

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Instytut Biologii

mgr Jarosław Szczepaniak

Wybrane materiały grafenowe jako czynniki
modulujące szlaki apoptotyczne i sygnalizację
zwnętrzkomórkową w komórkach glejaka IV
stopnia *in vitro*

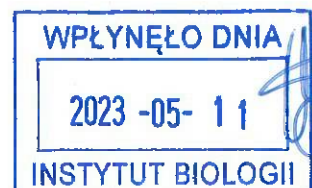
Selected graphene materials as modulating factors of apoptotic
pathways and extracellular signaling in glioma grade IV *in vitro*

Praca doktorska
Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem:


dr hab. Marta Grodzik, prof. SGGW (promotor)
Dr Barbara Strojny-Cieślak (promotor pomocniczy)
Katedra Nanobiotechnologii
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2023



Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data... 11.05.23 Podpis promotora pracy... 


Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca dyplomowa została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data... 11.05.2023

Podpis autora pracy... 

1. Streszczenie

Wybrane materiały grafenowe jako czynniki modulujące szlaki apoptotyczne i sygnalizację zewnątrzkomórkową, w komórkach glejaka IV stopnia *in vitro*

Glejak IV stopnia (GBM) jest złośliwym, pierwotnym nowotworem mózgu pochodzenia astrocytarnego. Grafen ma doskonałą strukturę sieci krystalicznej, hybrydyzację atomową sp² i liczne, ważne z punktu widzenia zastosowań w medycynie właściwości. Istotną modyfikacją pochodnych grafenu jest zmniejszenie zawartości tlenu (grup hydroksylowych, karboksylowych, epoksydowych) w rGO w stosunku do materiału wyjściowego jakim jest GO, co skutkuje wzrostem zdelokalizowanych elektronów na powierzchni płatków. Celem pracy było zbadanie i porównanie wpływu wybranych form alotropowych węgla (rGO i GN) na toksyczność, związany z tym szlak aktywacji apoptozy oraz cykl komórkowy, sygnalizację związaną z funkcjonowaniem błony komórkowej oraz w związku z tym modulacji mechanizmów adhezji i migracji wobec komórek nowotworowych glejaka IV stopnia i komórek prawidłowych. Materiał badawczy stanowiły hydrokoloidy płatków grafenu (GN/ExF) oraz zredukowanych tlenków grafenu (rGO/Term, rGO/ATS i rGO/TUD). Uzyskane wyniki wykazały, że badane materiały grafenowe i ich pochodne działają cytotoksycznie na komórki nowotworowe indukując apoptozę, w szczególności na drodze zależnej od mitochondriów. Ponadto wykazano zmiany w ekspresji genów kanałów jonowych zależnych od napięcia (*clcn3*, *nalc1* i *kcne4*) świadczące o możliwości modulacji sygnałów bioelektrycznych za pomocą materiałów węglowych. Co więcej płatki GN i rGO istotnie obniżyły ekspresję zewnątrzkomórkowych receptorów (uPar, CD105) oraz białek FAK i β -kateniny, co spowodowało obniżenie ruchliwości i migracji komórek U87. Silniejsze działanie cytotoksyczne i modulujące płatków rGO w porównaniu do GN może zależeć od obecności i rodzaju grup funkcyjnych zawierających tlen oraz zdegenerowanych połączeń między węglami i w konsekwencji zwiększonej hydrofilowości, która ułatwia kontakt z błoną komórkową, a tym samym działanie przeciwnowotworowe.

Słowa kluczowe: glejak, grafen, zredukowany tlenek grafenu, apoptoza, kanały jonowe, receptory zewnątrzkomórkowe, migracja, adhezja

Summary

Selected graphene materials as modulating factors of apoptotic pathways and extracellular signaling in glioma grade IV *in vitro*

Stage IV glioblastoma (GBM) is a malignant primary brain tumor of astrocytic origin. Graphene has an excellent crystal lattice structure, sp² atomic hybridization and numerous properties important from the point of view of medical applications. An important modification of graphene derivatives is the reduction of the oxygen content (hydroxyl, carboxyl, epoxide groups) in rGO in relation to the starting material which is GO, which results in an increase in delocalized electrons on the surface of the flakes. The aim of the study was to investigate and compare the effect of selected carbon allotropes (GN and rGO) on toxicity, the related pathway of apoptosis activation and the cell cycle, signaling related to the functioning of the cell membrane and, therefore, modulation of the mechanisms of adhesion and migration towards stage IV glioblastoma cancer cells and normal cells. The research material consisted of hydrocolloids of graphene flakes (GN/ExF) and reduced graphene oxides (rGO/Term, rGO/ATS and rGO/TUD). The obtained results showed that the studied graphene materials and their derivatives have a cytotoxic effect on cancer cells by inducing apoptosis, in particular in the mitochondria-dependent way. In addition, changes in the expression of voltage-dependent ion channel genes (*clcn3*, *nalcn* and *kcne4*) were demonstrated, indicating the possibility of modulation of bioelectrical signals with carbon materials. Moreover, GN and rGO flakes significantly reduced the expression of extracellular receptors (uPar, CD105) as well as FAK and β -catenin proteins, which resulted in reduced mobility and migration of U87 cells. The stronger cytotoxic and modulating effect of rGO flakes compared to GN may depend on the presence and type of oxygen-containing functional groups and degenerate connections between carbons and, consequently, increased hydrophilicity, which facilitates contact with the cell membrane, and thus anticancer activity.

Key words: glioma, graphene, reduced graphene oxide, apoptosis, ion channels, extracellular receptors, migration, invasiveness

*Serdecznie dziękuję
dr hab. Marcie Grodzik, prof. SGGW
dr Barbarze Strojny-Cieślak,
Pracownikom Katedry Nanobiotechnologii, Współautorom oraz wszystkim innym osobom z
pomocą których powstała niniejsza praca*

Pracę doktorską dedykuję moim rodzicom i najbliższym za wsparcie i możliwość kształcenia

Spis treści

1.	Streszczenie	5
2.	Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską	11
3.	Wykaz stosowanych skrótów	12
4.	Wstęp	16
5.	Hipoteza badawcza, cel i zakres pracy	19
6.	Metodyka badań	20
6.1	Materiały grafenowe	20
6.2	Modele biologiczne <i>in vitro</i>	22
6.3	Układ doświadczeń	23
6.3.1	Doświadczenie I	24
6.3.2	Doświadczenie II	25
6.3.3	Doświadczenie III	25
6.3.4	Doświadczenie IV	26
6.3.5	Doświadczenie V	26
6.4	Metody analityczne	27
6.5	Analiza statystyczna	28
7.	Omówienie głównych wyników prac eksperymentalnych	29
7.1.	Doświadczenie I - Charakterystyka i porównanie właściwości fizykochemicznych materiałów węglowych - Publikacja 1 (Szczepaniak J. i in., 2018), Publikacja 2 (Szczepaniak J. i in., 2021), Publikacja 3 (Szczepaniak J. i in., 2022)	29
7.2.	Doświadczenie II - Określenie wpływu płatków wybranych odmian alotropowych węgla (grafen, zredukowany tlenek grafenu) na żywotność i morfologię komórek glejaka IV stopnia U87 i komórek prawidłowych linii Hs5 - Publikacja 1 (Szczepaniak J. i in., 2018), Publikacja 3 (Szczepaniak J. i in., 2022)	33
7.3.	Doświadczenie III Określenie wpływu płatków wybranych odmian alotropowych węgla (zredukowany tlenek grafenu, grafen) na status funkcjonalny komórek ze szczególnym uwzględnieniem rodzaju indukowanej śmierci komórkowej oraz zmian cyklu komórkowego w badaniach na komórkach glejaka IV stopnia linii U87 - Publikacja 1 (Szczepaniak i in., 2018)	34
7.4.	Doświadczenie IV – Określenie wpływu płatków zredukowanego tlenku grafenu i płatków grafenu na potencjał błonowy zależny od funkcjonowania kanałów jonowych w komórkach glejaka IV stopnia linii U87 – Publikacja 2 (Szczepaniak J. i in., 2021)	36
7.5.	Doświadczenie V – Określenie wpływu płatków zredukowanego tlenku grafenu i płatków grafenu na ekspresję receptorów zewnątrzkomórkowych oraz białek związanych z migracją i adhezją w komórkach glejaka IV stopnia linii U87 – Publikacja 2 (Szczepaniak i in., 2021) i Publikacja 3 (Szczepaniak i in., 2022)	39
8.	Podsumowanie	43
9.	Wnioski	45
10.	Bibliografia	46
11.	Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	46

2. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską pod tytułem:

„Wybrane materiały grafenowe jako czynniki modulujące szlaki apoptotyczne i sygnalizację zewnątrzkomórkową w komórkach glejaka IV stopnia *in vitro*”

1. **Szczepaniak J**, Strojny B, Sawosz Chwalibog E, Jaworski S, Jagiello J, Winkowska M, Szmidt M, Wierzbicki M, Sosnowska M, Balaban J, Winnicka A, Lipinska L, Witkowska Pilaszewicz 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. <https://doi.org/10.3390/ijms19123939>

(IF: 4,183; 140 pkt)

2. **Szczepaniak J**, Jagiello J, Wierzbicki M, Nowak D, Sobczyk-Guzenda A, Sosnowska M, Jaworski S, Daniluk K, Szmidt M, Witkowska-Pilaszewicz O, Strojny-Cieslak B, Grodzik M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(2):515. <https://doi.org/10.3390/ijms22020515>

(IF: 6,208; 140 pkt)

3. **Szczepaniak J**, Sosnowska M, Wierzbicki M, Witkowska-Pilaszewicz O, Strojny-Cieslak B, Jagiello J, Fraczek W, Kusmierz M, Grodzik M. Reduced Graphene Oxide Modulates the FAK-dependent Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Cells *in vitro*. *Materials* 2022, 15, 5843. <https://doi.org/10.3390/ma15175843>

(IF: 3,748; 140 pkt)

Łączny IF publikacji stanowiących rozprawę doktorską: **14,139**; łączna liczba punktów: **420**

Punktacja podana według listy MEiN czasopism punktowanych z roku 2019 i 2021, Impact Factor (IF) według Journal Citation Reports (obowiązujący w dniu wydania publikacji).

3. Wykaz stosowanych skrótów:

4-Di-10-ASP – ang. *4-(4-diethylaminostyryl)-1-methylpyridinium iodide*, jodek 4-(4-dietyloaminostyrylo)-1-metylopirydyniowy

ADAM – ang. *a disintegrin and metalloproteinase*, dezintegryna i metaloproteinaza

AFM – ang. *atomic force microscope*, mikroskopia sił atomowych

AIF – ang. *apoptosis-inducing factor*, czynnik indukujący apoptozę

aifm1 – ang. *apoptosis inducing factor mitochondrial associated 1*, czynnik indukujący apoptozę związany z mitochondriami 1

AKT – ang. *protein kinase B*, kinaza białkowa B

ANOVA – ang. *analysis of variance*, analiza wariancji

Apaf-1 – ang. *apoptotic protease activating factor 1*, apoptotyczny czynnik aktywujący proteazę 1

ATCC – ang. *American Type Culture Collection*, Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych

ATS – ang. *ammonium thiosulphate*, tiosiarczan amonu

cacna1b – ang. *calcium voltage-gated channel subunit alpha1 b*, podjednostka alfa 1b kanału wapniowego bramkowanego napięciem

cacna1d – ang. *calcium voltage-gated channel subunit alpha1 d*, podjednostka alfa 1d kanału wapniowego bramkowanego napięciem

casp3 – ang. *caspase 3*, kaspaza 3

casp9 – ang. *caspase 9*, kaspaza 9

CD105 – ang. *endoglin*, endoglina

CELE – ang. *chicken embryo liver extract*, ekstrakt z wątroby zarodka kurczaka

clcn3 – ang. *chloride voltage-gated channel 3*, chlorkowy kanał 3 bramkowany napięciem

clcn6 – ang. *chloride voltage-gated channel 6*, chlorkowy kanał 6 bramkowany napięciem

cytc – ang. *cytochrome c*, cytochrom c

DAPI – ang. *2-[4-(aminoiminomethyl)phenyl]-1H-indole-6-carboximidamide hydrochloride*, chlorowodorek 2-[4-(aminoiminometylo)fenylo]-1H-indolo-6-karboksyimidoamidu

DIC – ang. *differentia interference contrast*, kontrast interferencji różnicowej

DMEM – ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, zmodyfikowane medium eagle Dulbecco

DN – ang. *diamond nanoparticles*, nanocząstki diamentu

DNA – ang. *deoxyribonucleic acid*, kwas deoksyrybonukleinowy

ECM – ang. *extracellular matrix*, matriks zewnątrzkomórkowa

EGFR – ang. *epidermal growth factor receptor*, receptor naskórkowego czynnika wzrostu

Em – ang. *emission*, emisja

Ex – ang. *excitation*, pobudzenie

ExF – ang. *exfoliation*, eksfoliacja

FACS – ang. *fluorescence assisted cell sorting*, sortowanie komórek wspomagane fluorescencyjnie

FAK – ang. *focal adhesion kinase*, kinaza ogniskowej adhezji

FAS – ang. *fragment apoptosis simulating*, symulacja fragmentów apoptozy

FBS – ang. *Fetal Bovine Serum*, surowica płodowo-bydłęca

FITC – ang. *fluorescein isothiocyanate*, izotiocyanian fluoresceiny

FTIR – ang. *fourier-transform infrared spectroscopy*, spektroskopia fourierowska w podczerwieni

FWHM – ang. *full width at half-maximum*, pełna szerokość w połowie maksimum

GAPDH – ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa

GBM – ang. *glioblastoma multiforme*, glejak wielopostaciowy

GN – ang. *graphene*, grafen

GO – ang. *graphene oxide*, tlenek grafenu

GSC – ang. *glioblastoma stem cell*, komórki macierzyste glejaka wielopostaciowego

ITME – ang. *Institute of Electronic Materials Technology*, Instytut Technologii Materiałów Elektronicznych

JC-1 – ang. *5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarocyanine iodide*, jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolilokarocyjaniny

kcnb1 – ang. *potassium voltage-gated channel subfamily B member 1*, człon 1 podrodziny kanału potasowego bramkowanego napięciem

kcne4 – ang. *potassium voltage-gated channel subfamily E*, podrodzina E kanałów potasowych bramkowanych napięciem

kcnj10 – ang. *potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 10*, członek podrodziny J 10 kanału potasowego prostownika do wewnątrz

Ki-67 – ang. *nuclear protein detected using monoclonal antibody Ki-67*, białko jądrowe wykryte przy użyciu przeciwciała monoklonalnego Ki-67

Lef-1 – ang. *lymphoid enhancer-binding factor 1*, czynnik wiązania wzmacniacza limfoidalnego 1

Log2RQ – ang. *relative quantitation*, względna ocena ilościowa

mcm2 – ang. *minichromosome maintenance complex component 2*, kompleks konserwacji minichromosomów składnik 2

MMP – ang. *matrix metalloproteinase*, metaloproteinaza macierzy

mTOR – ang. *mammalian target of rapamycin*, ssaczy cel rapamycyny

MTT – ang. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy

nalcn – ang. *sodium leak channel, non-selective*, nieselektywny kanał wycieku sodu

NG – ang. *nano graphene*, nano grafen

nGO – ang. *nano graphene oxide*, nano tlenek grafenu

NR – ang. *neutral red*, czerwień obojętna

NSCs – ang. *neural stem cells*, macierzyste komórki nerwowe

OXPPOS – ang. *mitochondrial oxidative phosphorylation*, mitochondrialna fosforylacja oksydacyjna

PAI1 – ang. *plasminogen activator inhibitor-1*, inhibitor aktywatora plazminogenu-1

PAI2 – ang. *plasminogen activator inhibitor-2*, inhibitor aktywatora plazminogenu-2

pcna – ang. *proliferating cell nuclear antigen*, antygen jądrowy komórek proliferujących

PCR – ang. *polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy

pH – ang. *potential of hydrogen*, potencjał wodoru

PI – ang. *polydispersity index*, indeks polidispersyjności

PI – ang. *propidium iodide*, jodek propidyny

RFU – ang. *relative fluorescence units*, względne jednostki fluorescencji

rGO – ang. *reduced graphene oxide*, zredukowany tlenek grafenu

RNase A – ang. *ribonuclease A*, rybonukleaza A

rpl13a – ang. *ribosomal protein L13a*, białko rybosomalne L13a

Rs – ang. *resistivity*, oporność

SEM – ang. *scanning electron microscope*, skaningowa mikroskopia elektronowa

Tcf-4 – ang. *transcription factor 4*, czynnik transkrypcji 4

TEM – ang. *transmission electron microscopy*, transmisyjna mikroskopia elektronowa

Term – ang. *thermal*, termiczny

TNF α – ang. *tumor necrosis factor α* , czynnik martwicy nowotworu α

TUD – ang. *thiourea dioxide*, dwutlenek tiomocznika

UHV – ang. *ultra-high vacuum*, bardzo wysoka próżnia

uPar – ang. *urokinase plasminogen activator surface receptor*, receptor powierzchniowy aktywatora plazminogenu urokinazy

VGIC – ang. *voltage-dependent ion channel*, zależny od napięcia kanał jonowy

V_m – ang. *membrane potential*, potencjał błony

WHO – ang. *World Health Organization*, Światowa Organizacja Zdrowia

XPS – ang. *X-ray Photoelectron Spectroscopy*, Rentgenowska Spektroskopia Fotoelektronowa

$\Delta\Psi_m$ – ang. *mitochondrial membrane potential*, potencjał błony mitochondrialnej

4. Wstęp

W 2004 grupa naukowców pod kierunkiem Geima i Novoselova opublikowała pracę naukową, w której opisano nowy materiał jakim była monokrystaliczna warstwa grafitu o grubości kilku atomów (Novoselov i in., 2004). To wydarzenie zapoczątkowało „erę grafenu”, która trwa do dziś. Badania nad tym materiałem skupiły się na stworzeniu nowych metod produkcji, modyfikacji i zastosowaniu go w naukach technicznych, biologicznych i medycznych.

Zredukowany tlenek grafenu (rGO) i tlenek grafenu (GO) są pochodnymi grafenu (GN). Grafen ma strukturę doskonałej sieci krystalicznej, hybrydyzację atomową sp^2 i liczne, ważne z punktu widzenia zastosowań w medycynie, właściwości. Obejmują one wysoką przewodność elektryczną i wytrzymałość mechaniczną. Dla porównania GO jest wysoce hydrofilowy ze względu na obecność grup tlenowych (hydroksylowych, karboksylowych, epoksydowych) i z tego względu może tworzyć stabilną zawiesinę wodną. rGO ma więcej grup tlenowych niż GN, ale mniej niż GO. Dlatego rGO jest mniej hydrofilowy, ale za to charakteryzuje się wyższą przewodnością elektryczną (Novoselov i in., 2005; Gao, 2015). Ponadto, w zależności od metody produkcji, materiały grafenopochodne mogą być modyfikowane w celu uzyskania unikalnego zakresu cech, w tym różnej wielkości płatków, liczby i rodzajów grup funkcyjnych, liczby defektów strukturalnych, a także w konsekwencji hydrofobowości i właściwości elektrycznych (Skoda i in., 2014).

Zostały podjęte próby wykorzystania materiałów węglowych, w tym nanocząstek diamentu, płatków grafenu i jego pochodnych w terapii glejaka IV stopnia. Głojak IV stopnia (GBM) ma pochodzenie astrocytarne i jest złośliwym pierwotnym guzem mózgu. Reprezentuje najczęściej występujący nowotwór ośrodkowego układu nerwowego i według klasyfikacji WHO należy do IV klasy zróżnicowania histologicznego. Najważniejszymi cechami tego typu nowotworu są obecność obszarów martwiczych i charakterystyczne unaczynienie (liczne mikronaczynia i naczynia kłębuszkowe), a także obecność komórek atypowych, pleomorfizm jądrowy i bardzo wysoka aktywność proliferacyjna komórek nowotworowych (Szala i in., 2012). Typ i miejsce wzrostu glejaka IV stopnia czynią go nieuleczalnym. Średnia zapadalność na GBM wynosi 3,19 na 100 000 osób rocznie, a średni całkowity czas przeżycia od postawienia diagnozy wynosi około 15 miesięcy, pomimo optymalnego leczenia, które obejmuje operacyjne usunięcie guza, chemio- i radioterapię (Molenaar, 2011). Brak sukcesu terapeutycznego przypisuje się wielu czynnikom, w tym szybkiemu naciekaniu komórek guza mózgu, heterogenności wewnątrz guza, ograniczonej dyfuzji leków terapeutycznych przez barierę krew-mózg i miąższ/guz mózgu oraz obecności komórek macierzystych (GSC) w guzie, które są odporne na chemio- i radioterapię, oraz są zdolne do tworzenia guza i samoodnowy (Zhang i in., 2017). Wszystkie te cechy przyczyniają się do nawrotu choroby nowotworowej i bardzo złego rokowania dla chorego (Quail, Joyce, 2017).

Grafen i jego pochodne mogą być cytotoksyczne dla komórek glejaka *in vitro* i *in vivo*. GN, GO i rGO indukowały między innymi apoptozę i zmniejszały żywotność i proliferację komórek w liniach komórkowych glejaka U87 i U118. Te same materiały zmniejszały również masę i objętość guzów hodowanych na błonie kosmówkowo-

omoczniowej. Aktywność tych materiałów różniła się siłą, najbardziej aktywny był GN, następnie rGO, a najmniej aktywny okazał się GO (Jaworski i in., 2015; Jaworski i in., 2013). Ponadto Jaworski i inni w swoich badaniach wykazali również, że płatki grafenu były zbyt duże (0,45-1,5 μm), aby dostać się do wnętrza komórek glejaka (Chwalibog i in., 2013; Jaworski i in., 2015). Zaobserwowali również, że GO może regulować ekspresję genów mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) w GBM, prowadząc w ten sposób do zmniejszenia potencjału inwazyjności komórek nowotworowych (Jaworski i in., 2019). Ponadto wykazano, że nanocząstki ND, NG i nGO zmniejszają adhezję i inwazyjność linii komórkowych U87 i U118, na skutek zmian w ekspresji białek ze szlaku EGFR/Akt/mTOR i szlaku β -kateninowego (Wierzbicki i in., 2017).

Ważną modyfikacją pochodnych grafenu w związku z zastosowaniem ich w medycynie wydaje się być zmniejszenie zawartości grup tlenowych w rGO w stosunku do materiału wyjściowego jakim jest GO, co skutkuje wzrostem zdelokalizowanych elektronów na powierzchni płatków grafenu. Może to prowadzić do zakłócenia szlaków sygnałowych w błonie plazmatycznej lub do bezpośredniej interakcji ze strukturami komórkowymi, które są wrażliwe na zmiany potencjału elektrochemicznego. Grafen i jego pochodne charakteryzują się silnymi właściwościami bioelektrycznymi ze względu na obecność zdelokalizowanych elektronów i grup funkcyjnych zawierających tlen na powierzchni płatków, stąd też przypuszcza się, że materiał ten może oddziaływać ze strukturami odbierającymi sygnały elektryczne np. kanałami jonowymi i powodując zmiany potencjału błony komórkowej.

Ładunek powierzchniowy komórki jest kluczowym parametrem biofizycznym, który zależy od składu błony cytoplazmatycznej i stanu fizjologicznego komórek. Oprócz obecności kanałów jonowych i transporterów, ujemne wartości potencjału błony komórkowej (V_m) przy fizjologicznych wartościach pH są spowodowane obecnością grup niejonowych w fosfolipidach (fosfatydylocholina; -62 mV), białkach i ich polisacharydowych koniugatach (Bondar i in., 2012). Bezpośrednie porównania poziomów V_m *in vitro* i *in vivo* komórek zdrowych i nowotworowych wykazały, że komórki nowotworowe były bardziej zdepolaryzowane niż komórki prawidłowe, z których się wywodzą (Marmo i in., 1994). Dlatego badane materiały grafenowe i ich pochodne (rGO i GN) mogą preferować adhezję do komórek nowotworowych o zdepolaryzowanych błonach komórkowych.

