny B, Grodzik M, Sawosz E, Winnicka A, Kurantowicz N, Jaworski S, Kutwin M, Urbańska K, Hotowy A, Wierzbicki M, Chwalibog A. Diamond nanoparticles modify curcumin activity: in vitro studies on cancer and normal cells and in ovo studies on chicken embryo model. PLoS ONE 2016 11(10):1-18.
- Beck I, Hotowy A, Sawosz E, Grodzik M, Wierzbicki M, Kutwin M, Jaworski S, Chwalibog A. Effect of silver nanoparticles and hydroxyproline, administered in ovo, on the development of blood vessels and cartilage collagen structure in chicken embryos. Archives of Animal Nutrition 2015 69(1):57-68.
- Grodzik M, Sawosz E, Jaworski S, Wierzbicki M, Strojny B, Hotowy A, Urbańska K, Kutwin M, Włodyga K, Kurantowicz N. Badania genetyczne i personalizacja terapii w leczeniu glejaków. Przegląd Hodowlany, Polskie Towarzystwo Zootechniczne 2015 6:14-16.

<u>Wojskowy Instytut Medyczny - prof. dr hab. Hanna Jung-Hauska oraz prof. dr hab. Grzegorza</u> <u>Gielerak.</u>

Realizacja badań we współpracy z prof. dr hab. Hanna Jung-Hauską oraz prof. dr hab. Grzegorzem Gielerakiem dotyczyła wytworzenia antybakteryjnego opatrunku zawierającego nanocząstki srebra oraz tlenek grafenu. Badania miały na celu opracowanie opatrunku, dzięki któremu możliwe byłoby ograniczenie stosowania antybiotyków oraz skuteczność działania antybakteryjnego także na bakterie antybiotykooporne. Bakterie po niewłaściwej ekspozycji na antybiotyki mogą stosunkowo szybko wytworzyć różne mechanizmy oporności na podane substancje. Celem

prowadzonych badań była charakterystyka interakcji i wyjaśnienie mechanizmu toksycznego działania nanomateriałów na komórki bakterii. Badania przeprowadzono na następujących gatunkach bakterii: *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Salmonella enterica, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus mutans, Bacillus subtilis*. Wykazano, że badane nanomateriały mogą być wykorzystane w eksperymentalnych opatrunkach i wykazują toksyczność w stosunku do komórek bakteryjnych poprzez niszczenie mechanicznie błony i/lub ściany komórkowej. W ramach współpracy opublikowane zostały następujące publikacje:

- Wierzbicki M, Jaworski S, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Stobiński L, Małolepszy A, Chwalibog A. Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatform. Nanoscale Research Letters 2019 14:1-11.
- Jaworski S, Wierzbicki M, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Biernat J, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Wojnarowicz J, Stobiński L, Małolepszy A, Mazurkiewicz-Pawlicka M, Łojkowski M, Kurantowicz N, Chwalibog A. Graphene oxide-based nanocomposites decorated with silver nanoparticles as an antibacterial agent. Nanoscale Research Letters 2018 13(1):1-17.

Instytut Technologii Materiałów Elektronicznych - dr hab. Ludwika Lipińska i dr Joanna Jagiełło.

Współpraca z dr hab. Ludwiką Lipińska obejmowały badania dotyczące nanopłatków tlenku grafenu. Wcześniejsze badania dotyczące nanocząstek diamentu i nanocząstek grafitu wykazały potrzebę zbadania nanomateriału o zbliżonej wielkości, lecz innej budowie fizykochemicznej niż nanocząstki diamantu. Zespół dr hab. Ludwiki Lipińskiej z Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych wytworzył materiał z wcześniej badanych nanocząstek grafitu - nanopłatki tlenku grafenu. Nanopłatki grafenu z racji wielkości materiału wyjściowego posiadały rozmiar około 5 nm, lecz nie miały morfologii sferycznej i posiadały formę kilku warstwowych płatków. Nanopłatki tlenku grafenu zostały dokładnie scharakteryzowane pod względem właściwości fizykochemicznych. Badania *in vitro* interakcji nanaopłatków grafenu wykazały interesujące zależności, wykazując niższą toksyczność niż materiału wyjściowego, nanocząstek grafitu. Nanopłatki tlenku grafenu wykazywały również zbliżone właściwości biologiczne do nanocząstek diamentu. W ramach współpracy opublikowane zostały następujące publikacje:

 Szczepaniak J, Strojny B, Sawosz E, Jaworski S, Jagiello J, Winkowska M, Szmidt M, Wierzbicki M, Sosnowska M, Balaban J, Winnicka A, Lipinska L, Witkowska-Piłaszewicz O, Grodzik M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. International Journal of Molecular Sciences 2018 19(12):3939-3939.

- Jaworski S, Hinzmann M, Sawosz E, Grodzik M, Kutwin M, Wierzbicki M, Strojny B, Vadalasetty K, Lipińska L, Chwalibog A. Interaction of different forms of graphene with chicken embryo red blood cells. Environmental Science and Pollution Research 2017 24(27):21671–21679.
- Szmidt M, Sawosz E, Urbańska K, Jaworski S, Kutwin M, Hotowy A, Wierzbicki M, Grodzik M, Lipińska L, Chwalibog A. Toxicity of different forms of graphene in a chicken embryo model. Environmental Science and Pollution Research 2016 23(19):19940-19948.
- Jaworski S, Sawosz E, Kutwin M, Wierzbicki M, Hinzmann M, Grodzik M, Winnicka A, Lipińska L, Włodyga K, Chwalibog A. In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma. International Journal of Nanomedicine 2015 10:1585-1596.
- Kurantowicz N, Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Strojny B, Wierzbicki M, Szeliga J, Hotowy A, Lipińska L, Koziński R, Jagiełło J, Chwalibog A. Interaction of graphene family materials with Listeria monocytogenes and Salmonella enterica. Nanoscale Research Letters 2015 10(1).
- Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Vadalasetty K, Grodzik M, Wierzbicki M, Kurantowicz N, Strojny B, Hotowy A, Lipińska L, Jagiełło J, Chwalibog A. Graphene functionalized with arginine decreases the development of glioblastoma multiforme tumor in a gene-dependent manner. International Journal of Molecular Sciences 2015 16(10):25214-25233.
- Strojny B, Kurantowicz N, Sawosz E, Grodzik M, Jaworski S, Kutwin M, Wierzbicki M, Hotowy A, Lipińska L, Chwalibog A. Long term influence of carbon nanoparticles on health and liver status in rats. PLoS ONE 2015 10(12).
- Hinzmann M, Jaworski S, Kutwin M, Jagiełło J, Koziński R, Wierzbicki M, Grodzik M, Lipińska L, Sawosz E, Chwalibog A. Nanoparticles containing allotropes of carbon have genotoxic effects on glioblastoma multiforme cells. International Journal of Nanomedicine 2014 9:2409-2417.
- Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Hotowy A, Wierzbicki M, Grodzik M, Kurantowicz N, Strojny B, Lipińska L, Chwalibog A. Toxicity of pristine graphene in experiments in a chicken embryo model. International Journal of Nanomedicine 2014 9:3913-3922.

Politechnika Warszawska, Zakład Inżynierii Powierzchni oraz Laboratorium Grafenowe – prof. dr hab. inż. Krzysztof Zdunek, prof. dr hab. inż. Leszek Stobiński, dr Rafał Chodun, dr Artur Małolepszy.

Konieczność dobrej charakterystyki badanych nanomateriałów oraz poszukiwanie materiałów grafenowych do badań było główną przyczyną zainicjowania współpracy z Zakładem Inżynierii Powierzchni Politechniki Warszawskiej pod kierownictwem prof. dr hab. inż. Krzysztofa Zdunka oraz Laboratorium Grafenowym Politechniki Warszawskiej pod kierownictwem prof. dr hab. inż. Leszka Stobińskiego. prof. dr hab. inż. Krzysztofa Zdunka oraz dr Rafał Chodun wykonali analizę fizykochemiczną nanomateriałów węglowych z wykorzystaniem spektroskopii Ramana, natomiast prof. dr hab. inż. Leszek Stobiński oraz dr Artur Małolepszy wyprodukowali i scharakteryzowali tlenek grafenu wykorzystany w części badań biozgodności. W ramach współpracy opublikowane zostały następujące prace:

- Wierzbicki M, Jaworski S, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Stobiński L, Małolepszy A, Chwalibog A. Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatform. Nanoscale Research Letters 2019 14: 1-11.
- Jaworski S, Wierzbicki M, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Biernat J, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Wojnarowicz J, Stobiński L, Małolepszy A, Mazurkiewicz-Pawlicka M, Łojkowski M, Kurantowicz N, Chwalibog A. Graphene oxide-based nanocomposites decorated with silver nanoparticles as an antibacterial agent. Nanoscale Research Letters 2018 13(1):1-17.
- Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Strojny B, Kurantowicz N, Zdunek K, Chodun R, Chwalibog A, Sawosz E. Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion. International Journal of Nanomedicine 2017 12:7241-7254.

<u>Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN – prof. dr hab. Dorota</u> <u>Pijanowska, dr Karolina Zakrzewska, dr Anna Samluk, dr Krzysztof Pluta</u>.

Współpraca z prof. dr hab. Dorotą Pijanowską dr Karoliną Zakrzewską, dr Anną Samluk oraz dr Krzysztofem Plutą dotyczyła możliwości rozszerzenia badań nad toksycznością nanocząstek diamentu oraz grafitu w stosunku do linii komórkowych glejaka oraz raka wątrobokomórkowego. Badania zespołu z Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN pozwoliły na zastosowanie w badaniach komórek transformowanych zielonym białkiem fluorescencyjnym (GFP), przyżyciowej analizy toksyczności przy użyciu biosensora komórkowego oraz analizę wydzielania albuminy przez komórki raka wątrobokomórkowego C3A. W ramach współpracy opublikowano pracę:

 Zakrzewska K, Samluk A, Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Sawosz E, Chwalibog A, Pijanowska D, Pluta K. Analysis of the cytotoxicity of carbon-based nanoparticles, diamond and graphite, in human glioblastoma and hepatoma cell lines. PLoS ONE 2015 10(3).

<u>Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Instytut Nauk o Zwierzętach – dr hab. Marcin</u> Gołębiewski, prof. SGGW

Współpraca z dr hab. Marcinem Gołębiewskim dotyczyła problematyki profilaktyki zapalenia gruczołu mlekowego u krów mlecznych z wykorzystaniem kompleksu nanocząstek srebra i miedzi. Badania kompleksu nanocząstek srebra i miedzi dotyczyły wpływu nanomateriałów na komórki nabłonkowe gruczołu mlekowego, wpływu nanomateriałów na wybrane bakterie wywołujące zapalenia gruczołu mlekowego oraz badania wpływu na parametry zdrowotne krowy, jakość mleka. W ramach współpracy realizowałem wszystkie badania dotyczące analizy cytotoksyczności nanomateriałów w stosunku do komórek zwierzęcy. W badaniach wykazano możliwość zastosowania kompleksu nanocząstek srebra i miedzi w celu nietoksycznej prewencji *mastitis* i stanów subklinicznych *mastitis*. W ramach współpracy opublikowano następujące publikacje oraz patenty:

- Kalińska A, Wójcik A, Slósarz J, Kruzińska B, Michalczuk M, Jaworski S, Wierzbicki M, Gołębiewski M. Occurrence and aetiology of staphylococcal mastitis – A review. Animal Science Papers and Reports 2018 36:263-273.
- Kalińska A, Jaworski S, Wierzbicki M, Gołębiewski M. Silver and copper nanoparticles an alternative in future mastitis treatment and prevention?. International Journal of Molecular Sciences 2019 20(7):1-13.
- Patent UPRP P.415237. Urządzenie do higieny wymienia i strzyków zwierząt. Gołębiewski M,
 Wójcik A, Wierzbicki M. 31.08.2018r.
- Patent UPRP P.415181 Urządzenie do kąpieli wymienia i strzyków zwierząt. Gołębiewski M,
 Wójcik A, Wierzbicki M. 31.08.2018r.
- Patent UPRP P.415178. Ściereczka jednorazowego użytku do higieny przedudojowej gruczołu mlekowego zwierząt. Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 30.11.2018 r.
- Patent UPRP P-415244. Zastosowanie preparatu do higieny wymienia i strzyków zwierząt.
 Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 30.11.2018 r.
- Patent UPRP P-415243. Zastosowanie preparatu do higieny wymienia i strzyków zwierząt.
 Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 30.11.2018 r.
- Patent UPRP P-415238. Zastosowanie preparatu do higieny wymienia i strzyków zwierząt.
 Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 30.11.2018 r.
- Patent UPRP P-415241. Zastosowanie preparatu do higieny wymienia i strzyków zwierząt.
 Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 30.11.2018 r.
- Patent UPRP P-415242. Preparat do zastosowania w profilaktyce i leczeniu zakażeń gruczołu mlekowego u zwierząt. Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 30.11.2018 r.

<u>Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Instytut Nauk o Zwierzętach – prof. Jan</u> <u>Niemiec, dr Monika Łukasiewicz</u>

Badania we współpracy z zespołem prof. Jana Niemca oraz dr Moniki Łukasiewicz dotyczyły zastosowania nanomateriałów do zwiększenia efektywności wzrostu zarodków kury, zwiększenia przyrostu masy mięśniowej oraz zmniejszenia suplementacji miedzi w paszach kur. Głównym celem
badań z badań w których wykorzystano nanocząstki miedzi i cynku było zmniejszenie negatywnego wpływu produkcji drobiu na środowisko naturalne, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej jakości produkcji. W ramach współpracy opublikowano następujące prace:

- Łukasiewicz M, Łozicki A, Casey N, Chwalibog A, Niemiec J, Matuszewski A, Sosnowska M, Wierzbicki M, Zielińska-Górska M, Bałaban J, Sawosz E. Effect of zinc nanoparticles on embryo and chicken growth, and the content of zinc in tissues and faeces. South African Journal of Animal Science 2020 50(1):109-119.
- Mroczek-Sosnowska N, Sawosz E, Vadalasetty K, Łukasiewicz M, Niemiec J, Wierzbicki M, Kutwin M, Jaworski S, Chwalibog A. Nanoparticles of copper stimulate angiogenesis at systemic and molecular level. International Journal of Molecular Sciences 2015 16(3):4838-4849.
- Scott A, Vadalasetty K, Łukasiewicz M, Jaworski S, Wierzbicki M, Chwalibog A, Sawosz E. Effect of different levels of copper nanoparticles and copper sulphate on performance, metabolism and blood biochemical profiles in broiler chicken. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 2018 102(1):e364-e373.

7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

7.1 Osiągniecia dydaktyczne

7.1.1 Opracowanie monografii dydaktycznych

 Współautorstwo monografii dydaktycznej pt. "Wybrane zagadnienia z podstaw mikrobiologii i fizjologii bakterii. Rekonstrukcja fenomenograficzna" pod redakcją dr hab. Sławomira Jaworskiego oraz dr Barbary Strojnej-Cieślak. Wydawnictwo SGGW, 2020. ISBN 978-83-7583-921-0.

7.1.2 Opracowanie oraz realizacja zajęć dydaktycznych

Od czasu zatrudnienia na stanowisku naukowo-dydaktycznym w 2013 roku zrealizowałem ponad dwa tysiące godzin dydaktycznych prowadząc zajęcia na czterech kierunkach studiów:

Zajęcia realizowane na kierunku Bioinżynieria zwierząt, Wydział Hodowli, Bioinżynierii i Ochrony Zwierząt

- Cytofizjologia ćwiczenia i wykłady, koordynator przedmiotu
- Analiza bioobrazowania ćwiczenia komputerowe, koordynator przedmiotu
- Podstawy techniki w biologii ćwiczenia i wykłady, koordynator przedmiotu
- Inżynieria Nanobiotechnologiczna wykłady, koordynator przedmiotu

• Fizjologia Procaryota - wykłady

Zajęcia realizowane na kierunku Hodowla i Ochrona Zwierząt Towarzyszących i Dzikich, Wydział Hodowli, Bioinżynierii i Ochrony Zwierząt

- Żywienie zwierząt drapieżnych ćwiczenia i wykłady, koordynator przedmiotu
- Podstawy mikrobiologii ćwiczenia i wykłady
- Analiza Instrumentalna -ćwiczenia

Zajęcia realizowane na kierunku Zootechnika, Wydział Hodowli, Bioinżynierii i Ochrony Zwierząt

- Mikrobiologia ćwiczenia i wykłady
- Analiza Instrumentalna -ćwiczenia

Zajęcia realizowane na kierunku Biologia, Wydział Rolnictwa i Biologii

• Nanobiotechnologia – ćwiczenia, koordynator przedmiotu

7.1.3 Opieka naukowa nad doktorantami

 Promotor pomocniczy pracy doktorskiej Natalii Kurantowicz pt. "Biozgodność grafenu w badaniach na wybranych modelach biologicznych", której promotorem była prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg, Wydział Nauk o Zwierzętach, SGGW. Data obrony: 13-03-2018

7.1.4 Opieka naukowa nad studentami

Promotor 11 prac inżynierskich i recenzent 12 prac inżynierskich i magisterskich na kierunkach Bioinżynieria Zwierząt, Biotechnologia oraz Biologia.

Prace inżynierskie:

- Aneta Jezierska : Wpływ nanopłatków grafenu naturalnego na hodowle sferoidalną komórek glejaka IV stopnia linii U87, 2020.
- Serafin Wiktoria: Ocena wrażliwości komórek śródbłonka na grafen i nanocząstki diamentu w zależności od obecności płodowej surowicy bydlęcej, 2020.
- Zawadzka Katarzyna: Ocena wpływu nanocząstek diamentu na proliferację i migrację z angiosfery komórek śródbłonka, 2020.
- Machnacki Karol: Analiza wpływu nanocząstek diamentu na biosyntezę kaweoliny-1 w komórkach glejaka IV stopnia linii U87, 2018.
- Machuła Marcin: Fulereny i nanocząstki tlenku grafenu jako nośniki 2-deoksy-D-glukozy w badaniu cytotoksyczności glejaka IV stopnia linii U87, 2018.
- Olszewska Magdalena: Ocena wpływu nanocząstek grafitu i diamentu na linię komórkową HUVEC z wykorzystaniem modelu angiogenezy, 2018.

- Owczarek Patrycja: Analiza antyangiogennych właściwości tlenku grafenu i fulerenu z wykorzystaniem modelu in vitro komórek śródbłonka, 2018.
- Sekretarska Justyna: Ocena antyoksydacyjnych właściwości nanopłatków tlenku grafenu i nanocząstek grafitu oraz ich wpływ na wewnątrzkomórkowe wydzielanie anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach glejaka linii U87 i U118, 2018.
- Wędzińska Aleksandra: Kokultura zdrowych oraz nowotworowych komórek nabłonkowych sutka jako model do badań toksyczności nanocząstek srebra, 2018.
- Jankowski Dawid: Hodowle sferoidalne komórek glejaka linii U87 jako model oznaczenia toksyczności jednościennych nanorurek węglowych, 2017.
- Stadryniak Monika: Wpływ nanocząstek diamentu, grafitu i tlenek grafenu na wybrane rodzaje transportu przez błony komórkowe glejaka wielopostaciowego linii U-87, 2016.
- Szlachcic Aleksandra: Wplyw nanoczastek i mikroczastek fosforu czerwonego i jednościennych nanorurek węglowych na kultury sferoidów glejaka wielopostaciowego linii U87, 2016.

7.1.5 Inne aktywności dydaktyczne:

- Członek zespołu ds. zmian w programie kierunku Biologia studiów II stopnia 2019 r.
- Udział w szkoleniu z zastosowania Jednolitego Systemu Antyplagiatowego 16.01.19
- Opiekun roku kierunku Bioinżynieria zwierząt studentów rozpoczynających studia inżynierskie w 2014 r. i studia magisterskie w roku 2017 r.
- Opiekun Międzywydziałowego Koła Naukowego Nanobiotechnologii w 2015 r.
- Udział w szkoleniu "Obsługa systemu Monitorowania Losów Zawodowych Absolwentów" organizowanym w ramach projektu "Podnoszenie jakości zarządzania zasobami SGGW" Warszawa 18.06.2014 r.

7.2 Osiągnięcia organizacyjne

7.2.1 Członkostwo w Radach i Komisjach

- Członek Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych; 2019, 2020
- Członek Rady Programowej Wydziału Rolnictwa i Biologii; 2019, 2020
- Członek zespołu ds. zmian w programie kierunku Biologia studiów II stopnia Wydziału Rolnictwa i Biologii; 2019, 2020
- Członek zespołu roboczego ds. dydaktyki Wydziału Rolnictwa i Biologii; 2020
- Członek komisji ds. dydaktyki Wydziału Nauk o Zwierzętach 2017-2019

7.2.2 Udział w komitetach organizacyjnych międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych

- Organizacja VIII Konferencji Młodych Badaczy pt. "Fizjologia i biochemia w żywieniu zwierząt" organizowanej przez Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonnie oraz Wydział Nauk o Zwierzątach SGGW w terminie 19-20.09.2011
- Organizacja konferencji Young Researchers Symposium 2014, Facing Environmental Challenges 18-22 Sierpień 2014, RPA.
- Organizacja I Konferencji Młodych Naukowców Biotechnologia w produkcji zwierzęcej; 2014;
 SGGW w Warszawie.
- Organizacja Międzynarodowej Konferencji Naukowej XLIV Scientific Session Nutrition of livestock, companion and wild animals, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, 16/17 June 2015
- Organizacja konferencji International Conference on Nanotechnology in Medicine (NanoMed) 2016, Warszawa
- Organizacja II Konferencji Młodych Naukowców. 2017; SGGW w Warszawie.

7.3 Osiągnięcia popularyzujące naukę

7.3.1 Popularyzacja i promocja nauki w prasie, Internecie, radio i TV:

Publikacje popularnonaukowe

- Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Wierzbicki M, Hotowy A, Chwalibog A. 2014.
 Magia Grafenu. Agricola pismo SGGW. 88: 35- 39.
- Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Wierzbicki M, Hotowy A, Chwalibog A. 2014.
 Magiczny grafen? Forum Akademickie. 11:23-27
- Sawosz E, Grodzik M, Wierzbicki M, Kutwin M, Jaworski S. 2013. Nanocząstki przyszłości.
 Rzeczpospolita dodatek Nauka, Biotechnologia, Medycyna. Nr 255 str.5
- Współpraca przy powstaniu artykułu "Polscy naukowcy komórki nowotworowe uśmiercają grafenem". PAP – Zdrowie 6.12.2013

Inne

- Film w zrealizowany przez SGGW TV dotyczący biologicznych zastosowań grafenu 30.07.2014 https://www.youtube.com/watch?v=JrImzAr6KIA&list=UUTSbk0DrdfnoVwdMXnSs2rQ
- Program popularnonaukowy "Jak to działa", odcinek nowoczesne materiały. Nr odcinka 58.
 15.03.14
- Popularnonaukowe audycje radiowe w radio Kampus i TokFM dotyczące zastosowań i oddziaływań biologicznych grafenu. 14.01.2014 i 20.03.2014

- Program o zastosowaniach biologicznych grafenu i jego perspektyw emitowany w TVN24, TVN Warszawa 19.12.2013 r.
- Popularnonaukowy opis projektu Preludium na stronie internetowej Narodowego Centrum Nauki opublikowany w zakładce "Przykładowe wnioski" 2012 r. https://www.ncn.gov.pl/finansowanie-nauki/przyklady-projektow/wierzbicki
- Tworzenie i redakcja strony internetowej Zakładu Nanbiotechnologii Nanobioteam 2015-2019 r.

8. Nagrody i Wyróżnienia

- 2020 r. Zespołowa Nagroda II st Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za osiągnięcia naukowe
- 2019 r. Zespołowa Nagroda II st Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za osiągnięcia naukowe
- 2018 r. Zespołowa Nagroda II st Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za osiągnięcia naukowe
- 2017 r. III miejsce w konkursie na najbardziej innowacyjny patent " Zawiesina wodna nanopłatków tlenku grafenu dekorowanych nanocząstkami metalicznej platyny, jej zastosowanie i sposób jej wytwarzania ", Eureka! DCP, Dziennik Gazeta Prawna.
- 2017 r. Zespołowa Nagroda II st Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za osiągnięcia naukowe
- 2016 r. Zespołowa Nagroda II st Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za osiągnięcia naukowe
- 2015 r. Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Wybitnych Młodych Naukowców
- 2014 r. Zespołowa Nagroda III st Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za osiągnięcia naukowe
- 2013 r. Dyplom uznania Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za osiągnięcia naukowe

Molen Wiebilm

Załącznik 3

WYKAZ OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH, STANOWIĄCYCH ZNACZNY WKŁAD W ROZWÓJ DYSCYPLINY NAUK BIOLOGICZNYCH

dr Mateusz Wierzbicki

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2020

Spis treści

Ι.	Informacja o osiągnięciach naukowych, o których mowa w art. 219 ust. 1. Pkt 2	3
	ustawy	
II.	Informacja o aktywności naukowej	5
III.	Informacja o współpracy z otoczeniem społecznym i gospodarczym	21
IV.	Informacje naukometryczne	24

I. Informacja o osiągnięciach naukowych, o których mowa w art. 219 ust. 1. Pkt 2 ustawy Osiągnięcie naukowe stanowi cykl pięciu, powiązanych tematycznie oryginalnych prac naukowych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports o łącznym IF 19,575 i punktacji MNiSW: 355 pkt. (115 pkt. według listy MNiSW z 2017 r. i 240 pkt. według listy MNiSW z 2019 r.) pod tytułem:

"Modulacja wybranych elementów mikrośrodowiska komórkowego przez nanostruktury odmian alotropowych węgla ze szczególnym uwzględnieniem działania antynowotworowego."

Wykaz prac stanowiących osiągnięcie naukowe:

P1 Zakrzewska KE, Samluk A, Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Sawosz E, Chwalibog A, Pijanowska DG, Pluta KD. Analysis of the cytotoxicity of carbon-based nanoparticles, diamond and graphite, in human glioblastoma and hepatoma cell lines. PloS One 2015, 10, e0122579, 40 punktów , IF(3,057), liczba cytowań: 1.

> Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji badań, przeprowadzeniu badań toksyczności in vitro, współudziale w opracowaniu wyników i analizie statystycznej.

Mój udział w publikacji szacuję na 15%

P2 Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Strojny B, Kurantowicz N, Zdunek K, Chodun R, Chwalibog A, Sawosz E. Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion. International Journal of Nanomedicine 2017, 12, 7241. 35 punktów, IF(4,370), liczba cytowań: 17.

> Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzanych badań, opracowaniu metodyki, przeprowadzeniu doświadczeń in vitro, przeprowadzeniu analiz Western blot i obrazowania fluorescencyjnego, współudziale w opracowaniu wyników i wykonaniu analizy statystycznej, przygotowaniu tekstu do druku. Mój udział w publikacji szacuję na 80%

P3 Wierzbicki M, Sawosz E, Strojny B, Jaworski S, Grodzik M, Chwalibog A. NF-κB-related decrease of glioma angiogenic potential by graphite nanoparticles and graphene oxide nanoplatelets. Scientific Reports 2018, 8, 14733. 40 punktów, IF(4.011), liczba cytowań: 9.

3

Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył opracowania koncepcji przeprowadzonych badań, opracowania metodyki, przeprowadzenia doświadczeń, analizy aktywności szlaków komórkowych, analizy aktywności angiogennej, opracowania wyników i wykonaniu analizy statystycznej, przygotowania tekstu do druku, korespondowania z redakcją czasopisma. Mój udział w publikacji szacuję na 85%

P4 Wierzbicki M, Jaworski S, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Stobiński L, Małolepszy A, Chwalibog A.
 Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatform. Nanoscale Research Letters, 2019, 14, 1–11. 100 punktów. IF(3,581), liczba cytowań: 3.

Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył tworzenia dotyczył opracowania koncepcji przeprowadzonych badań, opracowania metodyki badań, badania odpowiedzi zapalnej z wykorzystaniem membran antygenowych, udziału w przeprowadzeniu doświadczeń dotyczących toksyczności nanomateriałów in vitro, badania wpływu nanomateriałów na błonę kosmówkowo-omoczniową zarodka kury, analizie i opracowaniu wyników, wykonaniu analizy statystycznej, przygotowania tekstu do druku, korespondowania z redakcją czasopisma.

Mój udział w publikacji szacuję na 65%

P5 Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M, Jaworski S, Bałaban J, Sosnowska M, Wójcik B, Wędzińska A, Chwalibog A, Sawosz E. Graphene Oxide Scaffold Stimulates Differentiation and Proangiogenic Activities of Myogenic Progenitor Cells. International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 4173. 140 punktów. IF(4.556), liczba cytowań: 1.

> Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył tworzenia koncepcji przeprowadzonych badań, opracowania metodyki, obrazowania time-lapse, analizy aktywności angiogennej, analizy opracowania wyników i wykonania analizy statystycznej, przygotowania tekstu do druku, korespondowaniu z redakcją czasopisma.

Mój udział w publikacji szacuję na 80%

Oświadczenia współautorów zawierające procentowy udział oraz opis wkładu w powstanie prac znajduje się w Załączniku 6.

4

II. Informacja o aktywności naukowej

II.1 Wykaz opublikowanych monografii naukowych

Brak

II.2 Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych.

źródłowych, konsultacji z redaktorami monografii.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

 Rozdział w monografii: M. Wierzbicki, A. Wierzbicka. Nietoperze W: E. Sawosz, I. Kosieradzka, Żywienie zwierząt dzikich. Ssaki. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2012, str. 287-300. Mój udział w pracy dotyczył napisania tekstu, częściowo zebraniu materiałów

<u>Po uzyskaniu stopnia doktora</u> Brak

II.3 Informacja o członkostwie w redakcjach naukowych monografii.

Brak

II.4 Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I).

Pozycje wymienione w pkt I zostały zaznaczone poprzez pogrubienie.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

 Hinzmann M, Jaworski S, Kutwin M, Jagiełło J, Koziński R, Wierzbicki M, Grodzik M, Lipińska L, Sawosz E, Chwalibog A. Nanoparticles containing allotropes of carbon have genotoxic effects on glioblastoma multiforme cells. International Journal of Nanomedicine 9, 2014, ss. 2409-2417, DOI:10.2147/IJN.S62497, 35 punktów, IF(4,383), liczba cytowań: 38.

> Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w badaniach in vitro dotyczących żywotności komórek.

 Osińska E, Godlewski M, Wierzbicki M, Motyl T. Bone marrow-origin stem/progenitor cells in the mammary gland of heifers. Polish Journal of Veterinary Sciences 17, 1, 2014, ss. 161-163, DOI:10.2478/pjvs-2014-0021, 20 punktów, IF(0,604) liczba cytowań: 0.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na wykonania zdjęć z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego

3. Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Wierzbicki M, Hotowy A, Chwalibog A. Magia grafenu. Agricola, 88, 2014, ss. 35-39.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w pisaniu artykułu.

 Sawosz E, Grodzik M, Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M, Jaworski S, Strojny B, Kurantowicz N. Nanocząstki - molekuły sygnalne i transportowe w badaniach biologicznych. Przegląd Hodowlany, 3, 2014, ss. 41-43, 6 punktów.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w pisaniu artykułu.

Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Hotowy A, Wierzbicki M, Grodzik M, Kurantowicz N, Strojny B, Lipińska L, Chwalibog A. Toxicity of pristine graphene in experiments in a chicken embryo model. International Journal of Nanomedicine 9, 2014, ss. 3913-3922, DOI:10.2147/IJN.S65633, 35 punktów, IF(4,383), liczba cytowań: 40.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w podawaniu nanomateriałów do zarodków kury i przeprowadzeniu badań morfologicznych

6. Wierzbicki M. Modele zwierzęce w badaniach medycznych, biologicznych i zootechnicznych.
 Przegląd Hodowlany, Polskie Towarzystwo Zootechniczne, 6, 2014, ss. 26-28, 6 punktów.
 Mój wkład w powstanie pracy polegał na zebraniu materiałów źródłowych, napisaniu

publikacji i kontakcie z wydawnictwem.

 Grodzik M, Sawosz F, Sawosz E, Hotowy A, Wierzbicki M, Kutwin M, Jaworski S, Chwalibog A. Nano-nutrition of chicken embryos. The effect of in ovo administration of diamond nanoparticles and l-glutamine on molecular responses in chicken embryo pectoral muscles. International Journal of Molecular Sciences 14, 11, 2013, ss. 23033-23044, 30 punktów, IF(2,339), liczba cytowań: 24.

> Mój wkład w powstanie pracy polegał na przygotowaniu zawiesin nanocząstek i udziale w iniekcji nanomateriałów do zarodków kury.

Jaworski S, Sawosz E, Grodzik M, Kutwin M, Wierzbicki M, Włodyga K, Jasik A, Reichert M, Chwalibog A. Comparison of tumour morphology and structure from U87 and U118 glioma cells cultured on chicken embryo chorioallantoic membrane. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 57, 2013, ss. 593-598, DOI:10.2478/bvip-2013-0101, 20 punktów, IF(0,365), liczba cytowań: 5.

Mój udział w powstanie publikacji polegał na udziale w hodowaniu guzów glejaka na błonie kosmówkowo omoczniowej zarodka kury.

 Jaworski S, Sawosz E, Grodzik M, Winnicka A, Kutwin M, Wierzbicki M, Chwalibog A. In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells. International Journal of Nanomedicine 8, 2013, ss. 413-420, 35 punktów, IF(4,195), liczba cytowań: 88.

> Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w przeprowadzeniu badań perforacji błon komórkowych z wykorzystaniem testu LDH.

Kutwin M, Sawosz E, Jaworski S, Grodzik M, Ostaszewska T, Kamaszewski M, Wierzbicki M, Chwalibog A. Influence of nanoparticles of platinum on chicken embryo development and brain morphology. Nanoscale Research Letters, 8, 251, 2013, 35 punktów, IF(2,481), liczba cytowań: 32.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na przeprowadzeniu analizy statystycznej.

 Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M, Hotowy A, Kutwin M, Jaworski S, Sawosz F, Chwalibog A. Carbon nanoparticles downregulate expression of basic fibroblast growth factor in the heart during embryogenesis. International Journal of Nanomedicine 8, 2013, ss. 3427-3435, 35 punktów, IF(4,195), liczba cytowań: 33.

> Mój wkład w powstanie pracy polegał na przeprowadzeniu badań in vitro, przygotowaniu zawiesin nanomateriałów, analizy badań, przeprowadzeniu analizy statystycznej, przygotowaniu artykułu. Publikacja stanowiła część mojej pracy doktorskiej.

 Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M, Kutwin M, Jaworski S, Chwalibog A. Comparison of antiangiogenic properties of pristine carbon nanoparticles. Nanoscale Research Letters, 8, 195, 2013, 35 punktów, IF(2,481), liczba cytowań: 42.

> Mój wkład w powstanie pracy polegał na przeprowadzeniu badań in ovo, przeprowadzeniu analizy angiogenezy, przygotowaniu roztworów nanomateriałów, przeprowadzeniu analizy statystycznej, analizy wyników badań, przygotowaniu artykułu. Publikacja stanowiła część mojej pracy doktorskiej.

13. Grodzik M, Sawosz E, Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M, Jaworski S, Chwalibog A. VEGFdependent mechanism of anti-angiogenic action of diamond nanoparticles in glioblastoma multiforme tumor. Technical Proceedings of the 2012 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2012, 2012, ss. 218-221, 5 punktów, liczba cytowań: 2.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w wykonaniu badań działania antyangiogennego nanocząstek diamentu.

14. Szmidt M, Urbańska K, Grodzik M, Orłowski P, Sawosz E, Wierzbicki M, Sysa P. Morphology of human glioblastoma model cultured in ovo. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 56,

2, 2012, ss. 261-266, 20 punktów, IF(0,377), liczba cytowań: 6.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w hodowli guzów glejaka na błonie kosmówkowo omoczniowej zarodka kury.

15. Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M. Caveolin-1 localization in chicken embryo chorioallantoic membrane treated with diamond and graphite nanoparticles. Annals of Warsaw University of Life Sciences- SGGW Animal Science, 51, 2012, ss. 133-138, 2 punkty. Mój wkład w powstanie pracy polegał na przeprowadzeniu analizy lokalizacji kaweoliny-1 w komórkach błony kosmówkowo omoczniowej zarodka kury z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego, przygotowaniu roztworów nanomateriałów, przeprowadzeniu analizy statystycznej, analizy wyników badań, przygotowaniu artykułu i kontakcie z redakcją czasopisma. Publikacja stanowiła część mojej pracy doktorskiej.

 Zielińska M, Sawosz E, Grodzik M, Balcerak M, Wierzbicki M, Skomiał J, Sawosz F, Chwalibog A. Effect of taurine and gold nanoparticles on the morphological and molecular characteristics of muscle development during chicken embryogenesis. Archives of Animal Nutrition 66, 1, 2012, ss. 1-13, 30 punktów, IF(1,095), liczba cytowań: 15.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na przeprowadzeniu analizy statystycznej.

17. Grodzik M, Sawosz E, Wierzbicki M, Orlowski P, Hotowy A, Niemiec T, Szmidt M, Mitura K, Chwalibog A. Nanoparticles of carbon allotropes inhibit glioblastoma multiforme angiogenesis in ovo. International Journal of Nanomedicine 6, 2011, ss. 3041-3048, 40 punktów, IF(3,13), liczba cytowań: 42.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w hodowli guzów glejaka na błonie kosmówkowo omoczniowej zarodka kury oraz opracowaniu wyników.

 Zielinska M, Sawosz E, Grodzik M, Wierzbicki M, Gromadka M, Hotowy A, Sawosz F, Łozicki A, Chwalibog A. Effect of heparan sulfate and gold nanoparticles on muscle development during embryogenesis. International Journal of Nanomedicine 6, 2011, ss. 3163-3172, 40 punktów, IF(3,13), liczba cytowań: 15.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w doświadczeniach in ovo oraz opracowaniu wyników.

 Gniazdowska A, Krasuska U, Czajkowska K, Wierzbicki M, Bogatek R. Tlenek azotu i hemoglobiny roślinne. Postępy Biologii Komórki, Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej, 2, 2009, ss. 233-250, 15 punktów, IF(0,077), liczba cytowań: 2.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zebraniu materiałów źródłowych.

Po uzyskaniu stopnia doktora

Bałaban J, Wierzbicki M, Zielińska M, Szczepaniak J, Sosnowska M, Daniluk K, Cysewski D, Koczoń P, Chwalibog A, Sawosz E. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. Molecules 25, 8, 2020, ss. 1-21, DOI:10.3390/molecules25081991, 100 punktów, IF(3,06), liczba cytowań: 2.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w opracowywaniu metodyki, pozyskania odczynników, wykorzystywanej w badaniach, obsłudze oprogramowania służącego do pozyskania oraz analizy danych.

Daniluk K, Kutwin M, Grodzik M, Wierzbicki M, Strojny B, Szczepaniak J, Bałaban J, Sosnowska M, Chwalibog A, Sawosz E, Jaworski S. Use of selected carbon nanoparticles as melittin carriers for MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. Materials, MDPIAG 13, 1, 2020, ss. 1-20, DOI:10.3390/ma13010090, 140 punktów, IF(2,972), liczba cytowań: 0.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w obsłudze oprogramowania służącego do pozyskania oraz analizy danych oraz walidacji pozyskanych danych.

Łukasiewicz M, Łozicki A, Casey N, Chwalibog A, Niemiec J, Matuszewski A, Sosnowska M, Wierzbicki M, Zielińska M, Bałaban J, Sawosz E. Effect of zinc nanoparticles on embryo and chicken growth, and the content of zinc in tissues and faeces. South African Journal of Animal Science 50, 1, 2020, ss. 109-119, DOI:10.4314/sajas.v50i1.12, 70 punktów, IF(0,653), liczba cytowań: 1.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na przygotowaniu zawiesin nanocząstek oraz udziale w analizie fizykochemicznej nanocząstek.

Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M, Jaworski S, Bałaban J, Sosnowska M, Wójcik B, Wędzińska A, Chwalibog A, Sawosz E. Graphene Oxide Scaffold Stimulates Differentiation and Proangiogenic Activities of Myogenic Progenitor Cells. International Journal of Molecular Sciences 21, 11, 2020, ss. 1-16, DOI:10.3390/ijms21114173, 140 punktów, IF(4,183), liczba cytowań: 1.

Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył tworzenia koncepcji przeprowadzonych badań, opracowania metodyki, obrazowania time-lapse, analizy aktywności angiogennej, analizy opracowania wyników i wykonania analizy statystycznej, przygotowania tekstu do druku, korespondowaniu z redakcją czasopisma. Mój udział w publikacji szacuję na 80% (praca wchodząca w skład osiągnięcia

- naukowego). 5. Zielińska M, Hotowy A, Wierzbicki M, Bałaban J, Sosnowska M, Jaworski S, Strojny B, Chwalibog A, Sawosz E. Graphene oxide nanofilm and the addition of I-glutamine can
 - promote development of embryonic muscle cells. Journal of Nanobiotechnology 18, 2020, ss. 1-17, DOI:10.1186/s12951-020-00636-z, 140 punktów, IF(5,345), liczba cytowań: 1. *Mój wkład w powstanie prac poległ na udziale w tworzeniu metodyki pokrywania powierzchni nanofilmem grafenowym oraz udziale w badaniach in vitro*.
- 6. Grodzik M, Szczepaniak J, Strojny B, Hotowy A, Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Soltan E, Mandat T, Lewicka A, Chwalibog A. Diamond nanoparticles downregulate expression of

CycD and CycE in glioma cells. Molecules 24, 8, 2019, ss. 1-16, DOI:10.3390/molecules24081549, 100 punktów, IF(3,06), liczba cytowań: 2.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w badaniach dotyczących analizy morfologii komórek traktowanych nanocząstkami diamentu.

 Jaworski S, Strojny B, Sawosz E, Wierzbicki M, Grodzik M, Kutwin M, Daniluk K, Chwalibog A. Degradation of mitochondria and oxidative stress as the main mechanism of toxicity of pristine graphene on U87 glioblastoma cells and tumors and HS-5 cells. International Journal of Molecular Sciences 20, 3, 2019, ss. 1-17, DOI:10.3390/ijms20030650, 140 punktów, IF(4,183), liczba cytowań: 13

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w przeprowadzaniu testów toksyczności komórek linii U-87 oraz HS-5.

 Kalińska A, Jaworski S, Wierzbicki M, Gołębiewski M. Silver and copper nanoparticles - an alternative in future mastitis treatment and prevention?. International Journal of Molecular Sciences 20, 7, 2019, ss. 1-13, DOI:10.3390/ijms20071672, 140 punktów, IF(4,183), liczba cytowań: 7.

> Mój wkład w powstanie pracy polegał na przygotowaniu nanomateriałów i wykonaniu części oznaczeń fizykochemicznych nanocząstek, hodowli komórek HMEC oraz BME-UV1 oraz wykonaniu testów toksyczności.

Kutwin M, Sawosz E, Jaworski S, Wierzbicki M, Strojny B, Grodzik M, Sosnowska M, Trzaskowski M, Chwalibog A. Nanocomplexes of graphene oxide and platinum nanoparticles against colorectal cancer Colo205, HT-29, HTC-116, SW480, liver cancer HepG2, human breast cancer MCF-7, and adenocarcinoma LNCaP and human cervical Hela B cell lines. Materials, MDPIAG 12, 6, 2019, ss. 1-17, DOI:10.3390/ma12060909, 140 punktów, IF(2,972), liczba cytowań: 3.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w dostosowaniu metodyki badania wpływu nanomateriałów na linie komórkowe.

- Sekretarska J, Szczepaniak J, Sosnowska M, Grodzik M, Kutwin M, Wierzbicki M, Jaworski S, Bałaban J, Daniluk K, Sawosz E, Chwalibog A, Strojny B. Influence of selected carbon nanostructures on the CYP2C9 enzyme of the P450 cytochrome. Materials, MDPIAG 12, 24, 2019, ss. 1-14, DOI:10.3390/ma12244149, 140 punktów, IF(2,972), liczba cytowań: 1.
 - Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w dostosowaniu metodyki badania wpływu nanomateriałów na linie komórkowe oraz pomocy w zapewnieniu odczynników niezbędnych do przeprowadzenia badań.
- 11. Sosnowska M, Kutwin M, Jaworski S, Strojny B, Wierzbicki M, Szczepaniak J, Łojkowski M, Święszkowski W, Bałaban J, Chwalibog A, Sawosz E. Mechano-signalling, induced by

fullerene C60 nanofilms, arrests the cell cycle in the G2/M phase and decreases proliferation of liver cancer cells. International Journal of Nanomedicine 14, 2019, ss. 6197-6215, DOI:10.2147/IJN.S206934, 140 punktów, IF(4,471), liczba cytowań: 4.

Mój udział w powstanie pracy polegał na analizie uzyskanych danych oraz pomocy w przygotowaniu publikacji do druku.

Szmidt M, Stankiewicz A, Urbańska K, Jaworski S, Kutwin M, Wierzbicki M, Grodzik M, Burzyńska B, Góra M, Chwalibog A, Sawosz E. Graphene oxide down-regulates genes of the oxidative phosphorylation complexes in a glioblastoma. BMC Molecular Biology 20, 1, 2019, ss. 1-9, DOI:10.1186/s12867-018-0119-2, 70 punktów, IF(2,568). liczba cytowań: 5.

Mój udział w powstanie pracy polegał na udziale w analizie uzyskanych danych.

Wierzbicki M, Jaworski S, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Stobiński L, Małolepszy A, Chwalibog A. Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatform. Nanoscale Research Letters 14, 2019, ss. 1-11, DOI:10.1186/s11671-019-3166-9, 100 punktów, IF(3,159), liczba cytowań: 3.

Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył tworzenia dotyczył opracowania koncepcji przeprowadzonych badań, opracowania metodyki badań, badania odpowiedzi zapalnej z wykorzystaniem membran antygenowych, udziału w przeprowadzeniu doświadczeń dotyczących toksyczności nanomateriałów in vitro, badania wpływu nanomateriałów na błonę kosmówkowo-omoczniową zarodka kury, analizie i opracowaniu wyników, wykonaniu analizy statystycznej, przygotowania tekstu do druku, korespondowania z redakcją czasopisma.

Mój udział w publikacji szacuję na 65% (praca wchodząca w skład osiągnięcia naukowego).

Grodzik M, Szczepaniak J, Strojny B, Jaworski S, Wierzbicki M, Jagiello J, Soltan E, Mandat T. Graphenoid plates in glioma therapy. TechConnect Briefs 2018 - Advanced Materials 3, 2018, ss. 125-128, 5 punktów.

Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył udziału w zbieraniu materiałów źródłowych i analizy formalnej tekstu.

Jaworski S, Wierzbicki M, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Biernat J, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Wojnarowicz J, Stobiński L, Małolepszy A, Mazurkiewicz-Pawlicka M, Łojkowski M, Kurantowicz N, Chwalibog A. Graphene oxide-based nanocomposites decorated with silver nanoparticles as an antibacterial agent. Nanoscale Research Letters 13, 1, 2018, ss. 1-17, DOI:10.1186/s11671-018-2533-2, 35 punktów, IF(3,159), liczba cytowań: 42.

Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył udziale w badaniach stref zahamowania wzrostu mikroorganizmów oraz badania produkcji reaktywnych form tlenu.

Kalińska A, Wójcik A, Slósarz J, Kruzińska B, Michalczuk M, Jaworski S, Wierzbicki M, Gołębiewski M. Occurrence and aetiology of staphylococcal mastitis – A review. Animal Science Papers and Reports 36, 2018, ss. 263-273, 25 punktów, IF(0,697), liczba cytowań: 1.

Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył udziału w zbieraniu materiałów źródłowych i analizy formalnej tekstu.

17. Scott A, Vadalasetty K, Łukasiewicz M, Jaworski S, Wierzbicki M, Chwalibog A, Sawosz E. Effect of different levels of copper nanoparticles and copper sulphate on performance, metabolism and blood biochemical profiles in broiler chicken. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 102, 1, 2018, e364-e373, DOI:10.1111/jpn.12754, 30 punktów, IF(1,703), liczba cytowań: 14.

> Mój wkład w powstanie pracy polegał na przygotowaniu zawiesin nanocząstek oraz udziale w analizie fizykochemicznej nanocząstek

Strojny B, Sawosz E, Grodzik M, Jaworski S, Szczepaniak J, Sosnowska M, Wierzbicki M, Kutwin M, Orlińska S, Chwalibog A. Nanostructures of diamond, graphene oxide and graphite inhibit cYP1a2, cYP2D6 and cYP3a4 enzymes and downregulate their genes in liver cells. International Journal of Nanomedicine 13, 2018, ss. 8561-8575, DOI:10.2147/IJN.S188997, 35 punktów, IF(4,471), liczba cytowań: 3.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w dostosowaniu metodyki badania wpływu nanomateriałów na linie komórkowe.

Szczepaniak J, Strojny B, Sawosz E, Jaworski S, Jagiello J, Winkowska M, Szmidt M, Wierzbicki M, Sosnowska M, Balaban J, Winnicka A, Lipinska L, Witkowska-Piłaszewicz O, Grodzik M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. International Journal of Molecular Sciences 19, 12, 2018, ss. 3939-3939, 30 punktów, IF(4,183), liczba cytowań: 7.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w walidacji uzyskanych danych oraz wizualizacji danych.

20. Wierzbicki M, Sawosz E, Strojny B, Jaworski S, Grodzik M, Chwalibog A. NF-κB-related decrease of glioma angiogenic potential by graphite nanoparticles and graphene oxide nanoplatelets. Scientific Reports, Nature Publishing Group 8, 2018, ss. 1-9, DOI:10.1038/s41598-018-33179-3, 40 punktów, IF(4,011), liczba cytowań: 9.

Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył opracowania koncepcji przeprowadzonych badań, opracowania metodyki, przeprowadzenia doświadczeń, analizy aktywności szlaków komórkowych, analizy aktywności angiogennej, opracowania wyników i wykonaniu analizy statystycznej, przygotowania tekstu do druku, korespondowania z redakcją czasopisma.

Mój udział w publikacji szacuję na 85% (praca wchodząca w skład osiągnięcia naukowego).

Hotowy A, Sawosz E, Grodzik M, Wierzbicki M, Kutwin M, Jaworski S, Chwalibog
 A. Development and optimization of myocardial tissue culture in ovo. Engineering of
 Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów, 143, 2017, ss. 54, 7 punktów.

Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył udziału w zbieraniu materiałów źródłowych i analizy formalnej tekstu.

Jaworski S, Biniecka P, Bugajska Ż, Daniluk K, Dyjak S, Strojny B, Kutwin M, Wierzbicki M, Grodzik M, Chwalibog A. Analysis of the cytotoxicity of hierarchical nanoporous graphenic carbon against human glioblastoma grade IV cells. International Journal of Nanomedicine 12, 2017, ss. 3839-3849, DOI:10.2147/IJN.S135932, 35 punktów, IF(4,37), liczba cytowań: 2.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w badaniach dotyczących analizy morfologii komórek traktowanych nanomateriałami

Jaworski S, Hinzmann M, Sawosz E, Grodzik M, Kutwin M, Wierzbicki M, Strojny B, Vadalasetty K, Lipińska L, Chwalibog A. Interaction of different forms of graphene with chicken embryo red blood cells. Environmental Science and Pollution Research 24, 27, 2017, 21671–21679, DOI:10.1007/s11356-017-9788-5, 30 punktów, IF(2,8), liczba cytowań: 7.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na przygotowaniu zawiesin nanomateriałów oraz przeprowadzeniu części analiz fizykochemicznych.

 Kutwin M, Sawosz E, Jaworski S, Wierzbicki M, Strojny B, Grodzik M, Chwalibog A. Assessment of the proliferation status of glioblastoma cell and tumour tissue after nanoplatinum treatment. PLoS ONE 12, 5, 2017, ss. 1-14, DOI:10.1371/journal.pone.0178277, 40 punktów, IF(2,766), liczba cytowań: 11.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w hodowli guzów glejaka na błonie kosmówkowo omoczniowej zarodka kury.

Kutwin M, Sawosz E, Jaworski S, Hinzmann M, Wierzbicki M, Hotowy A, Grodzik M, Winnicka A, Chwalibog A. Investigation of platinum nanoparticle properties against U87 glioblastoma multiforme. Archives of Medical Science, 6, 2017, 1322–1334, DOI:10.5114/aoms.2016.58925, 30 punktów, IF(2,344), liczba cytowań: 12.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w badaniach in vitro dotyczących żywotności komórek. Sawosz E, Hotowy A, Bakowicz-Mitura K, Grodzik M, Wierzbicki M, Kutwin M, Jaworski S, Chwalibog A. Carbon allotropes for muscle regeneration. Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów, 143, 2017, ss. 49, 7 punktów.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w tworzeniu skafoldów grafenowych. 27. Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Strojny B, Kurantowicz N, Zdunek K, Chodun R, Chwalibog A, Sawosz E. Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion. International Journal of Nanomedicine 12, 2017, ss. 7241-7254, DOI:10.2147/IJN.S146193, 35 punktów, IF(4,37), liczba cytowań: 17.

> Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzanych badań, opracowaniu metodyki, przeprowadzeniu doświadczeń in vitro, przeprowadzeniu analiz Western blot i obrazowania fluorescencyjnego, współudziale w opracowaniu wyników i wykonaniu analizy statystycznej, przygotowaniu tekstu do druku.

> Mój udział w publikacji szacuję na 80%. (praca wchodząca w skład osiągnięcia naukowego).

28. Sawosz E, Grodzik M, Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M, Jaworski S, Kurantowicz N, StrojnyB. Dylematy nanobiotechnologii. Przegląd Hodowlany, 5, 2016, ss. 3-5, 6 punktów.

Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył udziału w zbieraniu materiałów źródłowych i opracowywania części tekstu.

29. Strojny B, Grodzik M, Sawosz E, Winnicka A, Kurantowicz N, Jaworski S, Kutwin M, Urbańska K, Hotowy A, Wierzbicki M, Chwalibog A. Diamond nanoparticles modify curcumin activity: in vitro studies on cancer and normal cells and in ovo studies on chicken embryo model. PLoS ONE 11, 10, 2016, ss. 1-18, DOI:10.1371/journal.pone.0164637, 40 punktów, IF(2,806), liczba cytowań: 17.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu analizy statystycznej.

 Szmidt M, Sawosz E, Urbańska K, Jaworski S, Kutwin M, Hotowy A, Wierzbicki M, Grodzik M, Lipińska L, Chwalibog A. Toxicity of different forms of graphene in a chicken embryo model. Environmental Science and Pollution Research 23, 19, 2016, ss. 19940-19948, DOI:10.1007/s11356-016-7178-z, 30 punktów, IF(2,741), liczba cytowań: 12.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w przeprowadzeniu badań in ovo. 31. Beck I, Hotowy A, Sawosz E, Grodzik M, Wierzbicki M, Kutwin M, Jaworski S, Chwalibog A. Effect of silver nanoparticles and hydroxyproline, administered in ovo, on the development of blood vessels and cartilage collagen structure in chicken embryos. Archives of Animal Nutrition 69, 1, 2015, ss. 57-68, DOI:10.1080/1745039X.2014.992179, 30 punktów, IF(1,319), liczba cytowań: 17.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w przeprowadzeniu badań in ovo. 32. Grodzik M, Sawosz E, Jaworski S, Wierzbicki M, Strojny B, Hotowy A, Urbańska K, Kutwin M, Włodyga K, Kurantowicz N. Badania genetyczne i personalizacja terapii w leczeniu glejaków. Przegląd Hodowlany, 6, 2015, ss. 14-16, 6 punktów.

Mój wkład w powstanie tej pracy dotyczył udziału w zbieraniu materiałów źródłowych i udziale w przygotowaniu tekstu do druku.

33. Jaworski S, Sawosz E, Kutwin M, Wierzbicki M, Hinzmann M, Grodzik M, Winnicka A, Lipińska L, Włodyga K, Chwalibog A. In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma. International Journal of Nanomedicine 10, 2015, ss. 1585-1596, DOI:10.2147/IJN.S77591, 35 punktów, IF(4,32), liczba cytowań: 62

Mój udział polegał na przygotowaniu zawiesin nanomateriałów oraz przygotowaniu figur.

34. Kurantowicz N, Strojny B, Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Wierzbicki M, Lipińska L, Bakowicz-Mitura K, Chwalibog A. Biodistribution of a high dose of diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles after multiple intraperitoneal injections in rats. Nanoscale Research Letters 10, 1, 2015, DOI:10.1186/s11671-015-1107-9, 35 punktów, IF(2,584), liczba cytowań: 47.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na przygotowaniu zawiesin nanomateriałów oraz przeprowadzeniu części analiz wizualizacji nanomateriałów w transmisyjnym mikroskopie elektronowym.

35. Kurantowicz N, Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Strojny B, Wierzbicki M, Szeliga J, Hotowy A, Lipińska L, Koziński R, Jagiełło J, Chwalibog A. Interaction of graphene family materials with Listeria monocytogenes and Salmonella enterica. Nanoscale Research Letters 10, 1, 2015, DOI:10.1186/s11671-015-0749-y, 35 punktów, IF(2,584), liczba cytowań: 51.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na przygotowaniu zawiesin nanomateriałów oraz przeprowadzeniu analiz potencjału zeta nanomateriałów.

36. Mroczek-Sosnowska N, Sawosz E, Vadalasetty K, Łukasiewicz M, Niemiec J, Wierzbicki M, Kutwin M, Jaworski S, Chwalibog A. Nanoparticles of copper stimulate angiogenesis at systemic and molecular level. International Journal of Molecular Sciences 16, 3, 2015, ss. 4838-4849, DOI:10.3390/ijms16034838, 30 punktów, IF(3,257), liczba cytowań: 39.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na przeprowadzeniu badań angiogenezy z wykorzystaniem modelu błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury.

37. Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Vadalasetty K, Grodzik M, Wierzbicki M, Kurantowicz N, Strojny B, Hotowy A, Lipińska L, Jagiełło J, Chwalibog A. Graphene functionalized with arginine decreases the development of glioblastoma multiforme tumor in a gene-dependent manner. International Journal of Molecular Sciences 16, 10, 2015, ss. 25214-25233, DOI:10.3390/ijms161025214, 30 punktów, IF(3,257), liczba cytowań: 21.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na wykonaniu części hodowli komórkowych i badań toksyczności.

 Strojny B, Kurantowicz N, Sawosz E, Grodzik M, Jaworski S, Kutwin M, Wierzbicki M, Hotowy A, Lipińska L, Chwalibog A. Long term influence of carbon nanoparticles on health and liver status in rats. PLoS ONE 10, 12, 2015, DOI:10.1371/journal.pone.0144821, 40 punktów, IF(3,057), liczba cytowań: 23.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na udziale w badaniach in vivo.

39. Zakrzewska K, Samluk A, Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Sawosz E, Chwalibog A, Pijanowska D, Pluta K. Analysis of the cytotoxicity of carbon-based nanoparticles, diamond and graphite, in human glioblastoma and hepatoma cell lines. PLoS ONE 10, 3, 2015, DOI:10.1371/journal.pone.0122579, 40 punktów, IF(3,057), liczba cytowań: 34.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji badań, przeprowadzeniu badań toksyczności in vitro, współudziale w opracowaniu wyników i analizie statystycznej.

Mój udział w publikacji szacuję na 15%. (praca wchodząca w skład osiągnięcia naukowego).

II.5 Wykaz osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych Brak

II.6 Wykaz publicznych realizacji dzieł artystycznych Brak

II.7. Informacja o wystąpieniach na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

 Wierzbicki M, Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Kurantowicz N, Strojny B. Carbon Nanoparticles Affects Migration of Glioblastoma Cell Lines. Young Researchers Symposium 2014, Facing Environmental Challenges 18-22 Sierpień 2014, RPA. Prezentacja ustna w języku angielskim.

- Wierzbicki M. Modele biologiczne w badaniach medycznych, biologicznych i zootechnicznych.
 XVIII Warsztaty Zootechniczne 19.11.2014, Warszawa. Prezentacja ustna w języku polskim.
- Wierzbicki M, Grodzik M, Jaworski S, Kutwin M, Sawosz E. Nanocząstki węgla zwiększają ekspresję kaweoliny-1 komórek glejaka wielopostaciowego. I Konferencja Młodych Naukowców Warszawa, 24-25.04.2014 Prezentacja ustna w języku polskim.
- 4. Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M, Prasek M, Jaworski S, Chwalibog A. Carbon nanoparticles effect on chicken embryo chorioallantoic membrane caveolae. IX International Conference of Young Researchers "Physiology and Biochemistry in Animal Nutrition" 16-19.09.2012 w Szczecinie. Prezentacja ustna w języku angielskim.

Po uzyskaniu stopnia doktora

- Wierzbicki M. Nanobiotechnology in Anticancer Therapy. "10th International Forum on Innovative Technologies for Medicine" – ITMED. 2016, Warszawa. Prezentacja ustna w języku angielskim.
- Wierzbicki M, Sawosz E, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Strojny B, Lipińska L, Chwalibóg A.
 2016. Graphite nanoparticles and graphene oxide decrease angiogenic potential of glioblastoma cell line U-87 but not U-118. NANOMED Conference, WULS, Warsaw, 7-9 November 2016. Prezentacja ustna w języku angielskim
- Wierzbicki M. Antyangiogenne właściwości nanocząstek węgla. Sympozjum "Nanotechnologia w biologii i medycynie" 22.11.2017 r Instytut Biochemii i Biofizyki PAN. Prezentacja ustna w języku angielskim
- 4. Wierzbicki M, Bałaban J, Jaworski S,Grodzik M, Strojny B, Sawosz E. "Proangiogenna macierz zewnątrzkomórkowa modyfikowana nanocząstkami srebra i tlenkiem grafenu" III seminarium imienia Prof. Aleksandry Sokołowskiej "Grafen" właściwości i zastosowanie" 06-09.12.2018r. Zakopane. Prezentacja ustna w języku polskim.
- M. Wierzbicki, E. Sawosz, J. Bałaban, M. Sosnowska, J. Szczepaniak, M. Gołębiewski "Carbon nanoparticles regulates glioma cells extracellular adhesion. 1st Termis-Eu Workshop. 22-23 March 2018. Warsaw. Konferencja międzynarodowa. Poster w języku angielski.
- M. Wierzbicki, E. Sawosz, B. Strojny, S. Jaworski, M. Grodzik, M. Kutwin, A. Chwalibog. Graphene Oxide Nanoplatelets Decrease Glioma Induced Angiogenesis. 1st CA17140 Conference COST15-17.10.2019. Ryga. Prezentacja ustna w języku angielskim.

II.8. Informacja o udziale w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

- Organizacja I Konferencji Młodych Naukowców Biotechnologia w produkcji zwierzęcej. 2014. SGGW w Warszawie.
- Organizacja konferencji naukowej Young Researchers Symposium 2014, Facing Environmental Challenges 18-22 Sierpień 2014, RPA.

Po uzyskaniu stopnia doktora

- Organizacja Międzynarodowej Konferencji Naukowej XLIV Scientific Session Nutrition of livestock, companion and wild animals, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, 16-17, 2015
- Organizacja Międzynarodowego Sympozjum NanoMED-2016 zorganizowanego w ramach współpracy pomiędzy "The Nanosmat Society", Stowarzyszeniem Innowacyjna Polska Wschodnia" oraz Katedrą Żywienia i Biotechnologii Zwierząt WNoZ w Warszawie. SGGW, Warszawa, 7-9 listopad 2016

II.9. Informacja o uczestnictwie w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.

- Projekt NCN Opus 2020/37/B/NZ7/03532: "Zależne od mikrośrodowiska zaburzenie nowotworowych naczyń włosowatych przez nanocząstki diamentu w leczeniu silnie unaczynionych nowotworów" 2021-2024 r. Kierownik
- Projekt MNiSW na utrzymanie SPUB 8707/E-385/SPUB/2017/1: "Mikroskop konfokalny FV1000 z komorą do przyżyciowej obserwacji komórek oraz dynamiki interakcji komórek z nanocząstkami" 2017-2018 r. Kierownik
- Projekt NCN Preludium 2011/03/N/NZ9/04290: "Nanocząstki diamentu i grafitu jako czynniki przeciwnowotworowe – charakterystyka antyżywieniowego mechanizmu działania na modelach in vitro oraz in ovo". 2011-2015 r.

Kierownik

 Projekt NCBiR, SZPITALE-JEDNOIMIENNE/23/2020, Grafeno-metaliczny aerosol (MetaGrafen) jako długoterminowy i nietoksyczny środek przeciwko koronawirusowi SARS-CoV-.2 Źródło finansowania: Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. 2020-2021 r. Wykonawca

- Projekt NCBiR LIDER LIDER/0070/L-7/2015: "Development of the innovative system for the prevention and treatment of sub-clinical mastitis in dairy cows based on synergism of silver and copper nanoparticles". 2017-2019 r. Wykonawca.
- Projekt NCBiR Gutfeed innowacyjne żywienie w zrównoważonej produkcji drobiarskiej Biostrateg 1/267659/7NCBR/2015 koordynator SGGW: prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg 2015 – 2018 r.

Wykonawca

- Projekt (MNS-DIAG) POIG 01.03.01-00 014/08: Micro- and nano-systems in chemistry and biomedical diagnosis. Źródło finansowania: Program Innowacyjna Gospodarka. 2007-2013. Wykonawca.
- Projekt NCN Opus 2011/03/B/NZ9/03387: Grafen i nanokompleksy grafitu jako modulatory odżywiania komórki i ekspresji białka p53 w badaniach na modelu glejaka wielopostaciowego in vitro i in ovo. Program: Opus. Źródło finansowania: Narodowe Centrum Nauki. 2012-2015. Wykonawca.

II.10 Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.

Brak

II.11. Informacja o odbytych stażach w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.

 Staż naukowy w Danii, University of Copenhagen, 01.06.2015-01.09.2015. Opiekunowie: prof. André Chwalibog i prof. Dan Klærke Projekt: Wpływu nanocząstek diamentu, grafitu, grafenu, platyny, srebra oraz złota na kanały potasowe badane na modelu *Xenopus laevis*.

II.12.Członkostwo w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz

z informacją o pełnionych funkcjach

- Członek komitetu redakcyjnego czasopisma MDPI "International Journal of Molecular Sciences" IF= 4.556 ("Topic Editor") 2020 r.
- Redaktor wydania specjalnego czasopisma MDPI "International Journal of Molecular Sciences" pod tytułem " Antitumor Properties of Nanoparticles" IF= 4.556. ("Guest Editor") 2020-2021 r.
- Redaktor wydania specjalnego czasopisma MDPI "Materials" pod tytułem "The Effect of Graphene on Cancer" IF=2.467, ("Guest Editor") 2019-2021 r.

II.13. Informacja o recenzowanych pracach naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych.

- 2020 r. 1 recenzja artykułu w czasopiśmie International Journal of Nanomedicine, Dovepress (IF= 5.115)
- 2. 2019 r. 1 recenzja w czasopiśmie Materials, MDPI (IF=2.467)

II.14.Informacja o uczestnictwie w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych.

Brak

II.15.Informacja o udziale w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż

określone w pkt. II.9.

- Projekt z konkursu "Systemu Wsparcia Finansowego dla Naukowców i Zespołów Badawczych, SGGW" 75000,0 zł, 2020 r. Kierownik projektu.
- Projekt z konkursu "Systemu Wsparcia Finansowego dla Naukowców i Zespołów Badawczych, SGGW "105000,0 zł, 2019 r. Kierownik projektu.
- 3. Kierownik projektu wewnętrznego SGGW: "Proangiogenna modyfikacja macierzy zewnątrzkomórkowej do celów biodruku naczyń krwionośnych" 2018 r. Kierownik projektu
- Kierownik projektu wewnętrznego SGGW: "Mechanizm antyangiogennego działania nanocząstek diamentu. badania na modelu komórek śródbłonka naczyń HUVEC". 2017 r. Kierownik projektu
- 5. Kierownik projektu wewnętrznego SGGW: "Endocytoza nanocząstek węglowych jako czynnik hamujący potencjał angiogenny badania na modelu in vitro". 2016 r. Kierownik projektu
- Kierownik projektu wewnętrznego SGGW: "Nanocząstki fosforu jako przełącznik molekularny. badania na modelu angiogenezy komórek śródbłonka naczyń (HUVEC)". 2015 r. Kierownik projektu

II.16. Informacja o uczestnictwie w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań, wnioski o przyznanie nagród naukowych, wnioski w innych konkursach mających charakter naukowy lub dydaktyczny.

Brak

III. Informacja o współpracy z otoczeniem społecznym i gospodarczym

III.1. Wykaz dorobku technologicznego.

Brak

III.2. Informacja o współpracy z sektorem gospodarczym.

- 2020r. współpraca ze szpitalem MSWiA dotycząca badania toksyczności nanocząstek na nowotwory trzustki oraz realizacja projektu Projekt NCBiR, SZPITALE-JEDNOIMIENNE/23/2020, Grafeno-metaliczny aerosol (MetaGrafen) jako długoterminowy i nietoksyczny środek przeciwko koronawirusowi SARS-CoV-2. 2020-2021
- 2012-2020 r. Współpraca z firmami Nano-Tech Polska" sp. z o.o. sp. k. oraz Nano-Koloid Sp. z o.o. w zakresie badań biozgodności nanocząstek produkowanych przez firmy.
- 3. 2018 2019 r. Współpraca z Wojskowym Instytutem Medycznym oraz firmą Braster S.A. w ramach badań dotyczących opracowania aktywnych opatrunków zawierających nanocząstki
- 2015 2018 r. Współpraca z firmą Wytwórnia Pasz PIAST PASZE Sp. z o.o. w ramach projektu NCBiR Gutfeed - innowacyjne żywienie w zrównoważonej produkcji drobiarskiej Biostrateg 1/267659/7NCBR/2015 2015-2018 r
- 5. 2013 -2014 r. Współpraca z firmami jako Wydziałowy koordynator ds. współpracy z przedsiębiorcami w ramach projektu "Podnoszenie jakości zarządzania zasobami SGGW" finansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki 2007-2013, priorytet IV Szkolnictwo wyższe i nauka, działanie 4.1: Wzmocnienie i rozwój potencjału dydaktycznego uczelni oraz zwiększenie liczby absolwentów kierunków o kluczowym znaczeniu dla gospodarki opartej na wiedzy, poddziałanie 4.1.1 Wzmocnienie potencjału dydaktycznego uczelni. Przygotowanie katalogu kluczowych pracodawców dla kierunków studiów Zootechnika, Hodowla i Ochrona Zwierząt Towarzyszących i Dzikich, Bioinżynieria Zwierząt w ramach projektu "Podnoszenie jakości zarządzania zasobami SGGW" Warszawa 2014 r. Koordynacja podpisania formalnego porozumienia o współpracy Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW oraz firm i instytucji:
 - KAWA.SKA. Sp. z o. o.
 - "Gallus" Związek Hodowców Drobiu Rasowego w Polsce
 - Miejski Ogród Zoologiczny w Płocku
 - Towarzystwo Przyrodnicze "Bocian"
 - Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN w Warszawie
 - Miejski Ogród Zoologiczny w Warszawie

III.3. Uzyskane prawa własności przemysłowej, w tym uzyskane patenty, krajowe lub międzynarodowe.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

Brak

Po uzyskaniu stopnia doktora

Patenty

 Patent US 10,471,095 B2. Suspension of graphene oxide nanoflakes in water, its use and a method of preparation thereof. Ewa Sawosz Chwalibóg, Marta Kutwin, Sławomir Jaworski, Mateusz Wierzbicki, Marta Grodzik, Anna Hotowy, Ludwika Lipińska, Joanna Jagiełło 12.11.2019

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na przeprowadzeniu części badań pozwalających za opracowanie koncepcji oraz przygotowaniu dokumentacji.

 Patent UPRP P 407166 Ewa Sawosz, Marta Kutwin, Sławomir Jaworski, Mateusz Wierzbicki, Marta Grodzik, Anna Hotowy, Ludwika Lipińska, Joanna Jagiełło. Zawiesina wodna nanopłatków tlenku grafenu dekorowanych nanocząstkami metalicznej platyny, jej zastosowanie i sposób jej wytwarzania, 5.09.2017.

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na przeprowadzeniu części badań pozwalających za opracowanie koncepcji oraz przygotowaniu dokumentacji.

 Patent UPRP P.415237. Urządzenie do higieny wymienia i strzyków zwierząt. Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 31.08.2018r.

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na przeprowadzeniu części badań pozwalających za opracowanie koncepcji.

 Patent UPRP P.415181 Urządzenie do kąpieli wymienia i strzyków zwierząt. Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 31.08.2018r.

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na przeprowadzeniu części badań pozwalających za opracowanie koncepcji.

 Patent UPRP P.415178. Ściereczka jednorazowego użytku do higieny przedudojowej gruczołu mlekowego zwierząt. Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 30.11.2018 r.

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na przeprowadzeniu części badań pozwalających za opracowanie koncepcji.

 Patent UPRP P-415244. Zastosowanie preparatu do higieny wymienia i strzyków zwierząt. Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 30.11.2018 r.

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na przeprowadzeniu części badań pozwalających za opracowanie koncepcji.

 Patent UPRP P-415243. Zastosowanie preparatu do higieny wymienia i strzyków zwierząt. Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 30.11.2018 r.

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na przeprowadzeniu części badań pozwalających za opracowanie koncepcji.

 Patent UPRP P-415238. Zastosowanie preparatu do higieny wymienia i strzyków zwierząt. Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 30.11.2018 r.

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na przeprowadzeniu części badań pozwalających za opracowanie koncepcji.

 Patent UPRP P-415241. Zastosowanie preparatu do higieny wymienia i strzyków zwierząt. Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 30.11.2018 r.

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na przeprowadzeniu części badań pozwalających za opracowanie koncepcji.

 Patent UPRP P-415242. Preparat do zastosowania w profilaktyce i leczeniu zakażeń gruczołu mlekowego u zwierząt. Gołębiewski M, Wójcik A, Wierzbicki M. 30.11.2018 r.

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na przeprowadzeniu części badań pozwalających za opracowanie koncepcji.

Zgłoszenia patentowe

 Zgłoszenie patentowe UPRP P.430970. Medium do hodowli komórek mięśniowych oraz zastosowanie ekstraktu z zarodka kury. Ewa Sawosz Chwalibóg, Jasmina Bałaban, Anna hotowy, Malwina Sosnowska, Marta Grodzik, Jarosław Szczepaniak, Mateusz Wierzbicki, Marta Kutwin, Sławomir Jaworski, Andrzej Chwalibóg, Barbara Strojny-Cieslak, Marlena Zielińska. 27.08.2019.

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na przeprowadzeniu części badań pozwalających za opracowanie koncepcji oraz przygotowaniu dokumentacji.

 Zgłoszenie patentowe UPRP P. 426145. Dodatek mineralny do paszy, sposób wytworzenia dodatku do paszy oraz zastosowanie. . Twórcy: Monika Łukasiewicz, Ewa Sawosz-Chwalibóg, Jan Niemiec, Andrzej Chwalibóg, Andrzej Łozicki, Arkadiusz Matuszewski, Mateusz Wierzbicki, Sławomir Jaworski, Damian Józefiak, Jan Jankowski, Ewa Koczywąs. 29.06.2018

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na przeprowadzeniu części badań pozwalających za opracowanie koncepcji

3. Zgłoszenie patentowe UPRP P. 423414 Sposób wielostronnej oceny biozgodności materiałów. Ewa Sawosz, Marta Kutwin, Sławomir Jaworski, Mateusz Wierzbicki, Marta Grodzik, Anna Hotowy, Barbara Strojny, Natalia Kurantowicz, Bogumiła Urbanowska, Malwina Sosnowska. 10.11.17. Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na przeprowadzeniu części badań pozwalających za opracowanie koncepcji

III.4. Informacja o wdrożonych technologiach. Brak

III.5. Informacja o wykonanych ekspertyzach lub innych opracowaniach wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców.

Brak

III.6. Informacja o udziale w zespołach eksperckich lub konkursowych. Brak

III.7. Informacja o projektach artystycznych realizowanych ze środowiskami pozaartystycznymi.

Brak

IV. INFORMACJE NAUKOMETRYCZNE

IV.1. Informacja o punktacji Impact Factor Sumaryczny IF: 147,135

IV.2. Informacja o liczbie cytowań publikacji wnioskodawcy, z oddzielnym uwzględnieniem autocytowań.

Liczba cytowań – 875 Liczba cytowań bez autocytowań – 724 Stan na dzień 27.11.2020 według Web of Science

IV.3. Informacja o posiadanym indeksie Hirscha.

17 (stan na dzień 27.11.2020) według Web of Science

IV.4. Informacja o liczbie punktów MNiSW

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: 2800

Mtem Walik

Załącznik 4

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA

dr Mateusz Wierzbicki

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2020

Załącznik 5



G OPEN ACCESS

Citation: Zakrzewska KE, Samluk A, Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Sawosz E, et al. (2015) Analysis of the Cytotoxicity of Carbon-Based Nanoparticles, Diamond and Graphite, in Human Glioblastoma and Hepatoma Cell Lines. PLoS ONE 10(3): e0122579. doi:10.1371/journal.pone.0122579

Academic Editor: Gianfranco Pintus, University of Sassari, ITALY

Received: August 28, 2014

Accepted: February 17, 2015

Published: March 27, 2015

Copyright: © 2015 Zakrzewska et al. This is an open access article distributed under the terms of the <u>Creative Commons Attribution License</u>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: Funding provided by National Science Centre Poland NCN 2011/03/N/NZ9/04290, http:// www.ncn.gov.pl MW; European Regional Development Found within the POIG Programme: MNS-DIAG "Micro- and Nano- Systems for Chemistry and Biomedical Diagnostics" (POIG.01.03.01-00-014/ 08-02), www.projekty.poig.gov.pl DGP. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. **RESEARCH ARTICLE**

Analysis of the Cytotoxicity of Carbon-Based Nanoparticles, Diamond and Graphite, in Human Glioblastoma and Hepatoma Cell Lines

Karolina Ewa Zakrzewska¹[®], Anna Samluk^{1®}, Mateusz Wierzbicki², Sławomir Jaworski², Marta Kutwin², Ewa Sawosz², André Chwalibog³, Dorota Genowefa Pijanowska¹, Krzysztof Dariusz Pluta¹*

1 Department of Hybrid Microbiosystem Engineering, Nalecz Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering PAS, Warsaw, Poland, 2 Division of Nanobiotechnology, Faculty of Animal Science, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Poland, 3 Department of Veterinary Clinical and Animal Sciences, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

These authors contributed equally to this work.
 <u>kpluta@ibib.waw.pl</u>

Abstract

Nanoparticles have attracted a great deal of attention as carriers for drug delivery to cancer cells. However, reports on their potential cytotoxicity raise questions of their safety and this matter needs attentive consideration. In this paper, for the first time, the cytotoxic effects of two carbon based nanoparticles, diamond and graphite, on glioblastoma and hepatoma cells were compared. First, we confirmed previous results that diamond nanoparticles are practically nontoxic. Second, graphite nanoparticles exhibited a negative impact on glioblastoma, but not on hepatoma cells. The studied carbon nanoparticles could be a potentially useful tool for therapeutics delivery to the brain tissue with minimal side effects on the hepatocytes. Furthermore, we showed the influence of the nanoparticles on the stable, fluorescently labeled tumor cell lines and concluded that the labeled cells are suitable for drug cytotoxicity tests.

Introduction

The characteristic features of nanoparticles (NPs), namely their small size (at least one dimension that measures 100 nanometers or less), high surface area per mass unit and dominating surface properties, provide potential for their application in biomedicine. Carbon NPs are most often used in applications such as drug delivery, bioengineering, biosensors or bioimaging [1]. Despite the similar composition of various carbon NPs, they have distinct physical and biological properties depending on their structure [2]. Diamond NPs (nanodiamond, ND) are characterized by low toxicity and high biocompatibility to a variety of cell types. ND produces low level of reactive oxygen species (ROS), does not stimulate macrophages to produce



Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

inflammatory cytokines and does not affect the morphology of cells at concentrations ranging from 1 to 100 µg/mL [3]. In contrast, the biological activity of graphite NPs (nanographite, NG) is poorly understood. There are only a few published reports on this subject, suggesting that NG is capable of inducing apoptosis and cell death or inflammatory responses in rats [4], or could inhibit angiogenesis [5]. Despite the similarity, in terms of having a crystalline form and nanoscale size, ND and NG have different C-atoms hybridization (sp³ and sp², respective-ly) and, thus, exhibit distinct physical and electrochemical properties. This could explain their differential effects exerted on human cells.

According to the World Health Organization cancers are among the leading causes of death throughout the world, and liver cancer is the second most frequent cause of cancer-related death [6]. Hepatocellular carcinoma (HCC) is a primary malignancy of the liver. HCC cells produce proteins at high levels and, thus, they are characterized by high oxygen and glucose consumption [7]. Prognosis for this type of cancer is very poor, because the survival rate of patients with HCC has not been improved significantly in the last two decades [8,9]. The only effective treatment for HCC is surgery (partial resection or transplantation), but only a small percentage of patients are candidates for this procedure, owing to complications associated with the tumor metastasis. Conventional therapy based on chemo- and radiotherapy is toxic to hepatocytes [10]. Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and most aggressive malignant brain tumor. GBM cells are characterized by low mitochondrial respiration, increased glycolysis for ATP generation and hypoxia preference [11]. They are resistant to the traditional therapy and, additionally, the blood-brain barrier limits the penetration of drugs to the tumor site. New strategies developed for cancer treatment are based on substances causing programmed cell death. However, targeted chemotherapeutic agents also have an impact on healthy cells [12,13]. Owing to the problems caused by the blood-brain barrier and to the difficult access to glioblastoma growing along the vasculature and nerves, studies are focusing on targeted therapy, which should not be toxic to the other cells, especially hepatocytes. One of the most promising methods is the use of NPs as carriers for anti-tumor agents.

The aim of this study was to evaluate the potential toxicity of ND and NG in glioblastoma (U87) and hepatoma (C3A) cells. Fluorescent labeling has been widely used in many biological applications, such as in the detection of cellular components (e.g. mitochondria), visualization of protein-protein interactions or *in vivo* cell tracking. Therefore, for the purpose of these experiments, EGFP (enhanced green fluorescent protein)-expressing U87 and C3A cells generated according to a method described elsewhere [14], were used. The experiments with the stable fluorescent cell lines (U87-EGFP and C3A-EGFP) were performed in order to compare the performance of the nontransduced and transduced cells as preliminary studies for future *in vivo* experiments. EGFP-labeling could potentially be toxic to human cells [15], but our data did not confirm this hypothesis because of the following results: unchanged albumin production and viability of the C3A-EGFP cells [16].

Materials and Methods

Ethics statement

The Ministry of Environment of the Republic of Poland has granted our Laboratory the approval for research on human cell lines modified by lentiviral vectors for use in closed systems (Decision No. 30/2011).

Nanoparticles

Carbon–based NPs, ND (explosion synthesized; specific surface area: ~282 m²/g; purity: >95%) and NG (explosion synthesized; specific surface area: 540–650 m²/g; purity: >93%), were




Fig 1. Transmission electron microscopy images of nanoparticles. Images of (A) diamond (ND) and (B) graphite (NG) nanoparticles. Scale bar: 100 nm.

obtained from Sky Spring Nanomaterials Inc. (Huston, USA). ND and NG powders were dispersed in ultrapure water by sonication to prepare 1.0 mg/mL solutions. Afterwards, the solutions were diluted to different concentrations with cell culture medium immediately prior to cell exposure. The dispersion, shape and size of the NPs were examined using a transmission electron microscope (TEM, JEM-2000EX) at an accelerating voltage of 80 kV (JEOL, Tokyo, Japan). Representative TEM images of ND and NG, taken in aqueous solutions at a concentration of 1.0 mg/mL, are presented in Fig 1. As can be seen, NG, but not ND, formed tightly aggregated clusters. The typical diameter of both ND and NG spherical particles ranged from 2–6 nm. The zeta potentials and polydispersity index (PDI) of NPs were measured in colloidal solutions at concentration of 50 µg/mL by the laser dynamic scattering-electrophoretic method, using a Zetasizer Nano ZS, model ZEN3500 (Malvern Instruments, UK). Each sample was measured following stabilization for 120 s at 25°C. The zeta potentials for ND and NG were –35.6 mV and 31.4 mV, respectively. PDI values for ND and NG were 0.29 and 0.41, respectively.

Cell cultures

Human glioblastoma U87 (ATCC No. HTB-14) and hepatoma C3A (ATCC No. CRL-10741) cell lines, as well as their fluorescently labeled derivatives, were cultured under standard conditions at 37° C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air in an AutoFlow NU-4750E Water Jacket CO₂ Incubator (NuAire, Plymouth, MN, USA). U87 cells were cultured in low glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), whereas C3A cells were grown in high glucose DMEM supplemented with 10% FBS and 1% nonessential amino acids.

In order to generate labeled cell lines, both U87 and C3A cells were transduced with lentiviral vectors that enabled the stable expression of the EGFP fluorescent marker. A full description of this genetic modification has been published elsewhere [14]. The resulting fluorescent cell lines (transduced cells): U87-EGFP and C3A-EGFP, displayed strong and uniform fluorescence emissions in a high percentage of cells, that is 90–95% as judged by flow cytometry (fluorescence-activated cell sorting, FACS) using a FACSCanto II instrument (BD, Warsaw, Poland).

Cell morphology

U87 and U87-EGFP cells were plated in 96-well microplates $(1 \times 10^4 \text{ cells per well})$ and incubated for 18 h. C3A and C3A-EGFP cells were plated in 96-well microplates $(3 \times 10^4 \text{ cells per well})$

and incubated for 24 h. The numbers of cells that allowed optimum growth over the entire incubation period were determined for every cell line in the pilot experiments. All cells were subsequently incubated with ND and NG at concentrations of 20, 50 and 100 μ g/mL. Cells cultured in medium without the addition of any NPs were used as a control. Images showing the cell morphology were captured using an inverted fluorescence microscope (Olympus IX71) and analyzed with CellP software (Olympus, Warsaw, Poland) 2 and 24 h after exposure.

Cell viability

Cell viability (I_{CV}) was assessed using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide reagent (MTT test). U87, U87-EGFP, C3A and C3A-EGFP cells were plated in 96-well microplates (1×10⁴ per well for glioblastoma cells and 3×10⁴ for hepatoma cells) and incubated for 18 or 24 h, respectively. Next, both types of cells were incubated for 2 or 24 h with ND and NG at concentrations of 20, 50 and 100 µg/mL. After removing the medium, the cells were incubated with 50 µL of the MTT solution at 37°C for 3 h. Next, the optical density (OD) of each well was recorded at 570 nm with a microplate reader (Synergy HT) and analyzed using KC-4 software (BioTek, Winooski, VT, USA). The I_{CV} values were expressed as ratios of the relative optical density for the tested samples (OD_{test} - OD_{blank}) to relative optical density for the control sample ($OD_{control}$ - OD_{blank}), both relative values were calculated versus the optical density for blank, Equation (1):

$$I_{cv} = (OD_{test} - OD_{blank}) / (OD_{control} - OD_{blank})$$
(1)

where OD_{test} is the optical density of cells exposed to ND or NG, $OD_{control}$ is the optical density of the control sample and OD_{blank} is the optical density of the wells without glioblastoma or hepatoma cells.

Cytotoxicity

The cells status, expressed as Cell Index (CI) corresponding to cell number, the morphology and their adherence, was monitored using a real-time xCELLigence RTCA SP cell analyzer (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA) based on an electronic cell sensor, which measures changes in the electrical properties of cell—growth surface interactions. U87, U87-EGFP, C3A and C3A-EGFP cells were plated in an RTCA SP 96-well microplate (1×10^4 U87 cells per well and 3×10^4 C3A cells per well) and left at room temperature for 30 min to allow cell attachment. Then, the plates were transferred into the RTCA SP instrument and incubated for 5 (U87 and U87-EGFP) or 18 h (C3A and C3A-EGFP). The cell numbers that allowed optimum growth over the entire incubation period were determined for every cell line in the pilot experiments. Next, both types of cells were incubated in culture medium containing ND and NG at concentrations of 20, 50 and 100 µg/mL. Cells cultured in a medium without the addition of ND and NG were used as a control. The background CI measured in the medium containing only NPs was at level 0. The CI was monitored for 2 h with a sampling time of 1 min. RTCA software (ACEA) was used for data acquisition and analysis.

Cell proliferation

Cell proliferation was evaluated using a Cell Proliferation ELISA BrdU kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany). U87, U87-EGFP, C3A and C3A-EGFP cells were plated in a 96-well microplate (5×10^3 U87 cells per well and 3×10^4 C3A cells per well) and incubated for 24 h. Then, the medium was removed and the cells were incubated with ND and NG at concentrations of 20, 50 and 100 µg/mL. A BrdU reagent was added to each well and incubated for a further 4 h. Further steps were performed according to the Roche Diagnostics protocol. The absorbance was

measured at 450 nm using a microplate reader (Infinite M200, Tecan, Durham, NC, USA). Cell proliferation (I_{CP}) was expressed as a ratio of relative optical density for tested samples ($OD_{test}-OD_{blank}$) to relative optical density for the control sample ($OD_{control}-OD_{blank}$), both relative values were calculated versus the optical density for the blank, Equation (2):

$$I_{CP} = (OD_{test} - OD_{blank}) / (OD_{control} - OD_{blank})$$
⁽²⁾

Albumin production

The concentration of human serum albumin secreted by the C3A and C3A-EGFP cells was measured using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a quantitation kit (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA) and a microplate reader (Synergy HT, BioTek). C3A and C3A-EGFP cells were plated in 96-well plates (3×10^4 cells per well) and incubated for 24 h. Then, the cells were further incubated for 24 h with ND and NG at concentrations of 20, 50 and 100 µg/mL. Cells cultured in a medium without the addition of ND and NG were used as a control. The amount of albumin was expressed in nanograms per 1×10^4 C3A and C3A-EGFP cells.

Statistical analysis

Data were analyzed using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) with Statgraphics Plus 4.1 (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, USA). A *P*-value that was lower than 0.05 was considered to be statistically significant. The differences between the groups were analyzed using Duncan's multiple range test. The results are presented as the mean values with the standard errors for each variable.

Results

Analysis of cell morphology

The morphology of the tumor cell lines was analyzed using an inverted fluorescence microscope 2 and 24 h after exposure to ND and NG. Regardless of the incubation time, we did not observe any differences in cell morphology compared to the nontreated cells. The NPs appeared on the bright field microphotographs as black dots, aggregated inside the cells or on the cells surface (Fig 2).

Comparison of cell viability

The viability of the tested tumor cell lines was evaluated using the MTT assay. The glioblastoma cells treated for 2 h with NG at all concentrations showed significantly lowered metabolic activity, by $28.3 \pm 5.9\%$ for U87 and $19.3 \pm 6.4\%$ for U87-EGFP when compared to the control (Fig 3A). A significantly decreased cell viability, by $32.5 \pm 9.1\%$ for U87 and $34.4 \pm 7.8\%$ for U87-EGFP, was also noticeable after 24 h of exposure to the NG-containing medium (Fig 3C).

For the hepatoma cell line, we did not observe any significant differences in metabolic activity after either 2 or 24 h of exposure, despite the small decrease by $4.7 \pm 1.5\%$ in C3A-EGFP after 2 h exposure to NG at a concentration of 20 µg/mL (Fig 3B; Fig 3D). Analysis of the effect of different ND concentrations on the studied tumor cell lines, U87 and C3A, did not show any negative impact on the cell viability after exposure for 2 or 24 h (Fig 3).

To exclude a possible negative impact of fluorescent protein expression on the metabolic activity in the transduced cells, one-way ANOVA using Duncan's test, was performed for the control groups (nontreated cells) at two time points (2 and 24 h). We did not observe any



Fig 2. Glioblastoma and hepatoma cells morphology. U87, U87-EGFP, C3A and C3A-EGFP cells morphology after 2 h exposure to medium containing nanoparticles at the highest concentration: graphite 100 μg/mL (NG 100) and diamond 100 μg/mL (ND 100), nontreated cells were used as a control (Control). Analysis of the cells morphology was performed using an inverted fluorescence microscope. Images of the labeled cells, U87-EGFP and C3A-EGFP, were captured using a green fluorescence filter. Scale bar: 200 μm.

PLOS ONE



Fig 3. MTT test analysis. U87, U87-EGFP, C3A and C3A-EGFP cells metabolic analysis was performed after 2 and 24 h of exposure to the culture medium containing nanoparticles at different concentrations: diamond 20 μ g/mL (ND 20), 50 μ g/mL (ND 50) and 100 μ g/mL (ND 100), and graphite 20 μ g/mL (NG 20), 50 μ g/mL (NG 50) and 100 μ g/mL (NG 100); nontreated cells were used as a control (Control). Metabolic activity of cells, expressed as I_{CV} , after 2 h of exposure to the culture medium with the above-mentioned different concentrations of diamond and graphite nanoparticles: U87 and U87-EGFP (**A**), and C3A and C3A-EGFP (**B**); and after 24 h of exposure to the culture medium with above-mentioned different concentrations of diamond and graphite nanoparticles: U87 and U87-EGFP (**A**), and C3A and C3A-EGFP (**B**); and after 24 h of exposure to the culture medium with above-mentioned different concentrations of diamond and graphite nanoparticles: U87 and U87-EGFP (**C**), and C3A and C3A-EGFP (**D**). Data analysis was carried out by two-way ANOVA and the differences between the groups were tested by Duncan's test. Data were averaged from three replicates (n = 3); P < 0.05. No significant interaction (nanoparticles with transduction) was observed.

PLOS ONE

statistically significant differences between the genetically modified and unlabeled cells (P>0.994 for glioblastoma cells and P>0.985 for hepatoma cells). To determine the potential impact of fluorescent protein production on the cells, a series of experiments was performed. In general, no significant alterations in cell morphology or physiology were observed (compare Figs 2–6).

Cytotoxicity

Cytotoxicity of the graphite nanoparticles. Among the four groups of cells tested, only unlabeled U87 showed a significant CI decrease (by 22.3%) after 2 h of exposure to a medium containing NG at a concentration of 100 μ g/mL (Fig 4A; dark blue line). Interestingly, when the hepatoma cells were incubated in the culture medium with the highest concentration of NG we observed a CI increase for both C3A and C3A-EGFP cells after 1 h (8 and 12%, respectively) and 2 h of exposure (24 and 28%, respectively) with respect to the CI values measured before the addition of NG (Fig 4A; Fig 4B; dark red and dark green lines, respectively).

Cytotoxicity of the diamond nanoparticles. Data from our experiments showed that ND had a broader spectrum of activity, yet it had lower cytotoxicity in the U87 cells compared to NG. After 1 h of exposure, we observed a statistically significant, approximate 10% decrease in





Fig 4. Glioblastoma and hepatoma cells status (CI). U87, U87-EGFP, C3A and C3A-EGFP CI monitored by a real-time cell analyzer (RTCA) after 1 and 2 h of exposure to the culture medium containing graphite and diamond nanoparticles at different concentrations: diamond 20 μ g/mL (ND 20), 50 μ g/mL (ND 50) and 100 μ g/mL (ND 100), and graphite 20 μ g/mL (NG 20), 50 μ g/mL (NG 50) and 100 μ g/mL (NG 100); nontreated cells were used as a control (NT). **(A)** U87 (blue lines) and C3A cells (red lines) treated with graphite (NG) after 1 h (vertical blue marker line) and 2 h (vertical red marker line) and control (vertical green marker line); **(B)** U87-EGFP cells (violet lines) and C3A-EGFP cells (green lines) treated with graphite after 1 h (vertical blue marker line); **(B)** U87-EGFP cells (violet lines) and C3A-EGFP cells (green marker line); **(C)** U87 (blue lines) and C3A cells (red lines) treated marker line) and 2 h (vertical red marker line) and control (vertical green marker line); **(C)** U87 (blue lines) and C3A cells (red lines) and C3A-EGFP cells (green lines) treated with diamond (ND) after 1 h (vertical blue marker line); **(D)** U87-EGFP cells (violet lines) and C3A-EGFP cells (green lines) treated with diamond (ND) after 1 h (vertical blue marker line); **(D)** U87-EGFP cells (violet lines) and C3A-EGFP cells (green lines) treated with diamond (ND) after 1 h (vertical blue marker line); **(D)** U87-EGFP cells (violet lines) and C3A-EGFP cells (green lines) treated with diamond (ND) after 1 h (vertical blue marker line); **(D)** U87-EGFP cells (violet lines) and C3A-EGFP cells (green lines) treated with diamond (ND) after 1 h (vertical blue marker line) and 2 h (vertical red marker line) and 2 h (vertical red marker line). Data analysis was carried out by two-way ANOVA and the differences between the groups were tested by Duncan's test. Data were averaged from three replicates (n = 3); P < 0.05. No significant interaction (nanoparticles with transduction) was observed.

CI for U87 at 50 μ g/mL and 100 μ g/mL, and a 7.3% decrease at the highest concentration for U87-EGFP cells (Fig 4C; Fig 4D; blue/dark blue and dark violet lines, respectively). When the same cells were treated with medium containing ND for 2 h, a cytotoxic effect was only observed in nontransduced U87 cells (Fig 4C; blue and dark blue lines).



Fig 5. BrdU incorporation test. U87, U87-EGFP, C3A and C3A-EGFP cells proliferation (expressed as I_{CP}) analysis was performed 24 h after treatment with the culture medium containing nanoparticles at different concentrations: diamond 20 µg/mL (ND 20), 50 µg/mL (ND 50) and 100 µg/mL (ND 100), and graphite 20 µg/mL (NG 20), 50 µg/mL (NG 50) and 100 µg/mL (NG 100); nontreated cells were used as a control (Control). (**A**) U87 and U87-EGFP cells and (**B**) C3A and C3A-EGFP cells after 24 h of exposure to the medium with different concentrations of diamond and graphite nanoparticles. Data analysis was carried out by two-way ANOVA and the differences between the groups were tested by Duncan's test. Data were averaged from three replicates (n = 3); P < 0.05. We observed significant interactions (nanoparticles with transduction) in glioblastoma cells (P = 0.0001).

doi:10.1371/journal.pone.0122579.g005





Fig 6. Human serum albumin concentration in culture medium. Albumin secreted by the C3A and C3A-EGFP cells treated for 24 h with the culture medium containing nanoparticles at different concentrations measured by ELISA test: diamond 20 μ g/mL (ND 20), 50 μ g/mL (ND 50) and 100 μ g/mL (ND 100), and graphite 20 μ g/mL (NG 20), 50 μ g/mL (NG 50) and 100 μ g/mL (NG 100). Albumin secretion by cells after 24 h exposure to the medium with different concentrations of diamond and graphite nanoparticles: (**A**) C3A cells and (**B**) C3A-EGFP cells. Nontreated cells were used as a control (Control). Data were analyzed using a two-way ANOVA with the Duncan's test. Data were averaged from three replicates (n = 3); *P* < 0.05. No significant interaction (nanoparticles with transduction) was observed.

PLOS ONE

The impact of ND on the CI of the hepatoma cells was similar to that observed for NG. The CI increased for C3A and C3A-EGFP after 1 h of exposure to all culture medium containing ND at different concentrations (Fig 4C; Fig 4D; all red and all green lines, respectively). Moreover, when C3A and C3A-EGFP cells were treated with ND for 2 h, a significant growth in the CI was observed at all concentrations. On the other hand, the largest increase, by about 24% for C3A and 32% for C3A-EGFP, was noticed at the highest concentration of ND (Fig 4C; Fig 4D; dark red and dark green lines, respectively).

Cell proliferation

The proliferative potential of the studied tumor cell lines was evaluated using the BrdU incorporation test. Glioblastoma cells, both unlabeled and EGFP-positive, treated for 24 h with the culture medium containing NG at concentrations 50 and 100 µg/mL showed significantly retarded cell proliferation, expressed as I_{CP} , when compared to the control, by about 38% on average (Fig 5A). For the hepatoma cell lines, we observed a significant increase in I_{CP} after 24 h of exposure to ND at a concentration of 50 µg/mL and to medium containing NG at all concentrations, when compared to the control, by about 31% on average (Fig 5B). Based on a one-way ANOVA with the Duncan's test, no statistically significant differences between transduced and nontransduced cells, of both U87 and C3A, were observed.

Comparison of human serum albumin secretion

To test the liver cell function specifically, the amounts of albumin secreted by C3A and C3A-EGFP cells treated for 24 h with the culture medium containing ND or NG at different concentrations (20, 50 and 100 µg/mL) were determined by the ELISA test. Data showed that, when compared to the control (nontreated cells), the presence of NPs in culture medium significantly lowered the synthesis of the protein in both types of the human hepatoma cells (n = 3; P<0.05) (Fig 6A; Fig 6B). The cells treated with ND secreted, on average, about 34 and 17% less albumin for C3A and C3A-EGFP, respectively. In the case in which hepatoma cells

were exposed to NG, albumin secretion was lower by the same values in C3A and C3A-EGFP cells when compared to the control.

Discussion

In this study, for the first time, the potential toxicity of ND and NG in nontransduced and EGFP-expressing glioblastoma and hepatoma cells was evaluated. Earlier reports have shown a constant improvement in the biosafety of the nanoparticles [17,18]. It has also been demonstrated that ND is practically nontoxic to many type of cells, such as human cervical cancer cell line (HeLa), mouse pre-adipocyte (3T3-L1) and osteoprogenitor cell line (489-2) [19], as well as human red blood cells [20] and neuroblastoma cells [3]. Thus, ND could potentially be the part of a drug-delivery system. Herein, we confirmed these observations. In contrast, despite the similar composition of NG and ND, NG is in fact toxic to glioblastoma cells at concentrations ranging from 20 to 100 µg/mL. Interestingly, neither ND nor NG affected the morphology or viability of hepatoma cells. It is an interesting result in terms of using C3A cells as a model of human liver cells in this study. The drug delivery vehicles must be characterized by high biocompatibility and low risk of liver tissue damage. Hepatocytes in the liver, owing to their biotransformation properties, should not be exposed to any toxic xenobiotics. Moreover, we did not observe any significant differences between the performance of both nontransduced and EGFP-expressing U87 and C3A cell lines. Our results support the idea that stable fluorescent cell lines can be employed in cytotoxicity tests as well as their nontransduced counterparts.

We did not observe any significant differences in morphology of U87 or C3A cells after 2 and 24 h of culturing in a medium with NG and ND. The NPs formed aggregates inside or outside the cells, but did not affect their structure. The mechanism of NPs internalization by cells is not completely understood. The main features affecting this process are as follow: NPs size, charge, shape and type of both NPs and cells [21-24]. From the present measurements, it is not possible to conclude whether the NPs entered the cells or were agglomerated on the cell surface. It has been suggested that NPs do not enter the cells [25], however, it was also demonstrated that NPs could be absorbed into the cells either through endocytosis [26,27] or phagocytosis [28,29]. The exemplary mechanism described by Wang et al. in 2011 [30] was based on endocytosis. The authors observed graphene oxide (GO) particles inside human fibroblasts (HDF), mainly located in the cytoplasm, lysosomes, mitochondrion and endoplasm. The amounts of GO inside the fibroblasts gradually increased during the culture period. The authors have suggested following mechanism: GO attachment to the surface of the cells \rightarrow signal transduction to the nucleus \rightarrow down-regulation of adhesive proteins' synthesis \rightarrow detachment, floating, and shrinking of the cells \rightarrow GO enter into the cytoplasm (endocytosis) \rightarrow disturbances in cell energy metabolism, gene transcription and translation \rightarrow cell death. In turn, Panessa-Warren et al. [31] showed that direct contact between carbon NPs and plasma membrane led to its focal dissolution, allowing small nanoparticles to enter the cytosol and, ultimately, the nucleus. The NPs entered the colon and lung cells on the mechanism independent of the phagocytosis and freely traveled within cytoplasm.

Some authors have reported that carbon NPs could cause the fluorescence quenching, however, in our case, this effect was not so clear. Wang et al. [32] showed that graphene microsheets derived from chemically reduced graphitic oxide (rGO) could effectively decrease the fluorescence intensity in the process that was linearly dependent on the concentration of rGO. Singh et al. [33] compared carbon nanotubes and their capabilities as quencher agents for different fluorophores. Their results showed that the quenching efficiency depends on both the type of NPs and the fluorophores used, and can reach almost 100%. We could not confirm these observations for ND or NG.

The MTT cell viability test demonstrated that NG, at concentrations from 20 to 100 µg/mL, decreased the viability of glioblastoma cells, both nontransduced and EGFP-positive, but did not affect labeled and unlabeled hepatoma cells. There is currently little empirical evidence on cytotoxicity of graphite nanoparticles. Graphite toxicity was not confirmed in rodent lungs after inhalation [34,35], but *in vitro* experiments with some forms of graphite NPs demonstrated differential effects or lack of toxicity depending on various factors: NPs preparation process, size, type of cells, etc. [25,28,30,36,37]. We can speculate that in our experiments observed cytotoxic effect of NG, when compared to ND, may result from the presence of highly reactive dangling carbon bonds on its surface. Interestingly, also here this effect is cell-dependent. To confirm this hypothesis a more detailed chemical and physical analysis of these NPs must be performed. Especially, when biological activity of nanomaterials from different studies is compared, deepened characterization of NPs chemical composition, purity, size distribution, shape and aggregation, surface reactivity, etc. is required. Additionally, since the effects of NPs exposure depend on the target cell type, the understanding of differences between cell membrane structure, function and physiology must be taken into consideration in the assessment of NPs safety.

ND and NG used in our experiments have different zeta potentials. This can suggest that NG, in opposite to ND, is positively charged. Tatur et al. [38] have recently shown that gold NPs functionalized with cationic head groups, in contrast to the NPs functionalized with anionic head groups, penetrated into the hydrophobic moiety of the lipid bilayers and caused membrane disruption at an increased concentration. However, we do not know the real surface charge of our NPs in culture medium. Another factor that may contribute to the NG cytotoxicity in glioblastoma cells is an aggregation of the NPs. NG has higher PDI value than ND and its tendency to aggregate was confirmed by the TEM images.

However, results from experiments that employed graphene to study cytotoxicity are currently available. To some extent, the chemical properties of graphene are similar to those of graphite, owing to the fact that, in both cases, C-atoms are sp² hybridized. Jaworski et al. [39] published their work on the influence of graphene platelets on the morphology, mortality, viability, membrane integrity and type of cell death. Our studies on graphite partially confirmed their results in the case of the MTT test and morphology observations of glioblastoma cells treated with graphene. Both graphene and NG decrease the viability of glioblastoma cells and form agglomerates on the cells surface or inside the cells. On the other hand, the metabolic activity level was not lowered in hepatoma cells after incubation with NG. Lammel et al. [40] tested the cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene NPs on hepatoma cells (HepG2). They observed cytotoxic effects such as plasma membrane damage, cell proliferation inhibition and cell death. Nevertheless, the total protein measurement remained unchanged. Another group worked on HepG2 and graphitic nanomaterials (graphene oxide and single-walled carbon nanotubes—SWCNTs), and concluded that graphene had only a moderate effect on the cellular functions when compared to SWCNTs and did not induce apoptosis based on the protein profile [41].

Using ND at concentrations from 20 to 100 μ g/mL did not have any negative effect on glioblastoma and hepatoma cells, both nontransduced and EGFP-positive. The cytotoxicity of ND at different concentrations and in different cell types has been discussed in many published articles. Studies of short-term exposure to medium containing ND did not show any significant influence on neuroblastoma, macrophage, keratinocyte [3,42], or hepatoma [43] cells. Some authors suggest that ND after internalization persists nonreactive inside the cell, i.e., in the cytoplasm, and does not harm mitochondria and other organelles [3].

Analysis of the MTT results also revealed an interesting contrast in behavior between nontransduced and EGFP-positive cells. After 2 h of incubation with ND and NG, U87 cells behaved significantly differently to U87-EGFP cells. We observed a small (about 15%), yet significant (P<0.05), increase in U87-EGFP cell viability after 2 h of ND exposure at all concentrations. The effect had gone after 24 h. No significant interaction between transduced and nontranduced U87 and C3A cells was observed. We are not able to explain this EGFP-protective phenomenon and we only can hypothesize about some possible interactions between EGFP folding and the NPs. De et al. [44] demonstrated protein refolding through electrostatic interactions after the addition of gold NPs.

The CI represents the status of the cells based on changes in their electrical properties. We analyzed the results obtained for cells cultured for 1 and 2 h after the addition of NPs. The CI in glioblastoma cells decreased after 2 h of incubation with 100 μ g/mL NG and after 1 and 2 h of incubation with 50 and 100 μ g/mL ND. We did not observe a CI decrease in U87-EGFP cells, except for after 1 h incubation with 50 and 100 μ g/mL ND. These results confirm the data obtained from the MTT test, whereby U87-EGFP cells were more viable than nontransduced cells. The opposite situation was observed in hepatoma cells, when the CI increased after incubation with the highest concentration of NG and ND in nontransduced as well as in EGFP-positive cells.

The BrdU incorporation test quantitatively measures a cells proliferative potential. The impact of the NPs on glioblastoma and hepatoma cells was different, but consistent with MTT and RTCA tests results. Notably, the presence of both ND and NG increased the number of hepatoma cells in S-phase. Glioblastoma cells reacted differently to NPs, and with NG at concentrations of 50 and 100 μ g/mL, the number of proliferating cells was lowered. Duan et al. [45] performed a series of experiments on human endothelial cells and silica NPs, and found a significant decrease in the S-phase population after NPs treatment. On the other hand, in their previous report, they showed that silica NPs damaged HepG2 cells through ROS production, but the level of cells in S-phase was higher than in the control groups [46].

Based on data from the MTT test, the CI values and the BrdU incorporation test, we can conclude that NG reduced the viability, adherence and proliferation of U87 cells, but did not affect the hepatoma cells. The only observed negative effect of ND was the adherence reduction in glioblastoma cells. Instead, this type of carbon nanomaterial increased viability, adherence and proliferation of hepatoma cells, which supports our hypothesis that ND fits the requirements for the nontoxic drug carriers.

Albumin, the typical protein synthesized by hepatocytes, serves as a popular indicator of changes in hepatoma cell physiology. A reduction in albumin production in C3A cells under stress conditions, i.e., in the presence of the NG and ND at concentrations ranging from 20 to 100 µg/mL, was more prominent in nontransduced cells than in EGFP-positive cells (ELISA test). Bakowicz-Mitura et al. [47] published their study about the influence of diamond powder on human gene expression. The authors found that, despite high biocompatibility and low cytotoxicity, ND had a high molecular activity and could change the expression of genes responsible for cancer. Wierzbicki et al. [5] confirmed that ND and NG can control gene expression. The authors measured mRNA levels of basic Fibroblast Growth Factor (bFGH) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in heart samples following NPs exposure. The levels of bFGH decreased, whereas the levels of VEGF were unchanged. Yuan et al. [48] published an article about the influence of the ZnO NPs on HepG2 cells. This type of NPs caused, in addition to mitochondrial dysfunction, changes in apoptosis-related proteins expression, e.g.: p-Akt, FOXO4, p-ERK, and p-JNK.

Conclusions

In this study, we confirmed the toxicity of NG to glioblastoma (U87) cells and showed some positive impact of ND and NG on hepatoma (C3A) cells. However, we observed impaired

albumin secretion by C3A cells in the presence of both ND and NG. We did not observe any notable differences between the morphology, viability and physiology of nontransduced and EGFP-expressing cells. Moreover, in some experiments, cells expressing the fluorescent marker had an advantage over their nonlabeled counterparts. We observed higher values of CI in EGFP-expressing glioblastoma cells than in nontransduced cells after NG and ND treatment. Additionally, the albumin level after NG and ND treatment in EGFP-expressing hepatoma cells was higher with respect to nontransduced cells.

Analysis of the results of potential cytotoxicity of the carbon-based NPs in U87 and C3A cells demonstrated their differential interactions and advantages, depending on the cell type. However, more research on physicochemical characteristics of these NPs is needed before firm conclusions can be drawn.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KEZ AS MW ES DGP KDP. Performed the experiments: KEZ AS MW SJ MK. Analyzed the data: KEZ AS MW SJ ES AC KDP. Contributed reagents/materials/analysis tools: MW ES DGP KDP. Wrote the paper: KEZ AS MW ES AC DGP KDP. Obtained the approval for research on human cell lines modified by lentiviral vectors: KDP.

References

- Mundra RV, Wu X, Sauer J, Dorodick JS, Kane RS. Nanotubes in biological applications. Curr Opin Biotechnol. 2013; 28C: 25–32.
- Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Biointerphase. 2007; 2: MR17–MR172 PMID: <u>20419892</u>
- Shrand AM, Huang H, Carlson C, Schlager JJ, Osawa E, Hussain SM, et al. Are Diamond Nanoparticles Cytotoxic? J Phys Chem B. 2007; 111: 2–7. PMID: <u>17201422</u>
- Eriksson C, Nygren H. The initial reactions of graphite and gold with blond. J Biomed Mater Res. 1997; 37: 130–136. PMID: <u>9335358</u>
- Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M, Hotowy A, Prasek M, Jaworski S, et al. Carbon nanoparticles downregulate expression of basic Fibroblast Growth Factor in the heart during embryogenesis. Int J Nanomedicine. 2013; 8: 3427–3435. doi: <u>10.2147/JJN.S49745</u> PMID: <u>24039425</u>
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013. Available: <u>http://globocan.iarc.fr</u>. Accessed 5 March 2014.
- Baudoin R, Griscom L, Prot JM, Legallais C, Leclerc E. Behaviour of HepG2/C3A cell cultures in a microfluidic bioreactor. Biohem Eng J. 2011; 53: 172–181.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferley J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. CA Cancer J Clin. 2011; 61: 69–90. doi: <u>10.3322/caac.20107</u> PMID: <u>21296855</u>
- Graf D, Vallbohmer D, Knoefel WT. Multimodal treatment of hepatocellular carcinoma. Eur J Inern Med. 2014; 25: 430–437. doi: <u>10.1016/j.ejim.2014.03.001</u> PMID: <u>24666568</u>
- Befeler AS, Bisceglie AM. Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Treatment. Gastroenterology. 2002; 122: 1609–1619. PMID: <u>12016426</u>
- Zhou Y, Zhou Y, Shingu T, Feng L, Chen Z, Ogasawara M, et al. Metabolic Alterations in Highly Tumorigenic Glioblastoma Cells. J Biol Chem. 2011; 286: 32843–32853. doi: <u>10.1074/jbc.M111.260935</u> PMID: <u>21795717</u>
- 12. Westmark B. Glioblastoma—a moving target. Ups J Med Sci. 2012; 117: 251–256. doi: <u>10.3109/</u> <u>03009734.2012.676574</u> PMID: <u>22512247</u>
- 13. Eisele G, Weller M. Targeting apoptosis pathways in glioblastoma. Cancer Lett. 2013; 332: 335–345. doi: 10.1016/j.canlet.2010.12.012 PMID: 21269762
- Samluk A, Zakrzewska KE, Pluta KD. Generation of fluorescently labeled cell lines, C3A hepatoma cells and human adult skin fibroblast, to study coculture models. Artif Organs. 2013; 37: E123–130. doi: 10.1111/aor.12064 PMID: 23581829

- 15. Baens M, Noels H, Broeckx V, Hagens S, Fevery S, Billiau AD, et al. The Dark Side of EGFP: Defective Polyubiquitination. PLoS One. 2006; 1: e54. PMID: 17183684
- Zakrzewska KE, Samluk A, Pluta KD, Pijanowska DG. Evaluation of the effects of antibiotics on cytotoxicity of EGFP and DsRed2 fluorescent proteins used for stable cell labeling. Acta Biochim Pol. 2014; 61: 809–813. PMID: <u>25379570</u>
- Lu X, Qian J, Zhou H, Gan Q, Tang W, Lu J, et al. In vitro cytotoxicity and induction of apoptosis by silica nanoparticles in human HepG2 hepatoma cells. Int J Nanomedicine. 2011; 6: 1889–1901. doi: <u>10.</u> 2147/IJN.S24005 PMID: 21931484
- Ding Y, Xiao C, Li Y, Cheng Y, Wang N, He C, et al. Efficacious hepatoma-targeted nanomedicine selfassembled from galactopeptide and doxorubicine driven by two-stage physical interactions. J Control Release. 2013; 169: 193–203. doi: <u>10.1016/j.jconrel.2012.12.006</u> PMID: <u>23247039</u>
- Vaijayanthimala V, Tzeng YK, Chang HC, Li CL. The biocompatibility of fluorescent nanodiamonds and their mechanism of cellular uptake. Nanotechnology. 2009; 20: 425103. doi: <u>10.1088/0957-4484/20/42/</u> <u>425103</u> PMID: <u>19779240</u>
- Lin YC, Tsai LW, Perevedentseva E, Chang HH, Lin CH, Sun DS, et al. The influence of nanodiamond on the oxygenation states and micro rheological properties of human red blood cells *in vitro*. J Biomed Opt. 2012; 17: 101512. doi: 10.1117/1.JBO.17.10.101512 PMID: 23223988
- Win KY, Feng SS. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. Biomaterials. 2005; 26: 2713–2722. PMID: <u>15585275</u>
- 22. Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. Int J Pharm. 2005; 298: 315–322. PMID: <u>15961266</u>
- Almofti MR, Harashima H, Shinohara Y, Almofti A, Li W, Kiwada H. Lipoplex size determines lipofection efficiency with or without serum. Mol Membr Biol. 2003; 20: 35–43. PMID: <u>12745924</u>
- Champion JA, Katare YK, Mitragotri S. Particle shape: a new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. J Control Release. 2007; 121: 3–9. PMID: <u>17544538</u>
- Chang Y, Yang ST, Liu JH Dong E, Wang Y, Cao A, et al. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. Toxicol Lett. 2011; 200: 201–210. doi: <u>10.1016/j.toxlet.2010.11.016</u> PMID: <u>21130147</u>
- Sanchez VC, Jachak A, Hurt RH, Kane AB. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. Chem Res Toxicol. 2012; 25: 15–34. doi: <u>10.1021/tx200339h</u> PMID: <u>21954945</u>
- Muro S, Cui X, Gajewski C, Murciano JC, Muzykantov VR, Koval M. Slow intracellular trafficking of catalase nanoparticles targeted to ICAM-1 protects endothelial cells from oxidative stress. Am J Physiol Cell Physiol. 2003; 285: C1339–1347. PMID: <u>12878488</u>
- Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Togna A, Togna G. Toxicity and Biocompatibility of carbon nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol. 2006; 6: 591–599. PMID: <u>16573109</u>
- Choi MR, Stanton-Maxey KJ, Stanley JK, Levin CS, Bardhan R, Akin D, et al. A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumor. Nano Lett. 2007; 7: 3759–3765. PMID: <u>17979310</u>
- 30. Wang K, Ruan J, Song H, Zhang J, Wo Y, Guo S, et al. Biocompatibility of Graphene Oxide. Nanoscale Res Lett. 2011; 6: 8.
- Panessa-Warren BJ, Warren JB, Wong SS, Misewich JA. Biological cellular response to carbon nanoparticle toxicity. J Phys Condens Matter. 2006; 18: S2185–S2201.
- Wang Y, Kurunthu D, Scott GW, Bardeen CJ. Fluorescence Quenching in Conjugated Polymers Blended with Reduced Graphitic Oxide. J Phys Chem C. 2010; 114: 4153–4159.
- Singh DK, Iyer PK, Giri PK. Role of molecular interactions and structural defects in the efficient fluorescencje quenching by carbon nanotubes. Carbon. 2012; 50: 4495–4505.
- Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. Toxicol Sci. 2004; 77: 117–125. PMID: <u>14514968</u>
- Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. Toxicol Sci. 2004; 77: 126–134. PMID: <u>14514958</u>
- Tian F, Cui D, Schwarz H, Estrada GG, Kobayashi H. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. Toxicol In Vitro. 2006; 20: 1202–1212. PMID: <u>16697548</u>
- **37.** De Nicola M, Gattia DM, Bellucci S, De Bellis G, Micciulla F, Pastore R, et al. Effect of different carbon nanotubes on cell viability and proliferation. J Phys Condens Matter. 2007; 19: 395013–395020.
- Tatur S, Maccarini M, Barker R, Nelson A, Fragneto G. Effect of functionalized gold nanoparticles on floating lipid bilayers. Langmuir. 2013; 29: 6606–6614. doi: <u>10.1021/la401074y</u> PMID: <u>23638939</u>
- 39. Jaworski S, Sawosz E, Grodzik M, Winnicka A, Prasek M, Wierzbicki M, et al. In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells. Int J Nanomedicine. 2013; 8: 413–420. doi: 10.2147/IJN.S39456 PMID: 23378763

- Lammel T, Boisseaux P, Fernandez-Cruz ML, Navas JM. Internalization and cytotoxicity of graphene oxoide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell Line HepG2. Part Fibre Toxicol. 2013; 10: 27. doi: 10.1186/1743-8977-10-27 PMID: 23849434
- Yuan J, Gao H, Ching CB. 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. 2011; 207: 213–221. doi: <u>10.1016/j.toxlet.2011.09.014</u> PMID: <u>21963432</u>
- Ai J, Bizar E, Jafarpour M, Montazeri M, Majdi A, Aminifard S, et al. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical desings. Int J Nanomedicine. 2011; 6: 1117–1127. doi: <u>10.2147/IJN.S16603</u> PMID: <u>21698080</u>
- Li Y, Tong Y, Cao R, Tian R, Yang B, Yang P. In vivo enhancement of anticancer therapy using bare or chemotherapeutic drug-bearing nanodiamond particles. Int J Nanomedicine. 2014; 9: 1065–1082. doi: <u>10.2147/IJN.S54864</u> PMID: <u>24591828</u>
- De M, Rotello VM. Synthetic "chaperones": nanoparticle-mediated refolding of thermally denatured protein. Chem Commin (Camb). 2008; 14: 3504–3506.
- Duan J, Yu Y, Li Y, Yu Y, Li Y, Zhou X, et al. Toxic Effect of Silica Nanoparticles on Endothelial Cells through DNA Damage Response via Chk1-Dependent G2/M Checkpoint. PloS One. 2013; 8: e62087. doi: <u>10.1371/journal.pone.0062087</u> PMID: <u>23620807</u>
- 46. Li Y, Sun L, Jin M, Du Z, Liu X, Guo C, et al. Size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. Toxicol In Vitro. 2011; 25: 1343–1352. doi: <u>10.1016/j.tiv.2011.05.003</u> PMID: <u>21575712</u>
- Bakowicz-Mitura K, Bartosz G, Mitura S. Influence of diamond powder particles on human gene expression. Surf Coat Technol. 2007; 201: 6131–6135.
- 48. Yuan L, Wang Y, Wang J, Xiao H, Liu X. Additive effect of zinc oxide nanoparticles and isoorientin on apoptosis in human hepatoma cell line. Toxicol Lett. 2014; 225: 294–304. doi: <u>10.1016/j.toxlet.2013.12.</u> 015 PMID: <u>24374571</u>

International Journal of Nanomedicine

a Open Access Full Text Article

ORIGINAL RESEARCH

Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion

This article was published in the following Dove Press journal: International Journal of Nanomedicine 4 October 2017 Number of times this article has been viewed

Mateusz Wierzbicki¹ Sławomir Jaworski¹ Marta Kutwin¹ Marta Grodzik¹ Barbara Strojny¹ Natalia Kurantowicz¹ Krzysztof Zdunek² Rafał Chodun² André Chwalibog³ Ewa Sawosz¹

¹Division of Nanobiotechnology, Warsaw University of Life Science, ²Faculty of Materials Science and Engineering, Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland; ³Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark

Correspondence: André Chwalibog University of Copenhagen, Groennegaardsvej 3, 1870 Frederiksberg, Denmark Tel +45 40 96 3573 Email ach@sund.ku.dk



Abstract: The highly invasive nature of glioblastoma is one of the most significant problems regarding the treatment of this tumor. Diamond nanoparticles (ND), graphite nanoparticles (NG), and graphene oxide nanoplatelets (nGO) have been explored for their biomedical applications, especially for drug delivery. The objective of this research was to assess changes in the adhesion, migration, and invasiveness of two glioblastoma cell lines, U87 and U118, after ND, NG, and nGO treatment. All treatments affected the cell surface structure, adhesion-dependent EGFR/AKT/mTOR, and β -catenin signaling pathways, decreasing the migration and invasiveness of both glioblastoma cell lines. The examined nanoparticles did not show strong toxicity but effectively deregulated cell migration. ND was effectively taken up by cells, whereas nGO and NG strongly interacted with the cell surface. These results indicate that nanoparticles could be used in biomedical applications as a low toxicity active compound for glioblastoma treatment. **Keywords:** diamond, graphene oxide, graphite, nanoparticles, glioblastoma, migration,

Keywords: diamond, graphene oxide, graphite, nanoparticles, glioblastoma, migration, invasiveness

Introduction

Glioblastoma is one of the most common malignant tumors of the central nervous system with an average life expectancy of only 6 months to 2 years.¹ This prognosis results from high tumor malignancy, an invasive phenotype, and the absence of an effective therapy. The ability of glioblastoma cells to undergo migration and invasion allows them to infiltrate brain tissue, while rarely undergoing extracranial metastasis.² Glioblastoma infiltrates surrounding brain tissue and therefore cannot be fully removed by surgical resection.