Kanały jonowe odgrywają ważną rolę w regulacji pobudliwości elektrycznej w komórkach prawidłowych i nowotworowych (Pollak i in., 2017). Kanały jonowe i transportery są również związane ze wzrostem i złośliwością guzów GBM (Simon i in., 2015). Analizy genomowe wykazały, że geny zaangażowane w transmisję lub transport jonów sodu, potasu czy wapnia należą do najczęściej mutowanych grup w komórkach GBM w 90% badanych próbek (Parsons i in., 2008, Joshi i in., 2011). Możliwe jest, by za pomocą czynników zewnętrznych modulować ilość i aktywność białek tworzących kanały jonowe (Varricchio i in., 2021). Materiały węglowe posiadające zdelokalizowane wolne elektrony mogą również posiadać taką właściwość.

Wspólną cechą glejaków jest ich bardzo duża inwazyjność (Verhaak i in., 2010). Istotne jest rozróżnienie procesów migracji i inwazyjności. Migracja jest w większości ograniczona do pewnych etapów cyklu komórkowego. Jest to typowa reakcja fizjologiczna charakterystyczna dla wielu typów komórek, np. wykonywana przez nerwowe komórki macierzyste (NSC), które poruszają się wzdłuż granicy tkanki mózgowej. Inwazja z kolei jest reakcją niepożądaną, nieadekwatną anatomicznie i нефizjologiczną (Hatoum i in., 2019). Na inwazję komórek nowotworowych wpływa kilka złożonych procesów komórkowych i molekularnych, które są związane z uszkodzeniem składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), separacją komórek i diapedezą przez błonę podstawną i zrąb. Degradacja ECM jest spowodowana nadekspresją kluczowych proteaz związanych ze zwiększoną inwazją (np. uPa, uPar, katepsyna B, MMP i ADAM), których aktywność w prawidłowych tkankach jest kontrolowana przez endogenne inhibitory (np. PAI1, PAI2, cystatyna C, stefina A, stefina B), które mogą nie działać prawidłowo w komórkach nowotworowych (Rao, 2003; Levicar i in., 2003). Ponadto fibronektyna, wiodący składnik macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), zwiększa aktywność inwazyjną glejaków (Ohnishi i in., 1997). Z drugiej strony udowodniono również, że pozytywna regulacja fibronektyny może skutkować obniżoną mobilnością i agresywnością komórek nowotworowych (Shannon i in., 2015). Sosnowska i inni w swoich badaniach wykazali, że alotropowe formy węgla takie jak nfGO w połączeniu z CELE (ekstraktem z wątroby zarodka kurzego) w komórkach raka wątrobowokomórkowego wpływają na ekspresję genów związanych z adhezją takich jak FAK, E-kadheryna, N-kadheryna i β -katenina (Sosnowska i in., 2021).

Wyzwań w zakresie normalizacji komórek glejaka IV stopnia jest wiele. Dzięki unikalnej strukturze i właściwościom fizykochemicznym, płatków grafenu i ich pochodnych mogą mieć zastosowanie jako składniki biologicznie czynne, w tym działając selektywnie cytotoksycznie, hamując mechanizmy migracji i inwazji czy indukując w komórkach nowotworowych proces apoptozy.

5. Hipoteza badawcza, cel i zakres pracy

Hipoteza badawcza:

Płatki zredukowanego tlenku grafenu i płatki grafenu, ze względu na dużą powierzchnię właściwą, nanometryczną grubość i obecność grup tlenowych na skutek kontaktu z błoną komórkową modulują procesy komórkowe takie jak apoptoza, proliferacja, adhezja czy mobilność. Z uwagi na odmienną ekspresję receptorów zewnątrzkomórkowych oraz potencjał błony w komórkach prawidłowych i w komórkach nowotworowych efekt wywoływany przez płatki tlenku grafenu i płatki grafenu nie jest tożsamy.

Podstawowy cel naukowy:

Celem pracy było zbadanie i porównanie wpływu wybranych form alotropowych węgla na toksyczność wobec komórek nowotworowych glejaka IV stopnia oraz związany z tym szlak aktywacji apoptozy, działanie szlaków komórkowych w błonie komórkowej i modulację mechanizmów adhezji.

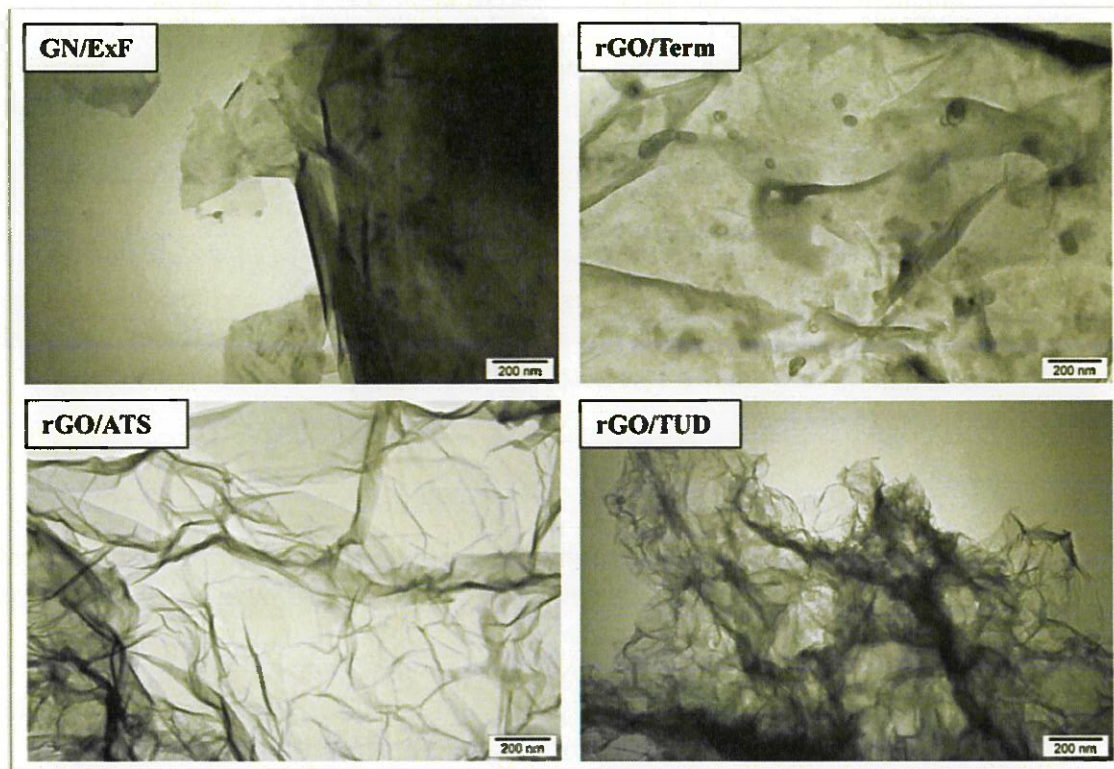
Zakres pracy:

- Charakterystyka i porównanie właściwości fizykochemicznych materiałów: morfologia, wielkość, analiza elementarna, rezystancja, widma (Ramana, FTIR, XPS), potencjał zeta.
- Określenie wpływu wybranych form alotropowych węgla (płatki zredukowanego tlenek grafenu i płatki grafenu) na przeżywalność (cytotoksyczność) i morfologię w komórkach prawidłowych (Hs5) i nowotworowych (U87).
- Określenie wpływu wybranych form alotropowych węgla (płatki zredukowanego tlenek grafenu i płatki grafenu) na apoptozę, proliferację i cykl komórkowy w komórkach nowotworowych (U87) na poziomie morfologicznym, funkcjonalnym i molekularnym.
- Określenie wpływu płatków grafenu i zredukowanych tlenków grafenu o różnym stopniu redukcji w zakresie oceny funkcjonalnej i molekularnej komórek, ze szczególnym uwzględnieniem modulacji szlaków sygnałowych w błonie komórkowej lub bezpośredniej interakcji ze strukturami komórkowymi wrażliwymi na zmiany potencjału elektrochemicznego (kanały jonowe) i receptorami zewnątrzkomórkowym w komórkach prawidłowych (Hs5) i nowotworowych (U87).
- Określenie wpływu płatków zredukowanych tlenków grafenu w porównaniu do grafenu w zakresie wpływu modulującego i transdukcyjnego na mechanizm adhezji w komórkach prawidłowych (Hs5) i nowotworowych (U87).

6. Metodyka badań

6.1 Materiały grafenowe

Badania przeprowadzono na wybranych, alotropowych formach węgla. W doświadczeniach wykorzystano następujące materiały: płatki zredukowanego tlenku grafenu (rGO): rGO/ATS, rGO/Term, rGO/TUD, oraz płatki grafenu (GN): GN/ExF. Morfologię badanych płatków przedstawiono na Ryc. 1.



Ryc.1 Wizualizacja płatków grafenu (GN/ExF) i zredukowanych tlenków grafenu (rGO/Term, rGO/ATS, rGO/TUD) z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Skala: 200 nm. (Szczepaniak J. i in., 2018).

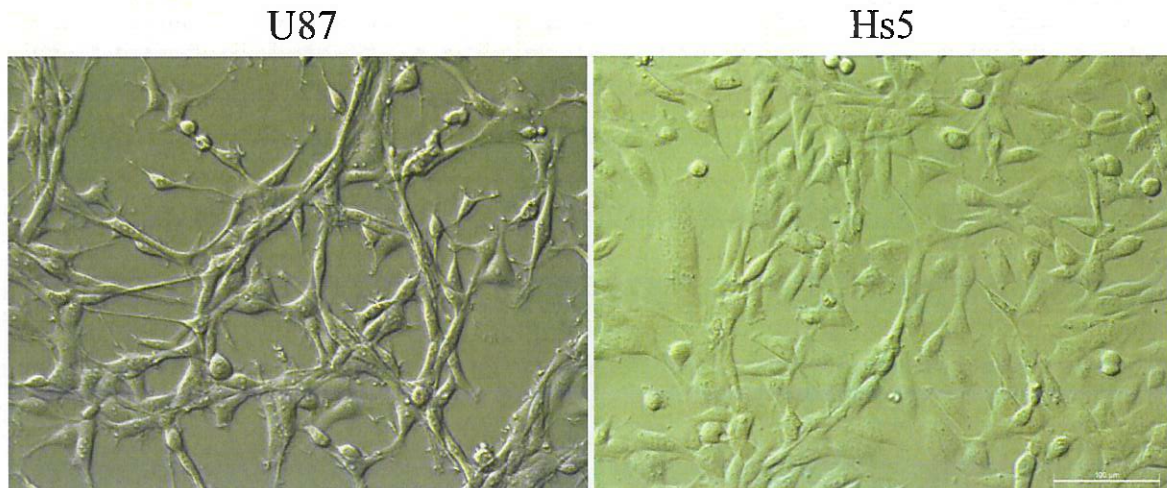
Grafen i zredukowane tlenki grafenu wyprodukowano i pozyskano z Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych (ITME) w Warszawie. Płatki grafenu (GN/ExF) zostały wyprodukowane za pomocą metody bezpośredniego złuszczenia grafitu z wykorzystaniem Capstone - fluorowanego środka powierzchniowo czynnego. Wszystkie płatki rGO wytworzono poprzez redukcję tlenku grafenu (GO) uprzednio otrzymanego zmodyfikowaną metodą Marciano. rGO/ATS został wytworzony w reakcji redukcji za pomocą tiosiarczanu amonu przez 20 h w temperaturze 95°C. rGO/Term wyprodukowano poprzez redukcję GO w piecu w temperaturze 1000°C przez 1h w atmosferze azotu. rGO/TUD uzyskano w reakcji redukcji w obecności dwutlenku tiomocznika w temperaturze 85°C przez 1,5 h. Materiały rGO/ATS i rGO/TUD oczyszczono przez filtrację ciśnieniową na membranie oraz dializę. Z proszków GN (GN/ExF) oraz trzech rodzajów proszków rGO (rGO/Term, rGO/ATS i rGO/TUD) przygotowano zawiesiny wyjściowe w sterylnej, ultra-czystej wodzie (oporność 18,3 MΩ·cm mierzona w temperaturze 25°C) o stężeniu 1 mg/ml. Przygotowane roztwory poddano sonifikacji w płuczce ultradźwiękowej o mocy 500 W/m² przez 30 minut.

Do dalszych eksperymentów przygotowano następujące rozcieńczenia badanych materiałów węglowych: 50, 100, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g/ml}$). Bezpośrednio przed dodaniem do hodowli komórkowej przygotowane zawiesiny sonifikowano przez 15 minut w celu rozbicia wytrącających się agregatów.

Zbadano szereg właściwości fizykochemicznych materiałów, m. in. wielkość oraz kształt materiałów określono poprzez wizualizację z zastosowaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego – TEM (JEOL, Tokio, Japonia). Analizę elementarną płatków GN i rGO przeprowadzono z wykorzystaniem analizatora tlenu O836 (LECO, Polska) w celu oceny zawartości tlenu w próbkach. Ponadto, określono także rezystancję [Ω/\square] za pomocą Hallotronu ECOPIA HMS 5500 z zewnętrznym polem magnetycznym 0,55 T, w celu sprawdzenia przewodności materiałów. Zebrano także widma Ramana za pomocą mikroskopu konfokalnego Reinshaw Invia z laserem Nd-YAG 532 nm w celu określenia przynależności materiałów do grupy GN i rGO. Ponadto, przeprowadzono charakterystykę chemiczną próbek GN i rGO z wykorzystaniem spektrofotometru IR (FTIR) z transformacją Fouriera (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). W celu określenia stabilności zawiesin dokonano pomiarów potencjału zeta za pomocą analizatora cząstek Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Wielka Brytania). Morfologię grafenu i zredukowanych tlenków grafenu zbadano także za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej – SEM (Hitachi S-3000N, Japonia). Analizę grup funkcyjnych związanych z powierzchnią badanych płatków przeprowadzono z wykorzystaniem metody rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronowej – XPS przy użyciu hemisferycznego analizatora elektronów Scienta R4000. Odpowiednie stężenia robocze przed każdym doświadczeniem poddawano 15 minutowej sonifikacji.

6.2 Modele biologiczne *in vitro*

W Doświadczeniach II-V wykorzystano dwie linie komórkowe: komórki glejaka IV stopnia U87-MG (HTB-14) oraz komórki zrębu szpiku o morfologii fibroblastów Hs5 (CRL-11882) pozyskane z Amerykańskiego Banku Komórek i Tkanek (ATCC, Stany Zjednoczone). Morfologię komórek przedstawiono na Ryc.2.

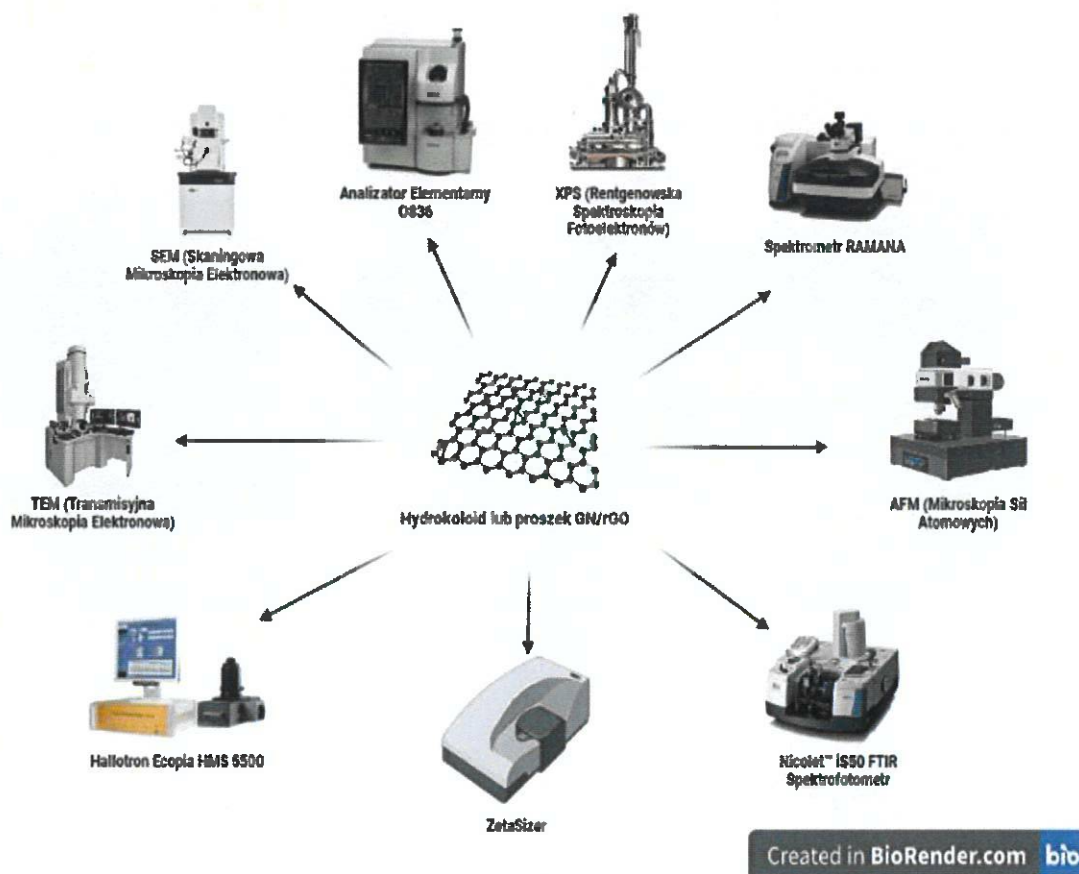


Ryc.2 Morfologia komórek U87 i Hs5 obserwowana w odwróconym mikroskopie świetlnym. Skala: 100 μm

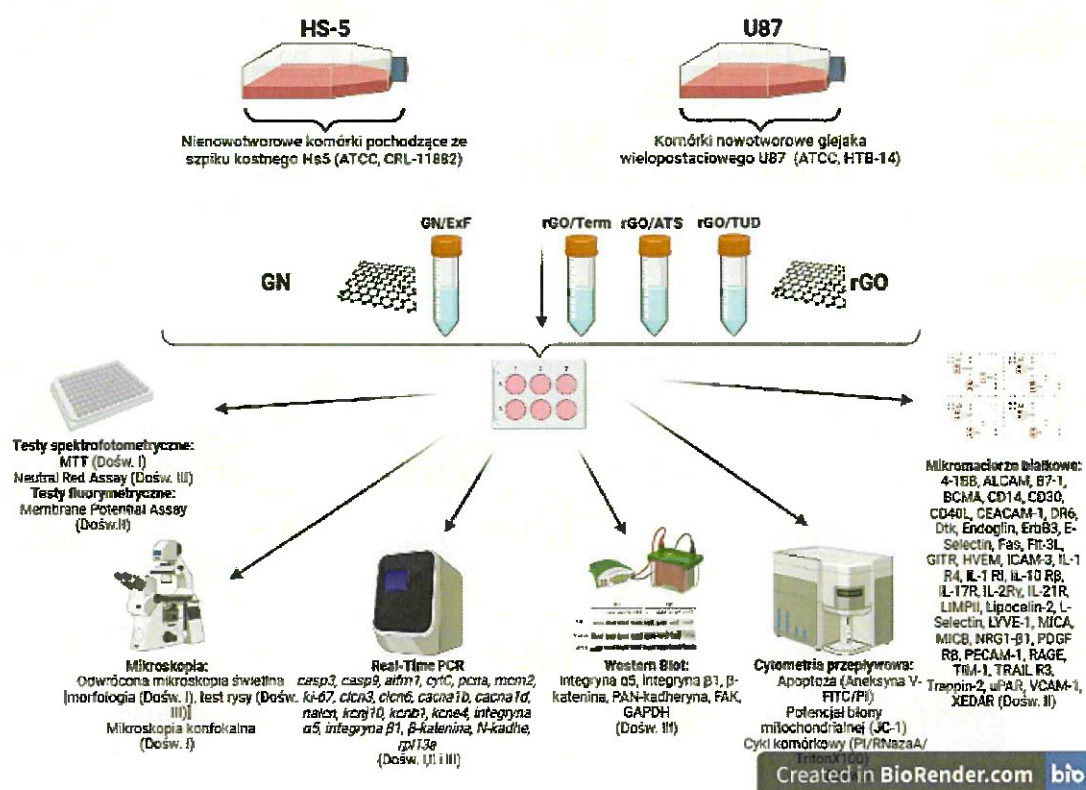
Linia U87 jest linią komórek nieśmiertelnych i wywodzi się z ludzkiego nowotworu glejaka IV stopnia (łac. *glioblastoma multiforme*). Linia komórek zrębu szpiku kostnego o morfologii fibroblastów Hs5 została unieśmiertelniona wektorem retrowirusowym LXS_N16E6E7. Komórki U87 i Hs5 hodowano w pożywce Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) z wysoką zawartością glukozy (4,5 mg/l). Podłoże wzbogacono dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) oraz mieszankę antybiotyków (penicylina 100 U/ml oraz streptomycyna 100 mg/ml). Wszystkie wymienione odczynniki pochodziły z GibcoTM (Thermo Scientific, Stany Zjednoczone). Do kultur komórek wykorzystano plastikowe jednorazowe naczynia hodowlane – butelki o powierzchni 25 cm² i 75 cm² oraz płytki 6- i 96- dołkowe. Hodowlę prowadzono w warunkach standardowych (37°C, 5% CO₂ oraz wilgotność 95%) w inkubatorze do hodowli *in vitro* (Mettler GmbH & Co., Niemcy).

6.3 Układ doświadczeń

W toku realizacji pracy doktorskiej przeprowadzono pięć doświadczeń, w ramach których użyto materiałów węglowych (rGO i GN) będących różnymi formami alotropowymi węgla. Dokonano ich charakterystyki fizykochemicznej, a następnie określono ich wpływ na funkcjonowanie komórek nowotworowych glejaka IV stopnia U87 i komórek prawidłowych ze zrębu szpiku kostnego Hs5 o morfologii fibroblastów. Schemat uwzględniający przebieg Doświadczenia I znajduję się na Ryc. 3 a doświadczeń II-V na Ryc. 4.



Ryc. 3 Szczegółowy schemat przeprowadzonych analiz z uwzględnieniem metod badawczych dotyczących charakterystyki materiałów grafenowych i ich pochodnych. Rycina powstała w ©BioRender (biorender.com).



Ryc. 4 Szczegółowy schemat przeprowadzonych doświadczeń z uwzględnieniem metod badawczych. Rycina powstała w ©BioRender (biorender.com).

6.3.1 Doświadczenie I - Publikacja 1 (Szczepaniak J. i in., 2018), Publikacja 2 (Szczepaniak J. i in., 2021), Publikacja 3 (Szczepaniak J. i in., 2022)

Celem doświadczenia była szczegółowa analiza fizykochemiczna badanych materiałów czyli płatek zredukowanego tlenku grafenu (rGO) oraz płatek grafenu (GN).

Zbadano następujące właściwości fizykochemiczne materiałów:

- wielkość, kształt i morfologię materiałów określono poprzez wizualizację z zastosowaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego – TEM (JEOL, Japonia) oraz skaningowej mikroskopii elektronowej – SEM (Hitachi S-3000N, Japonia),
- stabilność zawiesin (potencjał zeta) określono za pomocą analizatora cząstek Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, WB),
- zawartość tlenu w próbkach przeprowadzono z wykorzystaniem analizatora tlenu O836 (LECO, Polska),
- przewodność materiałów określono za pomocą Hallotronu ECOPIA HMS 5500 z zewnętrznym polem magnetycznym 0,55 T,
- widma ramanowskie struktury materiałów określono za pomocą mikroskopu konfokalnego Reinshaw Invia z laserem Nd-YAG 532 nm,

- widma oscylacyjne określono z wykorzystaniem spektrofotometru IR (FTIR) z transformacją Fouriera (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone),
- obecność grup funkcyjnych związanych z powierzchnią badanych płatków węglowych przeprowadzono z wykorzystaniem metody rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronowej – XPS przy użyciu hemisferycznego analizatora elektronów Scienta R4000.

6.3.2 Doświadczenie II - Publikacja 1 (Szczepaniak J. i in., 2018), Publikacja 3 (Szczepaniak J. i in., 2022)

Celem doświadczenia było określenie wpływu płatków zredukowanego tlenku grafenu (rGO) i płatków grafenu (GN) na żywotność komórek glejaka IV stopnia U87 i komórek prawidłowych Hs5.

W Doświadczeniu II komórki U87 i Hs5 potraktowano płatkami rGO/ATS, rGO/Term, rGO/TUD oraz GN/ExF w stężeniach 5, 10, 25, 50 i 100 µg/ml. Właściwe testy wykonywano po 24 h od wprowadzenia do kultury komórek badanych materiałów.

W celu oceny żywotności (cytotoksyczności) badanych materiałów grafenowych przeprowadzono test metaboliczny MTT (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) opierający się na redukcji soli tetrazolowej oraz test Neutral Red (Sigma, Niemcy), w którym czerwień obojętna pobierana jest do żywych komórek. Morfologia komórek została oceniona przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Olympus FV1000, Japonia) i barwników fluorescencyjnych takich jak jodek 4-(4 (didecyloamino)styrylo)-N-metylopirydyniowy (4-Di-10-ASP; Life Technologies, Stany Zjednoczone) oraz diamidyno-2-fenylindolem (DAPI; Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone) oraz przyżyciowo z użyciem odwróconego mikroskopu świetlnego (Leica DMI8, Wielka Brytania).

6.3.3 Doświadczenie III - Publikacja 1 (Szczepaniak J. i in., 2018)

Celem doświadczenia było określenie wpływu płatków zredukowanego tlenku grafenu i płatków grafenu na parametry morfologiczno-funkcjonalnej komórek, ze szczególnym uwzględnieniem rodzaju śmierci komórkowej, poziomu potencjału błony mitochondrialnej oraz przebiegu faz cyklu komórkowego.

W Doświadczeniu III komórki U87 potraktowano płatkami rGO/ATS, rGO/Term, rGO/TUD oraz GN/ExF w stężeniach 5, 10, 25, 50 i 100 µg/ml. Właściwe testy wykonywano po 24h od wprowadzenia do kultur komórek badanych materiałów.

Do zbadania rodzaju śmierci komórek (szczególnie indukcji apoptozy) przeprowadzono test z wykorzystaniem jodku propidyny (PI) oraz aneksyny V skoniugowanej z fluorochromem (Alexa Fluor® Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit, Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Przeprowadzono również analizę potencjału błony mitochondrialnej z wykorzystaniem barwnika JC-1 (Thermo Scientific, Stany Zjednoczone). Ponadto, przeprowadzono analizę cyklu komórkowego z wykorzystaniem RNazy A i jodku propidyny (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Analizy rodzaju śmierci komórkowej, poziomu potencjału błony

mitochondrialnej i cyklu komórkowego przeprowadzono z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na poziomie molekularnym przeprowadzono analizę ekspresji mRNA genów związanych z procesem apoptozy, funkcjonowaniem mitochondriów i proliferacji (*casp3*, *casp9*, *cytc*, *aifm*, *pcna*, *ki-67* i *mcm2*) z wykorzystaniem metody real time PCR ($\Delta\Delta C_t$) i odczynników Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone).

6.3.4 Doświadczenie IV- Publikacja 2 (Szczepaniak J. i in., 2021)

Celem doświadczenia było określenie zmian zachodzących w błonie komórkowej pod wpływem działania płatków zredukowanego tlenku grafenu o różnej zawartości grup tlenowych w porównaniu do płatków grafenu w komórkach glejaka IV stopnia U87 i komórkach prawidłowych Hs5 *in vitro*.

W Doświadczeniu IV komórki U87 i Hs5 potraktowano płatkami rGO/ATS, rGO/Term, rGO/TUD oraz GN/ExF w stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$. Właściwe testy wykonywano po 24 h od wprowadzenia do kultur komórek badanych materiałów.

W celu oceny interakcji płatków GN i rGOs z błoną komórkową glejaka IV stopnia i komórek prawidłowych w pierwszej kolejności przeprowadzono analizę potencjału błony komórkowej z wykorzystaniem testu Cellular Membrane Potential Assay Kit (Abcam, Wielka Brytania) i czytnika mikropłytek (Infinite M200, Tecan, Stany Zjednoczone), poprzez pomiar fluorescencji przy Ex/Em= 530/570 nm. Następnie przeprowadzono analizę na poziomie mRNA genów kodujących białka kanałów biorących udział w transporcie jonów chloru (*clcn3*, *clcn6*), wapnia (*cacna1b*, *cacna1d*), sodu (*nalcn*) i potasu (*kcnb1*, *kcnj10*, *kcne4*) z wykorzystaniem metody real time PCR ($\Delta\Delta C_t$) i odczynników Power SYBRTM Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Przeprowadzono również analizę ekspresji receptorów błony komórkowej z wykorzystaniem Human Receptor Antibody Array (Abcam, Wielka Brytania). Membrany analizowano za pomocą Azure Biosystem C400 (Azure, Stany Zjednoczone) i programu ImageJ (National Institutes of Health, Stany Zjednoczone).

6.3.5 Doświadczenie V - Publikacja 3 (Szczepaniak J. i in. 2022)

Celem pracy było określenie wpływu płatków zredukowanego tlenku grafenu w porównaniu z płatkami grafenu na procesy adhezji i migracji w komórkach glejaka IV stopnia U87 i komórkach prawidłowych Hs5.

W Doświadczeniu V komórki U87 i Hs5 potraktowano płatkami rGO/ATS i rGO/TUD oraz GN/ExF. w stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$. Właściwe testy wykonywano po 24h od wprowadzenia do kultur komórek badanych materiałów.

W celu oceny migracji i proliferacji komórek przeprowadzono test rysy, gdzie dodatkowo zastosowano utrwalanie i wybarwiono komórki metodą May Grünwald-Giemsa. Mobilność komórek analizowano w mikroskopie konfokalnym (Olympus FV 1000 z oprogramowaniem FV3000 (Olympus, Japonia) z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych: komórki Hs5 wyznakowano Cell Tracking Dye (Abcam, Wielka Brytania) na kolor zielony a komórki U87 przy użyciu Cell Tracking Dye (Abcam, Wielka Brytania) kolorem pomarańczowym.

Wybarwione komórki hodowano w ko-kulturze i traktowano badanymi materiałami węglowymi. Otrzymane filmy analizowano za pomocą programu ImageJ z nakładką TrackMate. Przeprowadzono również analizę ekspresji mRNA genów biorących udział w adhezji i migracji (*integryna $\alpha 5$ i $\beta 1$, β -katenina, N-kadheryna, PAN-kadheryna, FAK*) z wykorzystaniem metody real-time PCR ($\Delta\Delta$ CT) oraz odczynnika Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Dodatkowo w celu potwierdzenia zmian zachodzących na poziomie mRNA przeprowadzono analizę ekspresji białek biorących udział w adhezji i migracji z wykorzystaniem przeciwciał (*integryny $\alpha 5$ i $\beta 1$, β -kateniny, N-kadheryny, FAK*) stosując metodę Western Blot (BioRad, Niemcy) oraz detektora chemiluminescencji.

6.4 Metody analityczne

- Analiza morfologii i wielkości materiałów węglowych wykonana za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej - TEM (JEOL, Japonia) oraz skaningowej mikroskopii elektronowej – SEM (Hitachi S-3000N firmy Minato-ku, Japonia).
- Analiza potencjału zeta materiałów węglowych metodą mikroelektroforetyczną z wykorzystaniem efektu Dopplera w analizatorze cząstek Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Wielka Brytania).
- Analiza rozkładu wielkości i polidispersyjności materiałów węglowych przeprowadzona metodą pomiarów dynamicznego rozproszenia światła w analizatorze cząstek Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Wielka Brytania).
- Analiza rezystancji [Ω/\square] materiałów węglowych przeprowadzona z użyciem Hallotronu (ECOPIA HMS 5500) z zewnętrznym polem magnetycznym 0,55 T.
- Analiza elementarna materiałów węglowych przeprowadzono za pomocą analizatora tlenu O836 (LECO, Polska).
- Analiza widm Ramana materiałów węglowych przeprowadzono z użyciem mikroskopu konfokalnego Reinshaw Invia z laserem Nd-YAG 532 nm, pod obiektywem 100x z wielkością plamki 300 nm i laserem 1 mW.
- Analiza rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS) materiałów węglowych przeprowadzona z wykorzystaniem wielokomorowego systemu ultra-wysokiej próżni (UHV) PREVAC (PREVAC, Polska). Widma uzyskano stosując hemisferyczny analizator elektronów Scienta R4000 (Scienta, Szwecja). Zastosowano sprzęt uzupełniający, taki jak źródło promieniowania rentgenowskiego Scienta SAX-100 (Al $K\alpha$, 1486,6 eV, pasmo 0,8 eV) wyposażone w monochromator rentgenowski XM 650 (Scienta, Szwecja).
- Analiza grup funkcyjnych powierzchni materiałów węglowych przeprowadzona w podczerwieni w zakresie spektralnym 400-4000 cm^{-1} wykonano przy użyciu spektrometru IR (FTIR) z transformacją Fouriera iS50 (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone).
- Analiza morfologii komórek przyżyciowo z użyciem mikroskopu odwróconego Leica DMi8 (Cairn, Wielka Brytania) i mikroskopu konfokalnego Olympus FV1000 (Olympus, Japonia).
- Analiza żywotności (aktywności metabolicznej), integralności błony komórkowej oraz potencjału błony komórkowej w modelu *in vitro* – testy

kolorymetryczne i fluorymetryczne z użyciem czytnika do mikroplitek Infinite M200 (Tecan, Stany Zjednoczone).

- Analiza rodzaju śmierci komórkowej, cyklu komórkowego i potencjału błony mitochondrialnej - testy fluorymetryczne z wykorzystaniem cytometru przepływowego FACS Calibur™ (Becton Dickinson, Stany Zjednoczone).
- Analiza ekspresji mRNA wykonana z użyciem systemu LightCycler (F-Hoffmann-La Roche Ltd, Szwajcaria).
- Synteza cDNA z wykorzystaniem termocyklera 2720 (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone).
- Określenie stężenia RNA i cDNA przy użyciu NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone).
- Izolacja białka całkowitego przy użyciu młyna kulkowego TissueLyser LT (Qiagen, Stany Zjednoczone).
- Analiza receptorów błony komórkowej z wykorzystaniem macierzy białkowych (Abcam, Wielka Brytania). Oznaczenie ilości białek integryny $\alpha 5$, integryny $\beta 1$, N-kadheryny, β -kateniny i FAK metodą immunoblotingu z użyciem systemu Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad, Niemcy). Wizualizacja za pomocą Azure Biosystem C400 (Azure, Stany Zjednoczone).
- Analiza migracji komórek nowotworowych oceniono z wykorzystaniem insertów Culture-Inserts 2 Well for Self-Insertion (Animalab, Niemcy).
- Analizę ruchliwości komórek w ko-kulturze przeprowadzono z wykorzystaniem barwienia fluorescencyjnego: Cell Tracking Dye Kit (zielony) dla linii Hs5 (Abcam, Wielka Brytania) i Cell Tracking Dye Kit (pomarańczowy) dla linii U87 (Abcam, Wielka Brytania)). Ko-kultury wizualizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej z użyciem oprogramowania FV10-ASW 4.2 (Olympus, Japonia).

6.5 Analiza statystyczna

Dane analizowano za pomocą jednoczynnikowej i/lub dwuczynnikowej analizy wariancji przy użyciu GraphPad Prism ver. 8.4.3 i nowszej (GraphPad Software Inc., Stany Zjednoczone). Różnice między grupami zostały pokazane za pomocą testów Bonferroniego i/lub testów wielokrotnych porównań Dunnetta. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne oraz odchylenie standardowe. Różnice uznano za istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

7. Omówienie głównych wyników prac eksperymentalnych

7.1. Doświadczenie I - Charakterystyka i porównanie właściwości fizykochemicznych materiałów węglowych - Publikacja 1 (Szczepaniak J. i in., 2018), Publikacja 2 (Szczepaniak J. i in., 2021), Publikacja 3 (Szczepaniak J. i in., 2022)

We wszystkich opisanych doświadczeniach wykorzystano zredukowane tlenki grafenu, które powstały z tlenku grafenu (GO) wyprodukowanego zmodyfikowaną metodą Marciano. Użycie tego samego materiału podstawowego nie prowadziło do powstania identycznych produktów. Dodatkowo, z uwagi na założenie, że rodzaj i ilość grup tlenowych, może wpływać na sposób oddziaływania materiałów węglowych na funkcjonowanie komórek przeprowadzono szereg analiz fizykochemicznych ukazujących podobieństwa i różnice pomiędzy badanymi materiałami, między innymi: spektroskopię Ramana, analizę morfologii materiałów za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) oraz skaningowej (SEM), analizę elementarną potencjału zeta, spektroskopii w podczerwieni (FTIR) oraz spektroskopii rentgenowskiej (XPS) oraz analizę rezystancji.

Badaniem, które miało potwierdzić czy materiały węglowe są pochodnymi grafenu była spektroskopia Ramana, która opiera się na analizie trzech głównych pików w widmach grafenu (GN) i zredukowanych tlenków grafenu (rGO), w szczególności pozycji pików, jego szerokości i względnego stosunku intensywności pików ID/IG. Główne prążki w materiałach grafenowych są oznaczone jako D, G i 2D i powinny znajdować się przy szerokościach 1350 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} oraz 2680 cm^{-1} (Lan i in., 2018). Wyniki analizy (Ryc.1B, Szczepaniak J. i in., 2018), potwierdziły że GN/ExF przynależy do grafenu a rGO/Term, rGO/ATS i rGO/TUD do zredukowanych tlenków grafenu. Pasma G i 2D w GN/ExF obserwowano odpowiednio przy szerokościach 1580 cm^{-1} i 2700 cm^{-1} a pasma D i G przypadku rGO/Term, rGO/ATS oraz rGO/TUD odpowiednio 1350 cm^{-1} oraz 1580 cm^{-1} .

Analizę TEM wykorzystano do oceny morfologii płatków GN i rGO (Ryc.1A, Szczepaniak J. i in., 2018). Kształt badanych płatków węglowych był nieregularny, dodatkowo widoczne było pofałdowanie w szczególności w próbach rGO/ATS i rGO/TUD. Oh i Zhang (2011) potwierdzili, że GN i rGO najczęściej występują w postaci mniej lub bardziej pofałdowanych, jedno lub wielowarstwowych płatków; ciemniejsze obszary wskazują gęstą nanostrukturę kilku warstw grafenu lub zredukowanych tlenków grafenu, natomiast jaśniejsze na znacznie cieńszą, która w przypadku rGO zależy również od stopnia redukcji (Oh i Zhang, 2011).

Analiza elementarna zawartości tlenu (Tab.1, Szczepaniak J. i in., 2018) wykazała, że poziom tlenu w rGO/ATS wynosi 3%, w rGO/TUD ok 16%, a w rGO/Term 1 %.

Informację na temat rodzaju grup funkcyjnych zawierających tlen uzyskano z analizy FTIR (Ryc.A1, Szczepaniak J. i in., 2018; Ryc.1, Szczepaniak J. i in., 2021). Wykazano obecność grup hydroksylowych (-OH) na powierzchni wszystkich płatków pochodzących z natywnego roztworu wodnego, w którym sporządzono zawiesiny płatków. Zaobserwowano również obecność grup karbonylowych (C=O) i karboksylowych (COO-). Największą zawartość tych grup wykryto w przypadku materiału rGO/TUD. Widma FTIR płatków rGO/ATS i rGO/TUD mają dość podobną formę, co sugeruje istnienie zbliżonych grup funkcyjnych.

Natomiast brak wyraźnie widocznych pików w widmach GN/ExF i rGO/Term sugeruje, że w strukturze tych próbek nie ma wielu grup funkcyjnych zawierających tlen. W badaniu przeprowadzonym przez Loryuenyong i innych (2013) potwierdzono obecność grup hydroksylowych, karbonylowych i epoksydowych w materiałach GO i rGO. Emiru i Ayele (2017) uzyskali zbliżony układ pasm widma FTIR zredukowanego tlenku grafenu jak w niniejszej pracy, zaobserwowano takie grupy funkcyjne jak -OH, -COH, -COOH, -CO. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że redukcja tlenku grafenu przy zastosowaniu metod chemicznych prowadzi do obniżenia zawartości tlenowych grup funkcyjnych. Aczkolwiek, najskuteczniejszą metodą redukcji jest jednak proces termiczny, uzyskany rGO/Term charakteryzował się najmniejszą zawartością tlenu na poziomie 1 %.

Analiza XPS (Ryc.1A, Szczepaniak J. i in., 2022) posłużyła do precyzyjnego (jakościowego i ilościowego) określenia wszystkich połączeń pomiędzy atomami pierwiastków w badanym materiale. Widmo przy 284,5 eV, odpowiada aromatycznemu węglowi sp². Wadliwe struktury grafenu można było zaobserwować przy 284,1 eV, a ugrupowania alifatyczne C-C sp³ i C-H sp³ są widoczne odpowiednio przy 285 i 285,5 eV (Koinuma i in., 2013; Radaelli i in., 2016; Barinov i in., 2009). Widmo GN/ExF charakteryzowało się dobrze rozwiniętym wąskim pikiem świadczącym o obecności węgla sp², zaobserwowano również piki świadczące o obecności grup epoksydowych (największa ilość), hydroksylowych, karbonylowych i karboksylowych. Wyniki są zgodne z danymi innych autorów (Koinuma i in., 2013; Radaelli i in., 2016; Bordes i in., 2020) i świadczą o tym, że nawet w płatkach grafenu mogą znajdować się śladowe ilości grup tlenowych oraz o tym, że analiza elementarna oraz FTIR nie są wystarczająco czułymi metodami analitycznymi do określania grup funkcyjnych w materiałach węglowych. Redukcja GO za pomocą tiosiarczanu amonu (rGO/ATS) i dwutlenku tiomocznika (rGO/TUD) prowadzi do powstania zdegenerowanych form grafenu. Główne piki węgla sp² w badanych rGO są dobrze widoczne, ale w porównaniu do GN są wyraźnie niższe. Z kolei piki odpowiadające innym niż sp² połączeniom, w rGO są wyższe niż w przypadku GN/ExF. Na powierzchni zredukowane tlenki grafenu zawierały znaczne ilości innych form tlenu w porównaniu do płatków grafenu. Ilość tlenu karbonylowego była ponad dziesięciokrotnie wyższa, ilość tlenu hydroksylowego była prawie dwukrotnie wyższa a ilość tlenu chinonowego była ponad siedmiokrotnie wyższa w rGO/ATS i rGO/TUD w porównaniu do GN/ExF.

Badane materiały różniły się również pod względem rezystancji (Tab.1, Szczepaniak J. i in., 2018). Wyniki pomiarów pokazały, że najmniejszą rezystancją charakteryzowały się płatki GN/ExF na poziomie 0 Ohm/kwadrat, dla pozostałych materiałów wynosił on odpowiednio 21 Ohm/kwadrat (rGO/ATS) i 142 Ohm/kwadrat (rGO/TUD). W przypadku płatków rGO/Term nie uzyskano wyniku ze względu na trudność w kompresji próbki. Uzyskane wyniki potwierdzają fakt, że płatki o niższej zawartości tlenu mają mniejszą rezystancję, dzięki czemu mają lepsze właściwości przewodzące prąd. Pan i inni podczas analizy rezystancji badanych materiałów grafenowych dowiedli, że im wyższy stopień sfaldowania grafenu, tym trudniejszy jest transfer elektronów na powierzchni (Pan i in., 2017). Zaobserwowano taką samą zależność między stopniem faldowania a oporem. Im bardziej pofaldowana była powierzchnia materiału węglowego (rGO/Term < rGO/ATS < rGO/TUD), tym mniejszy opór wykazywały badane płatki węglowe.

Wszystkie zbadane właściwości fizykochemiczne wykorzystanych materiałów, czyli płatków zredukowanego tlenku grafenu (rGO/Term, rGO/ATS i rGO/TUD) oraz płatków grafenu (GN/ExF) zostały zebrane i porównane w Tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie właściwości fizykochemiczne płatków zredukowanych tlenków grafenu (rGO) oraz grafenu (GN).

	rGO/Term		rGO/ATS		rGO/TUD		GN/ExF	
Metoda wytwarzania	fizyczna (termiczna)		chemiczna (tiosiarczan amonu)		chemiczna (dwutlenek mocznika)		eksfoliacja	
Wielkość płatków (średnica hydrodynamiczna DLS)	1,1-2,3 nm		1,9-4,6 nm		3,4-4,7 nm		2,1-3,3 nm	
Morfologia	niewielkie pofałdowanie płatków		średnie pofałdowanie płatków		silne pofałdowanie płatków		znikome pofałdowanie płatków	
Potencjał Zeta (25 µg/ml)	-17,76 mV		- 13,86 mV		-19,06 mV		-17,73 mV	
Polidispersyjność	tak		tak		tak		tak	
Zawartość tlenu (%)	1		3		16		b.d.	
Widmo Ramana	D=1350 cm ⁻¹ G=1590 cm ⁻¹ I _D /I _G =1,18		D=1345 cm ⁻¹ G=1588 cm ⁻¹ I _D /I _G =1,30		D=1352 cm ⁻¹ G=1582 cm ⁻¹ I _D /I _G =1,43		G=1580 cm ⁻¹ 2D=2722 cm ⁻¹	
FTIR	O-H	+	O-H	+	O-H	+	O-H	+
	C=O	+	C=O	+	C=O	+	C=O	-
	COO-	-	COO-	+	COO-	+	COO-	+
	C-O-C	-	C-O-C	+	C-O-C	+	C-O-C	+
	S-O	-	S-O	+	S-O	+	S-O	-
XPS	C _{1s}	b.d.	C _{1s}	+	C _{1s}	+	C _{1s}	+
	F _{1s}	b.d.	F _{1s}	+	F _{1s}	-	F _{1s}	+
	O _{1s}	b.d.	O _{1s}	+	O _{1s}	+	O _{1s}	+
	N _{1s}	b.d.	N _{1s}	+	N _{1s}	+	N _{1s}	-
	S _{2s}	b.d.	S _{2s}	+	S _{2s}	-	S _{2s}	-
	defekty	b.d.	defekty	+	defekty	+	defekty	-
	% zawartości atomu							
C=C (sp²)	b.d.		43,7		46,8		68,9	
C-C (sp³)	b.d.		11,5		10,9		1,6	

b.d. – brak danych

Wykonane analizy pozwoliły zaobserwować podobieństwa i różnice we właściwościach fizykochemicznych badanych materiałów. Podsumowując wykonane analizy pozwoliły na identyfikację i przynależność badanych materiałów do poszczególnych form alotropowych węgla. Ponadto, określono szereg szczegółowych właściwości fizykochemicznych, które wydają się być bardzo istotne z punktu widzenia ich interakcji z błonami komórkowymi w modelu badawczym jakim są kultury komórkowe. Między innymi wykazano różnice w zawartości tlenu, co skorelowane jest z analizami FTIR, XPS

pokazującymi obecność poszczególnych grup funkcyjnych zawierających tlen, a także różnice w przewodności materiałów i związana z tym ilość zdelokalizowanych elektronów na powierzchni płatków, która warunkuje szczególne właściwości biologiczne materiałów.

7.2. Doświadczenie II - Określenie wpływu płatków wybranych odmian alotropowych węgla (grafen, zredukowany tlenek grafenu) na żywotność i morfologię komórek glejaka IV stopnia U87 i komórek prawidłowych linii Hs5 - Publikacja 1 (Szczepaniak J. i in., 2018), Publikacja 3 (Szczepaniak J. i in., 2022)

W celu określenia wpływu badanych form węgla na żywotność komórek U87 i Hs5 wykonano test MTT (Publikacja 1, Szczepaniak J. i in., 2018) oraz Neutral Red (Publikacja 3, Szczepaniak J. i in., 2022). W przypadku nienowotworowych komórek Hs5 w grupach traktowanych GN/ExF i rGO/Term zaobserwowano we wszystkich badanych stężeniach istotne statystycznie zmniejszenie aktywności metabolicznej komórek, aczkolwiek nie tak duże jak w przypadku komórek glejaka U87. W grupach komórek traktowanych płatkami rGO/ATS i rGO/TUD zaobserwowano, że płatki są również bardziej toksyczne dla komórek nowotworowych linii U87 niż prawidłowych linii Hs5. W testach z wykorzystaniem czerwieni obojętnej (NR) wykazano cytotoksyczność wszystkich badanych materiałów wobec komórek glejaka U87 jak również komórek Hs5 (Ryc.2, Szczepaniak J. i in., 2022). Dla obu linii płatki rGO były bardziej toksyczne niż GN.