Cell motility is a process based on the dynamic properties of the actin cytoskeleton. Glioblastoma cells have a complex actin cytoskeleton-related cell surface morphology with abundant membrane folds, microvilli, and filopodia, which play a role in its invasive phenotype.³ Cell migration begins with polymerization of actin filaments and extending lamellipodia and filopodia protrusions of the cell membrane.⁴ Protrusions are stabilized by focal adhesions and actin cytoskeleton in the form of stress fibers. Adhesion of tumor cells to extracellular matrix and extracellular sensing plays an important role in cell motility.^{5,6} Migration of tumor cells is regulated by various signaling pathways, including the EGFR/AKT/mTOR and β -catenin signaling pathways.⁷ Activation of those signaling pathways is also important in promoting tumor development,

International Journal of Nanomedicine 2017:12 7241-7254

7241

© 2017 Wierzbicki et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at https://www.dovepress.com/terms.php hereby accept the Ferms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraph 4.2 and 5 of our Terms (https://www.dovepress.com/terms.php). metastasis, and resistance to cancer therapies.^{8,9} Glioblastoma tumors commonly have mutations in PTEN, which are the most common genetic changes found in human cancers.¹⁰ PTEN inhibits the AKT signaling pathway, thus glioblastoma cells that have mutations in PTEN show constant activation of EGFR/AKT/mTOR signaling pathway.¹¹

Carbon nanoparticles have been explored for biomedical applications and are considered a possible choice as a low toxicity tumor therapy or drug delivery strategy. Diamond nanoparticles (ND), graphite nanoparticles (NG), and graphene oxide nanoplatelets (nGO) are carbon allotropes that, although similar in size, have different physical properties. ND has carbon atoms in sp³ hybridization, whereas NG and nGO have carbon atoms in the sp² hexagonal pattern. However, nGO has a unique thickness to surface area ratio, which distinguishes this material from both ND and NG. Carbon nanoparticles can bind to the plasma membrane, where they can interfere with surface proteins, including receptors, and become endocytosed.¹²⁻¹⁶ This suggests that carbon nanoparticles, although not directly toxic, can influence cell activity. Despite low toxicity, ND have been shown to inhibit the growth of new blood vessels, hence reducing the development of glioblastoma tumors, 13,17,18 suggesting reduction of cell migration.

In the present study, we hypothesized that ND, NG, and nGO can change abilities of glioblastoma cells to adhere to extracellular matrix, decreasing migration and invasiveness. We investigated endocytosis of nanoparticles, cell ultrastructure, adhesion-dependent EGFR/AKT/mTOR, and β -catenin signaling of two glioblastoma cell lines, U87 and U118.

Materials and methods Nanomaterials

ND and NG were purchased from SkySpring Nanomaterials (Houston, TX, USA). nGO were obtained from the Institute of Electronic Materials Technology through a modified Hummers method from NG as previously described.¹⁹ The nanopowders were dispersed in ultrapure water to prepare a 1.0 mg/mL solution. Immediately prior to exposure to cells, hydrocolloids of nanoparticles were sonicated for 30 min and diluted to different concentrations with supplemented Dulbecco's Modified Eagle's culture Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Transmission electron microscopy (TEM) images of nanoparticles were acquired with a JEM-1220 microscope (JEOL, Tokyo, Japan) at 80 kV, with a Morada 11 megapixel camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany) (Figure S1). Samples were prepared by placing droplets of hydrocolloids onto formvar-coated copper grids (Agar Scientific Ltd, Stansted, UK) and air dried before observations.

Zeta potential measurements were carried out with Nano-ZS90 Zetasizer (Malvern Instruments, Malvern, UK) at 25°C, using the Smoluchowski approximation. Each sample was measured after 120 s of stabilization at 25°C (20 replicates). Hydrodynamic diameter of nanoparticles in water was measured with dynamic light scattering (DLS) using a Nano-ZS90 Zetasizer (Malvern).

Nanoparticles were examined by vibrational spectroscopy. Raman scattering was studied at 2.33 eV (532 nm visible [VIS] laser) for the NG and nGO powders. The ND powder was analyzed at 4.66 eV (266 nm ultraviolet [UV] laser) due to the strong fluorescence of ND in the VIS spectrum. An argon laser was used as the source of the VIS laser, whereas a Crylas FQCW266-50 diode pumped continuous wave solid-state laser (Berlin, Germany) was used as the source of UV. The scattered light was dispersed by a Jasco NRS 5100 (Easton, PA, USA) spectrometer working in backscattering mode. During the measurements, the laser beams were focused onto 10 µm spots. Nanoparticles were placed on a silicon substrate. For NG and nGO, spectral resolutions were fixed at 8.4 cm⁻¹ and 3.5 mW laser power. In the case of ND, the spectral resolution was fixed at 20 cm⁻¹ and 5 mW laser power. Figure S2 shows the registered Raman spectra of ND, and Figure S3 presents the comparison of the NG and nGO Raman spectra.

U87 and U118 glioblastoma cell lines

Human glioblastoma U87 and U118 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, USA) and maintained in DMEM (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% $CO_2/95\%$ air in an NuAire DH AutoFlow CO_2 Air-Jacketed Incubator (Plymouth, MA, USA).

Cell morphology

Scanning electron microscopy (SEM) observations of the U87 or U118 glioblastoma cells were done using a Quanta 200 microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA). U87 or U118 glioblastoma cells were seeded in 35 mm diameter Petri dishes (1×10^5 cells per well). After 24 h, ND, NG, or nGO were introduced to the cells at a concentration of 20 µg/mL. Preparation of the cells for SEM observation was done after 24 h of exposure to nanoparticles in accordance with the

protocol of Heckman et al.²⁰ Cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) 7.2 pH, contrasted with 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) and 1% carbohydrazide (Sigma-Aldrich). Subsequently, cells were dehydrated in increasing concentrations of hexylene glycol (Sigma-Aldrich). Drying was performed using a Polaron CPD 7501 critical point dryer (Quorum Technologies, Laughton, UK).

TEM analysis

Glioblastoma cell ultrastructure was assessed by TEM using a JEM-1220 microscope (JEOL) at 80 kV, with a Morada 11 megapixel camera (Olympus Soft Imaging Solutions). U87 or U118 glioblastoma cells were seeded in 75 cm² cell culture flasks (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After 24 h, ND, NG, or nGO were introduced to cells at a concentration of 20 µg/mL. After 24 h of incubation, the cells were trypsinized, washed with PBS (Sigma-Aldrich), centrifuged for 5 min at 1,200 rpm, and fixed in a 2.5% solution of glutaraldehyde in PBS 7.2 pH (Sigma-Aldrich). Pellets were contrasted in 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich) and dehydrated in increasing concentrations of ethanol (Sigma-Aldrich). Subsequently, pellets were impregnated with epoxy embedding resin (Epoxy Embedding Kit, Sigma-Aldrich). The next day, samples were embedded in the same resin and hardened for 24 h at 36°C and incubated at 60°C for another 24 h. The blocks were cut into ultrathin sections (50-80 nm) using an ultramicrotome (LKB Ultratome III, Croydon, UK) and transferred onto copper grids, 200 meshes (Agar Scientific Ltd). Subsequently, the sections were contrasted using uranyl acetate (Sigma-Aldrich) and lead citrate (Sigma-Aldrich).

Cell viability using the XTT assay

Cell viability was evaluated using an XTT-based cell proliferation assay kit (Sigma-Aldrich). U87 and U118 cells were plated in 96-well plates (5×10^3 cells per well) and incubated for 24 h. Then, new medium containing ND, NG, or nGO was introduced to the cells at concentrations of 5, 20, 50, 100, and 200 µg/mL. XTT solution was added to each well and incubated for an additional 3 h at 37°C. The absorbance of each well was recorded at 450 nm using a Tecan Infinite 200 microplate reader (Tecan, Durham, USA). Cell viability after nanoparticle treatment was expressed as the percentage compared to the absorbance of control samples.

Migration assay

The migration of U87 and U118 cells was assessed using the cell exclusion zone assay. Cells were cultured in six-well plates with a rectangular silicone attachment (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) $(1 \times 10^5$ cells per well). After cells reached confluence, new medium containing ND, NG, or nGO at a concentration of 50 µg/mL was introduced to the cells. After 1 h of incubation, the silicone attachment was removed, and cells initiated migration. Images were taken immediately after silicone attachment removal (0 h time point) and after 48 h. Cell migration was analyzed after 48 h with an inverted microscope (Olympus Soft Imaging Solutions). The area of migration was calculated using ImageJ 1.48.²¹ All experiments were repeated at least three times.

Invasion assay

The invasiveness of U87 and U118 cells was determined by counting the number of cells that invaded through collagencoated (Sigma-Aldrich) Transwell inserts (BD Biosciences). Cells were trypsinized, washed twice, and suspended in serum-free medium. 5×10^4 cells were seeded in the Transwell inserts. After cells adhered to the Transwell insert, medium containing ND, NG, or nGO at a concentration of 50 µg/mL was introduced to the cells. Medium with 10% FBS (Thermo Fisher Scientific) was added to the lower chamber as a chemoattractant. Cells that passed through the filters into the lower part of Transwell inserts were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich). Cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Thermo Fisher Scientific) and counted in 10 fields of view under 100× magnification with an inverted confocal microscope FV-1000 (Olympus Soft Imaging Solutions). The experiments were repeated at least three times.

Adhesion assay

The adhesion of U87 and U118 cells in time points was determined using fluorescent microplate test. 96-well plates were coated with Geltrex Matrix (Thermo Fisher Scientific). Each well was coated with 100 µL Geltrex Matrix diluted to a final concentration of 1 mg/mL in DMEM without FBS. Plates were incubated for 1 h in 37°C, and Geltrex Matrix solution was aspirated and plates were air-dried. U87 and U118 cells were labeled using fluorescent kit - CytoPainter Cell Tracking Staining Kit - Green Fluorescence (Abcam). Before addition to wells, cells were treated with ND, NG, or nGO at a final concentration of 20 µg/mL in DMEM with 10% FBS for 30 min. After incubation 1.5×10^4 cells were added per well and after 15, 30, 60, and 120 min wells were gently washed three times with PBS. The intensity of fluorescence was read at excitation/emission =490/520 nm on a Tecan Infinite 200 microplate reader. Experiments were repeated two times.

Sample preparation for protein analysis

ND, NG, or nGO were introduced to cells at a concentration of 20 µg/mL and incubated for 24 h. Cells not treated with nanoparticles were used as the control. Cells were washed twice with PBS and harvested by centrifugation $(200 \times g \text{ for})$ 6 min at 4°C). Whole-cell protein extracts were prepared by suspending cells in ice-cold radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer with protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). The cells were incubated for 40 min on ice with vortexing at 10 min intervals followed by centrifugation for 30 min at 14,000 \times g at 4°C and collection of supernatant. Cytoplasmic and nuclear fractions were obtained by suspending cells in hypotonic buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂), followed by addition of Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) to a final concentration of 0.5% with protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich) and vortexing for 10 s. Supernatant of homogenate (cytoplasmic fraction) was collected after centrifugation for 10 min at 3,000 rpm at 4°C. Pellet (nuclear fraction) was resuspended in ice-cold RIPA buffer with protease and phosphatase inhibitors, incubated 30 min on ice with vortexing at 10 min intervals. Supernatant of homogenate (nuclear fraction) was collected after centrifugation for 30 min at $14,000 \times g$ at 4°C. Protein concentration was determined by the Bicinchoninic Acid Kit (Sigma-Aldrich).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis

Levels of mTOR (pSer2448) and AKT (pS473) phosphorylation were assayed by ELISA using ab176657 and ab168538 kits (Abcam, Cambridge, UK). The results were normalized to the total protein content determined by the Bicinchoninic Acid Kit (Sigma-Aldrich). Protein concentrations were measured in accordance with the manufacturer's instructions using lysates containing 100 μ g/mL of total protein. A standard curve was made for each assay using serial dilutions of the control lysates. All experiments were repeated twice, using cell extracts from three separate experiments.

Western blot analysis

An equal volume of samples was denatured with sample buffer containing beta-mercaptoethanol (Bio-Rad) and 5 min boiling. Proteins were resolved under reductive conditions with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes using the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% non-fat milk (Bio-Rad) in PBS for 60 min. Membranes were then incubated with primary antibodies in PBS with 5% non-fat milk or for detection of phosphorylated proteins with 1% BSA (Sigma-Aldrich) at $4^{\circ}C$ overnight.

The following primary antibodies were used: vinculin monoclonal antibody, Thermo Fisher Scientific, 700062; N-cadherin monoclonal antibody, Thermo Fisher Scientific, MA1-159; pan-cadherin polyclonal antibody, Thermo Fisher Scientific, 71-7100; beta catenin polyclonal antibody, Thermo Fisher Scientific, PA5-19469; EGFR polyclonal antibody, Thermo Fisher Scientific, PA1-1110; phospho-EGFR monoclonal antibody pTyr1173, Thermo Fisher Scientific, MA5-15158; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) monoclonal antibody, Thermo Fisher Scientific, MA5-15738; B-tubulin monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA, Sc-5274. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) monoclonal antibody, Thermo Fisher Scientific, 13-3900. The secondary antibody (goat anti-mouse WesternDot 625 or goat anti-rabbit WesternDot 625) diluted 1:500 was incubated with the membrane in PBS with 5% non-fat dry milk for 1 h at room temperature. GAPDH was used as a loading control for whole-cell lysate, whereas β -tubulin and PCNA were used as a loading control for cytoplasmic and nuclear fractions, respectively. Membranes were visualized using a GelDoc imaging system (Bio-Rad). Quantification and background correction were carried out using ImageJ 1.48.21

Cytoskeleton analysis

Cells were grown on glass bottom 35 mm² dishes coated with Geltrex Matrix (Thermo Fisher Scientific). Each dish was coated with 500 μ L Geltrex Matrix diluted to a final concentration of 1 mg/mL in DMEM without FBS. Plates were incubated for 1 h in 37°C and Geltrex Matrix solution was aspirated and dishes were air-dried (Nest Scientific, Rahway, NJ, USA). After 24 h of incubation, cells were treated with ND, NG, or nGO nanoparticles at the concentration of 20 μ g/mL for the next 24 h. Subsequently, cells were washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich). Actin cytoskeleton was stained with phalloidin conjugated with Atto 633 (Sigma-Aldrich). Imaging was performed using Olympus FV1000 confocal microscope (Olympus Soft Imaging Solutions) equipped with 60× oil immersion objective.

Statistical analysis

Data were analyzed using multifactorial analysis of variance with Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, USA). Differences between groups were tested with the Tukey's honest significant difference post hoc test.

Dovepress

Carbon nanoparticles decrease migration in glioma cells

Results are shown as mean with standard deviation. Differences at P < 0.05 were considered significant. Adhesion test data were analyzed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) with two-way analysis of variance and Bonferroni post hoc test comparing to the control at different time points. Results are shown as mean with standard deviation. Differences at P < 0.05 were considered significant.

Results and discussion Physicochemical characterization and toxicity of nanoparticles

TEM images (Figure S1) and Raman spectra of ND, NG, and nGO (Figures S2 and S3) are presented in the supplement. The registered Raman spectra were characteristic for these kinds of carbon materials.²² The spectra of NG and nGO consisted of two bands: a D band located at ~1,350 cm⁻¹ and a G band at $\sim 1,580$ cm⁻¹. The G band appears due to the C–C sp² vibrations,²³ while the D peak always indicates defects present in the carbon lattice.24,25 The very high intensity of the D/G band ratio of the presented spectra indicates that these were ultra-fine powders.²⁶ The ND Raman spectrum consists of G and D bands as well as the so-called T band that is characteristic of sp³ binding around 1,100 cm⁻¹ and a vibration characteristic for diamond around 1.330 cm^{-1,27,28} TEM analyses were used to evaluate morphology of nanoparticles (Table 1). Additionally, DLS analysis was performed to determine the average hydrodynamic diameter of nanoparticles. The zeta potential was analyzed to characterize surface charges and the stability of the suspensions (Table 1).

To evaluate ND, NG, and nGO toxicity in U87 and U118 glioblastoma cells, the viability of the cells was examined using the XTT assay (Figure 1). ND, NG, and nGO were added to cell cultures at concentrations of 10, 20, 50, 100, and 200 μ g/mL. The reduction in cell viability was dose-dependent and was strongest after NG treatment, followed by

 Table I
 Physicochemical properties of diamond nanoparticles,

 graphite nanoparticles and graphene oxide nanoplatelets

Nanoparticle	Zeta potential (mV)	Size of nanoparticle (TEM, nm)	Average hydrodynamic diameter (DLS, nm)
Diamond nanoparticle	21.1	2–7	109.4
Graphite nanoparticle	40.6	3–10	204.3
Graphene oxide nanoplatelets	19.4	2–8	126.2

Abbreviations: TEM, transmission electron microscope; DLS, dynamic light scattering.



Figure I U87 and U118 glioblastoma cell viability.

Notes: Cell viability was determined using the XTT assay. Cells were exposed to diamond nanoparticles (ND), graphite nanoparticles (NG), and graphene oxide (nGO) at concentrations of 10, 20, 50, 100, and 200 μ g/mL for 24 h. Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=4, each experiment in duplicate). Statistical significance between control (C) and the treated cells is indicated by an asterisk (multifactor analysis of variance [ANOVA]; *P*<0.05). There was statistical significance between U87 and U118 viability (P=0.0000) and the interaction between cell line and the type of nanoparticle (*P*=0.0000).

nGO and ND treatment. NG at a concentration of $200 \mu g/mL$ reduced the viability of the U87 cell line by 42% and that of the U188 cell line by 23%.

The results of viability assays were in accordance with the results from different studies, showing that the in vitro toxicity of graphene oxide is low.^{29,30} Graphene oxide, especially at low concentrations, does not show obvious cytotoxic effects on the human-derived cell lines A549 and SH-SY5Y.^{31,32} However, graphene oxide reduces glioblastoma cell viability and proliferation with increasing doses.¹² The toxicity of graphene oxide on mesenchymal stem cells depends on the size of the nanoparticles. nGO with a size of 11 nm induces a stronger reduction in proliferation and reactive oxygen species formation than larger particles.³³ Similarly, ND and NG show low toxicity on glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells.34 Moreover, ND has been suggested to be biocompatible with neuroblastoma cells and macrophages.35 However, neuroblastoma cells lose their neurite extensions after incubation with ND at a concentration of 100 µg/mL, and macrophages show morphological changes at this dose.16

Nanoparticle association with the plasma membrane and uptake

SEM images showed that nanoparticles were present on the surface of the body of cells and protrusions (Figure 2). ND, NG, and nGO agglomerated on the plasma membrane surface. High magnification SEM images demonstrated that the glioblastoma surface after treatment with NG and to a



Figure 2 Scanning electron microscopy of U87 and U118 glioblastoma cells. Notes: Electron microscopic images were taken after treatment with nanoparticles at 20 µg/mL for 24 h. Arrows on the scanning electron microscope images indicate agglomerates of nanoparticles, and arrowheads indicate cell surface irregularities. Scanning electron microscope images of U87 and U118 cells without treatment (C) and after treatment with diamond nanoparticles (ND), graphite nanoparticles (NG), and graphene oxide (nGO).

greater extent nGO showed irregularities, visible as less electron-dense spots, suggesting direct interactions of nGO with plasma membranes.

To determine whether the examined nanoparticles entered glioblastoma cells, further microscopic studies were performed. Nanoparticle uptake and cellular localization were assessed using TEM (Figure 3). U87 and U118 cells were treated with nanoparticles at a concentration of 20 μ g/mL and incubated for 24 h. The examination of glioblastoma cell ultrastructure revealed that ND, NG, and nGO were located inside cells. However, the amount of ND and NG inside cells was approximately three times greater than that of nGO. Nanoparticles were localized inside vacuoles and in

the cytoplasm. nGO more often than ND and NG were found to damage vacuoles and reach the cytoplasm.

The investigation of endocytosis and the morphology of glioblastoma cells suggests different behavior of the examined carbon nanoparticles, especially for ND and nGO. ND were effectively taken up by the cells, whereas nGO strongly interacted with the cell surface. Interestingly, NG showed features of both ND and nGO, which may be related to the sp² atom hybridization similar to nGO and the spherical structure similar to ND. Many vacuoles were loaded with nanoparticles, especially after treatment with ND and NG, suggesting that endocytosis of these nanoparticles is preferential and profound.



Figure 3 Ultrastructure of U87 and U118 glioblastoma cells.

Notes: Electron microscopic images were taken after treatment with nanoparticles at 20 µg/mL for 24 h. Transmission electron microscope images of U87 and U118 cells without treatment (C) and after treatment with diamond nanoparticles (ND), graphite nanoparticles (NG), and graphene oxide (nGO). Arrows indicate nanoparticles. Scale bar 1 µm.

Abbreviations: AP, autophagosome; EV, endocytic vesicle; Mi, mitochondrion; MVB, multivesicular body; N, nucleus; PMF, plasma membrane fold.

Nanoparticles decrease adhesion and migration of glioblastoma cells

To examine whether nanoparticles, after attachment to the cell membrane and endocytosis, can mitigate the ability of glioblastoma cells to adhere to extracellular matrix and migrate, we performed an adhesion test, two-dimensional migration assay, and a three-dimensional invasion assay. Adhesion test was performed in four time points (15, 30, 60, and 120 min). Treatment with ND, NG, or nGO decreased adhesion of both glioma cell lines. U87 had decreased adhesion starting from 30 min time point (Figure 4E), whereas U118 starting from 15-time point (Figure 4F).

Two-dimensional migration assay provides information about the abilities of cancer cells to move within a cell-free



Figure 4 U87 and U118 glioblastoma cell motility and adhesion.

Notes: Migration of glioblastoma cells was determined using the cell exclusion zone assay. Cells were treated with nanoparticles at 50 µg/mL. (A) U87 and U118 glioblastoma cells before treatment (0 h time point) and after 48 h not treated with nanoparticles and treated with diamond nanoparticles, graphite nanoparticles, and graphene oxide nanoparticles. (B) The invasiveness of U87 and U118 cells was determined by staining the nuclei of cells that had invaded through collagen-coated Transwell inserts with DAPI. Nuclei were counted using a confocal microscope after treatment with nanoparticles at 50 µg/mL. (C) Graph shows the percentage of the zone covered by cells. Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=3, each experiment in triplicate). Statistical significance is indicated with different superscripts (multifactor ANOVA; P<0.05). There was a significant difference between U87 and U118 migration (P=0.0000). No interactions between cell line and the type of nanoparticle were observed (P=0.0623). (D) Graph shows the percentage of cell invasion compared to control. Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=3, each experiment in triplicate). Statistical significance is indicated with different superscripts (multifactor ANOVA; P<0.05). There was a significance is indicated with different superscripts (multifactor ANOVA; P<0.05). There was no statistical significance between U87 and U118 invasion (P=0.3034); however, an interaction between cell line and the type of nanoparticle was observed (P=0.0003). (E, F) Adhesion of fluorescent-labeled U87 and U118 cells after treatment with nanoparticles at 20 µg/mL. 96-well plates were coated with extracelluar matrix. After 15, 30, 60, and 120 min wells were gently washed three times and intensity of fluorescence was read at microplate reader. Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=3, each experiment or traited and experimential groups is indicated with superscripts (multifactor ANOVA; P<0.05; #######################

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; C, control; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; ND, diamond nanoparticles; NG, graphite nanoparticles; nGO, graphene oxide nanoparticles.

area and is done without scratching off cells, which can influence the results due to the release of growth factors from damaged cells.³⁶ Treatment with ND, NG, or nGO at a concentration of 50 μ g/mL reduced the two-dimensional migration of both U87 and U118 glioblastoma cells by

approximately twofold (Figure 4). The strongest inhibition was observed after treatment with ND. U87 cells showed a stronger ability to migrate than U188. Although both U87 and U118 cell lines are able to migrate and are tumorigenic in animal models, U87 is approximately eight times more invasive than U118 cells.³⁷ Moreover, U87 cells can form approximately twofold larger tumors than U118 cells after the same duration of tumor development in immunodeficient mice.³⁸ Similar observations were made when U87 and U118 cells were inoculated into the chorioallantoic membrane of chicken embryos.³⁹

The three-dimensional invasion assay was used to evaluate whether tumor cells can pass through collagen-coated pores into medium containing a chemoattractant. In both cell lines, the invasion abilities were significantly reduced after treatment with ND, NG, or nGO at a concentration of 50 μ g/mL (Figure 4). The strongest inhibition was observed after treatment with nGO and NG, whereas ND reduced invasion to a lesser extent. There were no significant differences between the invasiveness of the U87 and U118 glioblastoma cell lines. However, we observed an interaction between the type of cell and the type of nanoparticle. In both models, nanoparticles reduced the migration capabilities of glioblastoma cells.

The invasion model is more similar to in vivo conditions than the two-dimensional migration model because cells need to interact with the extracellular matrix and respond to a chemoattractant and thus require different cell signaling pathways.⁴⁰ Cells migrating in the two-dimensional models often display only sparse filopodia, whereas in the threedimensional invasion model or in vivo, cells extensively use filopodia to probe the extracellular matrix and migrate.^{41,42} Both cell lines exhibited mutations in PTEN, whereas U118 also revealed p53 mutation. Glioblastoma cell lines with mutations in PTEN and both PTEN and p53 show increased membrane folding, however, cell lines containing both mutations have largest surface areas.³ U118 after treatment with NG showed approximately twofold higher reduction of cell invasion than U87 cells. There was no difference between cell lines after treatment with nGO, which could be related to a lower level of endocytosis.

To better understand interaction of cells with extracellular matrix cytoskeleton was analyzed. Images of actin cytoskeleton (Figure 5A) show that treatment with nanoparticles led to actin remodeling in cells, decreasing amount of stress fibers in cytoplasm. Moreover, cells treated with nanoparticles showed intensive F-actin formation in cell cortex, suggesting need of stabilization of cell adhesion. Cortical actin stabilizes integrin and cadherin adhesions and regulates intercellular tension.^{43,44} Stress fibers in cytoplasm stabilize cell and generate traction force during migration and are ended with focal adhesion complexes.⁶ ND, NG, and nGO nanoparticles decreased adhesion of cells to extracellular matrix showing similar effect to extracellular matrix with low mechanical rigidity.

Glioblastoma cells with low mechanical rigidity surface alter cell motility and cytoskeletal architecture.⁴⁵

Nanoparticles decrease adhesiondependent signaling pathways

To determine if changes in migration are associated with protein expression of adhesion molecules, levels of vinculin and cadherin proteins were examined (Figure 5B). Treatment with nanoparticles did not alter protein levels of vinculin, N-cadherin, and pan-cadherin. This suggests that nanoparticles change cell migration by impeding connection between cells and extracellular matrix.

EGFR/AKT/mTOR signaling pathway was analyzed by assessment of phosphorylation levels of EGFR, AKT, and mTOR protein. Treatment with ND, NG, and especially with nGO decreased level of phospho-EGFR (pTyr1173), whereas did not alter total level of EGFR protein (Figure 5B). The nanoparticles also decreased the activation of two downstream targets of EGFR, AKT, and mTOR (Figure 5D). Cell adhesion with extracellular matrix leads to ligandindependent activation of EGFR.^{46,47} Integrins induce phosphorylation of EGF receptor on tyrosine residues 845, 1068, 1086, and 1173, but not on residue 1148, a major site of phosphorylation in response to EGF.⁴⁸ Treatment with ND, NG, and nGO decreased level of phosphor-EGFR (pTyr1173) probably by decreasing glioblastoma cells' adhesion.

β-Catenin signaling was analyzed by assessment of level of β -catenin in nuclear and cytoplasmic fractions using Western blot method (Figure 5C). NG and nGO nanoparticles caused decrease in β -catenin level in nuclear fraction. ND affected β-catenin activity only after treatment of U87 cell line. β-Catenin is important protein in cadherin-based adhesions and is also an essential coactivator of canonical Wnt-mediated gene expression. Canonical Wnt signaling and cadherin-mediated cell adhesion depend on the same pool of β -catenin.⁴⁹ Decrease in nuclear level of β -catenin without changes in cadherin protein level suggests that treatment with nanoparticles leads to stabilization of β -catenin pool connected with cadherin junctions. The affinity between cadherin and β -catenin at junctions is increased by inhibition of receptor tyrosine kinases including EGFR.50-52 NG and nGO that inhibit EGFR phosphorylation to higher extent than ND caused also a decrease in nuclear level of β -catenin.

Downstream of EGFR, AKT, and mTOR plays important roles in many cellular processes, including proliferation, apoptosis, cell cycle progression, cell motility, and autophagy. The pathway is constantly activated in glioblastoma and other tumors, including breast cancer, gastric cancer, and



Figure 5 EGFR/AKT/mTOR and β -catenin signaling in glioblastoma cells after treated with nanoparticles.

Notes: (A) Confocal microscope images of U87 and U118 cells actin cytoskeleton. Cells were grown on extracellular matrix for 24 h and treated with diamond nanoparticles, graphite nanoparticles, or graphene oxide nanoparticles at a concentration of 20 µg/mL and incubated for 24 h. F-Actin was stained with phalloidin conjugated with Atto 633. (B) Western blot analysis of N-cadherin, pan-cadherin, vinculin, p-EGFR, and EGFR. GAPDH was used as a loading control. (C) Western blot analysis of nuclear and cytoplasmic protein fractions used for determination of β-catenin protein level. PCNA and β-tubulin were used as loading controls for nuclear and cytoplasmic fractions, respectively. (D) ELISA analysis of AKT and mTOR phosphorylation in comparison to control. Treatment with nanoparticles significantly reduced phospho-AKT (P<0.0000) and mTOR (P<0.0000). Phospho-AKT level was cell line dependent (P<0.0000) and was affected by interaction of cell line and nanoparticles (P<0.001). Phospho-mTOR level was also cell line dependent (P<0.0023) and was affected by interaction of cell line and nanoparticles (P<0.0000). Values are expressed as mean ± standard deviation (n=5, each experiment in duplicate). Statistical significance is indicated with different superscripts (multifactor ANOVA; P<0.05).

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; C, control; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; ND, diamond nanoparticles; NG, graphite nanoparticles; nGO, graphene oxide nanoparticles.

hepatocellular carcinoma.53 PI3K activates AKT by phosphorylation, which changes its localization to the nucleus where it activates mTOR and downstream targets. mTOR functions as two distinct complexes, mTORC1 and mTORC2. The suppression of mTORC1 leads to stimulation of mTORC2, which positively regulates cell survival and proliferation at different signaling levels, mainly by the activation of AKT.54 Apart from inhibition of EGFR phosphorylation, a decrease in the activation of mTOR could be caused by profound endocytosis of nanoparticles. Reports have shown that mTORC1 activation can be decreased during the failure of lysosome reformation.55-57 Lysosome reformation occurs in

endolysosomes or autolysosomes after processing a substrate. Inefficient digestion of substrates can lead to the accumulation of endolysosomes in the cytosol, 55,58 thereby decreasing lysosome reformation and mTORC1 activation. Thus, intensive endocytosis of nanoparticles, which are indigestible by cells, can lead to a decrease in mTORC1 activation and nutrient starvation.

Additionally, endocytosis of nanoparticles could lead to the internalization of large areas of the plasma membrane, thus decreasing the availability of receptor tyrosine kinases that, after binding with their ligands, activate the AKT/mTOR signaling pathway.59 Macropinocytosis is a possible way of entering into the cell for nanoparticles with size <10 nm, thereby delivering nanoparticles to early endosomes, late endosomes, and subsequently to lysosomes.⁶⁰ However, agglomerates of ND, NG, and nGO could be effectively internalized by endocytosis.61,62 Ligand-unmodified polymeric nanoparticles have been shown to enter U87 cells by mainly clathrin-dependent endocytosis and macropinocytosis.63 Ligand-unmodified iron oxide nanoparticles and silica-coated iron oxide nanoparticles also enter HeLa cells (human cervical cancer) by endocytosis, but mainly in a caveolin-dependent way.⁶⁴ This suggests that nanoparticle uptake is conducted by endocytosis, which depends on the size and surface characteristics of the nanoparticles.65 Non-spherical nanoparticles have a higher area of interaction with the plasma membrane. nGO examined in this study probably strongly interacted with the plasma membrane, leading to changes in cell surface morphology and caused strongest decreases in EGFR phosphorylation. Further investigations are required to explore the biological mechanisms of the interaction between the EGFR/AKT/mTOR signaling pathway and endocytosis triggered by ND, NG, and nGO nanoparticles.

We have demonstrated that ND, NG, and nGO nanoparticles caused decrease in U87 and U118 adhesion that led to decrease in migration and invasiveness of the glioblastoma cell lines U87 and U118 affecting activity of EGFR/AKT/ mTOR and β -catenin signaling pathways. These results indicate that the examined nanoparticles could be used as a low toxicity glioblastoma therapy, especially as an active compound for drug delivery.

Acknowledgments

This work was supported by the Polish National Research Council grant NCN "Prelude" 2011/03/N/NZ9/04290 and 2013/09/N/NZ9/01898. The manuscript is a part of the habilitation thesis by Mateusz Wierzbicki.

Author contributions

MW proposed and designed the study, guided the experiments and data analysis. MW, SJ and MK performed experiments. MG and BS analyzed data. KZ and RC performed and analyzed Raman spectrum. AC and ES supervised assembly of manuscript. MW and AC wrote the manuscript. NK improved presentation. All the authors read and approved the manuscript. All authors contributed toward data analysis, drafting and critically revising the paper and agree to be accountable for all aspects of the work.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004;64(19):6892–6899.
- Fonkem E, Lun M, Wong ET. Rare phenomenon of extracranial metastasis of glioblastoma. J Clin Oncol. 2011;29(34):4594–4595.
- Memmel S, Sukhorukov VL, Höring M, et al. Cell surface area and membrane folding in glioblastoma cell lines differing in PTEN and p53 status. *PLoS One*. 2014;9(1):e87052.
- Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003;112(4):453–465.
- Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):362–374.
- Kraikivski P, Slepchenko BM, Novak IL. Actin bundling: initiation mechanisms and kinetics. *Phys Rev Lett*. 2008;101(12):128102.
- Zhou H, Huang S. Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci.* 2011;12(1): 30–42.
- Burris HA. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;71(4):829–842.
- Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Rich JN. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer*. 2007;110(1):13–24.
- Endersby R, Baker SJ. PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. *Oncogene*. 2008;27(41):5416–5430.
- Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res.* 2001;264(1):29–41.
- Jaworski S, Sawosz E, Kutwin M, et al. In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:1585–1596.
- Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M, Prasek M, Jaworski S, Chwalibog A. Comparison of anti-angiogenic properties of pristine carbon nanoparticles. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8(1):195.
- Faklaris O, Joshi V, Irinopoulou T, et al. Photoluminescent diamond nanoparticles for cell labeling: study of the uptake mechanism in mammalian cells. ACS Nano. 2009;3(12):3955–3962.
- Neugart F, Zappe A, Jelezko F, et al. Dynamics of diamond nanoparticles in solution and cells. *Nano Lett.* 2007;7(12):3588–3591.
- Schrand AM, Dai L, Schlager JJ, Hussain SM, Osawa E. Differential biocompatibility of carbon nanotubes and nanodiamonds. *Diam Relat Mater*. 2007;16(12):2118–2123.
- Grodzik M, Sawosz E, Wierzbicki M, et al. Nanoparticles of carbon allotropes inhibit glioblastoma multiforme angiogenesis in ovo. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:3041–3048.
- Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M, et al. Carbon nanoparticles downregulate expression of basic fibroblast growth factor in the heart during embryogenesis. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3427–3435.
- Strojny B, Kurantowicz N, Sawosz E, et al. Long term influence of carbon nanoparticles on health and liver status in rats. *PLoS One*. 2015; 10(12):e0144821.
- Heckman C, Kanagasundaram S, Cayer M, Paige J. Preparation of cultured cells for scanning electron microscope. *Protoc Exch.* 2007: doi:10.1038/nprot.2007.504.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671–675.
- Krishnamoorthy K, Veerapandian M, Yun K, Kim S-J. The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation. *Carbon N Y.* 2013;53:38–49.
- 23. Tuinstra F, Koenig JL. Raman spectrum of graphite. *J Chem Phys.* 1970;53(3):1126–1130.
- Venugopal G, Jung M-H, Suemitsu M, Kim S-J. Fabrication of nanoscale three-dimensional graphite stacked-junctions by focused-ion-beam and observation of anomalous transport characteristics. *Carbon N Y*. 2011;49(8):2766–2772.