Różnice w wynikach testów cytotoksyczności (MTT i NR) mogły być spowodowane, między innymi, blokowaniem przez płatki GN i rGO niejonowej dyfuzji pasywnej czerwieni obojętnej przez błonę komórkową, a także zaburzeniem gradientu protonowego utrzymującego pH lizosomów na niższym poziomie niż cytoplazmy. Wyniki testu MTT i czerwieni obojętnej są zgodne z wynikami poprzednich badań, które wskazują, że płatki GN i rGO wykazują znaczną toksyczność wobec linii komórkowych glejaka IV stopnia, między innymi U251, U87 i U118 (Jaworski i in., 2015; Jaworski i in., 2013; Markovic i in., 2011; Hinzmann i in., 2014).

Obserwacje morfologii komórek traktowanych badanymi materiałami węglowymi w mikroskopie świetlnym wykazały, że komórki wykazują tendencję do wzrostu w grupach, w kierunku formacji sferoidalnej, z utratą typowej monowarstwy (Szczepaniak J. i in., 2018, Ryc.3A). Komórki U87 traktowane GN/ExF i rGO/ATS tworzyły wyraźne sferoidy z przylegającymi do nich płatkami węglowymi.

Nie zaobserwowano śladów materiałów węglowych wewnątrz ciał badanych komórek. Ze względu na swój rozmiar płatki GN/ExF, rGO/Term, rGO/ATS i rGO/TUD prawdopodobnie nie przedostawały się do wnętrza komórki. Jaworski i in. (2015) zaobserwowali, że płatki GO i rGO mniejsze niż 200 nm dostają się do cytoplazmy i wakuoli komórek U87 i U118 (Jaworski i in., 2015). Jednak inni badacze nie obserwowali wejścia GO (o wymiarach 588 nm) do komórek np. A549 (Chang i in., 2011).

Podsumowując, wszystkie badane materiały węglowe są toksyczne zarówno dla komórek U87 jak i komórek Hs5. Płatkami najbardziej obniżającymi żywotność komórek są rGO/TUD. Aczkolwiek bardziej wrażliwe na działanie badanych płatków węglowych okazały się komórki glejaka U87 niż komórki prawidłowe Hs5. Ponadto wykazano, że płatkami, które najchętniej przylegały do błony komórkowej glejaka U87 były rGO/ATS i rGO/TUD.

7.3. Doświadczenie III - Określenie wpływu płatków wybranych odmian alotropowych węgla (zredukowany tlenek grafenu, grafen) na status funkcjonalny komórek ze szczególnym uwzględnieniem rodzaju indukowanej śmierci komórkowej oraz zmian cyklu komórkowego w badaniach na komórkach glejaka IV stopnia linii U87 - Publikacja 1 (Szczepaniak i in., 2018)

W Doświadczeniu III analizowano wpływ płatków grafenu i zredukowanych tlenków grafenu na komórki nowotworowe glejaka IV stopnia linii U87. Formy alotropowe węgla w tym GO, rGO (Jaworski i in., 2015), GN (Jaworski i in., 2013), ND (Zakrzewska i in., 2015), fulereny (Trpkovic i in., 2012) oraz nanorurki (Han i in., 2012) są od wielu lat badane w kontekście indukowania apoptozy w komórkach nowotworowych i prawidłowych. Wyniki tych badań często są sprzeczne, czasem wskazują że płatki węglowe indukują apoptozę, a czasami pokazując, że indukują proliferację.

Zmniejszona aktywność metaboliczna komórek (test MTT, Doświadczenie II) wskazuje, że traktowane komórki umierały i/lub dzieliły się wolniej. Aby określić, które procesy miały miejsce, wykonano test cytometryczny przy użyciu aneksyny V-FITC (AnnV) i jodku propidyny (PI) określający rodzaj śmierci komórkowej. Najwyższy odsetek późno apoptotycznych komórek zaobserwowano w grupie traktowanej GN/ExF (Publikacja 2; Ryc.5B, Szczepaniak J. i in., 2018). Procent komórek apoptotycznych wynosił od 40 do 50% dla wszystkich badanych stężeń GN/ExF. Odsetek komórek apoptotycznych w pozostałych grupach traktowanych rGO był niższy w przedziale 16-32 % . Wcześniejsze badania wykazały, że rGO indukuje apoptozę w komórkach glejaka U87, U118, U138 (Jaworski i in., 2013; Moore i in., 2014). Apoptoza może być również indukowana przez nanocząstki grafenu w komórkach nowotworowych glejaka linii U251 poprzez aktywację kaspaz i fragmentację DNA (Markovic i in., 2012). Ponadto grafen i zredukowane tlenki grafenu fizycznie uszkadzały błony komórkowe, zwiększając przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej i zaburzając jej potencjał (Ou i in., 2016; Ou i in., 2017). Apoptoza może zachodzić trzema różnymi szlakami a kaspazy biorą zwykle udział w procesie apoptozy, niezależnie od drogi inicjacji. W prezentowanych badaniach sprawdzono poziom ekspresji mRNA kaspazy indukcyjnej (*casp9*) i kaspazy efektorowej (*casp3*). Wyniki analizy PCR nie wykazały statystycznie istotnego wzrostu ekspresji genu *casp9* w komórkach linii U87 w żadnej z traktowanych grup (Ryc. 5C, Szczepaniak J. i in., 2018). Tendencje do zwiększonej ekspresji *casp9* zaobserwowano w grupach traktowanych rGO/Term i rGO/TUD. W przypadku *casp3* wykazano statystycznie istotny wzrost ekspresji w komórkach U87 traktowanych rGO/ATS i rGO/TUD, podobne wyniki uzyskał Jaworski i inni (2015).

Ze względu na to, że mitochondria odgrywają kluczową rolę w procesie apoptozy (Mukhtar i in., 2012), w Doświadczeniu III przeanalizowano również wpływ płatków grafenu i jego pochodnych na potencjał błony mitochondrialnej z wykorzystaniem cytometru przepływowego i barwnika JC-1. Największą zmianę (spadek o ok. 80%) potencjału błony mitochondrialnej zaobserwowano w grupie traktowanej GN/ExF, w komórkach traktowanych rGO/ATS i rGO/TUD wynosił on odpowiednio 70,48% i 67,17% (Ryc. 6B; Szczepaniak J. i in., 2018). Wyniki testu cytometrycznego JC-1 były przesłanką do zbadania ekspresji genów *aifm1* i *cytc*, które są ważne z punktu widzenia szlaku apoptozy zależnego od mitochondriów. Po uszkodzeniu komórki, białko AIF jest rozsiewane przez kalpajny i katepsyny i przemieszcza się z mitochondriów do cytozolu, a następnie do jądra, gdzie oddziałuje z DNA i powoduje niezależną od chromatyny kondensację kaspaz oraz fragmentację DNA (Delettre

i in., 2006). Dodatkowo, nadekspresja *aifm1* sprzyja translokacji fosfatydyloseryny w błonie komórkowej oraz obniżeniu potencjału błony mitochondrialnej (Van Gurp i in., 2003). Wykazano statystycznie istotny wzrost ekspresji genu *aifm1* po traktowaniu płatkami rGO/Term w komórkach glejaka linii U87 (Ryc. 6C; Szczepaniak J. i in., 2018). W pozostałych grupach zaobserwowano tendencję wzrostową. W normalnych warunkach panujących w komórce cytochrom c (CytC) znajduje się w przestrzeni między zewnętrzną i wewnętrzną błoną mitochondrialną, gdzie pełni rolę nośnika elektronów w łańcuchu oddechowym. Czynniki proapoptotyczne mogą prowadzić do permeabilizacji błony mitochondrialnej, co skutkuje uwolnieniem cząsteczek cytochromu c do cytoplazmy (Garrido i in., 2006). W cytoplazmie CytC łączy się z czynnikiem białkowym Apaf-1 i prokaspazą 9 tworząc kompleks nazywany „kręgiem śmierci” lub apoptosomem, którego głównym zadaniem jest aktywacja kaspaz wykonawczych np. kaspazy 3, 6 i 7 (Bratton i in., 2010). W przedstawianym badaniu wykazano statystycznie istotny wzrost ekspresji genu *cytc* w komórkach U87 w grupach traktowanych GN/ExF i rGO/Term (Ryc. 6C; Szczepaniak J. i in., 2018). Wśród badanych zredukowanych tlenków grafenu rGO/Term charakteryzował się najniższą zawartością tlenu i zarazem indukował apoptozę silniej niż pozostałe. Aczkolwiek najskuteczniejszym induktorem apoptozy okazał się GN/ExF. Wskazuje to, że nawet niewielka ilość grup tlenu a także obecność zdegenerowanych wiązań węglowych sp² i w konsekwencji zmniejszenie liczby elektronów swobodnych oraz zwiększenie hydrofilowości płatków węglowych zmniejsza proapoptotyczną aktywność grafenu i jego pochodnych.

Dodatkowo, w Doświadczeniu II wzięto pod uwagę również potencjał proliferacyjny komórek nowotworowych linii U87 w celu sprawdzenia potencjalnych mechanizmów kompensacyjnych. Wykonano analizę cyklu komórkowego i określono ekspresję mRNA kluczowych genów zaangażowanych w jego regulację (*pcna*, *ki-67* i *mcm2*). Analiza cytometryczna nie wykazała istotnych różnic w odsetku komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Po traktowaniu komórek rGO/Term zaobserwowano niewielki wzrost odsetka komórek w fazie S cyklu komórkowego, zaobserwowano także niewielki spadek odsetka komórek w fazie G2/M po traktowaniu płatkami GN/ExF. Oceniliśmy ekspresję genów *pcna*, *ki-67* i *mcm2*, które biorą udział w regulacji cyklu komórkowego i proliferacji. Analiza ekspresji genów wykazała zmiany istotne statystycznie (Ryc. 7C, Szczepaniak J. i in., 2018). Ekspresja *pcna* była tylko znacząco zwiększona w grupie traktowanej rGO/Term, podczas gdy ekspresja *mcm2* w grupie traktowanej rGO/TUD była obniżona. Sawosz i in. w swoich badaniach wykazali tendencję do zmniejszonej ekspresji *pcna* w tkance mózgowej zarodków kury traktowanych płatkami grafenu *in ovo* (Sawosz i in., 2014). W przedstawionym badaniu ekspresja genu *pcna* wzrosła o 26% w grupie traktowanej rGO/Term i o 28% w grupie traktowanej GN/ExF. Było to prawdopodobnie spowodowane zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie S komórek glejaka linii U87. Ponadto wykazano, że badane materiały GN i rGO wpływają na ekspresję genu *ki-67* w komórkach glejaka IV stopnia, zwiększając jego ekspresję w grupach traktowanych rGO/Term i rGO/TUD.

Udowodniono że spośród badanych materiałów węglowych to GN/ExF wywoływał w komórkach glejaka U87 największy odsetek komórek apoptotycznych. Ponadto, w związku z analizą potencjału błony mitochondrialnej, wykazano że wszystkie badane materiały rGO i GN obniżają $\Delta\Psi_m$ w komórkach glejaka U87 na podobnym poziomie, co sugeruje, że jest to główny szlak aktywacji apoptozy, zależny od mitochondriów.

Co więcej analiza ekspresji genów (*casp3*, *casp9*, *cytc*, *aifm1*) na poziomie mRNA biorących udział w aktywacji apoptozy wykazała większy wpływ badanych materiałów na zmiany ekspresji *cytc* i *aifm1*, potwierdzając tym samym aktywację szlaku apoptozy zależnej od mitochondriów. Zaobserwowano również zwiększenie ekspresji genu *ki-67* na poziomie mRNA po traktowaniu rGO/Term i GN/ExF w komórkach glejaka U87, co w związku z niewielkimi zmianami cyklu komórkowego, może świadczyć o mechanizmach kompensacyjnych związanych z apoptozą.

7.4. Doświadczenie IV – Określenie wpływu płatków zredukowanego tlenku grafenu i płatków grafenu na potencjał błonowy zależny od funkcjonowania kanałów jonowych w komórkach glejaka IV stopnia linii U87 – Publikacja 2 (Szczepaniak J. i in., 2021)

W Doświadczeniu IV postawiono hipotezę, że cytotoksyczność rGO może wynikać z bezpośredniego kontaktu z błoną komórkową glejaka i może prowadzić do zaburzenia szlaków sygnałowych w błonie komórkowej lub z bezpośredniego oddziaływania ze strukturami komórkowymi wrażliwymi na zmiany potencjału elektrochemicznego (błona komórkowa np. kanały jonowe i receptory zewnątrzkomórkowe). Badanie interakcji między materiałami grafenowymi i jego pochodnymi może ujawnić podstawowe mechanizmy cytotoksyczności tych materiałów.

Selektywność płatków grafenu i jego pochodnych w stosunku do komórek nowotworowych można określić na podstawie różnic w potencjale błony komórkowej (V_m) między komórkami nowotworowymi i nienowotworowymi. Ładunek powierzchniowy komórki jest kluczowym parametrem biofizycznym, który zależy od składu błony cytoplazmatycznej i stanu fizjologicznego komórek. Teoria Cone'a (Cone i in., 1971) zakłada korelację pomiędzy proliferacją a V_m , ponieważ wykazał on znaczną depolaryzację V_m podczas transformacji złośliwej prawidłowych komórek (Tokuoka i in., 1957; Johnstone i in., 1959). Bezpośrednie porównanie poziomów V_m *in vitro* i *in vivo* komórek prawidłowych i nowotworowych wykazały, że komórki nowotworowe były bardziej zdepolaryzowane (Marmo i in., 1994). Komórka ulega depolaryzacji, gdy V_m jest względnie mniej ujemny (komórki nowotworowe, proliferujące: od 0 do -50 mV), podczas gdy komórka hiperpolaryzowana ma bardziej ujemny V_m (komórki normalne, nieproliferujące; od -50 do -90 mV) (Yang i in., 2013). Komórki glejaka posiadają potencjał na poziomie -14 mV zdepolaryzowanej błony komórkowej, który determinuje niższe siły odpychające. Płatki rGO/ATS i rGO/TUD mają niższy ładunek powierzchniowy i prawdopodobnie przez to chętniej przylegają do błon komórkowych glejaka linii U87. Analizując potencjał błony komórkowej (V_m) komórek U87 i Hs5, zaobserwowano jego spadek po traktowaniu płatkami rGO/ATS i rGO/TUD. W prawidłowych komórkach Hs5 spadek potencjału był mniejszy niż w komórkach U87. W innych badaniach Bondara i in. zaobserwowano, że potencjał błonowy w komórkach HeLa, w których apoptoza była indukowana termicznie, przesunął się ujemnie o około 4,2 mV w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Było to prawdopodobnie wynikiem redystrybucji fosfatydyloseryny, zawierającej ujemnie naładowaną grupę karboksylową, z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy lipidowej błony komórkowej (Bondar i in., 2012). Dlatego zmniejszenie potencjału błony komórkowej glejaka U87 po traktowaniu płatkami rGO/ATS i rGO/TUD może być częściowo spowodowane indukcją apoptozy w komórkach.

Płatki grafenu i zredukowanego tlenku grafenu poza bezpośrednim kontaktem z podwójną błoną lipidową mają kontakt także z kanałami jonowymi. Kanały jonowe to białka błonowe, które otwierają lub zamykają błonę plazmatyczną w zależności od gradientu napięcia. Są one niezbędne dla prawidłowej proliferacji komórek i odgrywają kluczową rolę w złośliwości glejaka, wpływając na kształt i objętość komórek, co z kolei może wpływać na inwazyjność i migrację guzów (Molenaar i in., 2011). W związku z tym w kolejnym etapie Doświadczenia IV oceniono wpływ płatków grafenu i jego pochodnych na ekspresję kanałów jonowych bramkowanych napięciem, uczestniczących w elektrochemicznych szlakach sygnałowych (Hille i in., 2001). Wang i in. wykazali, że z 18 genów kodujących kanały jonowe bramkowanych napięciem oraz ligandem ekspresja aż 16 genów (*cacna1d*, *clcn6*, *glrb*, *gria2*, *grid1*, *kcnab1*, *kcnb1*, *kcnd2*, *kcnj10*, *kcnma1*, *kcnqn3*, *nalcn*, *p2rx7*, *scn1a* i *vdac2*) była zmniejszona w tkance nowotworowej w porównaniu z prawidłową tkanką (Wang i in., 2015). Na podstawie tych badań do analizy wybrano geny kodujące zależne od napięcia podjednostki kanałów jonowych (*cacna1d*, *clcn6*, *kcnab1*, *kcnb1*, *kcnj10* i *nalcn*) (Ryc.4, Szczepaniak J. i in., 2021). Badanie zostało wzbogacone o dodatkowe analizy ekspresji genów *clcn3*, *cacna1b* oraz *kcne4* (Ryc.4, Szczepaniak J. i in., 2021). Badanie wykazało, że ekspresja *nalcn* w komórkach glejaka była istotnie wyższa niż w komórkach prawidłowych linii Hs5. Inni badacze zaobserwowali, że stężenie jonów Na⁺ w nowotworach złośliwych wzrasta w porównaniu z tkankami nienowotworowymi (Ouwkerk i in., 2007). Ponadto, ekspresja *nalcn* w komórkach glejaka U87 po traktowaniu rGO/ATS i rGO/TUD była istotnie wyższa. W komórkach Hs5 ten sam efekt zaobserwowano po traktowaniu wszystkimi materiałami. Literaturowe dane podają, że wzrost wewnątrzkomórkowego Na⁺ występuje we wczesnej fazie apoptozy (Fernández-Segura i in., 1999; Skepper i in., 1999). Co więcej w kilku badaniach zaobserwowano również podwyższenie cytoplazmatycznego stężenia Na⁺ w późnej fazie apoptozy (Arrebola i in., 2006; Arrebola i in., 2005). Zatem zwiększona ekspresja *nalcn* indukowana płatkami grafenu i jego pochodnymi, może wywołać apoptozę w komórkach glejaka, poprzez stymulację napływu sodu do cytoplazmy komórek. W następnej kolejności analizowano ekspresję genu *clcn6*, którego produkt jest zlokalizowany w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach retikulum endoplazmatycznego i błonie komórkowej. Badanie wykazało znaczny wzrost ekspresji *clcn6* po traktowaniu wszystkimi materiałami w komórkach glejaka linii U87. W przypadku komórek prawidłowych linii Hs5 wzrost ekspresji zaobserwowano jedynie w przypadku grupy GN/ExF i rGO/ATS. Obserwowana nadekspresja może prowadzić do zakwaszenia lizosomów (Poët i in., 2006). W związku z tym zwiększona ekspresja genu *clcn6* w komórkach glejaka linii U87 prowadzi do alkalizacji cytoplazmy. Warto wspomnieć, że w rzeczywistości wewnątrzkomórkowa alkalizacja i pozakomórkowe zakwaszenie są powszechnie obserwowane w przypadku nowotworów złośliwych. Zakwaszenie cytoplazmy z kolei prowadzi do aktywacji szlaków apoptozy w komórkach nowotworowych (Matsuyama i in., 2000). Na tej podstawie pokazano, że prawdopodobnie płatki GN i rGO w komórkach glejaka blokują transport Cl⁻/H⁺, w konsekwencji prowadząc do zakwaszenia cytoplazmy i aktywacji apoptozy. A wynikiem tego jest kompensacyjny wzrost ekspresji genu *clcn6*. Następnie w kanałach klasy Kv analizowano ekspresję kanałów *kcnb1* i *kcne4*, a także *kcnj10*, które należą do klasy kanałów potasowych Kir. Badanie potwierdziło znaczny wzrost ekspresji kanału *kcne4* po traktowaniu komórek glejaka linii U87 płatkami rGO/ATS. Natomiast po traktowaniu rGO/TUD zaobserwowano zmniejszenie ekspresji genu *kcne4*. W komórkach zdrowych linii Hs5 nie zaobserwowano zmian w ekspresji *kcne4*.

Na ogół w tkankach glejaka obserwuje się 2,9-krotny wzrost ekspresji genu *kcne4* w porównaniu do prawidłowych tkanek (Biasiotta i in., 2016). Następnie wykazano brak istotnych statystycznie zmian w ekspresji *cacna1b* w komórkach linii U87 po traktowaniu wszystkimi materiałami grafenowymi. W komórkach prawidłowych linii Hs5 ekspresja natomiast była zmniejszona we wszystkich grupach, zarówno GN jak i różnych rGO. Wyniki potwierdziły też, że ekspresja genu *cacna1b* w komórkach Hs5 była istotnie wyższa w porównaniu do komórek nowotworowych glejaka U87. Wang i in. wykazali, że *cacna1b* ulega ekspresji na niskim poziomie w komórkach nowotworowych w porównaniu do komórek zdrowych (Wang i in., 2015). W badaniach nie obserwowano zmian ekspresji genu *cacna1d* w komórkach glejaka U87. Zmiany zaobserwowano jedynie w przypadku traktowania komórek Hs5 materiałami rGO/Term, rGO/ATS oraz rGO/TUD w początkowym okresie leczenia 6h. Jednak 24h traktowanie badanymi materiałami zmniejszało ekspresję *cacna1d* w grupach rGO/ATS oraz rGO/TUD. Pierwotny wzrost ekspresji *cacna1d* może indukować większy napływ jonów Ca^{2+} do komórek. Stąd też po 24h traktowania zauważalne jest zmniejszenie ekspresji *cacna1d*, co zapewne spowodowane jest mechanizmem kompensacyjnym wyrównującym wcześniejszy napływ jonów. Następnie analiza ekspresji *clcn3* w komórkach glejaka wykazała istotny statystycznie wzrost ekspresji po traktowaniu płatkami rGO/ATS i rGO/TUD. Ostatnie badania wykazały, że *clcn3* ulega silnej ekspresji w GBM i odgrywa znaczącą rolę w przeżyciu komórek, proliferacji i złośliwości (Hong i in., 2015; Lui i in., 2010). Sontheimer i in. wykazali, że obniżona ekspresja genów *clcn3* hamuje migrację komórek glejaka IV stopnia *in vitro* i *in vivo* (Sontheimer i in., 2008). W związku z tym wzrost ekspresji *clcn3* może stymulować inwazyjność komórek glejaka U87.

Podsumowując, badane materiały a w szczególności zredukowane tlenki grafenu rGO/ATS i rGO/TUD, ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne (zawartość grup funkcyjnych zawierających tlen) wpływają na potencjał błonowy komórek glejaka U87, obniżając jego poziom. Ponadto uzyskane wyniki dotyczące ekspresji genów kanałów jonowych nie są do końca jasne. W komórkach glejaka U87 wykazano wzrost ekspresji genu *nalc1* po traktowaniu rGO/ATS i rGO/TUD, co może wskazywać na napływ jonów sodu do komórki i poprzez to wywoływać aktywację apoptozy. Co więcej badanie pokazało kompensacyjny wzrost ekspresji genu *clcn6* w komórkach glejaka U87 po traktowaniu wszystkimi materiałami, co może powodować alkalizację cytoplazmy, a tym samym prowadzić do aktywacji szlaków apoptotycznych. W przypadku ekspresji genu *kcne4* wykazano rozbieżności, ponieważ płatki rGO/ATS wykazały wzrost ekspresji, natomiast rGO/TUD jej obniżenie, więc w związku z nadekspresją tego genu w komórkach nowotworowych jego jeszcze większy wzrost może być zjawiskiem niepożądanym. Analiza ekspresji genu *clcn3* w komórkach glejaka wykazała wzrost ekspresji po traktowaniu płatkami rGO/ATS i rGO/TUD, co może stymulować inwazyjność komórek glejaka. Zatem widoczny jest wpływ zastosowanych materiałów w badanym zakresie, ale nie wszystkie geny związane z danym procesem ulegają jednoznacznie wzrostowi lub obniżeniu.

7.5. Doświadczenie V – Określenie wpływu płatków zredukowanego tlenu grafenu i płatków grafenu na ekspresję receptorów zewnątrzkomórkowych oraz białek związanych z migracją i adhezją w komórkach glejaka IV stopnia linii U87 – Publikacja 2 (Szczepaniak i in., 2021) i Publikacja 3 (Szczepaniak i in., 2022)

W Doświadczeniu V zbadano ekspresję wybranych receptorów zewnątrzkomórkowych na komórkach glejaka U87 i komórkach prawidłowych Hs5 po traktowaniu materiałami rGO i GN wykorzystując Human Receptor Antibody Array, dzięki któremu przeanalizowano ekspresję 40 różnych białek receptorowych, zewnątrzkomórkowych zaangażowanych w różne szlaki sygnałowe (Ryc. 5, Szczepaniak i in., 2021) oraz ekspresję białek związanych z migracją i adhezją (Ryc.6, Szczepaniak J. i in., 2022).

Zaobserwowano, że ekspresja białka uPar była zwiększona w komórkach nietraktowanych glejaka linii U87 w porównaniu z komórkami prawidłowymi linii Hs5. Inni badacze, również potwierdzili istotnie wyższą ekspresję białka uPar w komórkach glejaka U87 w porównaniu z prawidłowymi komórkami HMEC (Montuori i in., 2013). Analiza ekspresji uPar w komórkach glejaka U87 po traktowaniu płatkami GN/ExF, rGO/ATS i rGO/TUD wykazała istotny spadek jego ekspresji. uPar odpowiada za degradację składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) (Raghu i in., 2010). W związku z tym płatki GN i rGO mogą działać jako aktywatory rozszczepienia sąsiednich receptorów uPar, a także mogą blokować miejsca przyłączenia uPar i witronektyny, a tym samym hamować sygnalizację uPar (Høyer-Hansen i in., 1992; Høyer-Hansen i in., 1997). Analiza ekspresji receptorów białkowych wykazała również zmniejszoną ekspresję receptora endogliny (CD105) po traktowaniu GN i rGO w komórkach glejaka U87. CD105 odgrywa kluczową rolę w procesach angiogenezy i waskulogenezy, zapobiegając apoptozie w niedotlenionych komórkach śródbłonna (Smith i in., 2012). Badanie wykazało znacznie wyższą ekspresję endogliny w komórkach glejaka U87 w porównaniu z komórkami zdrowymi linii Hs5. Muenzner i in. potwierdzili, że domena C-końcowa endogliny jest niezbędna w procesie hamowania odklejania się komórek (Muenzner i in., 2005). Dlatego przypuszcza się, że traktowanie komórek U87 płatkami GN i rGO, skutkujące obniżeniem ekspresji endogliny może stymulować adhezję komórek, a w konsekwencji prowadzić do zmniejszenia zdolności migracji komórek nowotworowych.

W kolejnym etapie Doświadczenia V przeprowadzono test gojenia ran, aby ocenić migrację komórek U87 i Hs5 po traktowaniu płatkami GN i rGO (Ryc.3, Szczepaniak J. i in., 2022). Zaobserwowano, że komórki U87 migrowały szybciej niż komórki zdrowe Hs5 i prawie całkowicie pokryły rysę po 24 h, co jest zgodne z obserwacjami Formolo i in., którzy wykazali, że poziom inwazyjności linii glejaka U87 był 29-krotnie wyższy niż np. linii komórkowych T98G, LN18 i U118 (Formolo i in., 2011). Analiza pokazała, że traktowanie komórek płatkami rGO/TUD zmniejszyło migrację komórek glejaka U87. Natomiast komórki Hs5 wykazywały niską ruchliwość a dodatkowe traktowanie badanymi płatkami nie zmieniło mobilności w stosunku do grupy kontrolnej. Komórki nowotworowe migrują poprzez stopniową degradację otaczającej ich macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) w celu stworzenia własnych ścieżek migracji (Paul i in., 2017). Xiao i in. zaobserwowali w swoich badaniach, że komórki glejaka U87 w ko-kulturze ze zdrowymi neuronami i komórkami glejowymi miały istotnie większą mobilność (Xiao i in., 2018).

Wierzbicki i inni zaobserwowali, że traktowanie nanocząstkami NG i nGO zmniejszyło migrację komórek glejaka U87 i U118 (Wierzbicki i in., 2017). Wyniki te zostały również potwierdzone w prezentowanym eksperymencie poprzez analizę ruchliwości komórek nowotworowych U87 i zdrowych Hs5 we wspólnej hodowli (Ryc.4, Szczepaniak J. i in., 2022). Zaobserwowano, że materiałami o najsilniejszych właściwościach hamujących ruchliwość komórek glejaka U87 były płatki rGO/ATS i rGO/TUD. W przypadku komórek zdrowych Hs5 obserwowany efekt zahamowania był mniejszy.

Kolejnym krokiem w Doświadczeniu V była ocena ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA i/lub białek biorących udział w procesie migracji i adhezji. Czynniki regulujące ruchliwość komórek są receptory adhezji komórkowej oraz ECM (Aoudjit i in., 2012). Należą do nich integryny $\alpha 5$ i $\beta 1$, β -katenina, N-kadheryna, PAN-kadheryna i FAK, które analizowano w niniejszym badaniu, zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Integryny są głównymi receptorami ECM w komórkach zwierzęcych i odgrywają bardzo ważną rolę w progresji nowotworu, przerzutach i/lub oporności na leczenie. Integryna $\alpha 5 \beta 1$ ulega ekspresji na znacznie wyższym poziomie w komórkach GBM w porównaniu do zdrowej tkanki mózgowej, co sugeruje jej potencjalną rolę w rozwoju lub progresji GBM (Gingras i in., 1995). Wyniki uzyskane w badaniu wykazały statystycznie istotny wzrost poziomu ekspresji mRNA *integryny $\alpha 5$* po traktowaniu płatkami GN/ExF i rGO/TUD w komórkach glejaka linii U87. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian w ekspresji mRNA *integryny $\beta 1$* po działaniu na komórki glejaka U87 wszystkimi badanymi materiałami. Natomiast w prawidłowych komórkach Hs5 ekspresja mRNA *integryny $\beta 1$* wzrosła istotnie w grupie traktowanej płatkami rGO/ATS. Analiza ekspresji *integryny $\alpha 5$* na poziomie białka metodą Western Blot nie wykazała różnic po traktowaniu płatkami GN i rGO. W przypadku integryny $\beta 1$ ekspresja białka wzrosła po traktowaniu materiałami rGO/ATS i rGO/TUD. Ponadto zaobserwowano, że ekspresja białka integryny $\beta 1$ była znacznie wyższa w komórkach glejaka U87 w porównaniu do komórek prawidłowych Hs5. Inni badacze wykazali, że wysoka ekspresja integryny $\alpha 5 \beta 1$ wiąże się z gorszym rokowaniem u pacjentów z GBM (Janouskova i in., 2012). Zatem wzrost ekspresji integryny $\alpha 5$ po traktowaniu płatkami GN/ExF i rGO/TUD może mieć negatywny wpływ na inwazyjność, wywołując jej zwiększenie w komórkach nowotworowych. Riemenschneidera i in. zaobserwowali nadekspresję integryny $\alpha 5 \beta 1$ na poziomie białka w znacznym odsetku biopsji ludzkiego glejaka (Riemenschneider i in., 2005). Ponadto Janouskova i in. wykazali, że aktywacja p53 przez nutline-3a hamuje ekspresję integryny $\alpha 5 \beta 1$ (Janouskova i in., 2012). Dlatego podejrzewamy, że ekspresja *integryny $\beta 1$* na poziomie mRNA po traktowaniu płatkami GN nie zmieniła się w komórkach glejaka U87 z powodu aktywacji p53, która hamuje ekspresję *integryny $\beta 1$* . Jest prawdopodobne, że płatki GN działają na szlak sygnałowy, podobnie jak nutlina-3a. Ponadto składniki ECM, takie jak witronektyna, kolagen i fibronektyna, są naturalnymi ligandami integryn. Każda para integryn $\alpha \beta$ zawiera określony zestaw białek ECM (Hynes i in., 2002). Dlatego płatki GN przyłączone do ECM mogą aktywnie blokować dostęp do ligandów integryny $\beta 1$, takich jak fibronektyna, a poprzez wiązanie się z błoną komórkową GBM, aktywnie blokować samą integrynę $\beta 1$ i pośrednio zwiększać ekspresję integryny $\beta 1$ na poziomie białka. Zatem po traktowaniu płatkami komórki nowotworowe nie wykazywały zmian w ekspresji *integryny $\beta 1$* na poziomie mRNA, ale wykazywały zwiększoną ekspresję na poziomie białka po traktowaniu rGO/ATS i rGO/TUD.

Może to wynikać z faktu, że komórki nowotworowe posiadają zapas mRNA *integryny* $\beta 1$ i wykorzystują go w niesprzyjających warunkach do zwiększenia ekspresji integryny $\beta 1$ na poziomie białka, kompensując stres związany z blokowaniem ligandów fibronektyny w ECM i samej integryny $\beta 1$, tym samym zwiększając interakcję komórka-ECM i zmniejszając migrację.

W następnej kolejności analizowano β -kateninę, która gromadzi się w jądrze, gdzie oddziałuje z koregulatorami transkrypcji tworząc kompleks β -katenina/Lef/Tcf, który reguluje transkrypcję kilku genów zaangażowanych w proliferację, różnicowanie, przeżycie i apoptozę (Zhang i in., 2011). Nieprawidłowa aktywacja szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina jest cechą charakterystyczną wielu nowotworów (Reya i in., 2005). Wyniki analizy pokazały statystycznie istotny spadek ekspresji mRNA *β -kateniny* po traktowaniu wszystkimi badanymi materiałami w komórkach glejaka U87. Spadek ekspresji β -kateniny potwierdzono także w analizie Western Blot, gdzie zaobserwowano największy spadek ekspresji po traktowaniu płatkami rGO/TUD w komórkach glejaka U87. Wierzbicki i in. w swoich badaniach również pokazali zmniejszenie ekspresji cytoplazmatycznej β -kateniny na poziomie białka po traktowaniu nanocząstkami NG i nGO w komórkach glejaka U118 (Wierzbicki i in., 2017). Zatem zmniejszenie ekspresji β -kateniny może przyczynić się do zmniejszenia inwazyjności komórek nowotworowych, uwrażliwienia ich na inne terapię w tym radioterapię, oraz zmniejszenie nawrotu guza po resekcji (Chen i in., 2007). β -katenina jako składnik kompleksu adhezji komórkowej wiąże się z kadheryną i w ten sposób reguluje adhezję komórka-komórka. Zmiana wiązania β -kateniny z kadheryną zmniejsza adhezję komórek, jednocześnie promując migrację komórek i przejście nabłonkowo-mezenchymalne (Nelson i in., 2004). W doświadczeniu analizowano ekspresję N-kadheryny (na poziomie mRNA) i PAN-kadheryny (na poziomie białka). Wyniki analiz mRNA pokazały statystycznie istotny wzrost ekspresji *N-kadheryny* po traktowaniu wszystkimi badanymi materiałami. Prawdopodobnie wystąpiło tutaj zjawisko sprzężenia zwrotnego, ponieważ zaobserwowano jedynie niewielki spadek ekspresji PAN-kadheryny na poziomie białka po traktowaniu płatkami GN/ExF w komórkach glejaka U87. Wierzbicki i in. w swoich badaniach również zaobserwowali spadek ekspresji PAN-kadheryny na poziomie białka w komórkach glejaka U118 po traktowaniu nGO. W przypadku linii U87 nie zaobserwowano zmian w ekspresji zarówno N-kadheryny jak i PAN-kadheryny. Zasugerowano więc, że nanocząstki mogą modyfikować procesy migracji komórek nowotworowych poprzez utrudnianie interakcji między komórkami a ECM (Wierzbicki i in., 2017).

FAK jest wielofunkcyjnym regulatorem sygnalizacji komórkowej w mikrośrodowisku guza (Schaller i in., 2010). Podczas rozwoju różnych typów nowotworów FAK promuje mobilność, przeżycie i proliferację komórek. Ponadto farmakologiczne hamowanie aktywności FAK zwiększa siłę adhezji komórka-komórka, co może zapobiegać szybszemu rozprzestrzenianiu się komórek nowotworowych (Canel i in., 2010). Analizy na poziomie mRNA wykazały statystycznie istotny spadek ekspresji po traktowaniu płatkami rGO/ATS i rGO/TUD. Ponadto analiza ekspresji FAK na poziomie białka jednoznacznie potwierdziła i wykazała spadek ekspresji FAK po traktowaniu płatkami rGO/ATS i rGO/TUD w komórkach glejaka U87. Natomiast w komórkach zdrowych Hs5 obserwowano efekt całkowicie odwrotny, a mianowicie wzrost ekspresji białka FAK po traktowaniu wszystkimi materiałami. Lipiński i in. stwierdzili, że zwiększona aktywność FAK była skorelowana z wysoką proliferacją i niskimi wskaźnikami migracji w czterech różnych ludzkich liniach

komórkowych GBM, co sugeruje, że FAK jest ważnym białkiem w procesach sygnalizacyjnych, a jego regulacja może być wyznacznikiem rozwoju proliferacyjnego lub fenotypu migracyjnego (Lipinski i in., 2003). Zatem zmniejszenie ekspresji FAK w komórkach U87 może być przyczyną zmniejszonej proliferacji po traktowaniu płatkami rGO/ATS i rGO/TUD. Mechanizm interakcji z normalnymi komórkami może być inny, ponieważ zaobserwowano spadek ekspresji *FAK* na poziomie mRNA i wzrost ekspresji na poziomie białka, przy jednoczesnym spadku ruchliwości. Canel i in. zaobserwowali, że zwiększona ekspresja mRNA *FAK* nie zawsze przekłada się na zwiększony poziom białka (Canel i in., 2006). Dlatego w zdrowych komórkach Hs5 nie obserwowaliśmy związku między ekspresją FAK na poziomie mRNA i białka. Ponadto FAK bierze udział w tworzeniu klastrów receptorów integryn po związaniu komórek z białkami ECM, co może powodować dimeryzację FAK (Brami-Cherrier i in., 2014). Interakcja między C-końcową domeną FAK i integrynami w adhezji odbywa się za pośrednictwem wiązania integryna/FAK, ponieważ nadekspresja C-końcowego fragmentu FAK blokuje jego aktywację za pośrednictwem właśnie integryn (Mitra i in., 2005). Dlatego przypuszcza się, że w komórkach glejaka U87 traktowanych płatkami rGO zmniejszenie ekspresji FAK zarówno na poziomie mRNA, jak i białka może być spowodowane przez indukowany przez ten sam materiał wzrost ekspresji integryny $\beta 1$.

Podsumowując ostatni etap badań, analizy ekspresji receptorów zewnątrzkomórkowych na poziomie białka wykazały spadek ekspresji uPar i CD105 w komórkach glejaka U87 po traktowaniu wszystkimi materiałami węglowymi, co może skutkować stymulacją adhezji komórek, a w konsekwencji prowadzić do zmniejszenia zdolności migracji komórek nowotworowych. Ponadto wykazano, że płatki rGO/ATS i rGO/TUD hamują migrację/ruchliwość komórek nowotworowych w największym stopniu, co zdają się być efektem pożądanym. Uzyskane wyniki wykazały wzrost ekspresji *integryny* $\alpha 5$ na poziomie mRNA w komórkach glejaka U87 po traktowaniu GN/ExF i rGO/TUD, jednak nie wykazano zmian w ekspresji na poziomie białka. W przypadku integryny $\beta 1$ ekspresja na poziomie mRNA nie zmieniła się, jednak na poziomie białka wzrosła po traktowaniu materiałami rGO/ATS i rGO/TUD. Wykazano także spadek ekspresji β -kateniny na poziomie białka w komórkach glejaka U87 po traktowaniu rGO/TUD, co może przyczyniać się do zmniejszenia inwazyjności komórek. Analizy na poziomie mRNA wykazały spadek ekspresji *FAK* po traktowaniu płatkami rGO/ATS i rGO/TUD. Ponadto analiza ekspresji FAK na poziomie białka jednoznacznie potwierdziła i wykazała spadek ekspresji FAK po traktowaniu płatkami rGO/ATS i rGO/TUD w komórkach glejaka U87. Zatem zmniejszenie ekspresji FAK w komórkach U87 może być przyczyną zmniejszonej proliferacji po traktowaniu płatkami rGO/ATS i rGO/TUD.

8. Podsumowanie

Chemia powierzchni i rozmiar płatków grafenu odgrywają kluczową rolę w toksyczności, transporcie i dystrybucji grafenu do wnętrza komórki. Różne materiały grafenowe w zależności od charakterystyki fizykochemicznej mogą wywierać różny wpływ na komórki. W badaniu zostało potwierdzone, że płatki grafenu o większym rozmiarze i wyższym stopniu utleniania (rGO/TUD) mogą wykazywać większą cytotoksyczność w porównaniu do GN/ExF. W związku z tym w komórkach glejaka IV stopnia apoptoza może być indukowana za pomocą kilku szlaków, między innymi przez oddziaływanie z receptorami śmierci na błonie komórkowej. Uzyskane wyniki pokazują, że szlak mitochondrialny może

być dominującym mechanizmem leżącym u podstaw apoptozy indukowanej przez grafen i jego pochodnych. Dlatego wydaje się, że mitochondrium jest kluczowe dla interakcji grafen-komórka.

Najważniejsze wyniki uzyskane w prezentowanej pracy doktorskiej zestawiono w Tab.2

Tabela 2. Porównanie najważniejszych wyników prac eksperymentalnych uwzględniając rodzaj materiału węglowego (rGO/GN) i wykorzystane typy linii komórkowych (U87/Hs5).

		rGO/Term	rGO/ATS	rGO/TUD	GN/ExF
Żywotność					
MTT		25 µg/ml			
U87		53,36 %	63,96 %	42,45 %	63,57%
Hs5		82,47 %	96,02 %	86,14 %	71,23 %
Neutral Red		25 µg/ml			
U87		94,41 %	76,77 %	88,28 %	84,81 %
Hs5		100 %	29,95 %	71,16 %	85,38 %
Apoptoza					
PI/Aneksyna V		25 µg/ml			
		29 %	20 %	24 %	43 %
Ekspresja mRNA	<i>casp3</i>	↑	↑↑	↑↑	↑
	<i>casp9</i>	↑↑	↑	↑↑	↑
25 µg/ml					
Potencjał błony mitochondrialnej	↓ΔΨm	66,76 %	72,12 %	63,85 %	67,39 %
Ekspresja mRNA	<i>aifm</i>	↑↑	↑	↑↑	↑
	<i>cytc</i>	↑↑	↑	↑	↑↑
Bioelektryka błony komórkowej					
Potencjał błony komórkowej		25 µg/ml			
U87	Vm	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓
Hs5		↓	↓↓	↓↓	↓
Kanady jonowe					
Ekspresja mRNA		25 µg/ml, po 24 h			
U87	<i>clcn3</i>	-	↑	↑	-
	<i>clcn6</i>	-	-	-	-
	<i>nalcn</i>	-	↑	↑	-
	<i>kcne4</i>	-	↑	↓	-
Hs5	<i>clcn6</i>	-	-	-	-
	<i>cacna1b</i>	-	-	-	-
	<i>cacna1d</i>	-	↓	↓	-
	<i>nalcn</i>	↑	↑	↑	↑
Zahamowanie mobilności		25 µg/ml			
U87	% inhibicji	-	51,20 %	30,86 %	6,86 %
Hs5	% inhibicji	-	36,06 %	28,35 %	13,41 %
Receptory zewnątrzkomórkowe					
Ekspresja mRNA		25 µg/ml			

U87	<i>B-katenina</i>	-	↓↓	↓↓↓	↓
	<i>FAK</i>	-	↓	↓	-
Hs5	<i>B-katenina</i>	-	↓↓	↓↓↓	↓
	<i>FAK</i>	-	↓↓	↓↓↓	↓
Ekspresja białka	25 µg/ml				
U87	B-katenina	-	↓	↓↓	↓
	FAK	-	↓↓	↓↓	↓
Hs5	B-katenina	-	↓	↑↑	↑
	FAK	-	↑	↑	↑
Human Receptor Antibody Array	25 µg/ml				
U87	uPar	-	↓	↓	↓
	CD105	-	↓	↓	↓
Hs5	uPar	-	↑	↑	↑
	CD105	-	↑	↑	-

„-”, brak danych lub brak zmian

rGO może oddziaływać na komórki w wyniku bezpośredniego kontaktu z błoną komórkową glejaka za pośrednictwem grup funkcyjnych, które są obecne na powierzchni badanych płytek. Badania potwierdziły, że płytki grafenu i jego pochodne mają znaczący wpływ na ekspresję genów kanałów jonowych zależnych od napięcia (VGIC) w komórkach glejaka linii U87, w tym także znaczące zmiany potencjału błony komórkowej. W szczególności po traktowaniu płytkami rGO/ATS i rGO/TUD zaobserwowano duże zmiany w ekspresji genów kanałów jonowych zależnych od napięcia *clcn3*, *nalc1* oraz *kcnk4*. Ponadto przedstawiono, że badane formy grafenu i jego pochodnych (rGO i GN) mogą wpływać na ekspresję receptorów zewnątrzkomórkowych (uPar i CD105) w komórkach glejaka U87, znacznie zmniejszając ich ekspresję. Wykazano również, że rGO i GN obniżają ekspresję uPar, działając jako inhibitory proteolizy promowanej przez nowotwory. Dlatego mobilność komórek typu mezenchymalnego może być hamowana. Ponadto rGO i GN obniżają ekspresję endogliny (CD105) i prawdopodobnie wspomagają poprzez to wzrost adhezji komórek, w konsekwencji zmniejszając migrację komórek nowotworowych.

Badania poszerzyły ogólną wiedzę na temat mechanizmu funkcjonalnego płytek grafenu i jego pochodnych. Badane materiały takie jak rGO i GN mogą wpływać na ruchliwość komórek poprzez interakcje z receptorami błony komórkowej, takimi jak integryny $\alpha 5$ i $\beta 1$, β -katenina, kadheryny i FAK, poprzez powierzchniowe grupy funkcyjne badanych materiałów. Nie są one jednak selektywne w stosunku do komórek nowotworowych i oddziałują podobnie z komórkami prawidłowymi, chociaż siła tego oddziaływania jest słabsza lub ma odwrotny efekt. Zaobserwowano znaczący spadek ekspresji FAK zarówno na poziomie mRNA, jak i białka w komórkach glejaka U87 po traktowaniu płytkami rGO/ATS i rGO/TUD. Co więcej, chociaż efekt końcowy jest podobny w komórkach prawidłowych i nowotworowych (tj. zmniejszona mobilność), prawdopodobnie mechanizm przebiega różnymi szlakami, ponieważ ekspresja kluczowych białek związanych z mobilnością (tj. integryn, β -kateniny, kadheryn i FAK) nie jest spójna w komórkach prawidłowych Hs5 i nowotworowych U87. Zatem z całą pewnością należy kontynuować badania na bardziej zaawansowanym modelu badawczym, który pozwoliłby zweryfikować czy zmiany w ekspresji badanych receptorów/białek odpowiedzialnych za migrację i inwazyjność zwiększają/zmniejszają progresję tego typu nowotworów.

Przeprowadzone badania sugerują, że obecność grup funkcyjnych zawierających tlen, w tym ich liczba i rodzaj, może być najważniejszą cechą badanych płatków grafenowych dla ich przyszłego zastosowania w obszarze medycyny klinicznej. Z czterech badanych materiałów trudno jest wytypować jeden najlepszy. Uzyskane wyniki udowadniają, że materiały węglowe mają ogromny potencjał biologiczny, ale mechanizmy ich działania w dalszym ciągu są niejasne.

9. Wnioski

1. Zastosowanie różnych metod produkcji (chemiczne/fizyczne) zredukowanych tlenków grafenu pozwoliło na uzyskanie materiałów o odmiennych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych w stosunku do komórek nowotworowych glejaka IV stopnia.
2. Płatki grafenu oraz zredukowanych tlenków grafenu poprzez tendencję do przylegania do błony komórek glejaka IV stopnia U87 *in vitro* wywołują efekt cytotoksyczny związany ze spadkiem aktywności metabolicznej i w konsekwencji aktywacją apoptozy na drodze zależnej od wewnątrzkomórkowego szlaku mitochondrialnego.
3. Płatki grafenu i jego pochodne wpływają na ekspresję genów kanałów jonowych zależnych od napięcia, uczestniczących w elektro-chemicznych szlakach sygnałowych w komórkach glejaka IV stopnia linii U87, odpowiedzialnych za napływ jonów sodu i alkalizację cytoplazmy, co może doprowadzić do aktywacji apoptozy w komórkach.
4. Obniżenie ekspresji białka uPar oraz endogliny (CD105) oraz zwiększenie ekspresji na poziomie mRNA *integryny* $\alpha 5$ i na poziomie białka integryny $\beta 1$ i spadek ekspresji β -kateniny na poziomie mRNA i białka w komórkach glejaka linii U87 po traktowaniu płatkami grafenowymi może być mechanizmem stymulującym adhezję komórek i prowadzić do zmniejszenia migracji komórek nowotworowych.
5. Płatki zredukowanego tlenku grafenu obniżają ekspresję białka FAK w komórkach glejaka IV stopnia, co może wpływać na obniżenie proliferacji i migracji tych komórek.