- Ferrari AC. Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron–phonon coupling, doping and nonadiabatic effects. *Solid State Commun.* 2007;143(1–2):47–57.
- Lin Y-H, Yang C-Y, Lin S-F, Lin G-R. Triturating versatile carbon materials as saturable absorptive nano powders for ultrafast pulsating of erbium-doped fiber lasers. *Opt Mater Exp.* 2015;5(2):236.
- Ferrari AC, Robertson J. Raman spectroscopy of amorphous, nanostructured, diamond–like carbon, and nanodiamond. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2004;362(1824):2477–2512.
- Prawer S, Nemanich RJ. Raman spectroscopy of diamond and doped diamond. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2004;362(1824): 2537–2565.
- Wang Y, Wu S, Zhao X, Su Z, Du L, Sui A. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on human RPMI 8226 cells. *Biomed Mater Eng.* 2014;24(6):2007–2013.
- Sydlik SA, Jhunjhunwala S, Webber MJ, Anderson DG, Langer R. In vivo compatibility of graphene oxide with differing oxidation states. *ACS Nano.* 2015;9(4):3866–3874.
- Liu Z, Robinson JT, Sun X, Dai H. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. J Am Chem Soc. 2008; 130(33):10876–10877.
- Lv M, Zhang Y, Liang L, et al. Effect of graphene oxide on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells line. *Nanoscale*. 2012;4(13):3861–3866.
- Akhavan O, Ghaderi E, Akhavan A. Size-dependent genotoxicity of graphene nanoplatelets in human stem cells. *Biomaterials*. 2012;33(32): 8017–8025.
- Zakrzewska KE, Samluk A, Wierzbicki M, et al. Analysis of the cytotoxicity of carbon-based nanoparticles, diamond and graphite, in human glioblastoma and hepatoma cell lines. *PLoS One.* 2015;10(3): e0122579.
- Thomas V, Halloran BA, Ambalavanan N, Catledge SA, Vohra YK. In vitro studies on the effect of particle size on macrophage responses to nanodiamond wear debris. *Acta Biomater*. 2012;8(5):1939–1947.
- Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I. Assays for angiogenesis: a review. *Pharmacol Ther*. 1991;51(1):1–11.
- Formolo CA, Williams R, Gordish-Dressman H, MacDonald TJ, Lee NH, Hathout Y. Secretome signature of invasive glioblastoma multiforme. *J Proteome Res.* 2011;10(7):3149–3159.
- Xie Q, Bradley R, Kang L, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) autocrine activation predicts sensitivity to MET inhibition in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(2):570–575.
- Jaworski S, Sawosz E, Grodzik M, et al. Comparison of tumour morphology and structure from U87 and U118 glioma cells cultured on chicken embryo chorioallantoic membrane. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2013; 57(4):593–598.
- Jacquemet G, Hamidi H, Ivaska J. Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;36:23–31.
- Chan CE, Odde DJ. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science*. 2008;322(5908):1687–1691.
- 42. Lee D, Fong KP, King MR, Brass LF, Hammer DA. Differential dynamics of platelet contact and spreading. *Biophys J.* 2012;102(3):472–482.
- de Rooij J. Cadherin adhesion controlled by cortical actin dynamics. Nat Cell Biol. 2014;16(6):508–510.
- Rullo J, Becker H, Hyduk SJ, et al. Actin polymerization stabilizes α4β1 integrin anchors that mediate monocyte adhesion. *J Cell Biol.* 2012;197(1):115–129.
- Ulrich TA, de Juan Pardo EM, Kumar S. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res.* 2009;69(10):4167–4174.

- Shen X, Kramer RH. Adhesion-mediated squamous cell carcinoma survival through ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor. *Am J Pathol.* 2004;165(4):1315–1329.
- Larsen AB, Stockhausen M-T, Poulsen HS. Cell adhesion and EGFR activation regulate EphA2 expression in cancer. *Cell Signal*. 2010; 22(4):636–644.
- Moro L, Dolce L, Cabodi S, et al. Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J Biol Chem.* 2002;277(11):9405–9414.
- Heuberger J, Birchmeier W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(2):a002915.
- Coluccia AML, Vacca A, Duñach M, et al. Bcr-Abl stabilizes betacatenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 2007;26(5):1456–1466.
- Clevers H, Nusse R. Wnt/β-catenin signaling and disease. Cell. 2012; 149(6):1192–1205.
- Krejci P, Aklian A, Kaucka M, et al. Receptor tyrosine kinases activate canonical WNT/β-catenin signaling via MAP kinase/LRP6 pathway and direct β-catenin phosphorylation. *PLoS One*. 2012;7(4):e35826.
- Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. Front Oncol. 2014;4:64.
- Vadlakonda L, Dash A, Pasupuleti M, Anil Kumar K, Reddanna P. The paradox of Akt-mTOR interactions. *Front Oncol.* 2013;3:165.
- Yu L, McPhee CK, Zheng L, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*. 2010;465(7300): 942–946.
- Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the Vacuolar H+-ATPase. *Science*. 2011;334(6056): 678–683.
- Li M, Khambu B, Zhang H, et al. Suppression of lysosome function induces autophagy via a feedback down-regulation of MTOR complex 1 (MTORC1) activity. *J Biol Chem.* 2013;288(50):35769–35780.
- Bright NA, Reaves BJ, Mullock BM, Luzio JP. Dense core lysosomes can fuse with late endosomes and are re-formed from the resultant hybrid organelles. *J Cell Sci.* 1997;110(pt 17):2027–2040.
- Berger C, Madshus IH, Stang E. Cetuximab in combination with antihuman IgG antibodies efficiently down-regulates the EGF receptor by macropinocytosis. *Exp Cell Res.* 2012;318(20):2578–2591.
- Geiser M. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv. 2010;23(4):207–217.
- Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G, Suresh S. Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Adv Mater*. 2009;21:419–424.
- Gao H, Shi W, Freund LB. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(27):9469–9474.
- Gao H, Yang Z, Zhang S, et al. Ligand modified nanoparticles increases cell uptake, alters endocytosis and elevates glioma distribution and internalization. *Sci Rep.* 2013;3:2534.
- Bohmer N, Jordan A. Caveolin-1 and CDC42 mediated endocytosis of silica-coated iron oxide nanoparticles in HeLa cells. *Beilstein J Nanotechnol.* 2015;6:167–176.
- Oh N, Park J-H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(suppl 1):51–63.

Supplementary materials



Figure SI Transmission electron microscopic images of nanoparticles. Note: Images of diamond nanoparticles (A), graphite nanoparticles (B), and graphene oxide (C).



Figure S2 Raman spectra of diamond nanoparticles.

Note: Spectra consist of the vibration characteristic for diamond at ~1,330 cm⁻¹ and three bands: a T band located at ~1,100 cm⁻¹, a D band at ~1,290 cm⁻¹, and a G band at ~1,640 cm⁻¹.



Figure S3 Raman spectra of graphite nanoparticles and graphene oxide.

Notes: Spectra consist of two bands: a D band located at ~1,350 cm⁻¹ and a G band at ~1,580 cm⁻¹. Raman spectra of graphite nanoparticles and graphene oxide were normalized to the G band peak.

International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peerreviewed 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,

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

Dovepress

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.

SCIENTIFIC **Reports**

Received: 18 April 2018 Accepted: 18 September 2018 Published online: 03 October 2018

OPEN NF-κB-related decrease of glioma angiogenic potential by graphite nanoparticles and graphene oxide nanoplatelets

Mateusz Wierzbicki¹, Ewa Sawosz¹, Barbara Strojny¹, Sławomir Jaworski¹, Marta Grodzik¹ & André Chwalibog 102

Gliomas develop an expanded vessel network and a microenvironment characterized by an altered redox environment, which produces high levels of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) that fuel its growth and malignancy. ROS and RNS can influence tumor cell malignancy via the redox-regulated transcription factor NF-ĸB, whose activation is further regulated by the mutation status of p53. The objective of this study was to assess the influence of graphite nanoparticles (NG) and graphene oxide nanoplatelets (nGO) on the angiogenic potential of glioma cell lines with different p53 statuses. Nanoparticle treatment of glioma cells decreased the angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cocultured with U87 (p53 wild type) and was not effective for U118 (p53 mutant) cells. Nanoparticle activity was related to the decreased level of intracellular ROS and RNS, which downregulated NF- κ B signaling depending on the p53 status of the cell line. Activation of NF-κB signaling affected downstream protein levels of interleukin 6, interleukin 8, growth-regulated oncogene α , and monocyte chemotactic protein 1. These results indicate that the activity of NG and nGO can be regulated by the mutation status of glioma cells and therefore give new insights into the use of nanoparticles in personalized biomedical applications regarding glioma angiogenesis and its microenvironment.

Gliomas, which are some of the most common malignant tumors of the central nervous system, develop a microenvironment that is characterized by an altered redox state and an abundance of proangiogenic and proinflammatory factors¹. Gliomas develop an expanded vessels network and angiogenesis pathologies including vascular hyperproliferation and hemorrhage caused by the breakdown of the intratumoral blood-brain barrier². Proangiogenic signals in tumors are fueled by cycling hypoxia, ROS, RNS, acidosis, and inflammation^{1,3}. Tumor cells, including gliomas, maintain an altered redox environment with high production of ROS and RNS that causes tumorigenic cell signaling⁴. One main source of ROS in tumor cells is the NADPH oxidase family, which are plasma membrane-bound enzymes that produce superoxide through single-electron reduction⁵. Nitric oxide is produced by nitric oxide synthase (NOS), which forms the second most common RNS, peroxynitrite, after reacting with superoxide⁶. ROS and RNS influence tumor cell malignancy in different ways, but one of the most important is regulation of NF-KB transcription factor activation. NF-KB regulates numerous genes, including those involved in the development of the tumor microenvironment and the synthesis of proangiogenic and proinflammatory cytokines⁷. NF- κ B activation is also regulated by the mutation status of the tumor suppressor, p53⁸. p53 is one of the most frequently mutated genes due to its potent antitumor activities. Mutations in p53 lead to the inhibition of its principal activity, tumor suppression. Moreover, tumors with p53 mutations often show gain-of-function phenotypes that usually enhance their malignancy, including enhanced invasiveness and decreased sensitivity to proapoptotic signals⁹. Gain-of-function phenotypes originate from the increased half-life of p53, which influences signaling pathways in tumor cells and increases genomic instability¹⁰.

¹Division of Nanobiotechnology, Warsaw University of Life Science, Ciszewskiego 8, 02-786, Warsaw, Poland. ²Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Copenhagen, Groennegaardsvej 3, 1870, Frederiksberg, Denmark. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.W. (email: mateusz_ wierzbicki@sggw.pl)



Figure 1. Nanoparticle morphology. Transmission electron microscopy images of (A) graphite nanoparticles and (B) graphene oxide nanoplatelets.

Carbon nanoparticles exert a redox-modulating property that originates from their unique structure and the localization of functional groups on their surface. The occurrence of numerous oxygen-containing functional groups on carbon nanoparticles, such as the close proximity of carboxyl and hydroxyl groups, enables them to act as reducing agents¹¹. Graphene oxide and other graphene-based materials are effective scavengers of hydroxyl radicals and superoxide and can have properties of a weak H-donor antioxidant¹². Graphite nanoparticles (NG) have a similar structure to graphene, thus their antioxidant properties should not differ greatly. Due to the intensive endocytosis of NG and graphene oxide nanoplatelets (nGO) by glioma cells, it is hypothesized that nGO and NG will decrease intracellular ROS¹³. Moreover, it is assumed that this will decrease NF- κ B-dependent proangiogenic cytokines in a p53 wild-type glioma cell line (U87) but not in a p53 mutant cell line (U118).

Results

NG and nGO change the angiogenic potential of U87 but not U118 glioma cell lines. The physicochemical properties of NG and nGO were initially confirmed by investigating the nanoparticles using transmission electron microscopy (TEM) and analyzing their zeta potential. The Raman spectra of analyzed nanoparticles were recently published¹³. TEM images were used to confirm the nanoparticle morphology (Fig. 1); NG were spherical nanoparticles of approximately 8 nm, whereas nGO were of similar size and had a platelet morphology due to the method of synthesis from NG. The zeta potential was analyzed to characterize surface charges and the stability of the suspensions. The zeta potential of NG and nGO were 40.1 and 20.3 mV respectively, showing more stable hydrocolloids in NG.

Analysis of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) tube formation in coculture with U87 (p53 wild type) glioma cell line treated with NG or nGO decreased the examined angiogenesis parameters (Fig. 2). The total tube length and the number of junctions in HUVEC were used to indicate the angiogenic potential of glioma cells. Neither NG nor nGO treatment of U118 cells (with p53 mutations) changed the assessed HUVEC angiogenesis parameters.

NG and nGO have limited toxicity in glioma cells. Proliferation and membrane perforation were investigated using an lactate dehydrogenase (LDH) assay to evaluate if the observed decrease in the angiogenic potential of U87 glioma cells following NG or nGO treatment was not related with the direct toxicity of those nanomaterials (Fig. 3). NG and nGO were added to cell cultures of U87 and U118 cell lines at concentrations of 5, 10, 20, 50, and 100 µg/ml. NG did not influence the proliferation of glioma cells; however, nGO decreased the proliferation but only after treatment with 100μ g/ml. There were also significant differences between the cell lines (P=0.0000) and in the interactions between the cell lines and the nanoparticles (P=0.0124). The highest concentrations of NG and nGO also increased membrane perforation. Similar to the proliferation assay, there was a significant difference between the cell lines (P=0.0000) and in the interactions state the cell lines (P=0.0000) and in the interactions state the cell lines (P=0.0000) and in the interactions assay, there was a significant difference between the cell lines (P=0.0000) and in the interactions between the cell lines and nanoparticles (P=0.0000). Cell morphology was also investigated (Fig. 3A), and nanoparticle treatment resulted in the formation of light-reflecting structures inside the cells that were probably nanoparticle agglomerates, as previously shown using TEM analysis¹³.

Treatment with NG and nGO decreases the activation of NF-\kappaB signaling in U87 cells. To understand the phenomenon of decreased angiogenic activity in the U87 glioma cell line after NG and nGO treatment, 20 cytokines that are important in angiogenesis were analyzed, including vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), basic fibroblast growth factor (bFGF), interleukin 6 and 8 (IL-6 and IL-8), growth-regulated oncogene α (GRO α ; CXCL1), and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) (an array map with a list of all analyzed cytokines and uncropped images are included in Supplemental Figs S1–S3). In U87 cells, nanoparticles did not affect the levels of the most potent proangiogenic factors (i.e., VEGF-A and bFGF) but decreased the synthesis of IL-6, IL-8, GRO α (CXCL1), and MCP-1 (Fig. 4A). The U118 cell line showed only a minor increase in the synthesis of IL-8.

IL-6 activates signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), thus to confirm the changes in IL-6 protein levels after NG and nGO treatment, the phosphorylation level of STAT3 was assessed. Treatment of U87 cells decreased the STAT3 phosphorylation level without changing the total STAT3 protein level (Fig. 4D and E). Conversely, nanoparticles increased the STAT3 phosphorylation level in U118-treated cells (Fig. 4H and I).



Figure 2. NG and nGO decrease the angiogenic properties of U87 but not U118 glioma cells. Angiogenic properties were examined using indirect coculture (inserts) of glioma cell lines U87 and U118 with HUVEC on a thin layer of extracellular matrix. (**A**) Images of HUVEC tube formation following treatment with or without (C; control) graphite nanoparticles (NG) and graphene oxide nanoplatelets (nGO) in U87 or U118 cells in an insert above the HUVEC. The negative control (N) was conducted by culturing HUVEC with an insert but without glioma cells. Graphs show the mean number of junctions of HUVEC tubes in the field of view after coculture with U87 (**B**) and U118 (**D**) cells and the mean tube length in the field of view after coculture with U87 (**C**) and U118 (**E**) cells. Data were obtained by analyzing images using ImageJ software and the Angiogenesis Analyzer macro. Values are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical significance is indicated with different superscripts (one-way ANOVA; P < 0.05). *FOV*, field of view; *px*, pixels.



Figure 3. NG and nGO have limited toxicity in glioma cells. (**A**) Morphology of U87 and U118 glioma cells with or without treatment (C; control) with graphite nanoparticles (NG) and graphene oxide nanoplatelets (nGO). Morphology was assessed by light microscopy using phase contrast with 400X magnification. (**B**) Cell proliferation and (**C**) membrane perforation were determined using LDH assays. Cells were exposed to NG and nGO at concentrations of 5, 10, 20, 50, and 100 μ g/ml for 24 h. Statistical significance is indicated with different superscripts (multifactor ANOVA; *P* < 0.05). *RU*, relative units.



Figure 4. NG and nGO decrease the synthesis of NF-κB related proteins. (**A**) Antibody array analysis of proangiogenic cytokine synthesis in U87 and U118 glioma cells with or without treatment (C; control) with graphite nanoparticles (NG) and graphene oxide nanoplatelets (nGO). The full array map and uncropped images are available in the supplement. Nanoparticle treatment results in decreased synthesis of GRO α , IL-6, IL-8, and MCP-1 in U87 but not U118 cells. Transcription factor assay analysis of the activity of p50 and p65 NF-κB subunits in the nuclear fraction of U87 (**B**,**C**) and U118 (**F**,**G**) cells. Nanoparticle treatment of U87 cells decreased the activation of the p65 subunit and increased the activation of the p50 subunit. Analysis of STAT3 activation showed decreased STAT3 phosphorylation after nanoparticle treatment of U87 cells (**D**) but increased phosphorylation after treatment of U118 cells (**H**). The total STAT3 protein level was not changed (**E**,**I**). Statistical significance is indicated with different superscripts (one-way ANOVA; *P* < 0.05). *RU*, relative units.

NF- κB is a common regulator of IL-6, IL-8, $GRO\alpha$, and MCP-1 thus the binding activity of NF- κB subunits p50 and p65 to DNA-containing NF- κB response elements was assessed. The binding activity of the p65 subunit after nanoparticle treatment of U87 cells was significantly decreased, thus both NG and nGO reduced NF- κB signaling. In addition, the activity of the p50 subunit was also increased. Nanoparticles did not affect the p65 subunit in U118 cells but decreased the binding activity of the p50 subunit.

NG and nGO decrease the levels of intracellular ROS and nitric oxide. Intracellular synthesis of ROS and nitric oxide were analyzed to understand the reason behind the decreased NF- κ B signaling in U87 glioma cells treated with NG and nGO. ROS synthesis was assessed using two tests: the first for total ROS analysis and the second for determining the mitochondrial superoxide level. Treatment of U87 glioma cells with NG and nGO decreased the total ROS and, to a greater extent, the mitochondrial superoxide level (Fig. 5B and C). These results were confirmed by confocal microscopy analysis of superoxide levels in glioma cells (Fig. 5A). Furthermore, nitric oxide synthesis was also decreased (Fig. 5D). Similar results were obtained for the U118 cell line, thus showing that the differences in the effectiveness of NG and nGO on angiogenic potential were not related to ROS or nitric oxide levels but to the activity of the NF- κ B signaling pathway.

Discussion

Previous studies showed that carbon nanoparticles were not only intensively taken up by glioma cells but that they also decreased migration and invasiveness due to impaired extracellular adhesion and EGFR/AKT/mTOR signaling pathway regulation.¹³ Therefore it was suggested that carbon nanoparticles (i.e., NG and nGO) could influence other basic physiological activities of glioma cells and that the process of blood vessel growth toward the tumor should be assessed. This study has shown, for the first time, that NG and nGO can influence the angiogenic potential of glioma cells and that the response of glioma cells to carbon nanoparticle treatment can be dependent on p53 status related to NF- κ B activity.

Angiogenesis is one of the most important processes during tumor progression. The synthesis of proangiogenic and proinflammatory cytokines leads to the formation of highly vascularized tumors with a characteristic microenvironment. The findings reported here show that two allotropic forms of carbon nanoparticles (NG and nGO) can influence tumor angiogenesis despite their low toxicity, which is characteristic of most carbon



Figure 5. NG and nGO treatment decrease ROS and nitric oxide levels. (**A**) Confocal microscopy analysis of superoxide synthesis in U87 and U118 glioma cells with or without treatment (*C*; control) with graphite nanoparticles (NG) and graphene oxide nanoplatelets (nGO). MitoSOX reagent oxidized by superoxide exerts fluorescence in mitochondria (red color); nuclei are counterstained with Hoechst 33342. Nanoparticle treatment decreased superoxide levels in both cell lines. Similar results were obtained in the microplate analysis of superoxide levels (**C**,**F**). Analysis of total ROS levels using CellROX reagent in U87 (**B**) and U118 (**E**) cells showed a decrease in ROS after nanoparticle treatment. Analysis of nitric oxide levels in U87 (**D**) and U118 (**G**) cells similarly showed a decrease in nitric oxide after nanoparticle treatment. Statistical significance is indicated with different superscripts (one-way ANOVA; *P* < 0.05). *RFU*, relative fluorescence units.

nanoparticles¹⁴⁻¹⁶. Changes in proliferation and membrane perforation were limited, especially for nanoparticles at a final concentration of $20 \mu g/m$ l, therefore it was assumed that nanoparticle toxicity was not responsible for the decreased angiogenic potential of U87 glioma cells. The decrease in angiogenesis caused by carbon nanoparticles was previously reported but never in relation to tumor intracellular ROS. Experiments regarding the antiangiogenic properties of carbon nanoparticles showed that among diamond nanoparticles, NG, multiwall nanotubes, fullerene C60, and pristine graphene, the first two had the strongest antiangiogenic activity^{17,18}. In addition, multiwall nanotubes inhibited angiogenesis, as analyzed using the HUVEC angiogenesis model¹⁹ and chorioallantoic membrane model, induced by VEGF-A or bFGF²⁰.

ROS promote tumor cell angiogenesis by several pathways including NF-κB activation. In addition, ROS can promote angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factors (HIF) and activating 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase²¹. NF-κB is a transcription factor that regulates the expression of multiple genes and different cellular functions (i.e., inflammation and immunity); however, it is also known to regulate angiogenesis due to the increased synthesis of several pro-angiogenic proteins, including IL-6 and IL-8²². NF-κB proteins consist of different family members, including p65, that homo- or heterodimerize and have a C-terminal transcription activation domain that is essential for DNA binding and positive gene regulation. On the other hand, p50 can bind to DNA NF-κB binding sites but it cannot activate transcription unless it forms a heterodimer with p65. Moreover, due to it taking up the binding site on DNA, the p50 homodimer is considered as a competitive inhibitor of the NF-κB signaling pathway²³. Excess p50 downregulates p65, thus suggesting that a p50 homodimer may modulate transcription in place of the p50–p65 heterodimer that activates transcription of NF-κB-related genes²⁴.

ROS regulation of the NF-κB signaling pathway is complicated and depends on several processes; however, the main direct mechanisms of regulation consist of phosphorylation and direct oxidation of NF-κB subunits^{7,25}. In this study, decreased intracellular ROS increased the p50 subunit activation and decreased p65 subunit activation, which is in accordance with results of p50 and p65 regulation by ROS. The transcriptional activity of p65 is dependent on serine phosphorylation (Ser-276), which determinates its interaction with transcriptional coactivators. Phosphorylation of Ser-276 depends on ROS, and antioxidants have been shown to decrease Ser-276 phosphorylation²⁶⁻²⁸. The regulation of p50 function by ROS is different to that reported for the p65 subunit. Oxidation of p50 by ROS inhibits its DNA binding ability due to the oxidative sensitivity of a key cysteine (Cys-62) in the transcription activation domain^{29,30}. In addition, this cysteine may also be S-nitrosylated by nitric oxide³¹, which was decreased. Interestingly, inducible NOS is upregulated by the NF-κB signaling pathway³². Thus the observed decrease in nitric oxide synthesis could originate from both the activity of NG and nGO and the downregulation of the NF-κB signaling pathway. However, the scavenging activity of nanoparticles is more probable due to the observed decrease in nitric oxide synthesis in both cell lines. Consequently, p65 activity after nanoparticle treatment was not changed. Moreover, the results showing nGO scavenging activity were in accordance with other research showing that graphene oxide and other graphene-based materials were effective scavengers of hydroxyl radicals and superoxide and had properties of weak H-donor antioxidants¹².

These results showed that NF- κ B activation and its downstream effects are dependent on the p53 status of glioma cell lines. Wild-type p53 in the U87 cell line seemed to be responsible for the effectiveness of NG and nGO in decreasing NF- κ B signaling activation. U87 and U118 cell lines are often used as p53 wild-type and mutant glioma cell lines, respectively, due to the presence of phosphatase and tensin homolog mutations in both cell lines³³⁻³⁵. p53 mutations activate NF- κ B signaling, and transfection of wild-type p53 into p53-null lung cancer cell lines suppressed nuclear translocation of p65³⁶. Moreover, promotion and prolongation of NF- κ B signaling by a p53 mutant was described as one gain-of-function mechanism that leads to chronic inflammation^{8,9}.

NF- κ B activation after NG and nGO treatment decreased the synthesis of IL-6, IL-8, GRO α , and MCP-1. The decreased synthesis of those cytokines in U87 glioma cells diminished the angiogenic properties, which were analyzed using indirect coculture of glioma cells and HUVEC. GRO α is a chemoattractant molecule and a growth factor that induces angiogenesis and increases the tumorigenic potential of glioma cells³⁷. Conversely, in addition to MCP-1 being a strong monocyte chemoattractant, it is also a potent angiogenic factor that stimulates HIF-1\alpha and VEGF synthesis through a specific transcription factor (MCP-1-induced protein)³⁸. The regulation of IL-6, IL-8, $GRO\alpha$, and MCP-1 synthesis reported here is often reported in studies concerning the activation of the NF- κ B signaling pathway^{22,39}. This suggests that the regulation of NF- κ B signaling pathways by NG and nGO treatment was responsible for the observed results. Moreover, IL-6 is considered to be one of the most highly induced NF-κB-dependent cytokines⁴⁰. IL-6 is an inflammatory cytokine that not only regulates the immune inflammatory response but also plays an important role in cell proliferation and angiogenesis. Due to it pleiotropic activity, IL-6 is often synthesized by tumor cells, which leads to increased tumorigenesis and the formation of a tumor microenvironment that further enhances malignancy and decreases the effectiveness of therapies⁴¹. Similarly, IL-8 is a proangiogenic cytokine that exerts proangiogenic activities in many tumors, including glioblastomas⁴². Glioblastomas usually produce several proangiogenic cytokines including VEGF, IL-8, and IL-6. The combined inhibition of both VEGF and IL-6 was proposed to have a promising antitumor effect, and knockdown of both IL-6 and VEGF in a mouse model inhibited tumor development and cell infiltration⁴³. Both IL-6 and IL-8 affect several critical angiogenesis processes such as the promotion of endothelial cell migration and proliferation^{44,45}. Moreover, IL-6 induces VEGF synthesis in endothelial cells, probably via the activation of hypoxia-induced genes. The VEGF expression level after IL-6 induction was similar to the effect of hypoxia or chemically-activated HIF-1 α^{46} . The change in IL-6 synthesis following nanoparticle treatment was confirmed by analyzing STAT3 phosphorylation. IL-6 signal transduction leads to Janus kinase (JAK) activation, which mediates STAT3 phosphorylation⁴⁷. The results presented here showed that NG and nGO decreased the IL-6 protein level and STAT3 activation. Several studies analyzing the effects of intracellular ROS, including mitochondrial superoxide, on IL-6 and the NF-KB pathway have also observed major changes in STAT3 activation^{48,49}.

These results demonstrate that the antiangiogenic activities of NG and nGO depend on the p53 status and NF- κ B regulation. Furthermore, NG and nGO effectively decrease the angiogenic potential of a wild-type p53 glioma cell line (U87) by decreasing intracellular ROS and nitric oxide synthesis and leading to the downregulation of NF- κ B-dependent proteins IL-6, IL-8, GRO α , and MCP-1. These findings give new insights into the use of NG and nGO in personalized biomedical applications regarding glioma angiogenesis and its microenvironment.

Material and Methods

Nanomaterials. NG were purchased from SkySpring Nanomaterials (Houston, USA), while nGO were prepared at the Institute of Electronic Materials Technology from NG through a modified Hummers' method as previously described¹⁴. The nanopowders were dispersed in ultrapure water to prepare 1 mg/ml solutions. Immediately prior to cell exposure, hydrocolloids of nanoparticles were sonicated for 30 min and diluted to different concentrations with supplemented Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

TEM images of nanoparticles were acquired using a JEM-1220 microscope (Jeol, Tokyo, Japan) at 80 kV with a Morada 11-megapixel camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany). Samples were prepared by placing droplets of hydrocolloids onto formvar-coated copper grids (Agar Scientific, Stansted, UK) and air drying before observations.

Zeta potential measurements were carried out with the Nano-ZS90 Zetasizer (Malvern, Worcestershire, United Kingdom) at 25 °C using the Smoluchowski approximation. Each sample was measured after 120 s of stabilization at 25 °C (20 replicates). Nanoparticles were also examined by Raman spectroscopy using an inVia Raman Microscope (Renishaw, Gloucestershire, United Kingdom) with an Nd:YAG 532 nm laser. Hydrocolloids of nanoparticles were placed on a silicon substrate and incubated at 50 °C for 24 h to evaporate water.

Cell lines. Human glioma cell lines, U87 (p53 wild type) and U118 (p53 mutant), were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, USA) and maintained in DMEM (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific). HUVEC were obtained from Thermo Fisher Scientific and maintained in Medium 200 basal media supplemented with a large vessel endothelial supplement (Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin/ streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air.

Angiogenesis potential of glioma cells. The angiogenesis potential of glioma cells was analyzed with a tube formation assay using indirect coculture of U87 or U118 glioma cells with HUVEC. Glioma cells were cultured on a six-well plate $0.4 \,\mu$ m high pore density insert (Corning, New York, USA), and HUVEC were cultured below the insert on a layer of Geltrex Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Thermo Scientific).

Glioma cells were seeded at a density of 3×10^4 cells/well and incubated for 24 h in supplemented DMEM media. New media composed from supplemented DMEM and nonsupplemented Medium 200 (1:1) with or without (control group) 20μ g/ml of nanoparticles was subsequently introduced to the cells for the next 24 h. In addition, the negative control group (insert without cells) was treated as a control group. After incubation, inserts with glioma cells were placed above HUVEC (seeded at a density of 9.5×10^4 cells/well) in supplemented Medium 200 diluted 2.5-fold with nonsupplemented Medium 200. After 12 h of incubation, images of HUVEC tubes were made using a reversed microscope equipped with a 4X objective using phase contrast. The number of junctions and total tube length were analyzed with ImageJ software⁵⁰ and the Angiogenesis Analyzer macro⁵¹.

Cell proliferation and membrane permeabilization using the LDH assay. Cell viability was evaluated using an LDH-based assay kit (Thermo Fisher Scientific). U87 and U118 cells were plated in 96-well plates $(5 \times 10^3 \text{ cells/well})$ and incubated for 24 h. New medium containing NG or nGO was introduced to the cells at concentrations of 5, 10, 20, 50, and $100 \mu \text{g/ml}$. For cell proliferation analysis, cells were incubated with nanoparticles for 48 h and subsequently lysed for 45 min at 37 °C with lysis buffer. The total amount of LDH (depending on the number of cells) was analyzed by incubation with the reaction mixture at room temperature for 30 min. After the addition of a stop solution, absorbance was analyzed at 490 nm and 680 nm was used as a reference using a Tecan Infinite 200 microplate reader (Tecan, Durham, USA). Cell proliferation analysis, cells were incubated with nanoparticles for 24 h. The 96-well plates were centrifuged ($200 \times \text{g}$; 6 min), and 50μ l of cell medium from each well was transferred to a new 96-well plate. The reaction mixture was subsequently added to each well and incubated for 30 min. The amount of LDH released from the cells was analyzed by the addition of a stop solution, and absorbance was read at 490 nm and 680 nm was used as a reference (Tecan Infinite 200 microplate reader, Tecan). Cell membrane perforation was expressed as a relative value after subtracting the absorbance from blank samples are a relative value after subtracting the absorbance form blance form the cells was analyzed by the addition of a stop solution, and absorbance was read at 490 nm and 680 nm was used as a reference (Tecan Infinite 200 microplate reader, Tecan). Cell membrane perforation was expressed as a relative value after subtracting the absorbance from blank samples.

Sample preparation for protein analysis. For protein analysis, glioma cells were treated with NG or nGO at a concentration of 20μ g/ml and incubated for 24 h following a phosphate buffered saline (PBS) wash. Cells not treated with nanoparticles were used as the control. Whole-cell protein extracts were prepared by suspending cells in ice-cold radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The cells were incubated on ice for 40 min (vortexing at 10 min intervals) before being centrifuged (30 min; $14,000 \times \text{g}$; 4°C) and the supernatant collected. The nuclear fraction was obtained by suspending cells in hypotonic buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂). Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 0.5%, and the solution was vortexed for 10 s. The pellet containing the nuclear fraction was resuspended in ice-cold RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors and incubated on ice for 30 min (vortexing at 10 min intervals). The supernatant of the nuclear fraction homogenate was collected after centrifugation (30 min; $14,000 \times \text{g}$; 4°C). Protein concentration was determined using a Bicinchoninic Acid Kit (Sigma-Aldrich).

Analysis of NF-\kappaB subunit (p65 and p50) activity. NF- κ B analyses were carried out using the NF- κ B p65 and p50 Transcription Factor Assay Kit (Abcam, Cambridge, United Kingdom) that consists of double-stranded DNA sequence containing the NF- κ B response element immobilized onto the bottom of wells. p65 or p50 that was bound to the NF- κ B response element was detected by colorimetric readout using anti-p65 or anti-p50 primary antibodies and a horseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody. Analyses were performed in accordance with the manufacturer's instructions using lysates containing 15 µg of nuclear extract protein per well. Experiments were repeated three times.

Antibody array analysis. Analysis of proangiogenic cytokine synthesis was performed using an antibody array (ab134000; Abcam). The assay was performed in accordance with the manufacturer's instructions using lysates containing $100 \,\mu$ g/ml of total protein per membrane and cell extracts from three separate experiments. Membranes were visualized using the ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, USA).

STAT3 activation. Levels of total STAT3 protein and STAT3 phosphorylation (p-Y705) were assayed using Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISAs) (ab176655 and ab176654; Abcam). ELISAs were performed in accordance with the manufacturer's instructions using lysates containing 100 μ g/ml of total protein. A standard curve was constructed for each assay using serial dilutions of the control lysates. All experiments were repeated twice using cell extracts from three separate experiments.

ROS and nitric oxide synthesis analysis. Total ROS synthesis in glioma cells was analyzed using CellROX Green Reagent (Thermo Fisher Scientific), while mitochondrial superoxide levels were assessed using MitoSOX Red (Thermo Fisher Scientific). U87 and U118 cells were plated in black 96-well plates $(1 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ well})$ and 35 mm glass-bottomed dishes $(1 \times 10^5 \text{ cells/well}; \text{ Nest Biotechnology, Wuxi, China}) for confocal microscopy analysis and incubated for 24h. NG or nGO was introduced to the cells at concentrations of <math>20 \,\mu\text{g/ml}$ and incubated for 2 h at 37 °C. Cells were subsequently incubated with CellROX Green Reagent ($30 \,\text{min}; 37 \,^{\circ}\text{C}$) at a final concentration of $5 \,\mu\text{M}$ in supplemented DMEM medium or MitoSOX Red ($10 \,\text{min}; 37 \,^{\circ}\text{C}$) at a final concentration of the data was performed by subtracting the fluorescence intensity of blank wells containing cell medium (for the control group) or medium with NG or nGO nanoparticles (for treatment groups). MitoSOX Red staining was also observed using a confocal microscope (FV-1000; Olympus Corporation, Tokyo, Japan)

equipped with a temperature- and atmosphere-controlled chamber (37 °C; 5% CO₂). After the staining procedure described above, cells were counterstained with Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) at a final concentration of 10 μ M in PBS for 10 min. For visualization using confocal microscopy, cells were kept in PBS supplemented with 1% fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific).

Nitric oxide synthesis was determined using a fluorometric kit (Nitric Oxide Synthase Detection System; Sigma-Aldrich). U87 and U118 cells were plated in black 96-well plates (5×10^3 cells/well) and incubated for 24h. New medium containing NG or nGO was subsequently introduced to the cells at concentrations of 20µg/ml and incubated for 24h at 37 °C. Cells were incubated with a reaction mixture containing a diacetate derivative of 4,5-diaminofluorescein at a final concentration of 2.5μ M for 2 h at room temperature and washed with PBS. The fluorescence of triazolo-fluorescein was analyzed using a microplate reader (Tecan). Quantification of the data was performed by subtracting the fluorescence intensity of blank wells containing cell medium (for the control group) or medium with NG or nGO nanoparticles (for treatment groups).

Statistical analysis. Data were analyzed using one-way and multifactorial analysis of variance with Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Warrenton, USA). Differences between groups were tested with Tukey's honest significant difference test post hoc test. Results are shown as means with standard error of the mean. Differences at P < 0.05 were considered significant.

Data Availability

The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- 1. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature 473, 298-307 (2011).
- 2. Gilbertson, R. J. & Rich, J. N. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer* 7, 733–736 (2007).
- 3. Goel, S., Wong, A. H.-K. & Jain, R. K. Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2** (2012).
- 4. Holmström, K. M. & Finkel, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 15, 411–421 (2014).
- 5. Brown, D. I. & Griendling, K. K. Nox proteins in signal transduction. Free Radic Biol Med 47, 1239–1253 (2009).
- 6. Kostourou, V. et al. The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. Br J Cancer 104, 83–90 (2011).
- Morgan, M. J. & Liu, Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res* 21, 103–115 (2011).
 Cooks, T. *et al.* Mutant p53 prolongs NF-κB activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. *Cancer Cell* 23, 634–646 (2013).
- Liu, J., Zhang, C. & Feng, Z. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 46, 170–179 (2014).
- 10. Hanel, W. & Moll, U. M. Links between mutant p53 and genomic instability. J Cell Biochem 113, 433-439 (2012).
- 11. Holt, K. B. Undoped diamond nanoparticles: origins of surface redox chemistry. Phys Chem Phys 12, 2048–2058 (2010).
- 12. Qiu, Y. *et al*. Antioxidant chemistry of graphene-based materials and its role in oxidation protection technology. *Nanoscale* **6**, 11744–11755 (2014).
- Wierzbicki, M., Jaworski, S., Kutwin, M., Grodzik, M. & Strojny, B. Diamond, graphite and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion. *Int J Nanomedicine* 4, 7241–7254 (2017).
 Strojny, B. *et al.* Long term influence of carbon nanoparticles on health and liver status in rats. *PLoS One* 10, e0144821 (2015).
- Sydlik, S. A., Jhunjhunwala, S., Webber, M. J., Anderson, D. G. & Langer, R. *In vivo* compatibility of graphene oxide with differing oxidation states. *ACS Nano* 9, 3866–3874 (2015).
- Zakrzewska, K. E. et al. Analysis of the cytotoxicity of carbon-based nanoparticles, diamond and graphite, in human glioblastoma and hepatoma cell lines. PLoS One 10, e0122579 (2015).
- Wierzbicki, M. et al. Carbon nanoparticles downregulate expression of basic fibroblast growth factor in the heart during embryogenesis. Int J Nanomedicine 8, 3427–3435 (2013).
- 18. Wierzbicki, M. et al. Comparison of anti-angiogenic properties of pristine carbon nanoparticles. Nanoscale Res Lett 8, 195 (2013).
- 19. Walker, V. G. *et al.* Potential *in vitro* effects of carbon nanotubes on human aortic endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 236, 319–328 (2009).
- Murugesan, S., Mousa, S. A., O'Connor, L. J., Lincoln, D. W. & Linhardt, R. J. Carbon inhibits vascular endothelial growth factor- and fibroblast growth factor-promoted angiogenesis. FEBS Lett 581, 1157–1160 (2007).
- Juarez, J. C. et al. Superoxide dismutase 1 (SOD1) is essential for H2O2-mediated oxidation and inactivation of phosphatases in growth factor signaling. Proc Natl Acad Sci USA 105, 7147–7152 (2008).
- 22. Tak, P. P. & Firestein, G. S. NF-κB: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest 107, 7-11 (2001).
- Cao, S., Zhang, X., Edwards, J. P. & Mosser, D. M. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. J Biol Chem 281, 26041–26050 (2006).
- 24. Kravtsova-Ivantsiv, Y. *et al.* KPC1-mediated ubiquitination and proteasomal processing of NF-κB1 p105 to p50 restricts tumor growth. *Cell* **161**, 333–347 (2015).
- Kamata, H. et al. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. Cell 120, 649–661 (2005).
- Jamaluddin, M., Wang, S., Boldogh, I., Tian, B. & Brasier, A. R. TNF-alpha-induced NF-kappaB/RelA Ser(276) phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. *Cell Signal* 19, 1419–1433 (2007).
- Moon, E.-Y., Lee, J.-H., Lee, J.-W., Song, J.-H. & Pyo, S. ROS/Epac1-mediated Rap1/NF-kappaB activation is required for the expression of BAFF in Raw264.7 murine macrophages. *Cell Signal* 23, 1479–1488 (2011).
- Hara, K. et al. Scavenging of reactive oxygen species by astaxanthin inhibits epithelial-mesenchymal transition in high glucosestimulated mesothelial cells. PLoS One 12, e0184332 (2017).
- Matthews, J. R., Kaszubska, W., Turcatti, G., Wells, T. N. & Hay, R. T. Role of cysteine62 in DNA recognition by the P50 subunit of NF-kappa B. *Nucleic Acids Res* 21, 1727–1734 (1993).
 Matthewa, J. B., Walesquei, N., Visolinia, L. L. & Hay, R. T. Thioredovin regulates the DNA hinding activity of NE kappa P.
- Matthews, J. R., Wakasugi, N., Virelizier, J. L., Yodoi, J. & Hay, R. T. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* 20, 3821–3830 (1992).
- Matthews, J. R., Botting, C. H., Panico, M., Morris, H. R. & Hay, R. T. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. Nucleic Acids Res 24, 2236–2242 (1996).
- Simon, P. S. et al. The NF-κB p65 and p50 homodimer cooperate with IRF8 to activate iNOS transcription. BMC Cancer 15, 770 (2015).