10. Bibliografía:

1. Aoudjit, F.; Vuori, K. Integrin Signaling in Cancer Cell Survival and Chemoresistance. *Chemother. Res. Pract.* 2012, 2012, 283181.
2. Arrebola, F.; Fernández-Segura, E.; Campos, A.; Crespo, P.V.; Skepper, J.N.; Warley, A. Changes in intracellular electrolyte concentrations during apoptosis induced by UV irradiation of human myeloblastic cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006, 290, C638–C649.
3. Arrebola, F.; Zabiti, S.; Cañizares, F.J.; Cubero, M.A.; Crespo, P.V.; Fernández-Segura, E. Changes in intracellular sodium, chlorine, and potassium concentrations in staurosporine-induced apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 2005, 204, 500–507.
4. Barinov, A.; Gregoratti, L.; Dudin, P.; La Rosa, S.; Kiskinova, M. Imaging and Spectroscopy of Multiwalled Carbon Nanotubes during Oxidation: Defects and Oxygen Bonding. *Adv. Mater.* 2009, 21, 1916–1920.
5. Biasiotta, A.; D’Arcangelo, D.; Passarelli, F.; Nicodemi, E.M.; Facchiano, A. Ion channels expression and function are strongly modified in solid tumors and vascular malformations. *J. Transl. Med.* 2016, 14, 285.
6. Bondar, O.V.; Saifullina, D.V.; Shakhmaeva, I.I.; Mavlyutova, I.I.; Abdullin, T.I. Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. *Acta Nat.* 2012, 4, 78–81.
7. Bondar, O.V.; Saifullina, D.V.; Shakhmaeva, I.I.; Mavlyutova, I.I.; Abdullin, T.I. Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. *Acta Nat.* 2012, 4, 78–81.
8. Bordes, E.; Morcos, B.; Bourgogne, D.; Andanson, J.-M.; Bussière, P.-O.; Santini, C.C.; Benayad, A.; Gomes, M.C.; Pádua, A.A.H. Corrigendum: Dispersion and Stabilization of Exfoliated Graphene in Ionic Liquids. *Front. Chem.* 2020, 8, 556.
9. Brami-Cherrier, K.; Gervasi, N.; Arsenieva, D.; Walkiewicz, K.; Bouterin, M.; Ortega, A.; Leonard, P.G.; Seantier, B.; Gasmi, L.; Bouceba, T.; et al. FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. *EMBO J.* 2014, 33, 356–370.
10. Bratton, S.B.; Salvesen, G.S. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J. Cell Sci.* 2010;123:3209–3214.
11. Canel, M.; Secades, P.; Rodrigo, J.-P.; Cabanillas, R.; Herrero, A.; Suarez, C.; Chiara, M.-D. Overexpression of Focal Adhesion Kinase in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Independent of fak Gene Copy Number. *Clin. Cancer Res.* 2006, 12, 3272–3279.
12. Canel, M.; Serrels, A.; Miller, D.; Timpson, P.; Serrels, B.; Frame, M.C.; Brunton, V.G. Quantitative in vivo imaging of the effects of inhibiting integrin signaling via Src and FAK on cancer cell movement: Effects on E-cadherin dynamics. *Cancer Res.* 2010, 70, 9413–9422.
13. Chang, Y.; Yang, S.T.; Liu, J.H. et al. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol Lett.* 2011;200:201–210.
14. Chen, M.S.; Woodward, W.; Behbod, F.; Peddibhotla, S.; Alfaro, M.P.; Buchholz, T.A.; Rosen, J.M. Wnt/ β -catenin mediates radiation resistance of Scal⁺ progenitors in an immortalized mammary gland cell line. *J. Cell Sci.* 2007, 120, 468–477.
15. Chwalibog, A.; Jaworski, S.; Sawosz, E.; Grodzik, M.; Winnicka, A.; Prasek, M.; Wierzbicki, M. In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells. *Int. J. Nanomed.* 2013, 8, 413–420.

16. Cone, C.D. Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. *J. Theor. Biol.* 1971, 30, 151–181.
17. Delettre, C.; Yuste, V.J.; Moubarak, R.S.; Bras, M.; Lesbordes-Brion, J.C.; Petres, S.; Bellalou, J.; Susin, S.A. AIFsh, a novel apoptosis-inducing factor (AIF) pro-apoptotic isoform with potential pathological relevance in human cancer. *J. Biol. Chem.* 2006;281:6413–6427.
18. Emiru, T.F.; Ayele, D.W. Controlled synthesis, characterization and reduction of graphene oxide: A convenient method for large scale production. *Egypt. J. Basic Appl. Sci.* 2017, 4, 74–79.
19. Fernández-Segura, E.; Cañizares, F.J.; Cubero, M.A.; Warley, A.; Campos, A. Changes in Elemental Content During Apoptotic Cell Death Studied by Electron Probe X-Ray Microanalysis. *Exp. Cell Res.* 1999, 253, 454–462.
20. Formolo, C.A.; Williams, R.; Gordish-Dressman, H.; MacDonald, T.J.; Lee, N.H.; Hathout, Y. Secretome Signature of Invasive Glioblastoma Multiforme. *J. Proteome Res.* 2011, 10, 3149–3159.
21. Gao, W. *The Chemistry of Graphene Oxide*; Springer International Publishing: Basel, Switzerland, 2015.
22. Garrido, C.; Galluzzi, L.; Brunet, M.; Puig, P.E.; Didelot, C.; Kroemer, G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 2006;13:1423–1433.
23. Gingras, M.C.; Roussel, E.; Bruner, J.M.; Branch, C.D.; Moser, R.P. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J. Neuroimmunol.* 1995, 57, 143–153.
24. Han, Y.G.; Xu, J.; Li, Z.G.; Ren, G.G.; Yang, Z. In vitro toxicity of multi-walled carbon nanotubes in C6 rat glioma cells. *Neurotoxicology.* 2012;33:1128–1134.
25. Hatoum, A.; Mohammed, R.; Zakieh, O. The unique invasiveness of glioblastoma and possible drug targets on extracellular matrix. *Cancer Manag. Res.* 2019, 11, 1843–1855.
26. Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed.; Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, MA, USA, 2001; ISBN 0878933212.
27. 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. *Int. J. Nanomed.* 2014, 9, 2409–2417.
28. Hong, S.; Bi, M.; Wang, L.; Kang, Z.; Ling, L.; Zhao, C. CLC-3 channels in cancer (Review). *Oncol. Rep.* 2015, 33, 507–514.
29. Høyer-Hansen, G.; Behrendt, N.; Ploug, M.; Danø, K.; Preissner, K.T. The intact urokinase receptor is required for efficient vitronectin binding: Receptor cleavage prevents ligand interaction. *FEBS Lett.* 1997, 420, 79–85.
30. Høyer-Hansen, G.; Rønne, E.; Solberg, H.; Behrendt, N.; Ploug, M.; Lund, L.R.; Ellis, V.; Danø, K. Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 18224–18229.
31. Hynes, R.O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 2002, 110, 673–687.
32. Janouskova, H.; Maglott, A.; Leger, D.Y.; Bossert, C.; Noulet, F.; Guerin, E.; Guenot, D.; Pinel, S.; Chastagner, P.; Plenat, F.; et al. Integrin $\alpha 5\beta 1$ Plays a Critical Role in

- Resistance to Temozolomide by Interfering with the p53 Pathway in High-Grade Glioma. *Cancer Res.* 2012, 72, 3463–3470.
33. Jaworski, S.; Sawosz, E.; Grodzik, M.; Winnicka, A.; Prasek, M.; Wierzbicki, M.; Chwalibog, A. In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells. *Int. J. Nanomed.* 2013, 8, 413–420.
 34. Jaworski, S.; Sawosz, E.; Grodzik, M.; Winnicka, A.; Prasek, M.; Wierzbicki, M.; Chwalibog, A. In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells. *Int. J. Nanomed.* 2013, 8, 413–420.
 35. Jaworski, S.; Sawosz, E.; Kutwin, K.; 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. *Int. J. Nanomed.* 2015, 10, 1585–1596.
 36. Jaworski, S.; Sawosz, E.; Kutwin, M.; Wierzbicki, M.; Hinzmann, M.; Grodzik, M.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Włodyga, K.; Chwalibog, A. In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma. *Int. J. Nanomed.* 2015, 10, 1585–1596.
 37. 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.
 38. Johnstone, B.M. Micro-Electrode Penetration of Ascites Tumour Cells. *Nature* 1959, 183, 411.
 39. Joshi, A.D.; Parsons, D.W.; Velculescu, V.E.; Riggins, G.J. Sodium ion channel mutations in glioblastoma patients correlate with shorter survival. *Mol. Cancer* 2011, 10, 17.
 40. Koinuma, M.; Tateishi, H.; Hatakeyama, K.; Miyamoto, S.; Ogata, C.; Funatsu, A.; Taniguchi, T.; Matsumoto, Y. Analysis of Reduced Graphene Oxides by X-ray Photoelectron Spectroscopy and Electrochemical Capacitance. *Chem. Lett.* 2013, 42, 924–926.
 41. Lan, Y.; Zondode, M.; Deng, H.; Yan, J.-A.; Ndaw, M.; Lisfi, A.; Wang, C.; Pan, Y.-L. Basic Concepts and Recent Advances of Crystallographic Orientation Determination of Graphene by Raman Spectroscopy. *Crystals* 2018, 8, 375.
 42. Levičar, N.; Nutall, R.; Lah, T. Proteases in Brain Tumour Progression. *Acta Neurochir.* 2003, 145, 1023.
 43. Lipinski, C.A.; Tran, N.L.; Bay, C.; Kloss, J.M.; McDonough, W.S.; Beaudry, C.; Berens, M.E.; Loftus, J.C. Differential role of proline-rich tyrosine kinase 2 and focal adhesion kinase in determining glioblastoma migration and proliferation. *Mol. Cancer Res.* MCR 2003, 1, 323–332.
 44. Loryuenyong, V.; Totepvimarn, K.; Eimburanaprat, P.; Boonchompoo, W.; Buasri, A. Preparation and Characterization of Reduced Graphene Oxide Sheets via Water-Based Exfoliation and Reduction Methods. *Adv. Mater. Sci. Eng.* 2013, 2013, 923403.
 45. Lui, V.C.H.; Lung, S.S.S.; Pu, J.K.S.; Hung, K.N.; Leung, G.K.K. Invasion of human glioma cells is regulated by multiple chloride channels including ClC-3. *Anticancer Res.* 2010, 30, 4515–4524.
 46. Markovic, Z.M.; Harhaji-Trajkovic, L.; Marković, B.T.; Kepić, D.; Arsić, K.M.; Jovanović, S.P.; Pantovic, A.C.; Dramicanin, M.; Trajkovic, V. In vitro comparison of

- the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes. *Biomaterials* 2011, 32, 1121–1129.
47. Markovic, Z.M.; Ristic, B.Z.; Arsikin, K.M.; Klisic, D.G.; Harhaji-Trajkovic, L.M.; Todorovic-Markovic, B.M.; Kepic, D.P.; Kravic-Stevovic, T.K.; Jovanovic, S.P.; Milenkovic, M.M. et al. Graphene quantum dots as autophagy-inducing photodynamic agents. *Biomaterials*. 2012;33:7084–7092.
 48. Marmo, A.A.; Morris, D.M.; Schwalke, M.A.; Iliev, I.G.; Rogers, S. Electrical Potential Measurements in Human Breast Cancer and Benign Lesions. *Tumor Biol.* 1994, 15, 147–152.
 49. Marmo, A.A.; Morris, D.M.; Schwalke, M.A.; Iliev, I.G.; Rogers, S. Electrical Potential Measurements in Human Breast Cancer and Benign Lesions. *Tumor Biol.* 1994, 15, 147–152.
 50. Matsuyama, S.; Reed, J.C. Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death Differ.* 2000, 7, 1155–1165.
 51. Mitra, S.K.; Hanson, D.A.; Schlaepfer, D.D. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, 6, 56–68.
 52. Molenaar, R.J. Ion channels in glioblastoma. *ISRN Neurol.* 2011, 2011, 590249.
 53. Molenaar, R.J. Ion Channels in Glioblastoma. *ISRN Neurol.* 2011, 2011, 590249.
 54. Montuori, N.; Cosimato, V.; Rinaldi, L.; Rea, V.E.A.; Alfano, D.; Ragno, P. uPAR regulates pericellular proteolysis through a mechanism involving integrins and fMLF-receptors. *Thromb. Haemost.* 2013, 109, 309–318.
 55. Moore, T.L.; Podilakrishna, R.; Rao, A.; Alexis, F. Systemic administration of polymer-coated nano-graphene to deliver drugs to glioblastoma. *Part. Part. Syst. Charact.* 2014;31:886–894.
 56. Muenzner, P.; Rohde, M.; Kneitz, S.; Hauck, C.R. CEACAM engagement by human pathogens enhances cell adhesion and counteracts bacteria-induced detachment of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 2005, 170, 825–836.
 57. Mukhtar, E.; Adhami, V.M.; Khan, N.; Mukhtar, H. Apoptosis and Autophagy Induction As Mechanism of Cancer Prevention by Naturally Occuring Dietary Agents. *Curr. Drug Targets.* 2012;13:1831–1841.
 58. Nelson, W.J.; Nusse, R. Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science* 2004, 303, 1483–1487.
 59. Novoselov, K.S.; Geim, A.K.; Morozov, S.V.; Jiang, D.; Katsnelson, M.I.; Grigorieva, I.V.; Dubonos, S.V.; Firsov, A.A. Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene. *Nature* 2005, 438, 197–200.
 60. Oh, W.C.; Zhang, F.J. Preparation and characterization of graphene oxide reduced from a mild chemical method. *Asian J. Chem.* 2011, 23, 875–879.
 61. Ohnishi, T.; Arita, N.; Hiraga, S.; Taki, T.; Izumoto, S.; Fukushima, Y.; Hayakawa, T. Fibronectin-mediated cell migration promotes glioma cell invasion through chemokinetic activity. *Clin. Exp. Metastasis* 1997, 15, 538–546.
 62. Ou, L.; Lin, S.; Song, B.; Liu, J.; Lai, R.; Shao, L. The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: A review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. *Int. J. Nanomed.* 2017;12:6633–6646.
 63. Ou, L.; Song, B.; Liang, H.; Liu, J.; Feng, X.; Deng, B.; Sun, T.; Shao, L. Toxicity of graphene-family nanoparticles: A general review of the origins and mechanisms. *Part. Fibre Toxicol.* 2016;13:57.

64. Ouwerkerk, R.; Jacobs, M.A.; Macura, K.J.; Wolff, A.C.; Stearns, V.; Mezban, S.D.; Khouri, N.F.; Bluemke, D.A.; Bottomley, P.A. Elevated tissue sodium concentration in malignant breast lesions detected with non-invasive ²³Na MRI. *Breast Cancer Res. Treat.* 2007, 106, 151–160.
65. Pan, M.; Zhang, Y.; Shan, C.; Zhang, X.; Gao, G.; Pan, B. Flat Graphene-Enhanced Electron Transfer Involved in Redox Reactions. *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51, 8597–8605.
66. Parsons, D.W.; Jones, S.; Zhang, X.; Lin, J.C.-H.; Leary, R.J.; Angenendt, P.; Mankoo, P.; Carter, H.; Siu, I.-M.; Gallia, G.L.; et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* 2008, 321, 1807–1812.
67. Paul, C.D.; Mistriotis, P.; Konstantopoulos, K. Cancer cell motility: Lessons from migration in confined spaces. *Nat. Rev. Cancer* 2017, 17, 131–140.
68. Poët, M.; Kornak, U.; Schweizer, M.; Zdebik, A.A.; Scheel, O.; Hoelter, S.; Wurst, W.; Schmitt, A.; Fuhrmann, J.C.; Planells-Cases, R.; et al. Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CIC-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 13854–13859.
69. Pollak, J.; Rai, K.G.; Funk, C.C.; Arora, S.; Lee, E.; Zhu, J.; Price, N.D.; Paddison, P.J.; Ramirez, J.-M.; Rostomily, R.C. Ion channel expression patterns in glioblastoma stem cells with functional and therapeutic implications for malignancy. *PLoS ONE* 2017, 12, e0172884.
70. Quail, D.F.; Joyce, J.A. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* 2017, 31, 326–341.
71. Radaelli, G.; Heredia-Guerrero, J.A.; Masood, M.T.; Ceseracciu, L.; Davis, A.; Carzino, R.; Prato, M.; Bayer, I.S.; Athanassiou, A. Highly Effective Antiadhesive Coatings from pH-Modified Water-Dispersed Perfluorinated Acrylic Copolymers: The Case of Vulcanizing Rubber. *Adv. Mater. Interfaces* 2016, 3, 1600069.
72. Raghu, H.; Lakka, S.S.; Gondi, C.S.; Mohanam, S.; Dinh, D.H.; Gujrati, M.; Rao, J.S. Suppression of uPA and uPAR Attenuates Angiogenin Mediated Angiogenesis in Endothelial and Glioblastoma Cell Lines. *PLoS ONE* 2010, 5, e12458.
73. Rao, J.S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: The role of proteases. *Nat. Cancer* 2003, 3, 489–501.
74. Reya, T.; Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005, 434, 843–850.
75. Riemenschneider, M.J.; Mueller, W.; Betensky, R.A.; Mohapatra, G.; Louis, D.N. In Situ Analysis of Integrin and Growth Factor Receptor Signaling Pathways in Human Glioblastomas Suggests Overlapping Relationships with Focal Adhesion Kinase Activation. *Am. J. Pathol.* 2005, 167, 1379–1387.
76. Sawosz, E.; Jaworski, S.; Kutwin, M.; Hotowy, A.; Wierzbicki, M.; Grodzik, M.; Kurantowicz, N.; Strojny, B.; Lipinska, L.; Chwalibog, A. Toxicity of pristine graphene in experiments in a chicken embryo model. *Int. J. Nanomed.* 2014;9:3913–3922.
77. Schaller, M.D. Cellular functions of FAK kinases: Insight into molecular mechanisms and novel functions. *J. Cell Sci.* 2010, 123, 1007–1013.
78. Shannon, S.; Vaca, C.; Jia, D.; Entersz, I.; Schaer, A.; Carcione, J.; Weaver, M.; Avidar, Y.; Pettit, R.; Nair, M.; et al. Dexamethasone-Mediated Activation of Fibronectin Matrix Assembly Reduces Dispersal of Primary Human Glioblastoma Cells. *PLoS ONE* 2015, 10, e0135951.

79. Simon, O.J.; Müntefering, T.; Grauer, O.; Meuth, S.G. The role of ion channels in malignant brain tumors. *J. Neuro-Oncol.* 2015, 125, 225–235.
80. Skepper, J.N.; Karydis, I.; Garnett, M.R.; Hegyi, L.; Hardwick, S.J.; Warley, A.; Mitchinson, M.J.; Cary, N.R.B. Changes in elemental concentrations are associated with early stages of apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein: An X-ray microanalytical study. *J. Pathol.* 1999, 188, 100–106.
81. Skoda, M.; Dudek, I.; Jarosz, A.; Szukiewicz, D. Graphene: One Material, Many Possibilities-Application Difficulties in Biological System. *J. Nanomater.* 2014, 2014, 890246.
82. Smith, S.J.; Tilly, H.; Ward, J.H.; MacArthur, D.C.; Lowe, J.; Coyle, B.; Grundy, R.G. CD105 (Endoglin) exerts prognostic effects via its role in the microvascular niche of paediatric high grade glioma. *Acta Neuropathol.* 2012, 124, 99–110.
83. Sontheimer, H. An Unexpected Role for Ion Channels in Brain Tumor Metastasis. *Exp. Biol. Med.* 2008, 233, 779–791.
84. Sosnowska, M.; Kutwin, M.; Strojny, B.; Wierzbicki, M.; Cysewski, D.; Szczepaniak, J.; Ficek, M.; Koczoń, P.; Jaworski, S.; Chwalibog, A.; et al. Diamond Nanofilm Normalizes Proliferation and Metabolism in Liver Cancer Cells. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2021, 14, 115–137.
85. Szala, S.; Jarosz, M.; Smolarczyk, R.; Cichoń, T. “Vicious circles” of glioblastoma tumors: Vascularization and invasiveness. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2012, 66, 888–900.
86. Tokuoka, S.; Morioka, H. The membrane potential of the human cancer and related cells. *I. Gan* 1957, 48, 353–354.
87. Trpkovic, A.; Todorovic-Markovic, B.; Trajkovic, V. Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: Mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress. *Arch. Toxicol.* 2012;86:1809–1827.
88. Van Gurp, M.; Festjens, N.; Van Loo, G.; Saelens, X.; Vandenabeele, P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;304:487–497.
89. Varricchio, A.; Ramesh, S. A.; Yool, A. J. Novel Ion Channel Targets and Drug Delivery Tools for Controlling Glioblastoma Cell Invasiveness. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22(21), 11909.
90. Verhaak, R.G.; Hoadley, K.A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M.D.; Miller, C.R.; Ding, L.; Golub, T.; Mesirov, J.P.; et al. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010, 17, 98–110.
91. Wang, C.-Y.; Lai, M.-D.; Phan, N.N.; Sun, Z.; Lin, Y.-C. Meta-Analysis of Public Microarray Datasets Reveals Voltage-Gated Calcium Gene Signatures in Clinical Cancer Patients. *PLoS ONE* 2015, 10, e0125766.
92. Wang, R.; Gurguis, C.I.; Gu, W.; Ko, E.A.; Lim, I.; Bang, H.; Zhou, T.; Ko, J.-H. Ion channel gene expression predicts survival in glioma patients. *Sci. Rep.* 2015, 5, 11593.
93. 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. Nanomed.* 2017, 12, 7241–7254.

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW w tym w Archiwum Prac Dyplomowych SGGW

Jawostaw Szerepiński
.....
(czytelny podpis autora pracy)

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW po roku ...¹

.....
(czytelny podpis autora pracy)

¹ W przypadku pracy dotowanej przez firmę z zewnątrz postulującą klauzulę tajności

94. Xiao, M.; Li, X.; Song, Q.; Zhang, Q.; Lazzarino, M.; Cheng, G.; Severino, F.P.U.; Torre, V. A Fully 3D Interconnected Graphene–Carbon Nanotube Web Allows the Study of Glioma Infiltration in Bioengineered 3D Cortex-Like Networks. *Adv. Mater.* 2018, 30, e1806132.
95. Yang, M.; Brackenbury, W.J. Membrane potential and cancer progression. *Front. Physiol.* 2013, 4, 185.
96. Zakrzewska, K.E.; Samluk, A.; Wierzbicki, M.; Jaworski, S.; Kutwin, M.; Sawosz E.; Chwalibog, A.; Pijanowska, D.G.; Pluta, K.D. Analysis of the cytotoxicity of carbon-based nanoparticles, diamond and graphite, in human glioblastoma and hepatoma cell lines. *PLoS ONE.* 2015;10:e0122579.
97. Zhang, J.; Huang, K.; Shi, Z.; Zou, J.; Wang, Y.; Jia, Z.; Zhang, A.; Han, L.; Yue, X.; Liu, N. et al. High β -catenin/Tcf-4 activity confers glioma progression via direct regulation of AKT2 gene expression. *Neuro-Oncology* 2011, 13, 600–609.
98. Zhang, Y.; Cruickshanks, N.; Yuan, F.; Wang, B.; Patuski, M.; Wulfschlegel, J.; Gallagher, I.; Koepf, A.F.; Hatfield, S.; Papanicolaou, C.; et al. Targetable T-type Calcium Channels Drive Glioblastoma. *Cancer Res.* 2017, 77, 3479–3490.

11. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej



Article

Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme

Jaroslav Szczepaniak ¹, Barbara Strojny ¹, Ewa Sawosz Chwalibog ¹, Slawomir Jaworski ¹, Joanna Jagiello ², Magdalena Winkowska ², Maciej Szmidt ³, Mateusz Wierzbicki ¹, Malwina Sosnowska ¹, Jasmina Balaban ¹, Anna Winnicka ⁴, Ludwika Lipinska ², Olga Witkowska Pilaszewicz ⁴ and Marta Grodzik ^{1,*}

- ¹ Department of Animal Nutrition and Biotechnology, Faculty of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; jaroslav_szczepaniak@sggw.pl (J.S.); barbara_strojny@sggw.pl (B.S.); ewa_sawosz@sggw.pl (E.S.C.); slawomir_jaworski@sggw.pl (S.J.); mateusz_wierzbicki@sggw.pl (M.W.); malwina_sosnowska@sggw.pl (M.S.); jasmina_balaban@sggw.pl (J.B.); ludwika_lipinska@itme.edu.pl (L.L.)
 - ² Department of Chemical Synthesis and Flake Graphene, Institute of Electronic Materials Technology, 01-919 Warsaw, Poland; joanna_jagiello@itme.edu.pl (J.J.); magdalena.winkowska@itme.edu.pl (M.W.); ludwika_lipinska@itme.edu.pl (L.L.)
 - ³ Department of Morphologic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; Maciej.Szmidt@Acurian.com
 - ⁴ Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; anna_winnicka@sggw.pl (A.W.); olga_witkowska_pilaszewicz@sggw.pl (O.W.P.)
- * Correspondence: marta_grodzik@sggw.pl; Tel.: +48-22-5936673

Received: 20 November 2018; Accepted: 2 December 2018; Published: 7 December 2018



Abstract: Graphene (GN) and its derivatives (rGOs) show anticancer properties in glioblastoma multiforme (GBM) cells in vitro and in tumors in vivo. We compared the anti-tumor effects of rGOs with different oxygen contents with those of GN, and determined the characteristics of rGOs useful in anti-glioblastoma therapy using the U87 glioblastoma line. GN/ExF, rGO/Term, rGO/ATS, and rGO/TUD were structurally analysed via transmission electron microscopy, Raman spectroscopy, FTIR, and AFM. Zeta potential, oxygen content, and electrical resistance were determined. We analyzed the viability, metabolic activity, apoptosis, mitochondrial membrane potential, and cell cycle. Caspase- and mitochondrial-dependent apoptotic pathways were investigated by analyzing gene expression. rGO/TUD induced the greatest decrease in the metabolic activity of U87 cells. rGO/Term induced the highest level of apoptosis compared with that induced by GN/ExF. rGO/ATS induced a greater decrease in mitochondrial membrane potential than GN/ExF. No significant changes were observed in the cytometric study of the cell cycle. The effectiveness of these graphene derivatives was related to the presence of oxygen-containing functional groups and electron clouds. Their cytotoxicity mechanism may involve electron clouds, which are smaller in rGOs, decreasing their cytotoxic effect. Overall, cytotoxic activity involved depolarization of the mitochondrial membrane potential and the induction of apoptosis in U87 glioblastoma cells.

Keywords: reduced graphene oxide; brain tumor; glioblastoma multiforme; JC-1; cell cycle; apoptosis

1. Introduction

In 2004, a group of scientists led by Geim and Novoselov discovered stable free graphene, a material previously known only in theory. Geim and Novoselov obtained a graphene layer via mechanical exfoliation [1]. This marked the beginning of the “graphene era”, which continues to

this day. Research has been focused on creating new methods for the production, modification, and advantageous application of this material in the technical, biological, and medical fields.

Reduced graphene oxide (rGO) and graphene oxide (GO) are derivatives of graphene (GN). Graphene has a perfect crystal lattice structure, sp^2 hybridization, and numerous useful properties. These properties include a high electrical conductivity, inherent mechanical strength, and the ability to absorb white light. In comparison, GO is highly hydrophilic due to the presence of oxygen groups and therefore can form stable aqueous suspension. rGO has more oxygen groups than GN, but less than GO. Therefore, rGO is less hydrophilic than GO, but also has a higher electrical conductivity. [1,2].

In addition to the numerous applications of these materials in electronics, energetics, sensors, and filtration, graphene plates and their derivatives are also being assessed for use in medicine, such as in cancer treatment [3,4]. Glioblastoma multiforme (GBM) has an astrocytic origin and is a malignant primary tumor of the brain. It represents the most commonly occurring cancer of the central nervous system and is usually grade IV histologically. The most important features of this type of cancer are the presence of necrotic areas and characteristic vascularization (numerous microvessels and glomerular vessels), as well as the presence of atypical cells, nuclear pleomorphism, and high proliferative activity of malignant cells [5]. The type and place of glioblastoma growth render this tumor incurable. The average incidence rate of GBM is 3.19 per 100,000 persons per year, and the average overall survival after diagnosis is approximately 15 months [6]. Our previous study has shown that graphene and its derivatives can be cytotoxic to glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. Upon entering, GN, GO, and rGO induced apoptosis, and reduced cell viability and proliferation, in the U87 and U118 glioblastoma cell lines. GN, GO, and rGO also reduced the mass and volume of tumors cultured on chorioallantoic membranes. However, these compounds differ in strength; the most active is GN, the next is rGO, and the least active is GO [7,8]. Moreover, depending on the method of production, graphene-derived materials can be modified to have a wide range of characteristics, including different sized flakes, numbers and types of functional groups, numbers of defects, and hydrophobicity and electrical properties [9].

Graphene-based materials are expected to lead a revolution in medicine, but they are also associated with difficulties such as protein corona formation, the EPR (Enhanced Permeability and Retention) effect, and biodistribution [10]. In biological environments, graphene flakes can interact with the components of the physiological medium, which may induce radical changes in the size, shape, or chemistry of the surface flakes. Within the blood stream, the flakes can interact with cell membranes and induce reactive oxygen species, resulting in haemolysis [11]. It has been shown that rGO induced a toxic effect on endothelial cells [12]. The location of the glioma means that this tumor is treated in a different way than is traditional, like intravenously or intra-arterially. Active substances can be efficiently used with direct stereotactic injections into the tumor, or by using biomaterials supersaturated with these molecules, which intraoperative are located in a lodge after tumor reception [13]. Unconventional drug delivery causes the most common difficulties, in which nanomaterials distribution does not occur.

In the present study, we characterized three forms of rGO plates prepared from the same GO. We also investigated whether materials included in the rGO groups exert the same biological effects on glioblastoma multiforme cells, and how these effects compare with those of pure graphene.

We hypothesized that rGO does not exert identical effects on cells, but that the anti-cancer effect is likely greater compared with that of pure graphene. Effectiveness was examined by assessing viability, metabolic activity, cell cycle dynamics, and level of apoptosis. In the final stage of analysis, we examined gene expression involved in apoptosis and the cell cycle. Using these results, we sought to determine whether it is possible to identify the characteristics of rGO flakes that may be useful in anti-glioblastoma therapy. Our results indicate that it is possible to determine which pathway of apoptosis activation occurs in cells treated with these materials, and whether this same pathway is induced by all the examined materials.

2. Results and Discussion

In this study, we aimed to determine the cytotoxicity of pure graphene flakes (GN) and compare it with that of reduced graphene oxide flakes (rGO) produced by various methods. We also aimed to determine the pathway of cell death induced by the administration of these materials, and whether it is associated with a loss of mitochondrial membrane potential or with blocking the individual phases of the cell cycle.

2.1. Physicochemical Characterization of GN and rGO Flakes

The same graphene oxide (GO) was used as the primary material for the production of reduced graphene oxides via different chemical methods. The use of the same primary material does not lead to the formation of identical products. Therefore, physicochemical analyses (Raman radiation scattering, analysis of the morphology of the materials via transmission electron microscopy, elemental analysis, resistivity measurements, and measurements of zeta potential) were performed to examine the characteristics of the derived products.

The quality of the prepared materials was examined using Raman spectroscopy. This is based on analysis of the three main peaks in the spectra of graphene and reduced graphene oxides, as well as the peak position, peak width, and relative intensity ratio (I_D/I_G). These main bands are designated as D, G, and 2D, and are centered at 1350 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} , and 2680 cm^{-1} , respectively [14]. The results of Raman spectroscopic analysis (Figure 1) confirmed that GN/ExF belonged to graphene, and rGO/Term, rGO/ATS, and rGO/TUD belonged to reduced graphene oxides. The incorporation of GN/ExF graphene into graphene materials was confirmed based on existing data from the literature; G and 2D bands were observed at 1580 cm^{-1} and 2700 cm^{-1} , respectively. rGO/Term, rGO/ATS, and rGO/TUD were confirmed as reduced graphene oxides based on D and G bands appearing at 1350 cm^{-1} and 1580 cm^{-1} , respectively (also based on existing data in the literature). The G-band in Raman spectra corresponds to the C-C chains of carbon atoms. The D-band is correlated with structural defects, such as holes, rotated carbon bonds, or deformed rings, and with chemical defects corresponding to oxy-functional groups (carbonyl and hydroxyl) attached to the planar carbon lattice and edges. When the oxygen content is decreased, which results from the more efficient reduction of graphene oxide, the intensity ratio I_D/I_G increases. This can correspond to the appearance of numerous (but small) restored sp^2 regions. The size of defect-free sp^2 regions is inversely related to the ratio of D band intensity to G band intensity (I_D/I_G), and to the full width at half-maximum (FWHM) of the G band [15,16]. Based on the G band width and I_D/I_G ratio, one can assume that the sp^2 clusters grow larger and the I_D/I_G increases, while the G band becomes narrower, than those in the initial GO (79 cm^{-1}): rGO/Term 71.96 cm^{-1} , rGO/ATS 68.84 cm^{-1} , and rGO/TUD 59.18 cm^{-1} [17–19]. These results are shown in Figure 1.

Moreover, Raman measurement can provide information about the number of graphene layers. It can be estimated after 2D peak deconvolution, its shape and intensity (compared to the intensity of G peak) analysis. However, it cannot be used for GO and rGO materials, but for less defected graphene (e.g., exfoliated graphite or CVD graphene) [14]. The Raman spectrum of GN/ExF indicates that this graphene-like material consists of about 5–10 layers as the 2D peak can be split into two peaks and its intensity is two times lower than that of the G peak.

Three samples of rGO were prepared by the reduction of GO, so the number of layers of these materials is the same as that of GO flakes. Due to a strong tendency to agglomeration of rGO flakes, AFM measurements were only conducted for starting material (GO). The AFM measurement is shown in Figure 2. The thickness of GO flakes is about 2.5–2.7 nm, which corresponds to two-layer GO flakes.

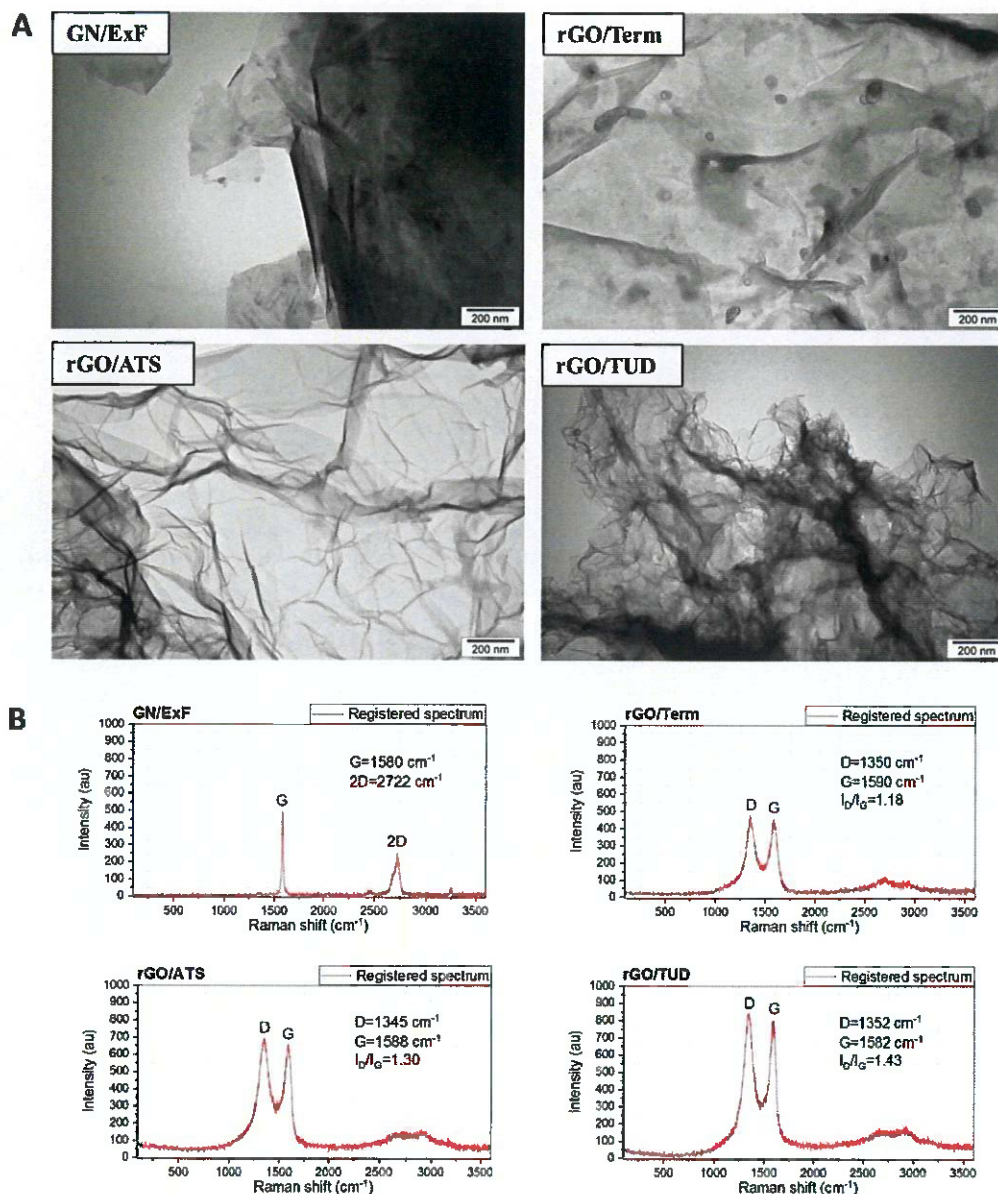


Figure 1. Transmission electron microscopy (TEM) images and Raman spectra of GN and rGO flakes. (A) Images of GN/ExF flakes and three types of rGO (rGO/ATS, rGO/Term, and rGO/TUD). (B) Spectra consist of three bands: D band located at $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$, G band at $\sim 1580\text{ cm}^{-1}$, and 2D band at $\sim 2700\text{ cm}^{-1}$. G band is characteristic of each graphene sample. The appearance of the D-band is typical of rGO samples because some oxygen functional groups remain after the reduction of GO. A strong 2D band only appears for graphene (GN); for rGOs, the 2D band occurs as a weak and broad signal. **Abbreviations:** rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene.

Three samples of rGO were prepared by the reduction of GO, so the number of layers of these materials is the same as that of GO flakes. Due to a strong tendency to agglomeration of rGO flakes, AFM measurements were only conducted for starting material (GO). The AFM measurement is shown in Figure 2. The thickness of GO flakes is about 2.5–2.7 nm, which corresponds to two-layer GO flakes.

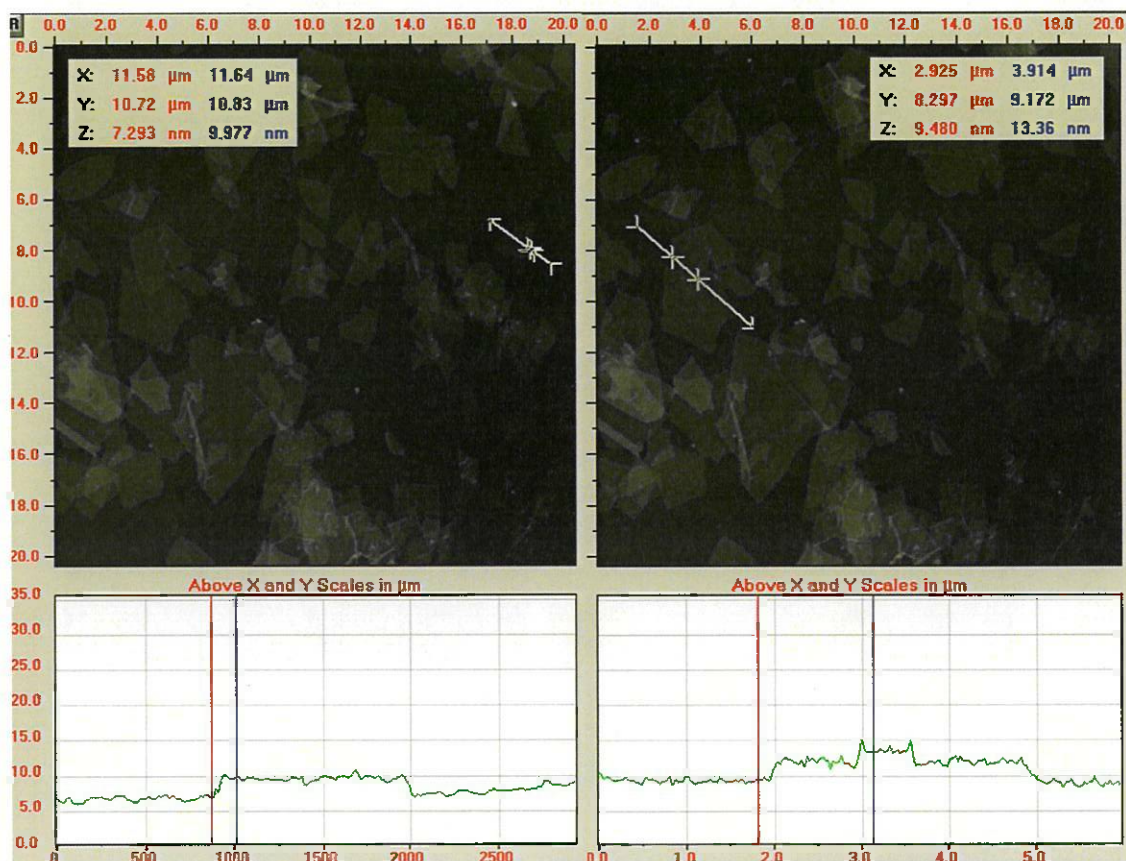


Figure 2. AFM measurement of GO flakes. X and Y scales are in μm and Z scale is in nm. Z axis corresponds to GO flake thickness. Left profile shows the thickness of a single GO flake (2.7 nm) and the right shows the GO thickness of a single flake (2.5 nm) and two flakes that overlap (3.4 nm). **Abbreviations:** AFM, atomic force microscope; GO, graphene oxide.

TEM analysis was used to assess the morphology of the flakes of rGO and GN. Figure 1A shows the representative microscopic images. In reduced graphene oxides (rGO/ATS and rGO/TUD), strong corrugation of the imaged flakes was visible. Oh and Zhang also confirmed that graphene and reduced graphene oxides most often occur in the form of more or less corrugated, single, or multilayer flakes [20]. The shapes of the flakes of GN and rGO were irregular, and their edges were often jagged. All of the graphene derivatives investigated in this study were able to agglomerate. Suparut and Somchai confirmed that nanosheets of graphene are similar to wavy veils, rippling and entangling with each other. They are transparent and stable under an electron beam, which is used to confirm the existence of two-dimensional graphene nanosheets [21]. In the TEM image, dark areas indicated the dense nanostructure of several graphene layers or reduced graphene oxides. Higher areas of transparency indicated a much thinner layer, which, in the case of reduced graphene oxides, depends on the degree of reduction. Lower oxygen improves delamination of the material [22]. We observed this in our rGO/ATS flakes by comparing them to rGO/TUD, in which strong corrugation and overlap was visible.

Elemental analysis (Table 1) showed a low oxygen level (3%) in the reduced graphene oxide rGO/ATS; this may have resulted from the high sulfur content of the reducer used (ammonium thiosulphate). At approximately 1%, the reduced rGO/Term graphene oxide showed the lowest percentage of oxygen. However, it was very challenging to measure resistance for this rGO due to the difficulty of compressing the sample. The highest oxygen content of approximately 16% was observed in rGO/TUD. Resistivity (R_s) was 21 Ohm/square and 142 Ohm/square for rGO/ATS

and rGO/TUD, respectively, and 0 Ohm/square for GN/ExF. Flakes with a lower oxygen content also have a lower resistivity, thereby serving as better conductors of electricity.

Table 1. Physicochemical properties of the GN and rGO flakes.

GN and rGO Flakes	Elemental Analysis (%O)	Resistance (Ohm/square)	Size of Platelets (μm)	Polydispersity Index	Method of Production
GN/ExF	n.a.	0	2.1–3.3	1	exfoliation
rGO/Term	1	n.a.	1.1–2.3	1	thermal
rGO/ATS	3	21	1.9–4.6	1	chemical (ammonium thiosulphate)
rGO/TUD	16	142	3.4–4.7	0.67	chemical (thiourea dioxide)

Abbreviations: mV, millivolt; μm , micrometer; rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; ExF, exfoliation; ATS, ammonium thiosulphate; Term, thermal; TUD, thiourea dioxide; n.a., not available.

The results of resistivity measurements are not shown for GN/ExF because the sample quantity was too scant, and the measurement performance was relatively low. Results of resistivity measurements are also not shown for rGO/Term because we were unable to compress the sample for measurement. This is a consequence of highly reduced GO, where no hydrogen bonds were present in the flakes. The GN/ExF sample is pure graphene, which does not contain oxygen atoms; hence it was excluded from elemental analysis.

Elemental analysis does not provide information about specific oxygen groups, so we conducted FTIR measurements (Chart A1). The FTIR spectra of rGO/TUD and rGO/ATS are quite similar, suggesting the existence of nearly the same functional groups. The band at 1735 cm^{-1} refers to C=O modes of carbonyl groups. The peak that appears at around 1560 cm^{-1} indicates C=C bonding in the aromatic structure of the materials. In the range of 1400 cm^{-1} and 1450 cm^{-1} , there are overlapped bands corresponding to CH vibrations, as well as to C-C (stretching) in the aromatic structure and to OH groups. Peaks at around $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ correspond to C-O (stretching) and CH (aromatic) bonds. No clearly seen peaks in GN/ExF and rGO/Term spectra suggest that there are no oxygen functional groups in the structure of these samples. This corresponds to elemental analysis, where these materials were found to have 0 and 1% oxygen content, respectively.

Zeta potential (Chart 1) was analyzed to characterize the surface charge and stability of the tested suspensions. The more oxygen-containing functional groups that exist on the surface of the rGOs, the higher the stability of the solution [23]. Zeta potentials were measured using five different concentrations of GN and each rGO. At concentrations of 5 and $10\text{ }\mu\text{g/mL}$, we observed the highest divergence between the flakes of the GN group and rGO groups. rGO/ATS showed the lowest stability (-9.51 mV) at a concentration of $10\text{ }\mu\text{g/mL}$; rGO/TUD showed the highest stability (-20.13 mV) at the concentration of $10\text{ }\mu\text{g/mL}$. At concentrations of 50 and $100\text{ }\mu\text{g/mL}$, all studied materials were characterized as flakes having a similar stability. Minidvan (2016) showed that the zeta potential of their rGO was -3.81 mV ; this was due to a decreased amount of oxygen-containing functional groups compared with those of GO [24]. Elemental analysis, conducted on rGO/TUD, showed that it had the highest percentage of oxygen, thus forming the most stable suspension observed in our study. GO easily disperses in the hydrophilic environment. To restore the sp^2 carbon structure of graphene sheets, reduction is necessary. As a result of the reduction, graphene sheets contain less functional groups and consequently more sp^2 hybridized carbon atoms, what is also directly connected with a higher number of delocalized electrons. rGO has a tendency to agglomerate, lowering the colloidal stability of the graphene flakes at the same time [25]. Thereby, the higher the degree of the reduction, the lower the stability, which is clearly visible in rGO/TUD (higher stability) and rGO/Term (lower stability) samples. In a low concentration of the hydrocolloids (especially $10\text{ }\mu\text{g/mL}$) of highly reduced samples, such as rGO/ATS and GN/ExF, a decrease of the stability and increase of the surface charge are observed at the same time. This is due to weaker interactions between rGO flakes and stronger interactions between rGO and the polar dispersant, which is water. In the rGO/ATS sample, in the lowest concentration ($5\text{ }\mu\text{g/mL}$), the hydrocolloid is stable because of a greater distance between flakes, and in the $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ concentration, the distance between flakes is reduced and the flakes start

to form agglomerates, which do not drop to the bottom; therefore, the stability decreases. In higher concentrations, flakes agglomerate and they drop to the bottom of a tube, resulting in the reduction of the hydrocolloid concentration and thus a higher stability of the colloid. As a consequence, the stability of the colloid is similar to the rGO/ATS sample at a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. In the least reduced sample, rGO/TUD, the highest stability is observed in all concentrations.