- Yee, D. et al. Effect of radiation on cytokine and cytokine receptor messenger-RNA profiles in p53 wild and mutated human glioblastoma cell lines. Clin Invest Med 24, 76–82 (2001).
- Yin, D. et al. Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). Oncogene 24, 344–354 (2005).
- 35. Eitel, J. A. *et al.* PTEN and p53 are required for hypoxia induced expression of maspin in glioblastoma cells. *Cell Cycle* **8**, 896–901 (2009).
- 36. Yang, L. et al. Mutations of p53 and KRAS activate NF-κB to promote chemoresistance and tumorigenesis via dysregulation of cell cycle and suppression of apoptosis in lung cancer cells. Cancer Lett 357, 520–526 (2015).
- Zhou, Y. et al. The chemokine GRO-α (ČXCL1) confers increased tumorigenicity to glioma cells. Carcinogenesis 26, 2058–2068 (2005).
- Niu, J., Azfer, A., Zhelyabovska, O., Fatma, S. & Kolattukudy, P. E. Monocyte chemotactic protein (MCP)-1 promotes angiogenesis via a novel transcription factor, MCP-1-induced protein (MCPIP). J Biol Chem 283, 14542–14551 (2008).
- Deng, Y. Y., Lu, J., Ling, E. A. & Kaur, C. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) produced via NF-kappaB signaling pathway mediates migration of amoeboid microglia in the periventricular white matter in hypoxic neonatal rats. *Glia* 57, 604–621 (2009).
- 40. Brasier, A. R. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res* 86, 211–218 (2010).
- 41. Middleton, K., Jones, J., Lwin, Z. & Coward, J. I. G. Interleukin-6: an angiogenic target in solid tumours. Crit Rev Oncol Hematol 89, 129–139 (2014).
- 42. Xie, T.-X., Xia, Z., Zhang, N., Gong, W. & Huang, S. Constitutive NF-kappaB activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. *Oncol Rep* 23, 725–732 (2010).
- Saidi, A. et al. Combined targeting of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor potently inhibits glioma growth and invasiveness. Int J Cancer 125, 1054–1064 (2009).
- 44. Lai, Y. et al. Interleukin-8 induces the endothelial cell migration through the Rac 1/RhoA-p38MAPK pathway. Eur Rev Med Pharmacol Sci 16, 630–638 (2012).
- 45. Hodge, D. R., Hurt, E. M. & Farrar, W. L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. Eur J Cancer 41, 2502–2512 (2005).
- Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L. W., Neufeld, G. & Levin, B.-Z. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 271, 736–741 (1996).
- 47. Wang, S.-W. & Sun, Y.-M. The IL-6/JAK/STAT3 pathway: potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (Review). Int J Oncol 44, 1032–1040 (2014).
- Akanda, M. R. *et al.* Regulation of JAK2/STAT3 and NF-κB signal transduction pathways; *Veronica polita* alleviates dextran sulfate sodium-induced murine colitis. *Biomed Pharmacother* 100, 296–303 (2018).
- Wung, B. S., Hsu, M. C., Wu, C. C. & Hsieh, C. W. Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation. *Life Sci* 78, 389–397 (2005).
- 50. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 9, 671-675 (2012).
- Carpentier, G., Martinelli, M., Courty, J. & Cascone, I. Angiogenesis analyzer for ImageJ. 4th ImageJ User and Developer Conference Proceedings. Mondorf-les-Bains, Luxembourg. 198–201 (2012).

Acknowledgements

This work was supported by the Polish National Research Council grant NCN 2016/21/B/NZ9/01029 and the Warsaw University of Life Sciences internal grant 505-10-070400-N00376-99. The manuscript is part of the habilitation thesis of Mateusz Wierzbicki.

Author Contributions

M.W. proposed and designed the study, guided the experiments and data analysis, and wrote the manuscript. M.W., B.S. and S.J. performed the experiments. M.G. analyzed the data. A.C. and E.S. supervised the research and assembly of the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-018-33179-3.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2018
NANO EXPRESS

Open Access

Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatform



Mateusz Wierzbicki^{1*}, Sławomir Jaworski¹, Ewa Sawosz¹, Anna Jung², Grzegorz Gielerak², Henryk Jaremek³, Witold Łojkowski⁴, Bartosz Woźniak⁴, Leszek Stobiński⁵, Artur Małolepszy⁵ and André Chwalibog⁶

Abstract

Antibacterial surfaces coated with nanomaterials, including silver nanoparticles, are considered effective alternative antimicrobial agents that can be used instead of antibiotics and chemical agents. However, reports of the potential toxicity of these materials raise questions about the safety of their use in biomedical applications. The objective of this research was to reduce the human cell cytotoxicity of silver nanoparticle-coated polyurethane foils by complexing silver nanoparticles with graphene oxide. The antimicrobial activity of nanoplatforms coated with silver nanoparticles, graphene oxide and the composite of silver nanoparticles and graphene oxide was assessed with *Salmonella enteritidis*. Cytotoxicity was analysed by an analysis of the viability and morphology of human fibroblasts, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and chicken embryo chorioallantoic membrane. Additionally, the synthesis level of inflammatory proteins was examined for fibroblasts cultured on different nanoplatforms. The nanoplatform coated with the silver nanoparticles and graphene oxide composite showed strongest antibacterial properties, although nanoplatforms coated with only silver nanoparticles or graphene oxide also resulted in decreased *S. enteritidis* growth. Furthermore, a nanoplatform coated with silver nanoparticles and graphene oxide the immunological stimulation and significantly reduced cytotoxicity towards fibroblasts, HUVECs and chicken embryo chorioallantoic membrane in comparison to the nanoplatform coated only with silver nanoparticles, due to the higher stability of the nanomaterials in the nanocomposite.

Keywords: Silver nanoparticles, Graphene oxide, Antibacterial surface, Toxicity, Fibroblasts, Endothelial cells

Introduction

Materials with antibacterial surfaces have been widely explored for use in medicine and the biomedical industry [1]. Nanomaterials are considered effective alternative antimicrobial agents that can be used instead of antibiotics and chemical agents [2]. Silver nanoparticles (AgNPs) are most often used for their antibacterial properties [3]. However, nanoparticles that show antimicrobial activity, including AgNPs, especially at higher concentrations, can be toxic to human cells and possibly affect human health

¹Institute of Biology, Department of Nanobiotechnology and Experiemntal Ecology, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland

Full list of author information is available at the end of the article

[4, 5]. Therefore, in the biomedical industry, the application of materials with surfaces coated with nanomaterials raises questions about their safety and toxicity.

One of the possible ways to minimalise the potential toxicity of nanomaterials is to limit their mobility without changing their antimicrobial properties. Firmly attached nanomaterials used in antibacterial surfaces that do not detach from the material reduce their toxicity for human cells [6]. One of the effective methods of coating surfaces with nanoparticles is ultrasonic technology [7]. Ultrasonic waves lead to structural changes to the nanomaterials, resulting in deagglomeration or agglomeration, depending on the nanomaterial [8]. Ultrasonic technology can also be used for the synthesis of nanocomposites from different materials, including metal ions and nanoparticles [9–11].



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

^{*} Correspondence: mateusz_wierzbicki@sggw.pl

Sonication has been used for the assembly of different nanomaterials, including the decoration of graphene oxide (GO) flakes with AgNPs and other nanoparticles [12].

The mechanism of the antibacterial activity of nanoparticles varies between the different types of nanoparticle; however, the main processes responsible for the antimicrobial properties of nanoparticles are as follows: direct interactions with the cell components and indirect processes including oxidation of cell components and disruption of oxidoreductive processes [3]. AgNP antibacterial activity results from the direct disruption of the bacterial cell membrane by AgNPs and the released Ag+ ions, inducing synthesis of reactive oxygen species (ROS), and the collapse of the plasma membrane potential, which leads to the depletion of intracellular ATP [13–15]. GO can be cytotoxic for bacterial cells due to ROS synthesis and direct cell immobilisation on the GO surface [16, 17], caused by the high adsorption capacities of GO and GO nanocomposites [18, 19].

However, the toxicity of nanoparticles has not only been observed in bacterial cells. Generally, human cells are less vulnerable to nanoparticles than bacteria due to their larger scale, and their effective repair and defence mechanisms, but cytotoxicity has been observed, especially at high concentrations. AgNP toxicity in in vitro studies occurs in concentrations of a similar order of magnitude, although they may vary substantially for more complex different biological systems or organisms [20]. The toxicity of AgNPs for multicellular organisms is often lower due to their structural and physiological differences, such as specialised cellular tissues, including epithelial cells [21]. GO biocompatibility for human cells depends on the concentration and sheet morphology. At higher concentrations, GO can lead to plasma membrane penetration and increased synthesis of ROS [22-24].

In our previous studies, we showed that nanoplatforms composed of AgNP and GO (Ag-GO) nanocomposite have a high antimicrobial efficiency towards bacteria (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*) and pathogenic yeast (*Candida albicans*), which was related with the increased ROS synthesis and plasma membrane perforation [25]. Ag-GO showed higher antibacterial activity than the AgNP or GO nanoplatforms, due to the combined activity of both nanomaterials. Here, we hypothesised that polyurethane foils coated with Ag-GO nanocomposite would have lower toxicity towards fibroblasts, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and an alternative in vivo model—chicken embryo chorioallantoic membrane—than foils only coated with AgNPs.

Results

AgNPs and GO Formed a Nanocomposite in Hydrocolloid

The transmission electron microscope (TEM) analysis was used to evaluate the morphology of the nanomaterials and their interactions within the Ag-GO composite (Fig. 1). AgNPs were spherical nanoparticles that had a mean size of approximately 55 nm. Additionally, TEM images showed the adhesion of silver nanoparticles to GO (Fig. 1e). These observations where further confirmed in the zeta potential analysis. The zeta potential of Ag-GO indicated that the hydrocolloid was unstable immediately after sonication, but stabilised after 24 h (zeta potential: -15.68 and - 27.7 mV, respectively; Table 1). In contrast, the AgNP hydrocolloid was unstable both immediately after sonication and after 24 h, whereas the GO hydrocolloid was guite stable and did not change significantly after 24 h (zeta potential: - 31.11 mV and - 28.42 mV, respectively). Additionally, dynamic light scattering (DLS) analysis showed that the Z-average size of AgNPs was 93.1 nm, GO was 1485.0 nm and Ag-GO was 1157.0 nm. The AgNP size distribution indicated three peaks associated with agglomerate formation, while the GO and Ag-GO size distribution indicated one peak (Fig. 1b, d, f).

Raman spectra and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) were used to characterise structural features of GO (Fig. 2). Figure 2a shows deconvolution of the D, G and D' of GO. The position of the D band is 1347 cm⁻¹ and the G band 1578 cm⁻¹; the ID/IG ratio is 1.34. The FT-IR analysis revealed a broad peak observed at ~ 3500 cm⁻¹, that is assigned mainly to water and hydroxyl groups. The peak around 1600 cm⁻¹ is assigned to C=C bonds present in graphitic carbon. Other peaks observed on the FT-IR spectrum show that GO is rich in groups containing C=O bonds (mainly carboxyl groups), peaks around 1720 cm⁻¹ and 915 cm⁻¹, epoxy (C–O–C) with the visible peak around 1200 cm⁻¹, and C–H bonds (peak around 2800 cm⁻¹).

AgNP-, GO- and Ag-GO-Coated Foils Reduced Salmonella enteritidis Growth

The antibacterial activity of the GO, AgNP and Ag-GO nanoplatforms was tested with *S. enteritidis.* The incubation of bacteria on foils coated with nanomaterials at 37 °C for 24 h resulted in decreased growth (Fig. 3). The strongest *S. enteritidis* growth inhibition was observed on the Ag-GO nanoplatform. However, both the AgNP and GO nanoplatforms also resulted in decreased *S. enteritidis* growth. A comparison of the scanning electron microscope (SEM) images of bacteria incubated on the Ag-GO nanoplatform to the control group showed a reduced number of *S. enteritidis* cells. Additionally, bacteria were adhered to the nanoplatforms and showed morphological changes, indicating the disruption of their cell membrane.

AgNP Toxicity Is Inhibited by GO in an Ag-GO Composite-Coated Nanoplatform

The toxicity of nanoplatforms was investigated by the direct incubation of fibroblasts and HUVECs for 24 h on nanoplatforms and uncoated foils (Fig. 4). There were



significant differences between the viability of both fibroblasts and HUVECs on the different nanoplatforms (P = 0.0003 and P = 0.0156, accordingly). GO nanoplatforms did not change the viability of fibroblasts, compared to the viability of cells incubated on uncoated foils. Similarly, there was no significant impact of GO on the viability of HUVECs. However, coating with AgNPs resulted in a 40– 50% decrease of the viability of both fibroblasts and HUVECs. The cell viability of fibroblasts and HUVECs was not changed when they were incubated on nanoplatforms coated with Ag-GO nanocomposite, showing the inhibition of AgNP toxicity. Cell morphology on uncoated foils showed the typical morphology of fibroblasts grown in 2D culture conditions (Fig. 4a). Cells incubated on AgNP-coated foil showed an intensive aggregation of cells. Cell morphology on the GO- and Ag-GO-coated nanoplatforms showed a reduction of agglomeration tendencies and cell spreading.

Nanoplatform toxicity was also evaluated using a chicken embryo chorioallantoic membrane (Fig. 5). Nanoplatforms were incubated directly on a chorioallantoic membrane, and its morphology at the place of contact was examined after

Table 1 Zeta potentials of the evaluated nanomaterials

Nanomaterial	Zeta potential after sonication [mV]	Zeta potential 24 h after sonication [mV]
Silver nanoparticles	- 2.7	- 6.5
Graphene oxide	- 31.1	- 28.4
Nanocomposite of silver nanoparticles and graphene oxide	- 15.7	- 27.7



48 h. AgNPs caused morphological changes to the chorioallantoic membrane, whereas in the case of the GO and Ag-GO nanoplatforms, the morphology was comparable to that of the control group (Fig. 5b). The chorioallantoic membrane, after incubation on the AgNP nanoplatform, showed a decreased number of capillary vessels, suggesting direct toxicity to the endothelial and mesenchyme cells.

AgNPs Decreased the Release of Interleukins 6 and 8

An antibody array was used to analyse the cell media content of 40 inflammatory proteins synthetised by fibroblasts (Fig. 6). The main inflammatory proteins released by fibroblasts were interleukin 8 (IL-8; Fig. 6, dots: E5, F5) and interleukin 6 (IL-6; Fig. 6, dots: E8, F8). The AgNP and Ag-GO nanoplatforms significantly decreased the release level of IL-8, whereas the GO nanoplatform did not have such an effect. Additionally, both the GO and Ag-GO nanoplatforms decreased the release level of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; Fig. 6, dots: G5, H5). The GO and Ag-GO nanoplatforms also led to the increased release level of tumour necrosis factor beta (TNF- β ; Fig. 6, dots: A9, B9). Interestingly, AgNP, GO and Ag-GO nanoplatforms significantly decreased the release level of IL-6. The level of release of the other analysed proteins was not changed. An array map with a list of all the analysed cytokines is included in Additional file 1: Figure S1.



Fig. 3 Nanoplatforms coated with silver nanoparticles and graphene oxide decreased the viability of *S. enteritidis*. Scanning electron microscope images of **a** control *S. enteritidis* bacteria and **b** *S. enteritidis* incubated on a silver nanoparticle- and graphene oxide-coated nanoplatform, after incubation at 37 °C for 24 h. **c** Viability of *S. enteritidis* after incubation on the nanoplatform for 24 h was assessed with a PrestoBlue assay. Values are expressed as mean \pm standard deviation (n = 3, each experiment in triplicate). Statistical significance is indicated by different superscripts (one-way ANOVA; P < 0.05). Abbreviations: C, control group (foil without nanoparticles); AgNPs, nanoplatform coated with silver nanoparticles; GO, nanoplatform coated with graphene oxide; Ag-GO, nanoplatform coated with composite of graphene oxide and silver nanoparticles; RU, relative units



Discussion

In biomedical applications, the safety of nanomaterials used in antimicrobial materials is as important as their efficiency in killing bacteria. In this study, we showed that coating materials with GO can efficiently decrease the toxicity of nanomaterials. Polyurethane foil coated with AgNPs and GO (Ag-GO) not only increased their antimicrobial properties, but also decreased their toxicity in human cells.

Raman spectroscopy was used to analyse structural features of graphene oxide. The G band in the Raman







spectra corresponds to sp^2 hybridised carbon-based material [26]. The D peak is related to defect or lattice disorder due to the binding of oxygen-functional group [27]. The intensity of the D band is associated with the size of the sp^2 in-plane domains [26]. The additional bands D' arise from the defects present in the graphitic structure of the carbon material. ID/IG ratio (calculated from the intensity of D and G bands) can be used to characterise the disorder of the graphitic structure in carbon materials. As demonstrated, GO has a highly disordered structure due to many functional groups in the structure formed during the oxidation of graphite powder [28].

The FT-IR spectrum of graphene oxide collected in the ATR mode revealed that GO has a lot of functional groups present in the structure, including carboxyl and epoxy groups, peaks around 1720 cm^{-1} and 915 cm^{-1} , epoxy (C–O–C) with the visible peak around 1200 cm^{-1} , and C–H bonds (peak around 2800 cm^{-1}). The FT-IR analysis is in good agreement with XPS measurements performed for GO where also hydroxyl, carboxyl, epoxy and carbonyl groups were identified [29].

The coating of nanomaterials was performed with ultrasonic technologies, which have been confirmed to be an effective method of coating various materials with antibacterial and fungicidal substances, including AgNPs [30, 31]. Ultrasonic waves utilise cavitation phenomena by generating and collapsing cavitation bubbles, producing high energy and pressure [32]. Nanomaterials accelerated to high velocities collide with the coated material and are deposited on the surface [33]. However, the effectivity of nanomaterial deposition can be increased not only by using a proper coating method, but also by making composites with nanomaterials that can be more easily attached to the surface. GO is a favourable nanomaterial for creating stable composites with both different nanomaterials and surfaces. Due to its unique structure, with carbon atoms in a hexagonal pattern with numerous oxygencontaining functional groups in close proximity, including carboxyl and hydroxyl groups, GO is prone to form covalent bonds or electrostatic interactions [34]. Usually, GOnanoparticle composites are synthesised by the attachment of metal ions or metal nanoparticles to GO surfaces through electrostatic or covalent interactions. Additionally, the reduction of metal ions and/or GO is performed to form covalent bonds [35]. Ag-GO composites have been made using ultrasonication by the in situ reduction of Ag⁺ [36, 37], as well by the deposition of AgNPs [12]. In our previous report, we showed that ultrasonic methods can be used to synthesise Ag-GO-coated nanoplatforms on polyurethane foils [25]. However, sonication not only led to coating polyurethane foils with nanomaterials, but also to the formation of an Ag-GO composite. The formation of the Ag-GO composite, even before coating the foils, could have result in the greater stability of AgNPs after coating.

In our studies, fibroblasts and HUVECs were used for cytotoxicity studies followed by analysis of chicken embryo chorioallantoic membrane. Skin fibroblasts are considered as a good model for skin irritation studies compared to in vivo analysis [38], whereas endothelial cells, including HUVEC cytotoxicity, are often studied due to probable direct contact of nanoparticles in biomedical applications and sensitivity of these cells to nanoparticles [39, 40]. Chicken embryo chorioallantoic membrane is an alternative in vivo model to rodent models for various toxicology studies including material toxicology and acute toxicological studies [41, 42].

Fibroblasts and HUVECs had higher viability when grown on Ag-GO than AgNP-coated nanoplatforms. Additionally, the AgNP nanoplatform caused morphological changes in the chorioallantoic membrane, whereas in the case of the GO and Ag-GO nanoplatforms, cell morphology was comparable to the control group. The decrease of toxicity on the Ag-GO nanoplatform could result from the combined effects of a higher stability of AgNPs in the complex with GO and a better deposition of AgNPs in the nanoplatform. The toxicity of animal cells is often more severe after nanoparticles have entered the cell by direct penetration or endocytosis [43]. Nanoparticle endocytosis is size and shape dependent. Bigger particles and composites are taken up to a lesser extent than particles that are approximately 45 nm in size [44]. The most noticeable relation between endocytosis and shape or size of nanomaterials is characteristic for carbon wall nanotubes. Nanotubes with length less than 1 µm effectively penetrate plasma membrane through direct diffusion, whereas phagocytosis or endocytosis pathways internalise longer nanotubes and agglomerates [45]. Recently, the Ag-GO nanocomposite was shown to be internalised by J774 macrophages, approximately 60% less than AgNPs. However, because Ag-GO induced more ROS, the overall toxicity for the cells was higher [46]. Additionally, kinetic analysis of shape-dependent internalisation of nanoparticles shows that spherical sized nanoparticles are generally internalised much faster than flat particles [47]. Furthermore, the toxicity of nanoparticles for human cells is usually size dependent, in which smaller particles show stronger cytotoxic properties. In studies on the size-dependent cytotoxicity of AgNPs for RAW, 264.7 macrophages and L929 fibroblast nanoparticles had lower viability after treatment with 20-nm AgNPs than after treatment with larger nanoparticles (80, 113 nm) [13]. Therefore, the increased size of Ag-GO composites and the decreased ability of cells to uptake nanoparticles resulting from stable deposition to the surface could be the reason for the observed higher viability of both HUVECs and fibroblasts cultured on the Ag-GO nanoplatform.

The AgNP and Ag-GO nanoplatforms significantly decreased the release level of IL-8 by fibroblasts. The GO and Ag-GO nanoplatforms led to an increased release of TNF- β . Additionally, AgNP, GO and Ag-GO nanoplatforms decreased the release of IL-6. Interestingly, changes in the synthesis of proinflammatory proteins by fibroblasts were related to the incubation of cells on nanoplatforms coated with AgNPs or GO. The synthesis levels of cells incubated on Ag-GO did not differ from those incubated on nanoplatforms coated with only one of these nanomaterials, suggesting that biological activity did not change after the synthesis of the composite. Fibroblasts are important in inflammatory and remodelling processes by initiating inflammatory responses and precipitating in the switch from acute inflammation to tissue repair [48, 49]. Therefore, the analysis of fibroblast secretions of inflammatory cytokines is important to predict the immunological response to nanoplatforms. Both IL-6 and IL-8 are one of the key inflammatory cytokines that, after synthesis by fibroblasts, leads to the activation of the immunological response [50, 51]. The human epidermal keratinocyte synthesis level of IL-6 decreases after treatment with AgNPs [52]. Similarly, the inhibition of IL-6 release by AgNPs was demonstrated in Jurcat cells and involves the MAPK pathway. AgNPs also decrease the synthesis levels of tumour necrosis factor alpha (TNF- α) [53]. TNF- α and, very similar in structure and function, TNF- β are inflammatory cytokines that are important during the acute inflammation phase. Although immune cells are mainly responsible for the release of those proteins during the acute phase of inflammation, fibroblasts and different cells are involved in the synthesis of inflammatory cytokines during the early process of wound healing [54]. Activity to induce TNF- α after treatment with GO was demonstrated using RAW264.7 macrophages [55], which suggests immunological stimulation. However, in our studies, the release levels of most of the analysed proinflammatory proteins were not changed after the cells were cultured on the GO and Ag-GO nanoplatforms. Therefore, these analyses suggest that both the GO and Ag-GO nanoplatforms possess good biocompatibility and should not lead to strong immunological reactions.

Conclusions

In conclusion, the presented results show that nanoplatforms coated with an Ag-GO composite have showed stronger growth inhibition of *S. enteritidis* than AgNP- and GO-coated nanoplatforms. Moreover Ag-GO composite significantly reduced cytotoxicity towards fibroblasts, HUVECs and chicken embryo chorioallantoic membrane, in comparison to nanoplatforms coated with AgNPs. The cell viability of fibroblasts and HUVECs was not changed when they were incubated on nanoplatforms coated with Ag-GO nanocomposite, showing the inhibition of AgNP toxicity. These results, together with low immunological stimulation, suggest that the GO could be used for reduction of cytotoxicity of different nanomaterials in nanocomposites. Furthermore, the results suggest that the Ag-GO nanoplatform could be considered for use in biomedical applications. However, additional studies are needed to evaluate Ag-GO nanoplatform for specific applications, including wound dressings.

Materials and Methods

Preparation and Characterisation of Nanoplatforms Coated with Nanomaterials

Nanoplatforms made from nanoparticle-coated polyurethane foils were prepared as previously described [25]. Square-shaped polyurethane foils $(15 \times 15 \text{ mm}, 0.05 \text{ mm})$ thick) were covered with suspensions of AgNPs (HydroSilver1000, Amepox, Łódź, Poland) synthetised by chemical reduction reaction in the presence of polyvinyl alcohol developed by Amepox and/or GO synthetised by modified Hummers' method. Ten grams of graphite powder was mixed with 230 ml of concentrated sulphuric acid (98%) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) at a temperature below 10 °C. Subsequently, 4.7 g of sodium nitrate (Sigma-Aldrich) and 30 g of potassium permanganate (Sigma-Aldrich) were added to the graphite mixture, while keeping the temperature below 10 °C. Then, the mixture was heated to 30 °C and stirred for 2 h. Subsequently, 100 ml of water was added and the mixture was treated with 10 ml of hydrogen peroxide. GO was purified by filtration and washed with deionised water until the pH of the filtrate reached 6.5. Suspensions of GO, AgNPs and the composite of AgNPs and GO (Ag-GO) were prepared in deionised water. During coating, the concentrations of nanomaterials were as follows: GO, 200 mg/l; AgNPs, 100 mg/l; Ag-GO, 200 mg/l; and AgNPs, 100 mg/l. Nanoparticle coating was performed using an ultrasonic horn (Ti horn, Ø13 mm, 60% efficiency, 20 kHz; Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA) at a temperature of $30 \pm$ 1 °C. The covered samples were flushed in deionised water and dried in sterile conditions. Nanoplatform characterisation with a scanning electron microscope (SEM), atomic force microscope (AFM) and lateral force microscope (LFM) has been previously reported, showing nanoplatforms almost entirely covered with nanomaterials [25].

The nanomaterials used to obtain the nanoplatforms were imaged using a transmission electron microscope (TEM). TEM images were acquired using a JEM-1220 microscope (JEOL, Tokyo, Japan) at 80 kV with a Morada 11-megapixel camera (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Samples were prepared by placing droplets of hydrocolloids onto formvar-coated copper grids (Agar Scientific, Stansted, UK), which were allowed to air-dry before observations.

Raman spectra were collected using a Renishaw inVia spectrometer with a 532-nm laser source (Wotton-under-Edge, UK). To avoid heating of the sample, the laser power was kept low (0.3 mW, calibrated on the sample). The Raman mapping mode was used with a scan area of approximately $10 \times 10 \,\mu$ m, containing 25 spectra). Each spectrum

consisting of two main bands, a G band (~ 1578 cm^{-1}) and D band (~ 1347 cm^{-1}), was fit using Lorentzian line shape. FT-IR measurements were performed using a Nicolet iS10 spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in attenuated total reflectance mode on a diamond crystal. Graphene oxide suspension was dried on the polyethylene surface at room temperature to create GO thin foil. The spectrum was collected in the range 400–4000 cm⁻¹.

Zeta potential measurements of GO (20 mg/l), AgNPs (10 mg/l) and Ag-GO (GO 20 mg/l and AgNPs 10 mg/l) were carried out with a Nano-ZS90 Zetasizer (Malvern Instruments, Malvern, UK) at $25 \,^{\circ}$ C, using the Smoluchowski approximation. Nanomaterials were sonicated for 30 min and zeta potential was immediately measured. Subsequently, nanomaterials were left for 24 h at room temperature and the zeta potential was measured again. Each measurement was repeated at least seven times after 60 s of stabilisation at $25 \,^{\circ}$ C.

The hydrodynamic diameter of nanoparticles in water and their size distribution were measured with dynamic light scattering (DLS) using a Nano-ZS90 Zetasizer (Malvern). Similar to for the zeta potential analysis, GO (20 mg/l), AgNPs (10 mg/l) and Ag-GO (GO 20 mg/l and AgNPs 10 mg/l) were sonicated for 30 min and left for 24 h at room temperature. Each sample was measured at least seven times at 25 °C.

Bacterial Cultivation

Salmonella enteritidis subspecies enterica serovar Enteritidis (ATCC 13076) was obtained from LGC Standards (Łomianki, Poland). The bacteria were grown on tryptic soy agar (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The bacteria, grown on agar plates, were harvested by gently washing the plates with sterile distilled saline solution. To calculate the number of bacteria in the cell suspension, the optical density of the suspensions at 600 nm (OD600) was measured using a spectrophotometer (Helios Epsilon, Unicam, Milwaukee, WI, USA). A calibration curve was prepared by performing serial tenfold dilutions of bacterial suspensions of a known optical density, up to 10^{-5} . After 24 h of incubation at 37 °C, the number of formed colonies was enumerated and the number of colony-forming units (CFU) of the original bacterial suspension was calculated.

Bacteria Viability Assay

Viability was evaluated using a PrestoBlue Cell Viability Assay (Thermo Fisher Scientific). Bacteria were cultured onto foils coated with GO, AgNPs and Ag-GO, located on inserts inserted into six-well plates (200 μ l MH broth with 5×10^3 CFU per foil) and incubated for 24 h. Subsequently, 90 μ l of each sample was transferred to 96-well plates and 10 μ l of PrestoBlue reagent was added to each well and incubated for an additional 2 h at 37 °C. The optical density of each well was recorded at 570 nm using a microplate reader (Infinite M200, Tecan, Durham, NC, USA). Bacteria viability was expressed as the relative value after substitution of the absorbance from the blank samples. Experiments were repeated three times.

Scanning Electron Microscopy Analysis

Bacteria were incubated on foils with Ag-GO and a sterile cover glass. Bacteria cultures (100μ l, 10^6 CFU/ml) were incubated on foils and a cover glass for 24 h at 37 °C. All samples were dried and covered with gold. Cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and contrasted with 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich) and 1% carbohydrazide (Sigma-Aldrich). Subsequently, cells were dehydrated in increasing concentrations of hexylene glycol (Sigma-Aldrich). Drying was performed using a Polaron CPD 7501 critical point dryer (Quorum Technologies, Laughton, UK). Finally, the samples were imaged with a SEM (FEI Quanta 200, Tokyo, Japan) at an acceleration voltage of 15 kV.

Human Cell Lines

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs; catalogue number: C0035C) and human fibroblasts (catalogue number: C0135C) were obtained from Thermo Fisher Scientific. HUVECs were maintained on low-serum Medium 200 basal media supplemented with Large Vessel Endothelial Supplement (Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific), whereas fibroblasts were cultured in low-serum Medium 106 (Thermo Fisher Scientific) supplemented with Low Serum Growth Supplement (Thermo Fisher Scientific) and 1× penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% $CO_2/95\%$ air.

To analyse biological interactions, the nanoplatforms were put into six-well plates. After detachment from the cell culture flask, HUVECs or fibroblasts were placed directly on the nanoplatform with 100 μ l of growth media. To avoid the media drying during incubations, plates were kept in humidity chambers.

Analysis of Nanoplatform Toxicity to HUVECs and Fibroblasts

To analyse HUVEC and fibroblast viability on the nanoplatforms, cells were cultured in the droplet directly on the nanoplatforms or uncoated foil $(1 \times 10^4 \text{ cells in } 100 \,\mu\text{J}$ growth media). After 24 h of incubation, cell viability was analysed using a PrestoBlue assay (Thermo Fisher Scientific). PrestoBlue reagent was incubated with assessed cells for 2 h in a cell culture incubator. Subsequently, 50 μ l of growth media with PrestoBlue reagent was transferred to a 96-well plate where fluorescence (excitation $\lambda = 560 \,\text{nm}$, emission $\lambda = 590 \,\text{nm}$) was analysed using a Tecan Infinite

200 microplate reader (Tecan, Durham, USA). Cell viability was expressed as the relative value after substitution of the fluorescence from blank samples. Experiments were repeated three times.

Fibroblast morphology was observed using an inverted optical microscope (Olympus Corporation) using phase contrast. Fibroblasts were seeded in 35-mm diameter Petri dishes directly on the nanoplatforms (1×10^4 cells in 100 µl growth media). Images were taken after 24 h of incubation.

Chorioallantoic Membrane Assay

Fertilised eggs from Ross 308 hens were obtained from a certified hatchery and kept for 4 days at 12 °C. The eggs were cleaned, sterilised with UVC light and divided into four groups $(4 \times 20 \text{ eggs})$. Embryos were incubated at standard conditions (temperature 37 °C, humidity 60% and turned once per hour). At 8 days of embryonic development, small holes (1 cm²) were made in the shell above the air space, the inner membrane was gently striped off and the nanoplatforms were placed on the chicken embryo chorioallantoic membrane. Subsequently, chicken embryos were incubated for the next 48 h, when nanoplatforms were cut out with the chorioallantoic membrane that was directly below the nanoplatform. The chorioallantoic membrane on the nanoplatforms was imaged using a stereoscopic microscope (SZX10, Olympus Corporation).

Antibody Array Analysis

An analysis of inflammation cytokines in fibroblast growth medium was performed using an antibody array (Abcam, Cambridge, UK; catalogue number ab134003). Fibroblast cells (1×10^4) were incubated on nanoplatforms coated with AgNPs, GO, Ag-GO and uncoated foil with 100 µl of media. After 24 h, 80 µl of growth medium was collected. For each experimental group, the growth medium from six foils was used for analysis. Pooled growth medium from the six experiments was centrifuged (1600 rpm for 5 min), and 500 µl of growth media was diluted in 500 µl of PBS. Therefore, 1 ml of diluted growth media was used per each analysed membrane. The assay was performed in accordance with the manufacturer's instructions. Diluted growth media was incubated with the membranes for 24 h at 4 °C. Subsequently, antibodies conjugated with biotins were added and incubated for the next 24 h at 4 °C. In the next step, the membranes were incubated with streptavidin conjugated with horseradish peroxidase for 2 h at room temperature. Membranes were visualised after the addition of the provided horseradish peroxidase substrate using a ChemiDoc imaging system (Bio-Rad, Hercules, USA).

Statistical Analysis

Data were analysed using one-way analysis of variance with GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences between groups were tested with Tukey's HSD post hoc tests. Results are shown as means with standard deviations. Differences at P < 0.05 were considered significant.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10. 1186/s11671-019-3166-9.

Additional file 1: Figure S1. Antibody array map.

Abbreviations

Ag-GO: Composite of silver nanoparticles and graphene oxide; AgNPs: Silver nanoparticles; CFU: Colony-forming units; DLS: Dynamic light scattering; FT-IR: Fourier transform infrared spectroscopy; GM-CSF: Granulocytemacrophage colony-stimulating factor; GO: Graphene oxide; HUVECs: Human umbilical vein endothelial cells; IL-6: Interleukin 6; IL-8: Interleukin 8; SEM: Scanning electron microscope; TEM: Transmission electron microscope; TNF-α: Tumour necrosis factor alpha; TNF-β: Tumour necrosis factor beta

Acknowledgements

The manuscript is a part of the habilitation thesis of Mateusz Wierzbicki.

Authors' Contributions

MW designed the study, guided the experiments and data analysis and wrote the manuscript. MW, SJ and ES performed the experiments. AJ, GG and HJ supervised the assembly of the manuscript. WŁ and BW prepared the nanoplatforms. LS and AM synthesised the graphene oxide. AC participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by an internal grant of the Military Institute of Medicine no 419 and by the Polish National Research Council grant NCN 2016/23/D/NZ9/01401.

Availability of Data and Materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Institute of Biology, Department of Nanobiotechnology and Experiemntal Ecology, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland. ²Military Institute of Medicine, Szaserów 128, 04-141 Warsaw, Poland. ³Braster S.A., Cichy Ogród 7, 05-580 Ożarów Mazowiecki, Poland. ⁴Institute of High Pressure Physics of the Polish Academy of Sciences, Sokołowska 29/37, 01-142 Warsaw, Poland. ⁵Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland. ⁶Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Copenhagen, Groennegaardsvej 3, 1870 Frederiksberg, Denmark.

Received: 2 April 2019 Accepted: 30 September 2019 Published online: 11 October 2019

References

- Marin S, Vlasceanu GM, Tiplea RE et al (2015) Applications and toxicity of silver nanoparticles: a recent review. Curr Top Med Chem 15:1596–1604
- Huh AJ, Kwon YJ (2011) "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. J Control Release 156:128–145. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002

- Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H (2017) Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. J Nanobiotechnology 15:65. https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z
- Marambio-Jones C, Hoek EMV (2010) A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J Nanopart Res 12:1531–1551. https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y
- López-Serrano A, Muñoz Olivas R, Sanz Landaluze J, Cámara C (2014) Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. Anal Methods 6:38–56. https://doi.org/10.1039/C3AY40517F
- Lu W, Senapati D, Wang S et al (2010) Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. Chem Phys Lett 487. https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.01.027
- Perelshtein I, Applerot G, Perkas N et al (2010) Ultrasound radiation as a "throwing stones" technique for the production of antibacterial nanocomposite textiles. ACS Appl Mater Interfaces 2:1999–2004. https://doi. org/10.1021/am100291w
- Taurozzi JS, Hackley VA, Wiesner MR (2011) Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment--issues and recommendations. Nanotoxicology 5:711–729. https://doi.org/10.3109/ 17435390.2010.528846
- Lu X, Mao H, Chao D et al (2006) Ultrasonic synthesis of polyaniline nanotubes containing Fe3O4 nanoparticles. J Solid State Chem 179:2609– 2615. https://doi.org/10.1016/j.jssc.2006.04.029
- Tong H, Li H-L, Zhang X-G (2007) Ultrasonic synthesis of highly dispersed Pt nanoparticles supported on MWCNTs and their electrocatalytic activity towards methanol oxidation. Carbon 45:2424–2432. https://doi.org/10.1016/ j.carbon.2007.06.028
- Samuel MS, Bhattacharya J, Parthiban C et al (2018) Ultrasound-assisted synthesis of metal organic framework for the photocatalytic reduction of 4nitrophenol under direct sunlight. Ultrason Sonochem 49:215–221. https:// doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.08.004
- Zhu Z, Su M, Ma L et al (2013) Preparation of graphene oxide–silver nanoparticle nanohybrids with highly antibacterial capability. Talanta 117: 449–455. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.017
- Park MVDZ, Neigh AM, Vermeulen JP et al (2011) The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. Biomaterials 32:9810–9817. https://doi.org/10.1016/j. biomaterials.2011.08.085
- Xu H, Qu F, Xu H et al (2012) Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli O157:H7. Biometals 25:45–53. https://doi.org/10.1007/s10534-011-9482-x
- Sondi I, Salopek-Sondi B (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interface Sci 275:177–182. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012
- Gurunathan S, Han JW, Dayem AA et al (2012) Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in Pseudomonas aeruginosa. Int J Nanomedicine 7:5901–5914. https://doi.org/ 10.2147/JJN.S37397
- Kurantowicz N, Sawosz E, Jaworski S et al (2015) Interaction of graphene family materials with Listeria monocytogenes and Salmonella enterica. Nanoscale Res Lett 10:23
- Naeem H, Ajmal M, Qureshi RB et al (2019) Facile synthesis of graphene oxide–silver nanocomposite for decontamination of water from multiple pollutants by adsorption, catalysis and antibacterial activity. J Environ Manag 230:199–211. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.061
- Samuel MS, Bhattacharya J, Raj S et al (2019) Efficient removal of chromium (VI) from aqueous solution using chitosan grafted graphene oxide (CS-GO) nanocomposite. Int J Biol Macromol 121:285–292. https://doi.org/10.1016/j. ijbiomac.2018.09.170
- Vazquez-Muñoz R, Borrego B, Juárez-Moreno K et al (2017) Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: does the complexity of biological systems matter? Toxicol Lett 276:11–20. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.007
- Ivask A, Juganson K, Bondarenko O et al (2014) Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells in vitro: a comparative review. Nanotoxicology 8(Suppl 1):57–71. https://doi.org/10.3109/17435390.2013. 855831
- Liao K-H, Lin Y-S, Macosko CW, Haynes CL (2011) Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. ACS Appl Mater Interfaces 3:2607–2615. https://doi.org/10.1021/am200428v

- Kurantowicz N, Strojny B, Sawosz E et al (2015) Biodistribution of a high dose of diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles after multiple intraperitoneal injections in rats. Nanoscale Res Lett 10:398
- 24. Wu S-Y, An SSA, Hulme J (2015) Current applications of graphene oxide in nanomedicine. Int J Nanomedicine 10:9–24. https://doi.org/10.2147/JJN.S88285
- Jaworski S, Wierzbicki M, Sawosz E et al (2018) Graphene oxide-based nanocomposites decorated with silver nanoparticles as an antibacterial agent. Nanoscale Res Lett 13:1–17
- Ferrari AC, Robertson J (2000) Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon. Phys Rev B 61:14095–14107. https://doi.org/10. 1103/PhysRevB.61.14095
- Wróblewska A, Dużyńska A, Judek J et al (2017) Statistical analysis of the reduction process of graphene oxide probed by Raman spectroscopy mapping. J Phys Condens Matter 29:475201. https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa92fe
- Ferrari AC (2007) Raman spectroscopy of graphene and graphite: disorder, electron–phonon coupling, doping and nonadiabatic effects. Solid State Commun 143:47–57. https://doi.org/10.1016/j.ssc.2007.03.052
- Stobinski L, Lesiak B, Malolepszy A et al (2014) Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods. J Electron Spectros Relat Phenomena 195. https://doi.org/10.1016/ j.elspec.2014.07.003
- Liu K-G, Abbasi AR, Azadbakht A et al (2017) Deposition of silver nanoparticles on polyester fiber under ultrasound irradiations. Ultrason Sonochem 34:13–18. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.04.006
- Tang S, Tang Y, Gao F et al (2007) Ultrasonic electrodeposition of silver nanoparticles on dielectric silica spheres. Nanotechnology 18:295607. https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/29/295607
- Gedanken A (2004) Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. Ultrason Sonochem 11:47–55. https://doi.org/10.1016/j. ultsonch.2004.01.037
- Tzanakis I, Eskin DG, Georgoulas A, Fytanidis DK (2014) Incubation pit analysis and calculation of the hydrodynamic impact pressure from the implosion of an acoustic cavitation bubble. Ultrason Sonochem 21:866–878. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.10.003
- Chen D, Feng H, Li J (2012) Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications. Chem Rev 112:6027–6053. https://doi.org/ 10.1021/cr300115g
- Yin PT, Shah S, Chhowalla M, Lee K-B (2015) Design, synthesis, and characterization of graphene–nanoparticle hybrid materials for bioapplications. Chem Rev 115:2483–2531. https://doi.org/10.1021/cr500537t
- Bao Q, Zhang D, Qi P (2011) Synthesis and characterization of silver nanoparticle and graphene oxide nanosheet composites as a bactericidal agent for water disinfection. J Colloid Interface Sci 360:463–470. https://doi. org/10.1016/j.jcis.2011.05.009
- Hui KS, Hui KN, Dinh DA et al (2014) Green synthesis of dimensioncontrolled silver nanoparticle–graphene oxide with in situ ultrasonication. Acta Mater 64:326–332. https://doi.org/10.1016/j.actamat.2013.10.045
- Lee JK, Kim DB, Kim JI, Kim PY (2000) In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. Toxicol in Vitro 14:345–349. https://doi.org/10.1016/S0887-2333(00)00028-X
- Cao Y (2018) The toxicity of nanoparticles to human endothelial cells. Adv Exp Med Biol 1048:59–69. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72041-8_4
- Cao Y, Gong Y, Liu L et al (2017) The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. J Appl Toxicol 37:1359–1369. https://doi.org/10.1002/jat.3470
- Kue CS, Tan KY, Lam ML, Lee HB (2015) Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anticancer drugs. Exp Anim 64:129–138. https://doi.org/10.1538/expanim.14-0059
- Ribatti D (2016) The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. Mech Dev 141:70–77. https://doi.org/10. 1016/j.mod.2016.05.003
- Caballero-Díaz E, Pfeiffer C, Kastl L et al (2013) The toxicity of silver nanoparticles depends on their uptake by cells and thus on their surface chemistry. Part Part Syst Charact 30:1079–1085. https://doi.org/10.1002/ppsc.201300215
- Wang S-H, Lee C-W, Chiou A, Wei P-K (2010) Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. J Nanobiotechnology 8:33. https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-33
- Raffa V, Ciofani G, Vittorio O et al (2010) Physicochemical properties affecting cellular uptake of carbon nanotubes. Nanomedicine (Lond) 5:89– 97. https://doi.org/10.2217/nnm.09.95

- 46. de Luna LAV, de Moraes ACM, Consonni SR et al (2016) Comparative in vitro toxicity of a graphene oxide-silver nanocomposite and the pristine counterparts toward macrophages. J Nanobiotechnology 14. https://doi. org/10.1186/s12951-016-0165-1
- Chen L, Xiao S, Zhu H et al (2016) Shape-dependent internalization kinetics of nanoparticles by membranes. Soft Matter 12:2632–2641. https://doi.org/ 10.1039/C5SM018698
- Buckley CD, Pilling D, Lord JM et al (2001) Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. Trends Immunol 22:199–204
- Smith TJ (2005) Insights into the role of fibroblasts in human autoimmune diseases. Clin Exp Immunol 141:388–397. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02824.x
- Kishimoto T (2006) Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. Arthritis Res Ther 8(Suppl 2):S2. https://doi.org/10.1186/ar1916
- Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP (1997) Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. Am J Pathol 151:317–322
- Singh H, Du J, Singh P, Yi TH (2018) Role of green silver nanoparticles synthesized from Symphytum officinale leaf extract in protection against UVB-induced photoaging. J Nanostruct Chem 8:359–368. https://doi.org/10. 1007/s40097-018-0281-6
- Parnsamut C, Brimson S (2015) Effects of silver nanoparticles and gold nanoparticles on IL-2, IL-6, and TNF-α production via MAPK pathway in leukemic cell lines. Genet Mol Res 14:3650–3668. https://doi.org/10.4238/ 2015.April.17.15
- Ritsu M, Kawakami K, Kanno E et al (2017) Critical role of tumor necrosis factor-α in the early process of wound healing in skin. J Dermatol Dermatol Surg 21:14–19. https://doi.org/10.1016/j.jdds.2016.09.001
- Chen G-Y, Yang H-J, Lu C-H et al (2012) Simultaneous induction of autophagy and toll-like receptor signaling pathways by graphene oxide. Biomaterials 33:6559–6569. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.064

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at > springeropen.com





Article Graphene Oxide Scaffold Stimulates Differentiation and Proangiogenic Activities of Myogenic Progenitor Cells

Mateusz Wierzbicki ^{1,*}, Anna Hotowy ¹, Marta Kutwin ¹, Sławomir Jaworski ¹, Jaśmina Bałaban ¹, Malwina Sosnowska ¹, Barbara Wójcik ¹, Aleksandra Wędzińska ¹, André Chwalibog ² and Ewa Sawosz ¹

- Department of Nanobiotechnology and Experimental Ecology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland; anna_hotowy@sggw.edu.pl (A.H.); marta_kutwin@sggw.edu.pl (M.K.); slawomir_jaworski@sggw.edu.pl (S.J.); jasmina_balaban@sggw.edu.pl (J.B.); malwina_sosnowska@sggw.edu.pl (M.S.); barbara_wojcik@sggw.edu.pl (B.W.); a.wedzinska1@gmail.com (A.W.); ewa_sawosz_chwalibog@sggw.edu.pl (E.S.)
- ² Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Copenhagen, Groennegaardsvej 3, 1870 Frederiksberg, Denmark; ach@sund.ku.dk
- * Correspondence: mateusz_wierzbicki@sggw.edu.pl

Received: 10 May 2020; Accepted: 9 June 2020; Published: 11 June 2020



Abstract: The physiological process of muscle regeneration is quite limited due to low satellite cell quantity and also the inability to regenerate and reconstruct niche tissue. The purpose of the study was to examine whether a graphene oxide scaffold is able to stimulate myogenic progenitor cell proliferation and the endocrine functions of differentiating cells, and therefore, their active participation in the construction of muscle tissue. Studies were carried out using mesenchymal cells taken from 6-day-old chicken embryos and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were used to assess angiogenesis. The graphene scaffold was readily colonized by myogenic progenitor cells and the cells dissected from heart, brain, eye, and blood vessels did not avoid the scaffold. The scaffold strongly induced myogenic progenitor cell signaling pathways and simultaneously activated proangiogenic signaling pathways via exocrine vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion. The present study revealed that the graphene oxide (GO) scaffold initiates the processes of muscle cell differentiation due to mechanical interaction with myogenic progenitor cell.

Keywords: angiogenesis; myogenic progenitor cells; graphene oxide

1. Introduction

Degradation, degeneration, and surgical removal are among the most common causes of muscle loss. These processes are largely irreversible. Despite the ability of muscle cells to regenerate, the physiological process of regeneration is quite limited. This is because there exist a limited number of satellite cells, and also a result of the inability of a muscle to regenerate and reconstruct its niche. The niche, which is the immediate environment of stem cells, well cell availability and growth factors mutually influence each other and are required for the regeneration of tissues [1]. However, the interactions between these factors are not fully understood. It seems that designing an appropriate niche—one that is optimally suited for promoting cellular regeneration—is the most difficult challenge faced by researchers who aim to enhance the regeneration of muscle tissue [2]. The creation of a new tissue, however, involves interactions between three basic elements: cells capable of proliferation, differentiation, and creating interconnections; scaffolds that act as mechanical foundations for growth; and growth and functional factors [3]. Many studies have been devoted to the invention and adaptation of synthetic or biological niche environments for tissue engineering.

Carbon is relatively biocompatible and is a promising scaffold material. Carbon nanomaterials can be used to create scaffolds of various structural types and can impart features of regularity and, most importantly, flexibility. This allows for the imitation of the physiological structures characteristic of the muscle niche. Graphene, particularly, graphene oxide (GO), easily attaches to other compounds through interactions involving the surface oxygen groups and can create a surface containing a mosaic of chemical groups that are exposed to the environment [4]. It has a great physical and chemical plasticity and possesses a strong and durable graphene mesh structure [5,6], which possesses favorable characteristics and facilitates formation of a scaffold with the potential action as a graphene-derived synthetic extracellular matrix (ECM) structure [7]. The presence of numerous oxygen groups on the GO surface enhances its hydrophilicity and biocompatibility [8], improving its biological applicability.

Key elements of tissue formation involve interactions between the ECM and the cells that are capable of proliferation, differentiation, and creation of interconnections. However, many key phenomena involved in these interactions have not been sufficiently elucidated. In particular, the physicochemical impact of components of the ECM on myogenic progenitor cell proliferation, differentiation, tissue formation, and, above all, activation of extracellular signaling are not clear. The embryonic chicken muscle development model can provide a precise, convenient and rapid means to study interactions between the myogenic progenitor cells and the potential ECM mimics. Muscle tissues of chicken embryos are formed similarly to those of other animals. Multipotent stem cells of the mesoderm ignite somites and leg buds arise from somites 26 to 32 throughout 17 Hamburger–Hamilton stages (HH) (52–64 h) and up to 26 HH (day 5) [9]. Stimulated myoblast precursors migrate to the limb bud and are guided and nourished by the substances of the extracellular matrix present in the peripheral mesenchyme of the limb bud.

Proliferating precursors of muscle cells have express specific proteins throughout specific stages of tissue development, which extends from proliferation to differentiation. In order from the earliest to the latest, the proteins expressed include MYF5 (myogenic factor 5), MyoD (myogenic differentiation 1), MRF4 (myogenic factor 6), and myogenin. MyoD controls the chromatin context and manages the genes involved in myogenic programming [10]. MyoD is a marker of skeletal muscle cells and, together with Myf5, is essential for the establishment of a viable muscle lineage [11].

Muscle cells and their precursors, however, exhibit not only endocrine, but also paracrine properties. In vitro studies of muscle satellite cells co-cultured with endothelial cells have found them to greatly stimulate angiogenesis [12]. Moreover, VEGF secretion by muscle satellite cells was observed, indicating that muscle satellite cells secrete proangiogenic factors into the environment and create a niche for their development and the formation of muscle tissue. Another study showed that the coupling between the ECM and myogenic precursor cells (MPCs) activated myogenesis and angiogenesis [13]. Cooperation between muscle and endothelial cell regeneration at the molecular level (production of apelin, periostin, and oncostatin) conditioned the regeneration of muscle.

The purpose of the present study was to examine whether GO scaffolds are able to stimulate the myogenic progenitor cell differentiation, which includes the stimulation of endocrine properties and enhances their active participation in the construction of muscle tissue. The research is focused on the scaffold interaction with the cells and its role in the promotion of tissue formation.

2. Results

2.1. GO Scaffold Characterisation

GO (50 mg/L) formed a stable aqueous hydrocolloid (zeta potential: -27.0 mV) that showed GO flakes with an average diameter from 5 to 30 μ m via transmission electron microscopy (TEM) (Figure 1C). The GO scaffold was analyzed using scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). A 1 mg/mL aqueous GO hydrocolloid was used to prepare the GO scaffold. SEM images

showed layers of GO flakes covering the surface of cell culture plates (Figure 1F). AFM analysis was performed to assess the GO scaffold on a cell culture plate and a perfectly flat silicon wafer. AFM analysis of the GO scaffold on the silicon wafer showed that GO formed a surface with sharp peaks and the average roughness of 5.1 nm (Figure 1D,E). The GO scaffold created using a polystyrene cell culture surface had an increased number of peaks but a reduced average roughness of 2.0 nm (Figure 1A,B), which indicated that GO fills cavities of polystyrene cell cultures, which leaves surfaces less rough.



Figure 1. Graphene oxide scaffold morphology. (**A**) Atomic force microscopy images and (**B**) a topography model of the surface of the graphene oxide scaffold on a polystyrene culture plate. (**C**) Transmission electron microscopy image of graphene oxide. (**D**) Atomic force microscopy images and (**E**) a topography model of the graphene oxide scaffold surface on a flat silicon wafer. (**F**) Scanning electron microscopy image of the graphene oxide scaffold.

2.2. PMC Localise Preferentially on GO Scaffold

Organs/tissues dissected from a different part of the body (a hind limb (PMC), heart (PHC), brain (PNC), an eye (PEC), and a blood vessel from the chorioallantoic membrane (PVC)) were sources of mesenchymal cells involved in development of specific organs or tissues. GO enhanced viability of PMC and PEC, but decreased viability of PVC and did not affect PNC and PHC viability (Figure 2). To clearly observe morphological differences between the cells grown on the GO scaffold and polystyrene, as well as to assess the direction of movement and homing preference of the GO surface, an island pattern was used (Figure 2K). Thus, we compared morphologies of cells on the GO island with those growing beyond GO and on the border of the GO island. A morphological assessment of cells revealed that cells were typical for the period of embryonic development assessed. Mesenchymal stem cells and differentiated cells were observed in each sample. All cells were located on the polystyrene surface, on the border of the GO island, and on the GO island, however, they varied with respect to density and morphology (Figure 2). PMC, unlike other observed cells, actively localized on GO islands. (Figure 2B), whereas non-PMC were located outside the GO. Images of the GO island border showed that cells predominantly localized parallel to the GO border, however, sometimes they attached to the GO scaffold (Figure 2D,F,H,J). The GO scaffold was not definitively avoided by PHC, PNC, PEC, and PVC, however, any preference to locate on the GO was not observed.



Figure 2. Analysis of the cell localization and viability on the GO scaffold. (**A**) Viability and (**B**) morphologies of progenitor muscle cells from hind limb (PMC) on the GO scaffold. (**C**) Viability and (**D**) morphology of progenitor eye cells (PEC) on the GO scaffold. (**E**) Viability and (**F**) morphology of progenitor heart-derived cells (PHC) on the GO scaffold. (**G**) Viability and (**H**) morphology of cells derived from brain (progenitor nerve cells, PNC) on the GO scaffold. (**I**) Viability and (**J**) morphology of cells from a chorioallantoic membrane's blood vessel (progenitor vessel cells, PVC) on the GO scaffold. (**I**) viability and (**J**) morphology of cells from a chorioallantoic membrane's blood vessel (progenitor vessel cells, PVC) on the GO scaffold. Morphology was assessed on the edge of the GO scaffold via light microscopy with phase contrast and 200 × magnification. Statistical significance is indicated with different superscripts (unpaired *t*-test; *p* < 0.05). (**K**) Pattern of GO islands used in cell localization and morphology analysis. Acronyms: C, control; GO, graphene oxide; RV, relative value.

To verify PMC behavior on the GO scaffold, SEM visualization was carried out after the cells were incubated with the GO scaffold for extended periods. PMC incubated for 96 h and imaged via SEM showed a tendency to localize on GO islands. At the border of GO islands, cells were placed perpendicularly to the GO circle with protrusions directed towards the GO surface (Figure 3A). SEM imaging allowed researchers to distinguish between two layers of PMC. The first one was large and contained flattened cells located at the bottom of wells. These cells adhered to the GO scaffold. The second layer of cells grew over the bottom cell layer and consisted of oval, slightly rectangular single and fused myoblasts (Figure 3B,C). Cells of the second layer, myogenic progenitor cells and differentiated myocytes, had cytoplasmic protrusions that were connected to cells of the first layer.



Figure 3. PMC morphology after a 96-h incubation and PMC migration on a GO scaffold. (**A**) Scanning electron microscope visualization of PMC on the edge and (**B**,**C**) the center of the GO scaffold. (**D**) Visualization of the whole GO scaffold overgrown by PMC. (E) Representative images of the migration analysis of PMC throughout the GO scaffold. Image of the initial ("0 h") position of the PMC and their positions after an 18-h incubation period on a polystyrene culture plate ("C") and a graphene oxide scaffold ("GO"). (F) Fold decreases of the cell-free areas measured as the difference determined between 0 h and 18 h images. Arrows indicate the edge of the GO scaffold. Statistical significance is indicated with different superscripts (unpaired *t*-test; *p* < 0.05). Abbreviations: C, control; GO, graphene oxide; RV, relative value.

2.3. The GO Scaffold Increases Migration of PMC

To assess PMC surface preference, cell migration speed on the control polystyrene and the polystyrene covered with a GO scaffold were analyzed. Analysis of migration was initiated when the cell reached the edge of the scaffold and began to migrate to the GO scaffold. Cells in the control group (Figure 3E, "C") covered the polystyrene surface during the 18-h time-lapse imaging period almost two times slower than the cells that migrated next to the GO scaffold (Figure 3E, "GO").

2.4. The GO Scaffold Increases Expression of the MyoD1 mRNA and Enhances Synthesis of VEGF-A Proteins

To explain mechanism of the PMC–GO scaffold interaction, mRNA expression levels of the key genes responsible for myogenic progenitor cell differentiation, proliferation, and maturation were assessed. The GO scaffold influenced expression of the genes involved in myogenic progenitor cell proliferation and differentiation. The GO surface enhanced expression of MyoD1, which is the gene responsible for differentiation, and decreased expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) involved in proliferation and of ATP5B (coding ATP synthase F1 subunit beta). However, the GO scaffold did not affect basic fibroblast growth factor (bFGF expression (Figure 4). Interestingly,

VEGF-A gene indicating the angiogenesis process was upregulated after application of the GO scaffold. To analyze cell secretion of VEGF-A, the level of this protein in media was assessed. The concentration of VEGF-A in the culture medium from the PMC incubated on the GO surface was increased as compared to the control (Figure 4).



Figure 4. Analysis of mRNA expression and protein level. (**A**) Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) protein level in the cell medium after incubation of PMC on a standard cell culture plate (control—"C"), PMC on the graphene oxide scaffold ("GO scaff"), PMC on a standard cell culture plate treated with GO (final concentration—10 µg/mL). Expression level of the genes coding (**B**) VEGF-A, (**C**) basic fibroblast growth factor (bFGF), (**D**) myoblast determination protein 1 MyoD, (**E**) ATP synthase F1 subunit beta ATP5B, (**F**) proliferating cell nuclear antigen PCNA. Statistical significance is indicated with different superscripts (one-way ANOVA; *p* < 0.05). Abbreviations: RU, relative units.

To confirm the release of VEGF-A, PMC cultured on a GO surface ex ovo and tube formation angiogenesis models were assessed. To evaluate proangiogenic properties of the PMC culture media, a GO scaffold human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) tube formation assay was performed. The medium from the PMC cultured on a GO scaffold was used as an experimental group (Figure 5C), the medium from the PMC cultured on a standard polystyrene surface was used as a control (Figure 5B). Additionally, freshly supplemented DMEM was used as a negative control (Figure 5A). The number of tube junctions formed after incubation with experimental and control media indicated angiogenic potential. The number of junctions formed after exposure to the experimental group was statistically higher than that of the control and negative control groups (Figure 5D).

Additionally, proangiogenic properties of the medium were verified using an implant taken from the peripheral blood vessel of a chicken embryo. After a 3-d incubation period, the vascular implants subjected to culture media from the control PMC and the PMC cultivated on a GO scaffold significantly differed. The fragment of the vessel that was cultured in the presence of the control PMC media was weakly altered. Groups of single cells in the vicinity of dense vessel tissue were clearly visible (Figure 5E,F). Morphological features of these cells corresponded to those of endothelial cells. A blood vessel scrap grown in the presence of the medium from the PMC cultured on a GO scaffold was more drastically altered. Its edges were more jagged, and cells migrated away from the sample.



Figure 5. Analysis of angiogenic properties of PMC media. Images of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) tube formation in (**A**) the control medium and (**B**) the negative control medium with the post-incubation addition of the medium from the PMC cultured under standard conditions as the control, and (**C**) with the post-incubation addition of the medium from the PMC cultured on a graphene oxide scaffold. (**D**) Graph showing the mean number of junctions of HUVEC tubes in the field of view. Values are expressed as mean ± standard deviation. Statistical significance is indicated with different superscripts (one-way ANOVA; *p* < 0.05). (**E**) Implant from the peripheral blood vessel of a chicken embryo incubated in the medium derived from standard PMC cultures (negative control) and (**F**) analysis of cells incubated in the medium from the PMC cultured on graphene oxide. Abbreviations: RV, relative value; N, negative control; C, control; GO scaff, experimental group.

3. Discussion

GO is an extremely thin, resilient, light, and durable structure. It is considered a basement, or ECM-equivalent, structure. According to Kenry et al. [14], superior properties of graphene and graphene-like materials may enhance the regeneration capacity of tissues in a controlled way. However, application of GO as a substructure for cellular proliferation and differentiation requires examination of its toxicity. The problem of potential GO toxicity has inspired an increasing number of in vitro and in vivo studies. Several studies showed that intratracheal exposure to GO is highly toxic [15]. Sydlik et al. [16] stated that the GO implanted subcutaneously and intraperitoneally was moderately compatible with the inflammatory response. In the previous work, we showed that the short- and long-term exposure of rats to intraperitoneal GO did not produce toxicity [17,18]. It seems that toxicity of GO remains controversial and depends on many factors, including the graphene source, the biological medium used, and the experimental protocol. When introduced to the culture medium, GO was internalized and localized to F-actin filaments, which altered cell–cycle progression, apoptosis, and oxidative stress [19]. In our experiments, however, GO was immobilized as a scaffold and did not interact with the actin inside the cell. In vitro experiments carried out using standard methods introduced experimental nanomaterials to the culture medium, but insufficiently evaluated affinity.

For this reason, an "affinity test" was performed. All cells were seeded on 6-well plates using an island pattern, which was prepared using the GO hydrocolloid. This allowed researchers to observe behavior of the cells that were free to undergo both migration and colonization of GO islands or plate areas between islands. This "nano-island" strategy was used to assess protein-detecting sensors [20] by Lunova et al. [21], who assessed properties of liver cancer cells. In our experiments, we used a similar island method to assess cell affinity and propensity for colonization.

Another group of studies have determined that different levels of toxicity for GO depend on the chemical groups available on the surface of the material, and primarily on the amount of oxygen, especially of the C = O groups, available, which is inversely proportional to toxicity [22,23]. In this study, GO with a moderately high oxygen content (39–49%) was evaluated. Differences in GO biocompatibility also depend on biological models and the type of cells used. We have shown that expected differences in biocompatibility of GO can be observed using cells taken from different areas of the embryo. GO was investigated as a nanoscaffold prepared by applying and drying GO flakes that had been suspended in water at the bottom of a culture plate. Self-assembly of GO flakes produced a very thin layer that adhered to the GO scaffold at the bottom of the dish. The cells dissected from the peripheral blood vessels (PVC) reacted negatively to the GO scaffold. In contrast, the cells dissected from muscle (PMC) and eye (PEC) tissue had increased numbers when exposed to GO and GO did not affect growth of heart (PHC)- and brain (PNC)-derived cells. Thus, it can be assumed that in regenerative medicine, consideration must be paid to using compatible cells and surfaces.

Here, we evaluate the potential of GO to act as the ECM. The nanoscaffold's ECM-like surface should be non-toxic and provide an adequate surface for cell adherence. Interestingly, all types of cells were observed attached to the GO scaffold. Regardless of the cell type, graphene islands were never completely avoided by cells. This indicated that GO was moderately biocompatible and confirmed the previous experiments that used GO as a nanoscaffold component. Introducing GO to polycaprolactone nanofiber scaffolds increased differentiation of mouse marrow mesenchymal stem cells (mMSC) to osteo-like cells and rat pheochromocytoma cells (PC12-L) to neuro-like cells [24]. Moreover, a chicken embryo muscle extract together with GO were used for the maturation of muscle progenitor cells [25]. Biocompatible GO was also used to reinforce gelatin-hydrphyapatitie 3D scaffolds and promoted bone regeneration in orthopedics [26]. Moreover, GO was used to reinforce electrospun gelatin or PCL scaffolds, increased tensile strength, and provided energy at the site of a break [27]. In other studies, GO-PCL and GO sheets were shown to be biocompatible. Further, they both facilitated myoblast differentiation from human mesenchymal stem cells [28]. The authors suggested that GO sheets and GO-based scaffolds were the most favorable hydrocolloids assessed for promoting skeletal muscle and other tissue regeneration. Additionally, other authors indicated that the reduced graphene oxide nanoribbon grid facilitated rapid osteogenic differentiation [29].

In light of the results of our experiments assessing different types of mesenchymal cells, GO was most suitable for regenerating muscle cells. Effects of extended incubation on migration revealed a strong affinity of PMC for the GO scaffold. This may be a result of mechanical or/and chemical properties of the GO scaffold surface. Mechanical properties, particularly with respect to elastic modulus, of mammalian cells (between 1 to 100 kPa [30]) vary. Mechanotransduction-sensitive signaling regulates myogenic differentiation, as well as endocrine and exocrine activities of these cells. It has been demonstrated that elasticity (12 kPa) of the matrix of myogenic progenitor cells influences their capacity to self-renew and restore muscle tissue [31]. In other studies, polyurethane–nano-GO nanofibrous scaffold was used for stimulation of myogenic differentiation due to nanofibrous morphology and high mechanical flexibility [32].

The challenge of creating nanosurface involving cellular interactions was discussed by Liu and Tang [33], who argued that ECM-like nanoparticle structures influence cellular movement and attachment, which can be visualized via assessment of lamellipodia or/and filopodia occurrence. In our experiment, the filopodia of all cells were observed at the borders of scaffold islands, mainly in the cells located parallel to GO islands, and filopodia were directed towards the scaffold. PMC,

however, had lamellipodia that were positioned outstretched on the GO scaffold surface perpendicular to the GO surface. Visualization of PMC with SEM revealed the tendency of cells to migrate, attach to GO scaffolds, and revealed their preference to settle on GO islands. Moreover, the specific organization of cells throughout growth was observed. Tissues collected from embryonic hind buds consisted of undifferentiated cells, which differentiated and fused to form multinucleated myofibers. During embryogenesis, primary myotubes are established on day 4-7 to form the scaffold and to differentiate to form secondary myotubes on day 8–16 [34]. In our experiments, visualization via SEM revealed scaffolding layers that were created by primary muscle cells. Further, differentiating elongate and thin cells were connected to scaffolding cells. However, muscle fibers only formed when cells were connected to undifferentiated scaffolding cells to form a feeding-like layer or if they were connected to GO. Moreover, GO strongly promoted the signaling required for differentiation. An assessment of MyoD gene expression in the PMC incubated on either GO scaffolds or in the presence of the GO hydrocolloids revealed increased MyoD expression. MyoD is an early determinant of myogenic progenitor cells to the myogenic lineage. In particular, MyoD stimulates myoblasts to promote differentiation [35]. This regulator of myogenesis is expressed in proliferating myoblasts [36] and is capable of transdifferentiating many different kinds of cells to muscle cells [10,37]. Our results revealing increased expression of MyoD in the cells confirm the hypothesis that GO has pro-differentiation, rather than pro-proliferative, effects. Moreover, myoblast differentiation is correlated with decreased expression of a regulator of proliferation, PCNA, a phenomenon that was also observed in this study. However, expression of MyoD genes is often negatively correlated with bFGF expression [38]. In our study, exposure to a scaffold was not accompanied with the decreased expression of FGF2.

Studies of scaffolds also emphasized the role of the environment in shaping the regeneration of muscle tissue, especially hypoxia [31,39]. During ageing and muscle degeneration, satellite cells lose their ability to communicate and interact with the cells involved in angiogenesis [40]. The formation of blood vessels is fundamental for formatting new tissue, because they facilitate the delivery of oxygen, nutrients, and functional factors to cells. Therefore, the induction of angiogenesis by scaffolds enhances tissue regeneration. Acellular collagen-heparin scaffolds showed induced angiogenesis by secretion of VEGF and FGF2, ensuring lack of hypoxic cells [41]. In different studies, release of VEGF and IGF-1 from macroporous scaffolds enhanced muscle regeneration [42]. In our investigation, angiogenesis was induced due to upregulation of VEGF-A transcription and protein synthesis after PMC were cultured on a GO scaffold. In experiments using a mouse multipotent mesenchymal progenitor muscle cell line, C2C12, Bryan et al. [43] showed that VEGF expression is coordinately controlled with myogenic differentiation. Moreover, the study showed that MyoD is necessary for maintenance of proper levels of VEGF expression and endogenous synthesis of MyoD promotes VEGF expression. These findings are in accordance with our results, which showed that increased expression of MyoD is accompanied by increased VEGF levels, however, we also showed that increasing VEGF expression at transcript and protein levels compared with controls occurred in the cells cultured with GO scaffolds. In other experiments, activation of VEGF expression in mesenchymal stromal cells after vibration stimulation was observed [27]. Moreover, multi-layered electrospun scaffolds with macroporosity were used to facilitate angiogenesis in a tissue-engineered smooth muscle. The 25% macroporous group showed increased angiogenesis and improved implanted cell survival [44]. Mechanical impact on the cell likely triggers mechanisms determining cell fate. The GO scaffold induced VEGF release by myogenic cells, which indicated that surface and cell interactions play a key role in differentiation. Myogenic progenitor cells used in our experiments exhibited a preference for the GO scaffold and subsequently initiated differentiation.

This study revealed that the GO scaffold was readily populated and colonized by PMC and simultaneously activated exocrine VEGF secretion. Our findings show that GO scaffolds can initiate processes of muscle cell differentiation and stimulate angiogenesis due to mechanical interaction with PMC.

4. Materials and Methods

4.1. Graphene Oxide Scaffold

A GO water suspension (4 mg/mL) was purchased from Nanopoz, Poznań. GO flakes were produced from graphite using a modified Hummers method. Experimental scaffolds comprised of GO were prepared as previously described [45]. In short, the GO hydrocolloid (1 mg/mL) was applied to the bottom of a 6-well plate and dried in a laminar chamber. GO was applied such that it covered either 100% or 20% of its surface by placing GO hydrocolloid drops to the surface to form islands that spread throughout each well. To assess cytotoxicity of GOs, 20 μ L of GO hydrocolloids were placed at the bottom of each well of a 96-well microplate and dried for 2 h.

Morphologic features of GO were assessed via TEM imaging using a JEM-1220 microscope (JEOL, Tokyo, Japan) equipped with a Morada 11 megapixel camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany) at 80 kV. Samples were prepared by placing a GO droplet onto formvar-coated copper grids (Agar Scientific Ltd., Stansted, UK). Samples were air-dried before they were examined. Zeta potential measurements were carried out using a Nano-ZS90 Zetasizer (Malvern Instruments, Malvern, UK) instrument at 25 °C using the Smoluchowski approximation. Each sample was measured after 120 s of stabilisation at 25 °C.

The surface of GO was analyzed via AFM and SEM. AFM imaging was performed using MFP 3D BioAFM with a commercial triangular cantilever (MPLCT, Bruker, Camarillo, CA, USA), spring constant k = 0.10 N/m in dynamic (AC) mode. SEM imaging was performed using a Quanta 200 microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA). Each GO scaffold was pre-dried on the bottom of a 6-well plate in a laminar flow cabinet. Subsequently, each scaffold was contrasted with 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and 1% carbohydrazide (Sigma-Aldrich) and dehydrated in increasing concentrations of hexylene glycol (Sigma-Aldrich). Drying was performed using a Polaron CPD 7501 critical point dryer (Quorum Technologies, Laughton, UK).

4.2. Cell Culture

Mesenchymal cells were taken from 6-d-old chicken embryos. Fertilized chicken (Ross 308) eggs were purchased from a hatchery and maintained in an incubator under standard conditions. After incubating for 6 days, eggs were removed, and embryos were put on Petri dishes. Using a stereoscopic microscope, different parts of the body, including the hind limb, heart, brain, eye, and blood vessels from the chorioallantoic membrane were dissected and placed into tubes containing trypsin for 24 h at 5–8 °C. Next, trypsin and collected organs were neutralized with DMEM and tissue samples were disintegrated by passing through tips and placed in 75 mL flasks. Cells were maintained in DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air in an incubator (NuAire DH AutoFlow CO₂ Air-Jacketed Incubator, Plymouth, MA, USA). After one day, fresh DMEM was supplied and cells were cultured until a confluence of 80% was reached. Cells were detached using trypsin and placed on experimental 6-well plates (1 × 10⁵ cells per well) and cultured.

HUVEC were obtained from Thermo Fisher Scientific and maintained in the M200PRF basal media supplemented with a large vessel endothelial supplement (Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air.

4.3. Cell Morphology

Primary mesenchymal cells originating from a hind limb (PMC), primary heart cells (PHC), primary neuronal cells originating from the brain (PNC), primary eye cells (PEC), and primary blood vessel cells isolated from the chorioallantoic membrane (PVC) were assessed using an optical inverted microscope (TL-LED, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) connected to a digital camera

(Leica MC190 HD) using LAS V4.10 software. Cells were seeded (1×10^5 cells per well) in 35 mm diameter Petri dishes with and without GO scaffolds. After incubation for 24 h, samples were imaged.

PMC were additionally visualized using a Quanta 200 SEM (FEI, Hillsboro, OR, USA). Cells were seeded (1×10^5 cells per well) in 35 mm diameter Petri dishes with and without GO scaffolds. After a 96-h incubation period, samples were prepared as described by Heckman et al. [46]. Cells were fixed using 2.5% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.2, contrasted with 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich) and 1% carbohydrazide (Sigma-Aldrich). Subsequently, cells were dehydrated in increasing concentrations of hexylene glycol (Sigma-Aldrich). Drying was performed using a Polaron CPD 7501 critical point dryer (Quorum Technologies, Laughton, UK).

4.4. Cell Viability

The viability of PMC, PHC, PNC, PEC, and PVC grown on the GO scaffold was assessed using a Presto blue assay (Thermo Fisher Scientific). PMC, PHC, PNC, PEC, and PVC were seeded in 96-well microplates with and without GO scaffolds (1×10^4 cells per well in 100 µL of supplemented DMEM media) and incubated for 24 h. Subsequently, 11 µL of the Presto blue reagent were added to each well and results were examined using a Tecan Infinite 200 microplate reader (Tecan, Durham, NC, USA) after a 3 h incubation step in accordance with the manufacturer's instructions.

4.5. Analysis of PMC Migration on a GO Scaffold

To analyze PMC migration on a GO scaffold, cells and GO hydrocolloids were applied to separate wells of a silicone insert (2-well culture inserts, Ibid, Gräfelfing, Germany) attached to a 35 mm dish (µ-Dish 35 mm, high, Ibidi). Initially, 50 µL of GO hydrocolloids (10 µg/mL) were applied to wells of the silicon insert and were allowed to dry using a laminar flow cabinet. Subsequently, PMC $(1 \times 10^4 \text{ cells per well in a total volume of 70 } \mu\text{L})$ were seeded in a well without GO. After the cells reached confluence, the silicon insert was gently removed and the cells were incubated for additional 48 h to allow them to migrate to the edge of the GO scaffold. After incubation, media were exchanged for 3 mL DMEM supplemented with4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, final concentration-20 mM). The cells were imaged using a confocal FV-1000 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) microscope equipped with an incubation chamber that maintained temperature of 37 °C. PMC migration on the GO scaffold was analyzed using time-lapse imaging for 18 h (8 min intervals). The analysis of the cell-free area at the initial (0 h) and 18 h timepoint was performed using the MRI Wound Healing Tool macro (http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagejmacros/wiki/Wound_Healing_Tool) for ImageJ software [47]. Migration rate was calculated as the average relative difference between the cell-free areas at 0 and 18 h timepoints using 3 independent experiments. Full time-lapse images of the cells grown on control surfaces and the GO scaffold are available in supplementary information.

4.6. mRNA Expression RT-PCR

To determine transcript levels of VEGF-A, FGF2, MyoD1, and PCNA, PMC were cultured in 6-well plates with and without a GO scaffold. GO hydrocolloids were added to a final concentration of 10 μ g/mL, and the cells lacking a scaffold were used as a control. Next, 1×10^4 cells per well (passage 3) were seeded onto each well and incubated for 3 days. The cells were washed with PBS, centrifuged and stored at -80 °C. Gene expression levels were measured using the quantitative polymerase chain reaction method (qPCR). PMC were homogenized in the TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific), and total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. RNA samples were purified using the SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and quantified using a NanoDrop ND 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Total RNA (2 mg) was reverse transcribed using a reverse transcriptase with oligo (dT) (Promega) and random primers (TAG Copenhagen A/S, Copenhagen, Denmark). Subsequently, real-time PCR was performed using complementary DNA and gene-specific primer pairs (TAG, Copenhagen A/S, Copenhagen, Denmark) mixed with the LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche Applied Science, Penzberg,

Germany) in a LightCycler 480 real-time PCR system (Roche Applied Science, Penzberg, Germany).

The primers used are listed in Table 1. For each complementary DNA, reactions were performed in triplicate. To determine transcript levels, relative quantification was conducted using the ACTB housekeeping gene.

Target	Forward Primer	Reverse Primer
FGF2	GGCACTGAAATGTGCAACAG	TCCAGGTCCAGTTTTTGGTC
VEGF-A	TGAGGGCCTAGAATGTGTCC	TCTTTTGACCCTTCCCCTTT
PCNA	TGCACGCATTTGTAGAGACC	AGTCAGCTGGACTGGCTCAT
MyoD1	CGGCGGCTCAGCAAGGTCAAC	CGGCCCGCTGTACTCCATCATG
ATP5B	GTTATTCGGTGTTCGCTGGT	GTAGACCAGAGCGACCTTGG
ACTB	GTCCACCTTCCAGCAGATGT	ATAAAGCCATGCCAATCTCG

Table 1. Primers used for real-time PCR.

4.7. Quantification of VEGF-A Protein Secretion

PMC cells were seeded (1×10^5) and cultured in 75-mL flasks (covered with GO or not covered as a control) in the supplemented DMEM media. The media were changed after 3 days. After 6 days, all media were removed, and the cells were washed twice with warmed PBS without calcium and magnesium ions (Thermo Fisher Scientific). Subsequently, the cells were starved in DMEM without serum for 2 days, and culture media were centrifuged at 1,500 rpm at 4 °C for 10 min, aliquoted, and stored at -80 °C for later use. Cell-free supernatants of cultures were used for the determination of secreted VEGF-A levels using a chicken VEGF-A kit (Mybiosource, San Diego, CA, USA). The assay was performed according to the manufacturer's instructions and absorbance was measured using a microplate reader (Tecan Infinite 200, Durham, NC, USA) at 450 nm.

4.8. Angiogenesis Potential of PMC

The angiogenic potential of PMCs was analyzed using a HUVEC tube formation assay. Tube formation was performed using μ -Slide Angiogenesis (Ibidi, Gräfelfing, Germany) slides coated with the 10 μ L Geltrex Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Thermo Fisher Scientific). Cells were suspended in media composed of supplemented M200PRF (80%) and a fresh supplemented DMEM medium (20%) (negative control), supplemented M200PRF (80%) and a post-culture DMEM (20%) obtained as described above for the PMC cultured without the GO scaffold (control group), supplemented M200PRF (80%) and a post-culture DMEM (20%) from the PMC cultured on the GO scaffold (experimental group). HUVEC suspensions (50 μ L) were seeded at a density of 1 × 10⁴ cells/well. After 5 h of incubation, HUVEC tubes were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 10 min. Subsequently, tubes were gently washed with PBS (Thermo Fisher Scientific) and stained with the ActinRed 555 ReadyProbes Reagent (Thermo Fisher Scientific). Tubes were imaged using an FV1000 confocal microscope equipped with a 4 X objective (Olympus Corporation). The number of junctions present within the tube mesh was assessed using the ImageJ software [47] and the Angiogenesis Analyzer macro [48].

Proangiogenic properties of culture media used to grow PMC were also verified using an implant taken from the peripheral blood vessel of a chicken embryo. On day 9 of the chicken embryo development, 5 mm samples of a peripheral blood vessel were removed and placed in a 6-well plate with the control medium (post-culture DMEM from the PMC cultured without a GO scaffold) and the experimental medium (post-culture DMEM from the PMC cultured on a GO scaffold). After incubating for 3 days, the vascular implant was fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 10 min, stained with hematoxylin–eosin (Sigma-Aldrich), and imaged using an optical inverted microscope (TL-LED, Leica Microsystems GmbH).

4.9. Statistical Analysis

The data were analyzed using the one-way analysis of variance (for analysis of three or more groups) or an unpaired *t*-test using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The differences between the groups determined via the one-way analysis of variance were tested with Tukey's honest significant difference (HSD) post hoc test. The results are shown as means and standard deviations. Differences of p < 0.05 were considered significant.

Supplementary Materials: Time-lapse images of the cells grown on control surfaces and the GO scaffold are available in the supplementary information. Supplementary materials can be found at http://www.mdpi.com/1422-0067/21/11/4173/s1.

Author Contributions: Conceptualization, M.W. and E.S.; methodology, M.W. and A.H.; software, M.W. and M.K.; validation, J.B., S.J., and A.W.; formal analysis, M.K., B.W.; investigation, M.W. and A.H.; resources, E.S.; data curation, M.S.; writing—original draft preparation, M.W.; writing—review and editing, A.C.; visualization, M.W.; supervision, E.S.; project administration, E.S.; funding acquisition, E.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Science Centre Poland, project number 2016/21/B/NZ9/01029.

Acknowledgments: The manuscript is part of the habilitation thesis of Mateusz Wierzbicki.

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

Abbreviations

ACTB	actin beta
AFM	atomic force microscope
ATP5B	ATP synthase F1 subunit beta
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	extracellular matrix
FGF2	fibroblast growth factor 2
GO	graphene oxide
HH	Hamburger-Hamilton stage
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
MyoD1	myogenic differentiation 1
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PEC	primary eye cells
PHC	primary heart cells
PMC	primary mesenchyme cells
PNC	primary neuronal cells
PVC	primary blood vessel cells
SEM	scanning electron microscope
TEM	transmission electron microscope
VEGF-A	vascular endothelial growth factor A

References

- Owen, S.C.; Shoichet, M.S. Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. J. Biomed. Mater. Res. A 2010, 94, 1321–1331. [CrossRef] [PubMed]
- 2. Guilak, F.; Cohen, D.M.; Estes, B.T.; Gimble, J.M.; Liedtke, W.; Chen, C.S. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell* **2009**, *5*, 17–26. [CrossRef] [PubMed]
- 3. Flaim, C.J.; Teng, D.; Chien, S.; Bhatia, S.N. Combinatorial signaling microenvironments for studying stem cell fate. *Stem Cells Dev.* **2008**. [CrossRef]
- 4. Liu, Y.; Yu, D.; Zeng, C.; Miao, Z.; Dai, L. Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors. *Langmuir* **2010**, *26*, 6158–6160. [CrossRef] [PubMed]
- 5. Geim, A.K.; Novoselov, K.S. The rise of graphene. Nat. Mater. 2007, 6, 183–191. [CrossRef]
- Allen, M.J.; Tung, V.C.; Kaner, R.B. Honeycomb Carbon: A Review of Graphene. *Chem. Rev.* 2010, 110, 132–145. [CrossRef]

- Nanda, S.; Papaefthymiou, G.; Yi, D. Functionalization of Graphene Oxide and its Biomedical Applications. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* 2015, 40, 1–25. [CrossRef]
- 8. Dreyer, D.R.; Park, S.; Bielawski, C.W.; Ruoff, R.S. The chemistry of graphene oxide. *Chem. Soc. Rev.* 2010, *39*, 228–240. [CrossRef]
- 9. Mimeault, M.; Batra, S.K. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev.* **2008**, *4*, 27–49. [CrossRef]
- 10. Tapscott, S.J. The circuitry of a master switch: Myod and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Dev. Camb. Engl.* **2005**, *132*, 2685–2695. [CrossRef]
- 11. Rudnicki, M.A.; Schnegelsberg, P.N.; Stead, R.H.; Braun, T.; Arnold, H.H.; Jaenisch, R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **1993**, *75*, 1351–1359. [CrossRef]
- 12. Rhoads, R.P.; Johnson, R.M.; Rathbone, C.R.; Liu, X.; Temm-Grove, C.; Sheehan, S.M.; Hoying, J.B.; Allen, R.E. Satellite cell-mediated angiogenesis in vitro coincides with a functional hypoxia-inducible factor pathway. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2009**, 296, 1321–1328. [CrossRef]
- Latroche, C.; Weiss-Gayet, M.; Muller, L.; Gitiaux, C.; Leblanc, P.; Liot, S.; Ben-Larbi, S.; Abou-Khalil, R.; Verger, N.; Bardot, P.; et al. Coupling between Myogenesis and Angiogenesis during Skeletal Muscle Regeneration is Stimulated by Restorative Macrophages. *Stem Cell Rep.* 2017, *9*, 2018–2033. [CrossRef]
- 14. Kenry; Lee, W.C.; Loh, K.P.; Lim, C.T. When stem cells meet graphene: Opportunities and challenges in regenerative medicine. *Biomaterials* **2018**, *155*, 236–250. [CrossRef]
- Bengtson, S.; Knudsen, K.B.; Kyjovska, Z.O.; Berthing, T.; Skaug, V.; Levin, M.; Koponen, I.K.; Shivayogimath, A.; Booth, T.J.; Alonso, B.; et al. Differences in inflammation and acute phase response but similar genotoxicity in mice following pulmonary exposure to graphene oxide and reduced graphene oxide. *PLoS ONE* 2017, 12. [CrossRef]
- 16. Sydlik, S.A.; Jhunjhunwala, S.; Webber, M.J.; Anderson, D.G.; Langer, R. In vivo compatibility of graphene oxide with differing oxidation states. *ACS Nano* **2015**, *9*, 3866–3874. [CrossRef]
- Kurantowicz, N.; Strojny, B.; Sawosz, E.; Jaworski, S.; Kutwin, M.; Grodzik, M.; Wierzbicki, M.; Lipińska, L.; Mitura, K.; Chwalibog, A. Biodistribution of a High Dose of Diamond, Graphite, and Graphene Oxide Nanoparticles after Multiple Intraperitoneal Injections in Rats. *Nanoscale Res. Lett.* 2015, *10*, 398. [CrossRef]
- Strojny, B.; Kurantowicz, N.; Sawosz, E.; Grodzik, M.; Jaworski, S.; Kutwin, M.; Wierzbicki, M.; Hotowy, A.; Lipińska, L.; Chwalibog, A. Long term influence of carbon nanoparticles on health and liver status in rats. *PLoS ONE* 2015, *10*, e0144821. [CrossRef]
- Matesanz, M.-C.; Vila, M.; Feito, M.-J.; Linares, J.; Gonçalves, G.; Vallet-Regi, M.; Marques, P.-A.A.P.; Portolés, M.-T. The effects of graphene oxide nanosheets localized on F-actin filaments on cell-cycle alterations. *Biomaterials* 2013, 34, 1562–1569. [CrossRef]
- Hong, S.; Lee, S.; Yi, J. Sensitive and molecular size-selective detection of proteins using a chip-based and heteroliganded gold nanoisland by localized surface plasmon resonance spectroscopy. *Nanoscale Res. Lett.* 2011, *6*, 336. [CrossRef]
- Lunova, M.; Zablotskii, V.; Dempsey, N.M.; Devillers, T.; Jirsa, M.; Syková, E.; Kubinová, Š.; Lunov, O.; Dejneka, A. Modulation of collective cell behaviour by geometrical constraints. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* 2016, *8*, 1099–1110. [CrossRef]
- 22. Zhang, W.; Yan, L.; Li, M.; Zhao, R.; Yang, X.; Ji, T.; Gu, Z.; Yin, J.-J.; Gao, X.; Nie, G. Deciphering the underlying mechanisms of oxidation-state dependent cytotoxicity of graphene oxide on mammalian cells. *Toxicol. Lett.* **2015**, 237, 61–71. [CrossRef]
- 23. Chng, E.L.K.; Pumera, M. The toxicity of graphene oxides: Dependence on the oxidative methods used. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 8227–8235. [CrossRef]
- 24. Song, J.; Gao, H.; Zhu, G.; Cao, X.; Shi, X.; Wang, Y. The preparation and characterization of polycaprolactone/graphene oxide biocomposite nanofiber scaffolds and their application for directing cell behaviors. *Carbon* **2015**, *95*, 1039–1050. [CrossRef]
- Bałaban, J.; Wierzbicki, M.; Zielińska, M.; Szczepaniak, J.; Sosnowska, M.; Daniluk, K.; Cysewski, D.; Koczoń, P.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. *Molecules* 2020, 25, 1991. [CrossRef] [PubMed]

- 26. Nair, M.; Nancy, D.; Krishnan, A.G.; Anjusree, G.S.; Vadukumpully, S.; Nair, S.V. Graphene oxide nanoflakes incorporated gelatin-hydroxyapatite scaffolds enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nanotechnology* **2015**, *26*. [CrossRef]
- 27. Kim, I.S.; Song, Y.M.; Lee, B.; Hwang, S.J. Human mesenchymal stromal cells are mechanosensitive to vibration stimuli. *J. Dent. Res.* **2012**, *91*, 1135–1140. [CrossRef]
- Chaudhuri, B.; Bhadra, D.; Moroni, L.; Pramanik, K. Myoblast differentiation of human mesenchymal stem cells on graphene oxide and electrospun graphene oxide-polymer composite fibrous meshes: Importance of graphene oxide conductivity and dielectric constant on their biocompatibility. *Biofabrication* 2015, 7. [CrossRef]
- 29. Akhavan, O.; Ghaderi, E.; Shahsavar, M. Graphene nanogrids for selective and fast osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Carbon* **2013**, *59*, 200–211. [CrossRef]
- 30. Haase, K.; Pelling, A.E. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *J. R. Soc. Interface* **2015**, 12. [CrossRef]
- 31. Chaillou, T.; Lanner, J.T. Regulation of myogenesis and skeletal muscle regeneration: Effects of oxygen levels on satellite cell activity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2016**, *30*, 3929–3941. [CrossRef] [PubMed]
- 32. Jo, S.B.; Erdenebileg, U.; Dashnyam, K.; Jin, G.-Z.; Cha, J.-R.; El-Fiqi, A.; Knowles, J.C.; Patel, K.D.; Lee, H.-H.; Lee, J.-H.; et al. Nano-graphene oxide/polyurethane nanofibers: Mechanically flexible and myogenic stimulating matrix for skeletal tissue engineering. *J. Tissue Eng.* **2020**, *11*. [CrossRef] [PubMed]
- Liu, X.-Q.; Tang, R.-Z. Biological responses to nanomaterials: Understanding nano-bio effects on cell behaviors. *Drug Deliv.* 2017, 24, 1–15. [CrossRef] [PubMed]
- 34. Lee, A.S.J.; Zhang, M.; Evans, D.J.R. Changes in the proportion and number of Pax(7 + ve) and MF20(+ve) myoblasts during chick myogenesis in the head and limb. *Int. J. Dev. Biol.* **2004**, *48*, 31–38. [CrossRef]
- 35. Ishibashi, J.; Perry, R.L.; Asakura, A.; Rudnicki, M.A. MyoD induces myogenic differentiation through cooperation of its NH2- and COOH-terminal regions. *J. Cell Biol.* **2005**, *171*, 471–482. [CrossRef]
- 36. Al-Musawi, S.L.; Lock, F.; Simbi, B.H.; Bayol, S.A.M.; Stickland, N.C. Muscle specific differences in the regulation of myogenic differentiation in chickens genetically selected for divergent growth rates. *Differentiation* **2011**, *82*, 127–135. [CrossRef]
- 37. Hu, P.; Geles, K.G.; Paik, J.-H.; DePinho, R.A.; Tjian, R. Codependent activators direct myoblast-specific MyoD transcription. *Dev. Cell* **2008**, *15*, 534–546. [CrossRef]
- Tortorella, L.L.; Milasincic, D.J.; Pilch, P.F. Critical proliferation-independent window for basic fibroblast growth factor repression of myogenesis via the p42/p44 MAPK signaling pathway. J. Biol. Chem. 2001, 276, 13709–13717. [CrossRef]
- Flann, K.L.; Rathbone, C.R.; Cole, L.C.; Liu, X.; Allen, R.E.; Rhoads, R.P. Hypoxia simultaneously alters satellite cell-mediated angiogenesis and hepatocyte growth factor expression. *J. Cell. Physiol.* 2014, 229, 572–579. [CrossRef]
- Rhoads, R.P.; Flann, K.L.; Cardinal, T.R.; Rathbone, C.R.; Liu, X.; Allen, R.E. Satellite cells isolated from aged or dystrophic muscle exhibit a reduced capacity to promote angiogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013, 440, 399–404. [CrossRef]
- 41. Nillesen, S.T.M.; Geutjes, P.J.; Wismans, R.; Schalkwijk, J.; Daamen, W.F.; van Kuppevelt, T.H. Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen–heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials* **2007**, *28*, 1123–1131. [CrossRef] [PubMed]
- 42. Borselli, C.; Cezar, C.A.; Shvartsman, D.; Vandenburgh, H.H.; Mooney, D.J. The role of multifunctional delivery scaffold in the ability of cultured myoblasts to promote muscle regeneration. *Biomaterials* **2011**, *32*, 8905–8914. [CrossRef] [PubMed]
- 43. Bryan, B.A.; Walshe, T.E.; Mitchell, D.C.; Havumaki, J.S.; Saint-Geniez, M.; Maharaj, A.S.; Maldonado, A.E.; D'Amore, P.A. Coordinated vascular endothelial growth factor expression and signaling during skeletal myogenic differentiation. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 994–1006. [CrossRef] [PubMed]
- Walthers, C.M.; Nazemi, A.; Patel, S.; Wu, B.; Dunn, J.C.Y. The Effect of Scaffold Macroporosity on Angiogenesis and Cell Survival in Tissue-Engineered Smooth Muscle. *Biomaterials* 2014, 35, 5129–5137. [CrossRef] [PubMed]

- 45. Sosnowska, M.; Kutwin, M.; Jaworski, S.; Strojny, B.; Wierzbicki, M.; Szczepaniak, J.; Łojkowski, M.; Święszkowski, W.; Bałaban, J.; Chwalibog, A.; et al. Mechano-signalling, induced by fullerene C60 nanofilms, arrests the cell cycle in the G2/M phase and decreases proliferation of liver cancer cells. *Int. J. Nanomed.* **2019**, 14, 6197–6215. [CrossRef]
- 46. Heckman, C.; Kanagasundaram, S.; Cayer, M.; Paige, J. Preparation of cultured cells for scanning electron microscope. *Protoc. Exch.* 2007. [CrossRef]
- 47. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675. [CrossRef]
- 48. Carpentier, G.; Martinelli, M.; Courty, J.; Cascone, I. *Angiogenesis Analyzer for ImageJ. 4th ImageJ User and Developer Conference Proceedings*; Mondorf-les-Bains: Luxembourg, 2012; pp. 198–201.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW

dr Mateusz Wierzbicki

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2020

Załącznik 6

1. Zestawienie deklarowanego procentowego udziału współautorów w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia

Lp.	Publikacja	Autor	Udział
			procentowy (%)
P1	Analysis of the cytotoxicity of carbon-based	Zakrzewska KE	20
	nanoparticles, diamond and graphite, in	Samluk A	20
	human glioblastoma and hepatoma cell	Wierzbicki M	15
	lines. PloS One 2015, 10, e0122579.	Jaworski S	5
		Kutwin M	5
		Sawosz E	5
		Chwalibog A	5
		Pijanowska DG	5
		Pluta KD	20
P2	Diamond, graphite, and graphene oxide	Wierzbicki M	80
	nanoparticles decrease migration and	Jaworski S	2
	invasiveness in glioblastoma cell lines by	Kutwin M	2
	impairing extracellular adhesion.	Grodzik M	2
	International Journal of Nanomedicine	Strojny B	2
	2017, 12, 7241.	Kurantowicz N	2
		Zdunek K	2,5
		Chodun R	2,5
		Chwalibog A	2
		Sawosz E	3
Р3	NF-ĸB-related decrease of glioma	Wierzbicki M	85
	angiogenic potential by graphite	Sawosz E	5
	nanoparticles and graphene oxide	Strojny B	2
	nanoplatelets. Scientific Reports 2018, 8,	Jaworski S	2
	14733.	Grodzik M	2
		Chwalibog A	4
P4	Graphene Oxide in a Composite with Silver	Wierzbicki M	65
	Nanoparticles Reduces the Fibroblast and	Jaworski S	2
·	Endothelial Cell Cytotoxicity of an	Sawosz E	1
		Jung A	15

	Antibacterial Nanoplatform. Nanoscale	Gielerak G	2,5
	Research Letters, 2019, 14, 1–11.	Jaremek H	2,5
		Łojkowski W	2,5
		Woźniak B	2,5
		Stobiński L	2,5
		Małolepszy A	2,5
		Chwalibog A	2
P5	Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M,	Wierzbicki M	80
	Jaworski S, Bałaban J, Sosnowska M,	Hotowy A	5
	Wójcik B, Wędzińska A, Chwalibog A,	Kutwin M	2
	Sawosz E. Graphene Oxide Scaffold	Jaworski S	2
	Stimulates Differentiation and	Bałaban J	2
	Proangiogenic Activities of Myogenic	Sosnowska M	2
	Progenitor Cells. International Journal of	Wójcik B	1
	Molecular Sciences 2020, 21, 4173.	Wędzińska A	2
		Chwalibog A	2
		Sawosz E	2

Moteur Wiebiti

Dr Karolina Zakrzewska Pracownia Inżynierii Tkankowej Zakład I Mikrobiosystemów Hybrydowych i Analitycznych Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN ul. Ks. Trojdena 4 02-109 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Karolina Ewa Zakrzewska, Anna Samluk, Mateusz Wierzbicki, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Ewa Sawosz, André Chwalibog, Dorota Genowefa Pijanowska, Krzysztof Dariusz Pluta. Analysis of the Cytotoxicity of Carbon-Based Nanoparticles, Diamond and Graphite, in Human Glioblastoma and Hepatoma Cell Lines. PLoS One. 2015; 10(3): e0122579 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na:

współpracy w planowaniu doświadczeń, koordynacji współpracy jednostek, pisaniu pracy oraz analizie danych, udziale w doświadczeniach dotyczących: produkcji wektora wirusowego, transdukcji komórek, analizy cytometrycznej oraz żywotności komórek (RTCA).

Udział procentowy w pracy szacuję na 20%.

Kondine Lotinevela

Podpis

Dr Anna Samluk Pracownia Inżynierii Tkankowej Zakład I Mikrobiosystemów Hybrydowych i Analitycznych Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN ul. Ks. Trojdena 4 02-109 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Karolina Ewa Zakrzewska, Anna Samluk, Mateusz Wierzbicki, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Ewa Sawosz, André Chwalibog, Dorota Genowefa Pijanowska, Krzysztof Dariusz Pluta. Analysis of the Cytotoxicity of Carbon-Based Nanoparticles, Diamond and Graphite, in Human Glioblastoma and Hepatoma Cell Lines. PLoS One. 2015; 10(3): e0122579 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: współpracy w planowaniu doświadczeń, koordynacji współpracy jednostek, pisaniu pracy oraz analizie danych, udziale w doświadczeniach dotyczących produkcji wektora wirusowego, transdukcji komórek, analizie cytometrycznej, żywotności komórek z wykorzystanym RTCA.

Udział procentowy w pracy szacuję na 20%

Anno Somlech Heanlich

Podpis
Dr hab. Sławomir Jaworski, prof. SGGW Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8 02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Karolina Ewa Zakrzewska, Anna Samluk, Mateusz Wierzbicki, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Ewa Sawosz, André Chwalibog, Dorota Genowefa Pijanowska, Krzysztof Dariusz Pluta. Analysis of the Cytotoxicity of Carbon-Based Nanoparticles, Diamond and Graphite, in Human Glioblastoma and Hepatoma Cell Lines. PLoS One. 2015; 10(3): e0122579 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: Udziale w przygotowaniu zawiesin nanomateriałów i analizie fizykochemicznej nanomateriałów.

Podpis

Dr Marta Kutwin Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8 02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Karolina Ewa Zakrzewska, Anna Samluk, Mateusz Wierzbicki, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Ewa Sawosz, André Chwalibog, Dorota Genowefa Pijanowska, Krzysztof Dariusz Pluta. Analysis of the Cytotoxicity of Carbon-Based Nanoparticles, Diamond and Graphite, in Human Glioblastoma and Hepatoma Cell Lines. PLoS One. 2015; 10(3): e0122579 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: Udziale w analizie morfologii komórek po traktowaniu nanocząstkami. Udział procentowy w pracy szacuję na 5%

Jutus Maite

Podpis

Prof. dr hab. Ewa Sawosz Chalibóg Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8 02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Karolina Ewa Zakrzewska, Anna Samluk, Mateusz Wierzbicki, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Ewa Sawosz, André Chwalibog, Dorota Genowefa Pijanowska, Krzysztof Dariusz Pluta. Analysis of the Cytotoxicity of Carbon-Based Nanoparticles, Diamond and Graphite, in Human Glioblastoma and Hepatoma Cell Lines. PLoS One. 2015; 10(3): e0122579 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: współpracy w planowaniu doświadczeń, pisaniu pracy oraz analizie danych dotyczących interakcji nanocząstek z komórkami Udział procentowy w pracy szacuję na 5%

Podpis

Prof. André Chwalibog
afiliacja
Department of Veterinary Clinical and Animal Sciences,
University of Copenhagen,
Groennegaardsvej 3, Frederiksberg, Copenhagen 1870,
Denmark

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Karolina Ewa Zakrzewska, Anna Samluk, Mateusz Wierzbicki, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Ewa Sawosz, André Chwalibog, Dorota Genowefa Pijanowska, Krzysztof Dariusz Pluta. Analysis of the Cytotoxicity of Carbon-Based Nanoparticles, Diamond and Graphite, in Human Glioblastoma and Hepatoma Cell Lines. PLoS One. 2015; 10(3): e0122579 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: nadzorowaniu spójności badań oraz nadzorowaniu przygotowania tekstu do wysłania do czasopisma.

A. C. Podpis

Dr Krzysztof Pluta Pracownia Inżynierii Tkankowej Zakład I Mikrobiosystemów Hybrydowych i Analitycznych Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN ul. Ks. Trojdena 4 02-109 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Karolina Ewa Zakrzewska, Anna Samluk, Mateusz Wierzbicki, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Ewa Sawosz, André Chwalibog, Dorota Genowefa Pijanowska, Krzysztof Dariusz Pluta. Analysis of the Cytotoxicity of Carbon-Based Nanoparticles, Diamond and Graphite, in Human Glioblastoma and Hepatoma Cell Lines. PLoS One. 2015; 10(3): e0122579 jako części rozprawy habilitacyjnej dra Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: współpracy w planowaniu doświadczeń, uczestnictwie w wykonaniu doświadczeń polegających na produkcji wektora wirusowego, transdukcji komórek, analizie statusu komórek z użyciem urządzenia RTCA, analizie cytometrycznej; pisaniu pracy oraz analizie danych, uzyskaniu zgodny na badania na ludzkich liniach komórkowych zmodyfikowanych wektorami lentiwirusowymi, złożenie publikacji i korespondencja z czasopismem. Udział procentowy w pracy szacuję na 20%.

dr hab. Sławomir Jaworski, prof. SGGW Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Strojny B, Kurantowicz N, Zdunek K, Chodun R, Chwalibog A, Sawosz E. Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion, International journal of nanomedicine 2017, 12, 7241. jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: udziale w analizie wpływu nanomateriałów na migrację i inwazyjność komórek.

javoist Podpis

Warszawa ... 0.2.17.2020

dr Marta Kutwin Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Strojny B, Kurantowicz N, Zdunek K, Chodun R, Chwalibog A, Sawosz E. Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion, International journal of nanomedicine 2017, 12, 7241. jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: udziale w przeprowadzeniu analizy żywotności komórek po traktowaniu nanocząstkami.

utuis podpis

dr hab. Marta Grodzik, prof. SGGW Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Strojny B, Kurantowicz N, Zdunek K, Chodun R, Chwalibog A, Sawosz E. Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion, International journal of nanomedicine 2017, 12, 7241. jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: analizie statystycznej wyników wpływu nanomateriałów na żywotność komórek.

Udział procentowy w pracy szacuję na 2%

4 Guadrix

dr Barbara Strojny-Cieślak Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy: Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Strojny B, Kurantowicz N, Zdunek K, Chodun R, Chwalibog A, Sawosz E. Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion, International journal of nanomedicine 2017, 12, 7241. jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: analizie zdjęć morfologii komórek po traktowaniu nanomateriałami wykonanych skaningowym mikroskopem elektronowym.

Barbers Stoji C'olel Podpis

dr Natalia Kurantowicz Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii ul. Ciszewskiego 8

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystaniepracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Strojny B, Kurantowicz N, Zdunek K, Chodun R, Chwalibog A, Sawosz E. Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion, International journal of nanomedicine 2017, 12, 7241. jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: *pomocy w przygotowaniu figur*.

Udział procentowy w pracy szacuję na 2%

Natolia Kurantocica

prof. dr hab. inż. Krzysztof Zdunek Wydział Inżynierii Materiałowej, Zakład Inżynierii Powierzchni, Politechnika Warszawska ul. Wołoska 141, 02-507 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Strojny B, Kurantowicz N, Zdunek K, Chodun R, Chwalibog A, Sawosz E. Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion. Int J Nanomedicine. 2017 4;12:7241-7254. jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: wykonaniu oraz analizie spektroskopii Ramana nanocząstek diamentu, grafitu oraz tlenku grafenu.

Podpis

dr inż. Rafał Chodun Wydział Inżynierii Materiałowej, Zakład Inżynierii Powierzchni, Politechnika Warszawska uł. Wołoska 141, 02-507 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Strojny B, Kurantowicz N, Zdunek K, Chodun R, Chwalibog A, Sawosz E. Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion. Int J Nanomedicine. 2017 4;12:7241-7254.

jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: wykonaniu oraz analizie spektroskopii Ramana nanocząstek diamentu, grafitu oraz tlenku grafenu.

Udział procentowy w pracy szacuję na 2,5%.

Refat Clude

Prof. André Chwalibog afiliacja Department of Veterinary Clinical and Animal Sciences, University of Copenhagen, Groennegaardsvej 3, Frederiksberg, Copenhagen 1870, Denmark

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Strojny B, Kurantowicz N, Zdunek K, Chodun R, Chwalibog A, Sawosz E. Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion, International journal of nanomedicine 2017, 12, 7241. jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: przygotowania tekstu do wysłania do czasopisma, korespondencji z czasopismem.

Udział procentowy w pracy szacuję na 2%

A AMM

Prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Kutwin M, Grodzik M, Strojny B, Kurantowicz N, Zdunek K, Chodun R, Chwalibog A, Sawosz E. Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion, International journal of nanomedicine 2017, 12, 7241. jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: nadzorowaniu pisania publikacji i przygotowania do złożenia tekstu do czasopisma

Prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy: Wierzbicki M, Sawosz E, Strojny B, Jaworski S, Grodzik M, Chwalibog A. NF-κB-related decrease of glioma angiogenic potential by graphite nanoparticles and graphene oxide nanoplatelets. Scientific reports 2018, 8, 14733. jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: nadzorowaniu spójności badań oraz nadzorowaniu przygotowania tekstu do wysłania do czasopisma.

Udział procentowy w pracy szacuję na 5%

Ead)

Dr Barbara Strojny-Cieślak Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy: Wierzbicki M, Sawosz E, Strojny B, Jaworski S, Grodzik M, Chwalibog A. NF-κB-related decrease of glioma angiogenic potential by graphite nanoparticles and graphene oxide nanoplatelets. Scientific reports 2018, 8, 14733 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: udziale w analizie syntezy reaktywnych form tlenu po traktowaniu nanomateriałami

Barbere Shiji Cie, Cle Podpis

Dr hab. Sławomir Jaworski, prof. SGGW Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy: Wierzbicki M, Sawosz E, Strojny B, Jaworski S, Grodzik M, Chwalibog A. NF-κB-related decrease of glioma angiogenic potential by graphite nanoparticles and graphene oxide nanoplatelets. Scientific reports 2018, 8, 14733 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: udziale w badaniu żywotności komórek linii U87 po traktowaniu nanomateriałami.

Jawoist Podpis

Dr hab. Marta Grodzik, prof. SGGW Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy: Wierzbicki M, Sawosz E, Strojny B, Jaworski S, Grodzik M, Chwalibog A. NF-κB-related decrease of glioma angiogenic potential by graphite nanoparticles and graphene oxide nanoplatelets. Scientific reports 2018, 8, 14733 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: udziale w przeprowadzeniu analizy statystycznej wyników badań.

Udział procentowy w pracy szacuję na 2%

H. auchit
Prof. André Chwalibog afiliacja Department of Veterinary Clinical and Animal Sciences, University of Copenhagen, Groennegaardsvej 3, Frederiksberg, Copenhagen 1870, Denmark

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy: Wierzbicki M, Sawosz E, Strojny B, Jaworski S, Grodzik M, Chwalibog A. NF-KB-related

decrease of glioma angiogenic potential by graphite nanoparticles and graphene oxide nanoplatelets. Scientific reports 2018, 8, 14733 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: nadzorowaniu spójności badań oraz nadzorowaniu przygotowania tekstu do wysłania do czasopisma.

Udział procentowy w pracy szacuję na 4%

AMM

Dr hab. Sławomir Jaworski, prof. SGGW Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8 02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Stobiński L, Małolepszy A, Chwalibog A. Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatform. Nanoscale Research Letters, 2019, 14, 1-11 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: badaniu żywotności Salmonella enteritidis po inkubacji z nanoplatformami i analizie zdjęć morfologii Salmonella enteritidis wykonanych skaningowym mikroskopem elektronowym.

Jauoisi Podpis

Prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8 02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Stobiński L, Małolepszy A, Chwalibog A. Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatform. Nanoscale Research Letters, 2019, 14, 1–11 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na:

udziale w przeprowadzaniu badani *in ovo* i nadzowrowaniu przygotowania tekstu do wysłania do czasopisma

zan Podpis

Warszawa, 24.07.2020

prof. dr hab. n. med. Hanna Anna Jung-Hauska Klinika Pediatrii, Nefrologii i Alergologii Dziecięcej Wojskowy Instytut Medyczny 04-141 Warszawa ul. Szaserów 128

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Stobiński L, Małolepszy A, Chwalibog A. Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatform. Nanoscale Research Letters, 2019, 14, 1–11 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy.

Prof. dr hab. n. med. Anna Jung-Hauska Specjalista Chorob Dziecięcych 79696 Nefrologii i Alergologii Warszawa, ul. Margerytki 42 Podpis

Warszawa, 24.07.2020

gen. dyw. prof. dr hab. n. med. Grzegorz Gielerak Wojskowy Instytut Medyczny 04-141 Warszawa ul. Szaserów 128

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Stobiński L, Małolepszy A, Chwalibog A. Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatform. Nanoscale Research Letters, 2019, 14, 1–11 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: współkierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w pracy.

Podpis

Warszawa, 24.07.2020

prof. dr hab. Witold Łojkowski Instytut Wysokich Ciśnień Polskiej Akademii Nauk ul. Sokołowska 29/37 01-142 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Stobiński L, Małolepszy A, Chwalibog A. Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatform. Nanoscale Research Letters, 2019, 14, 1–11 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: uczestnictwie w przygotowaniu folii pokrytych nanokompozytem tlenku grafenu i nanocząstek srebra

Udział procentowy w pracy szacuję na 2,5%

24

Wited Lain

Podpis

dr Artur Małolepszy Zakład Procesów Rozdzielania, Laboratorium Grafenowe Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej ul. Waryńskiego 1 00-645 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Stobiński L, Małolepszy A, Chwalibog A. Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatform. Nanoscale Research Letters, 2019, 14, 1–11 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: syntezie i analizie fizykochemicznej tlenku grafenu

Arter Matolgary Podpis

Prof. André Chwalibog afiliacja Department of Veterinary Clinical and Animal Sciences, University of Copenhagen, Groennegaardsvej 3, Frederiksberg, Copenhagen 1870, Denmark

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Jaworski S, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Jaremek H, Łojkowski W, Woźniak B, Stobiński L, Małolepszy A, Chwalibog A. Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatform. Nanoscale Research Letters, 2019, 14, 1–11 jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: nadzorowaniu przeprowadzanych badań i przygotowania tekstu do wysłania do czasopisma.

Udział procentowy w pracy szacuję na 2%

Dr Anna Hotowy Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8 02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M.; Jaworski, S.; Bałaban, J.; Sosnowska, M.; Wójcik, B.; Wędzińska, A.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Graphene Oxide Scaffold Stimulates Differentiation and Proangiogenic Activities of Myogenic Progenitor Cells. International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 4173.

jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: Zaprojektowaniu starterów do oraz analiza wyników badań z wykorzystaniem Real-Time PCR.

Podpis

Dr Marta Kutwin Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8 02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M.; Jaworski, S.; Bałaban, J.; Sosnowska, M.; Wójcik, B.; Wędzińska, A.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Graphene Oxide Scaffold Stimulates Differentiation and Proangiogenic Activities of Myogenic Progenitor Cells. International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 4173.

jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: Udziale w analizach wykonanych programem ImageJ oraz analizie formalnej tekstu przed wysłaniem publikacji.

Udział procentowy w pracy szacuję na 2 %

luluy parte

Dr hab. Sławomir Jaworski, prof. SGGW Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8 02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M.; Jaworski, S.; Bałaban, J.; Sosnowska, M.; Wójcik, B.; Wędzińska, A.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Graphene Oxide Scaffold Stimulates Differentiation and Proangiogenic Activities of Myogenic Progenitor Cells. International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 4173.

jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: Edycji i formalnej analizie figur oraz tekstu publikacji.

Javongh Podpis

Mgr Jaśmina Bałaban Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8 02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M.; Jaworski, S.; Bałaban, J.; Sosnowska, M.; Wójcik, B.; Wędzińska, A.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Graphene Oxide Scaffold Stimulates Differentiation and Proangiogenic Activities of Myogenic Progenitor Cells. International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 4173.

jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: Udziale w pokrywaniu nanoskafoldem powierzchni płytek hodowlanych oraz walidacji uzyskanych wyników analizy wzrostu komórek na nanoplatformach

Saraban Podpis

Mgr Malwina Sosnowska Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8 02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M.; Jaworski, S.; Bałaban, J.; Sosnowska, M.; Wójcik, B.; Wędzińska, A.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Graphene Oxide Scaffold Stimulates Differentiation and Proangiogenic Activities of Myogenic Progenitor Cells. International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 4173.

jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: Dostosowaniu metodyki pokrywania powierzchni nanoskafoldem oraz udziale w pokrywaniu nanoskafoldem powierzchni płytek hodowlanych Udział procentowy w pracy szacuję na 2 %

Sosnowshe Malvine

Mgr Barbara Wójcik Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8 02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M.; Jaworski, S.; Bałaban, J.; Sosnowska, M.; Wójcik, B.; Wędzińska, A.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Graphene Oxide Scaffold Stimulates Differentiation and Proangiogenic Activities of Myogenic Progenitor Cells. International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 4173.

jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: Udziale w przygotowaniu formalnym tekstu i figur do publikacji.

Udział procentowy w pracy szacuję na 1 %

Jackans Wejuk

mgr inż. Aleksandra Wędzińska Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8 02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M.; Jaworski, S.; Bałaban, J.; Sosnowska, M.; Wójcik, B.; Wędzińska, A.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Graphene Oxide Scaffold Stimulates Differentiation and Proangiogenic Activities of Myogenic Progenitor Cells. International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 4173.

jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: współpracy w analizie zdjęć świetlnych.

Udział procentowy w pracy szacuję na 2 %

Aleusandra Wedsiddua

Prof. André Chwalibog afiliacja Department of Veterinary Clinical and Animal Sciences, University of Copenhagen, Groennegaardsvej 3, Frederiksberg, Copenhagen 1870, Denmark

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M.; Jaworski, S.; Bałaban, J.; Sosnowska, M.; Wójcik, B.; Wędzińska, A.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Graphene Oxide Scaffold Stimulates Differentiation and Proangiogenic Activities of Myogenic Progenitor Cells. International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 4173.

jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: Nadzorowaniu przygotowania publikacji do czasopisma, edycji tekstu przed wysłaniem do czasopisma.

A. M. Podpis

Prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg Samodzielny Zakład Nanobiotechnologii i Ekologii Doświadczalnej Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie ul. Ciszewskiego 8 02-786 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pracy:

Wierzbicki M, Hotowy A, Kutwin M.; Jaworski, S.; Bałaban, J.; Sosnowska, M.; Wójcik, B.; Wędzińska, A.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Graphene Oxide Scaffold Stimulates Differentiation and Proangiogenic Activities of Myogenic Progenitor Cells. International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 4173.

jako części rozprawy habilitacyjnej dr Mateusza Wierzbickiego.

Oświadczam, że mój udział w wyżej wymienionej pracy polegał na: Udziale w projektowaniu badań, nadzorowaniu przeprowadzanych badań, zapewnieniu środków na realizację badań

2 ans Podpis Podpis

DWA PENDRIVE'Y Z KOPIĄ WYMAGANYCH DOKUMENTÓW

dr Mateusz Wierzbicki

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2020

Załącznik 6