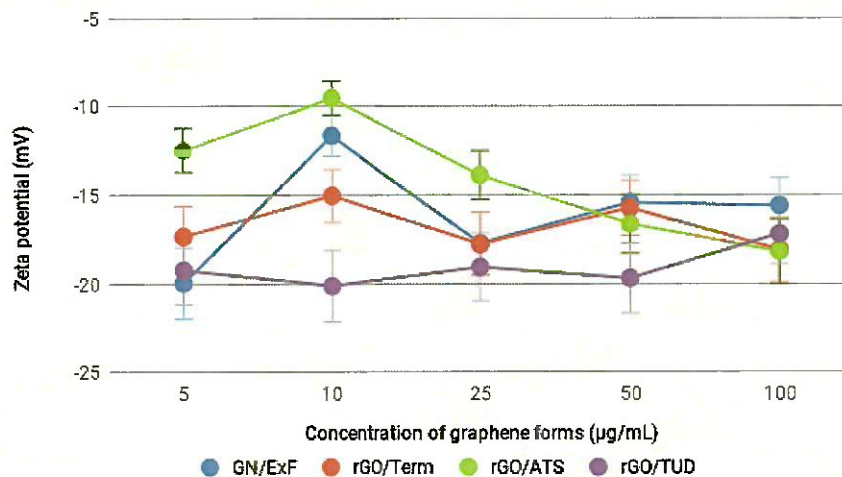


Chart 1. Zeta potential of GN and rGOs. Zeta potential is expressed in mV and was measured at different concentrations (5, 10, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of the tested GN and rGOs. **Abbreviations:** mV, millivolt; GN, graphene; rGO, reduced graphene oxide.

The hydrodynamic diameter of the flakes and the dispersibility of the suspension were estimated using ZetaSizer. Detailed results are shown in Table 1. The hydrodynamic diameter of the flakes fluctuated within 1–5 μm , and flake suspensions were polydispersed. By polydispersity, we mean the heterogeneity of the flake suspension. This phenomenon was found based on measurements of the hydrodynamic diameter; the Polydispersity Index (PI) was calculated by the ZetaSizer measurement software. From each type of material, we tested three samples, and each sample was measured 10 times. In magnification 100,000 \times in TEM, we observed the presence of different sized flakes (from few nm to few μm). In this way, we confirmed the polydispersity index calculated from ZetaSize.

2.2. The Influence of GN and rGO on Cellular Morphology and Viability

We assessed the interactions of rGO flakes, compared with those of GN, with glioblastoma cells. For this, we examined how cytotoxicity of the oxygen content in rGOs exerts different effects on glioblastoma cells. First, we assessed the effect of graphene flakes on the general morphology of glioblastoma cells (examined via light and confocal microscopy), and then we examined the viability and metabolic activity of the cells using an MTT assay. An MTT assay was also performed with normal cell line Hs-5. In the control group (untreated U87 cells), examined using light microscopy, the cells showed a clearly outlined cellular body with long protrusions, and the tendency to grow in groups towards a spheroid formation without forming a typical monolayer (Figure 3A). Cell nuclei were clearly outlined with visible nucleoli.

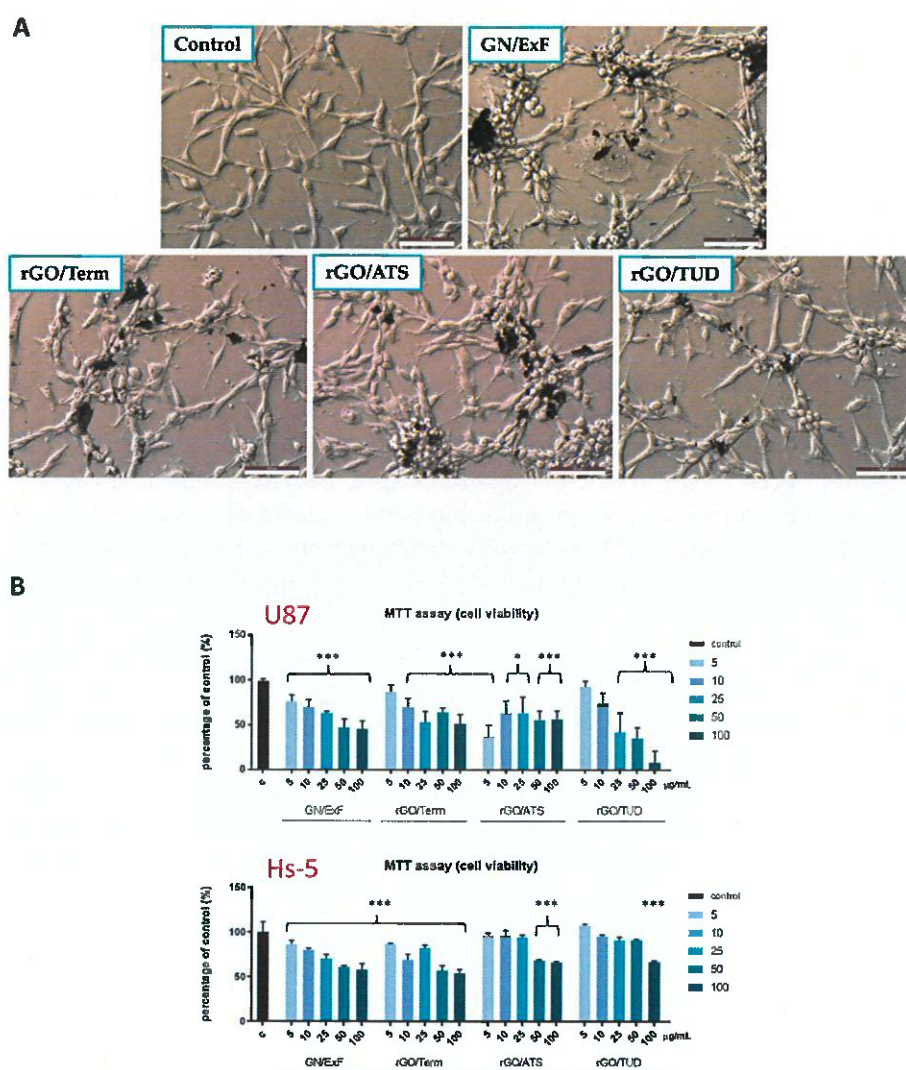


Figure 3. Morphology and cell viability of untreated U87 cells, and those treated with GN and rGO flakes, as evaluated by optical microscopy and viability assays. (A) The images show untreated U87 cells and those treated with GN and rGO flakes. Control cells were not treated with graphene flakes. Scale bar: 100 µm. Cell viability was determined using the (B) MTT assay. U87 and Hs-5 cells were exposed to GN and rGO flakes at concentrations of 5, 10, 25, 50, and 100 µg/mL for 24 h. Values are expressed as mean ± standard deviation. Statistical significance between the control and treated cells is indicated by an asterisk and was assessed using Bonferroni's multiple comparison test. Differences with p -value < 0.05 were considered significant. One asterisk (*) p -value < 0.01, three asterisks (***) all with p -value < 0.001. **Abbreviations:** rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

In the examined samples, the number of cells in the field of view was kept constant (Figure 3A). In the samples treated with GN/ExF (Figure A1) and rGO/ATS (Figure A2, large groups of cells with well-adhered graphene flakes were clearly visible. This indicates that in these cases, graphene was able to form agglomerates. In most cases, graphenoid forms overlapped with cells. The most individual graphene flakes could be clearly seen in images treated with rGO/Term (Figure A3). Graphene flakes tended to adhere to the central part of the cellular body, such as the cytoplasm and nucleus, rather than to cellular protrusions. The greatest changes in cell morphology, such as pore formation called light spots [26], were observed in cells treated with GN/ExF and rGO/TUD (Figure A4). GN/ExF was the least compatible due to a lack of oxygen-containing functional groups. The images also showed

more oval cell bodies in cells treated with rGO/ATS. Cells treated with GN/ExF did not show oval cell bodies, and were more elongated. Lammel and co-workers observed the impact of graphene oxide on the ultrastructure of the plasma membrane and found that nano-sized graphene penetrates the plasma membrane of the HepG2 cell line [27]. They showed that at the site of interaction between the graphene nanoplatelet and the plasma membrane, membrane invagination and some disruption of the plasma membrane occur. Other researchers reported that the exposure of cells to high concentrations of graphene decreased the membrane integrity in GLC-82, MCF-7, Panc-1, and MDA-MB-231 cell lines [28].

An evaluation of cell morphology using light and confocal microscopy showed that the effects observed in all the treated groups were similar. Treatment with rGO/ATS was the most effective against the glioblastoma line U87, causing complete destruction of the cell membrane. Based on the results of microscopic observations, we used the MTT assay to assess whether graphene and its derivatives also affect the viability and metabolic activity of the stromal Hs-5 and glioblastoma U87 cells. In the case of non-cancerous Hs-5 cells in GN/ExF and rGO/Term treated groups, they caused statistically significant changes in all tested concentrations, but a lower decrease in metabolic activity than in the case of U87 cells. For the rGO/ATS group, a statistically significant decrease in the viability of normal cells was observed at the concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, whereas in the rGO/TUD group, this was only seen at the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In both groups, graphene flakes were found to be less toxic to healthy cells than cancerous U87 cells. For the U87 cell line MTT assay, a significant effect (p -value < 0.0001) was observed for each group (Figure 3B). The highest decrease in metabolic activity, at $8.69 \pm 12.88\%$, was found in the group treated with rGO/TUD at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Interestingly, in the group treated with rGO/ATS, the lowest viability, at $37.7 \pm 12.55\%$, occurred at a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rGO/ATS. In other groups treated with GN/ExF and rGO/Term, ~50% mortality was observed at concentrations ranging from 25 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In a few cases, such as in the first group, the viability did not decrease below 72%, while the metabolic activity of the cells decreased up to 45% with the increasing concentration of GN/ExF. This may indicate a disturbance in the metabolic activity of the mitochondria with an intact cellular membrane. In the group treated with rGO/ATS, the lowest metabolic activity was observed at a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This may be due to the fact that in the lower concentration, the flakes are not agglomerated and, consequently, they can induce a stronger cytotoxic effect.

Because of their size, the flakes of GN/ExF, rGO/ATS, rGO/Term, and rGO/TUD have difficulty penetrating the cell; however, they physically or biologically reduce the viability of U87 cells. This may have been caused by a reduced amount of hydrophilic groups. The results confirm previous studies, indicating that GN and rGO flakes show significant toxicity against several cell lines (U251, U87, U118) [7,8,29,30]. rGO and GN can adhere to the two-layered lipid membrane due to hydrophobic interactions with the membrane [31]. Consequently, exposure to high concentrations of GN and rGO causes physical or biological damage to the cell membrane, accompanied by the destabilization of actin filaments and the cytoskeleton [32]. Moreover, one of our previous studies showed that functionalizing rGO with amino acids (such as proline) decreases the cytotoxic effects of graphene derivatives; this may have occurred because the amino acid blocked the hydrophobic of the molecules which strongly interact with the cellular membrane [33].

The morphology of U87 glioblastoma cells treated with GN and rGO flakes was also evaluated by confocal microscopy. Two dyes were used to visualize cell structures. DAPI (Ex = 350, Em = 470 nm) binds selectively to DNA. 4-Di-10-ASP (Ex = 456, Em = 590 nm) is a lipophilic fluorescent dye for marking cell membranes and other hydrophobic structures. Differential interference contrast (DIC) was used to visualize the GN and rGO flakes, enabling visualization of the whole surface of the flake. In the control group, a clearly outlined cell membrane and cell nucleus, as well as numerous connections between cells, were observed (Figure 4a). Cell shape was not retained in any of the treated groups, except in the cells treated with GN/ExF (Figure 4b); in cells treated with GN/ExF, the membrane most closely resembled that of the control cells. All the other treated groups showed disrupted cell

membranes. The most extensive damage to the cell membrane was observed in the group treated with rGO/Term (Figure 4c), where the most severe damage to the cell membrane was present (Figure 4c). In each treated group, we observed that graphene adhered to the cell. Using the images acquired via DIC, we observed that the graphene flakes adhering to the cells possessed different sizes. In cells treated with rGO/Term (Figure 4c), perforations in the cell membrane were observed by localized reductions in the intensity of the 4-Di-10-ASP signal, which is marked with a red arrow. Duan et al. showed that cells (line A549 and Raw264.7) treated with GO have the light spots clearly corresponding to dark regions under fluorescence-based imaging, suggesting that these features represent holes (pores) in cell membranes [26].

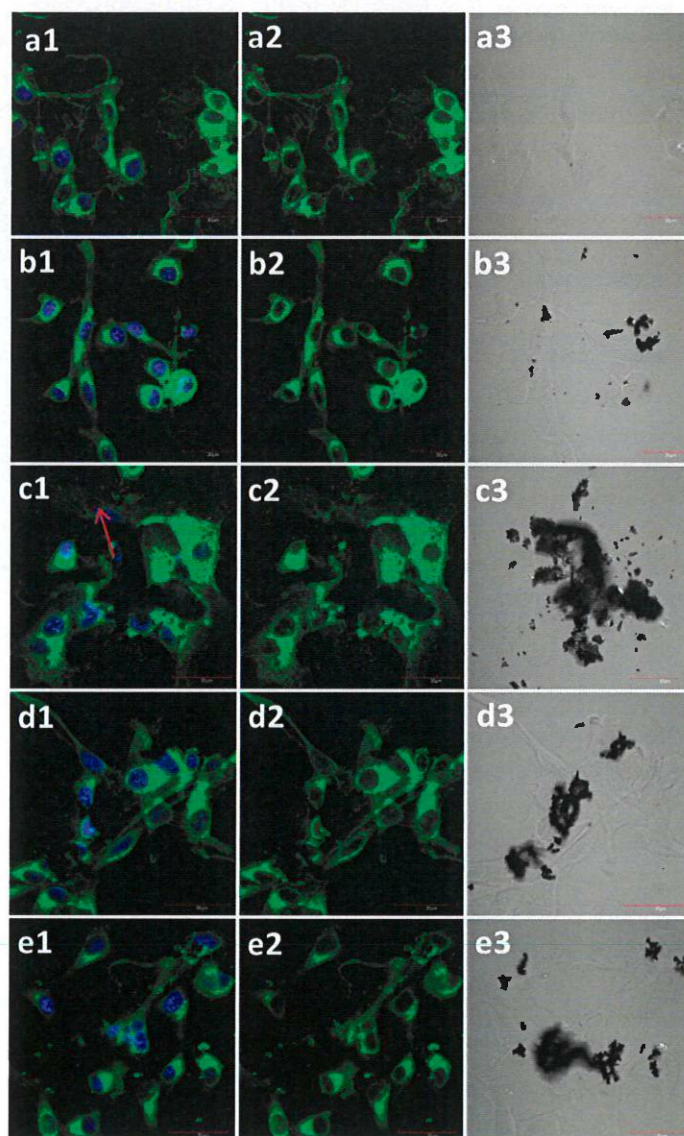


Figure 4. Morphology of untreated U87 cells and those treated with GN and rGO flakes at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 24 h evaluated by confocal microscopy. Images show the untreated control (a) group and groups treated with: GN/ExF (b), rGO/Term (c), rGO/ATS (d), and rGO/TUD (e). The pictures marked with the number (1) show the combination of 4-Di-10-ASP (green) and DAPI (blue); (2) show the 4-Di-10-ASP (green); and (3) show the DIC contrast. The red arrow marks damage to the cell membrane. Scale bar: 30 μm . **Abbreviations:** rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; 4-Di-10-ASP, 4-(4-(didecylamino)styryl)-N-methylpyridinium iodide.

2.3. A Balance between Types of Cell Death and Proliferation

Allotropic forms, including GO [7], rGO [7], GN [8], diamond [34], fullerenes [35], and nanotubes [36], have been studied for many years in the context of inducing apoptosis in normal and cancer cells. The results of these studies have been contradictory, sometimes indicating that GO causes apoptosis [8,35,36] and sometimes showing that it induces proliferation [7,34]. Therefore, in this work, we wanted to examine how flakes that do not contain oxygen, such as flakes of GN, affect glioblastoma cells. We also examined the effect of flakes containing different contents of oxygen, which stems from varying degrees of reduction resulting from using different methods to process the same GO. Our results show that treating glioblastoma cells with flakes of GN and rGOs reduced cellular metabolism. This indicates that the number of viable cells was decreased compared to that of the untreated control group. The decreased metabolic activity indicated that the cells were dying, or dividing slower, or both, which may occur simultaneously. Therefore, we next examined cell death and proliferation. To determine which processes were occurring, we conducted a cytometric assay using Annexin V-FITC (AnnV) and PI. The results of the apoptosis study are shown in Figure 5. The highest percentage of AnnV/PI-positive late-apoptotic cells was observed in the GN/ExF group (Figure 5B). The percentage of apoptotic cells ranged between 40 and 50% for all the tested concentrations of GN/ExF. A small percentage of necrotic cells was also observed in the GN/ExF-treated group. The percentage of apoptotic cells in the remaining groups was less than that observed in the GN/ExF-treated group. In the rGO/Term-treated group (Figure 5B), with rGO/Term concentrations of 5–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the proportion of apoptotic cells ranged between 28–32%. The highest percentage of necrotic cells, compared with that of the control group, was observed in the rGO/ATS- and rGO/TUD-treated groups (Figure 5B).

Numerous studies have demonstrated that graphene flakes and their derivatives are effective against glioblastoma cells, exerting a tumor suppressive action by activating apoptosis. We have also previously shown that reduced graphene oxide induces apoptosis in both U87 and U118 glioblastoma lines [8]. Moore et al. investigated the impact of nanographene in U-138 glioblastoma cells. The results showed a significant increase in the number of dead cells and decreased the cell density after treatment with graphene at concentrations higher than 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [37]. It was also found that apoptosis is induced in human U251 glioblastoma cells via exposed phosphatidylserine, caspase activation, and fragmentation of DNA [38]. Moreover, graphene and reduced graphene oxides physically damaged cell membranes, increased the permeability of the outer mitochondrial membrane, and disrupted membrane potential [39,40]. Apoptosis can occur via three different pathways. Caspases are usually involved in the process of apoptosis, regardless of the path of initiation. Depending on the stage of apoptosis in which they participate, they are divided into inductive caspases (e.g., caspases 8 and 9) and executive, otherwise called effector, caspases (e.g., caspases 3, 6, and 7) [41]. Therefore, in this study, we analyzed the induction caspase 9 and the effector caspase 3. The results of our real-time PCR analysis indicated that the expression of the *casp9* gene did not show a statistically significant increase in any of the treated cell groups (Figure 5C). A tendency for the increased expression of *casp9* was observed in the rGO/Term and rGO/TUD-treated groups. The level of *casp3* showed a statistically significant increase in the rGO/ATS- and rGO/TUD-treated groups, and similar results were shown in a previous study [7].

Since mitochondria play a key role in apoptosis [41], next we analyzed whether graphene and its derivatives reduce the mitochondrial membrane potential, thereby inducing cell death via the mitochondrial pathway. A JC-1 assay was used to examine the mitochondrial membrane potential in U87 cells untreated and treated with graphene and reduced graphene oxide flakes. JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarocyanine iodide) is a lipophilic, cyanocyanine cationic dye that selectively penetrates the mitochondria and can reversibly alter the emission of red fluorescence to green fluorescence in the case of reduced membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$). Healthy cells have a high membrane potential; in healthy cells, JC-1 selectively accumulates in the mitochondria and forms aggregates that show red fluorescence. In apoptotic cells, JC-1 localizes as a monomer exhibiting green fluorescence [42]. The greatest change in the mitochondrial membrane

potential was observed in the group treated with GN/ExF at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In the groups treated with rGO/TUD and rGO/ATS at a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 70.48 and 67.17% of cells, respectively, showed a low mitochondrial membrane potential compared to the cells in other treatment groups, treated using the same concentration (Figure 6B).

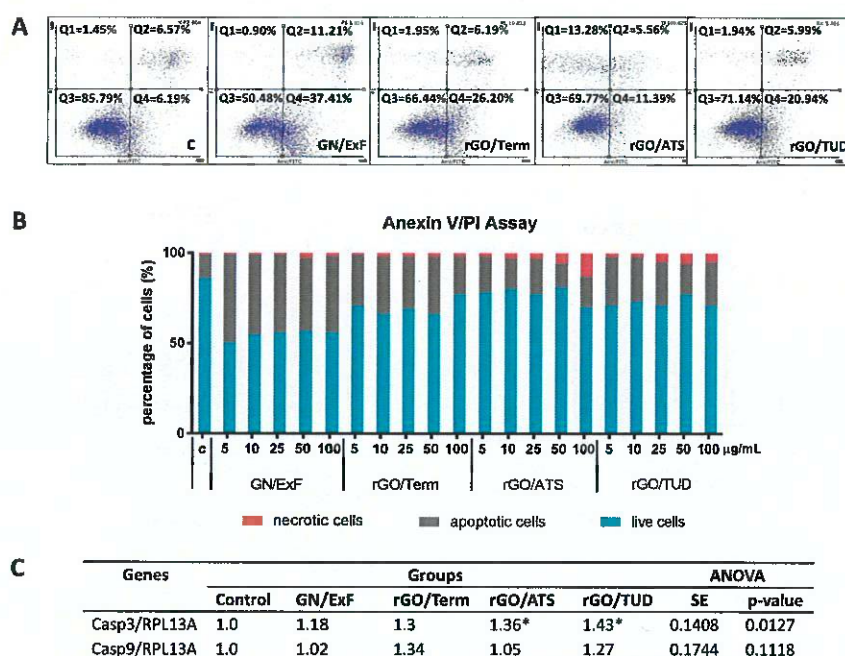


Figure 5. Determining the type of death of U87 cells untreated and treated with GN and rGO flakes via Annexin V-FITC and PI assay, and via the evaluation of *casp3* and *casp9* gene expression. (A) Cells were stained with Annexin V/PI and analyzed by flow cytometry. Scatter diagrams show cells untreated and treated with graphene flakes and reduced graphene oxide flakes at the following concentrations: GN/ExF (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), rGO/ATS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), rGO/Term (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and rGO/TUD (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, treated for 24 h). Quadrants in the cytograms show live cells (Q3) and individual stages of cell death: Q1—necrotic cells, Q2—late apoptotic cells, and Q4—early apoptotic cells. (B) Chart shows the percentage of apoptotic and necrotic cells for all the tested concentrations (5, 10, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of GN and rGOs. (C) Gene expression profile in glioblastoma cell line U87; gene expression of *casp3* and *casp9* in U87 cells untreated and treated with graphene (GN) or reduced graphene oxide (rGO) flakes. Bonferroni's multiple comparison test was used for statistical analysis. Values in rows marked with an asterisk show significant differences. Values marked with one asterisk (*) indicate a p -value < 0.005. Values were normalized to that of the reference gene house-keeping gene *rpl13a*. The expression level of the examined genes was expressed as the relative quantitation (RQ) value. **Abbreviations:** PI, propidium iodide; FACS, fluorescence assisted cell sorting; Q, quadrant; C, control group (untreated cells); rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; *casp3*, caspase 3; *casp9*, caspase 9; *rpl13a*, ribosomal protein L13a.

The results of the JC-1 cytometric assay prompted us to examine the expression of genes, namely *aifm1* and *cytc*, important in the mitochondrial pathway of apoptosis. Apoptosis-inducing agent (AIF) is a pro-apoptotic flavoprotein that participates in caspase-independent cell death. Under physiological conditions, AIF is an FAD-dependent mitochondrial oxidoreductase that plays a role in oxidative phosphorylation. Thus, AIF has a protective function in some cell types. After cellular damage, however, AIF is cleaved by calpains and cathepsins, and moves from the mitochondria to the cytosol and then into the nucleus. In the nucleus, it interacts with DNA and causes the chromatin-independent condensation of caspases and large-scale fragmentation of DNA [43]. Overexpression of AIF promotes peripheral chromatin condensation in the nucleus, DNA fragmentation into 50-kb fragments, translocation of phosphatidylserine in the cell membrane,

and a decrease in the mitochondrial membrane potential [44]. The expression of the *aifm1* gene showed a statistically significant increase after treatment with rGO/Term (Figure 6C). In the remaining groups, only a tendency to increase was observed.

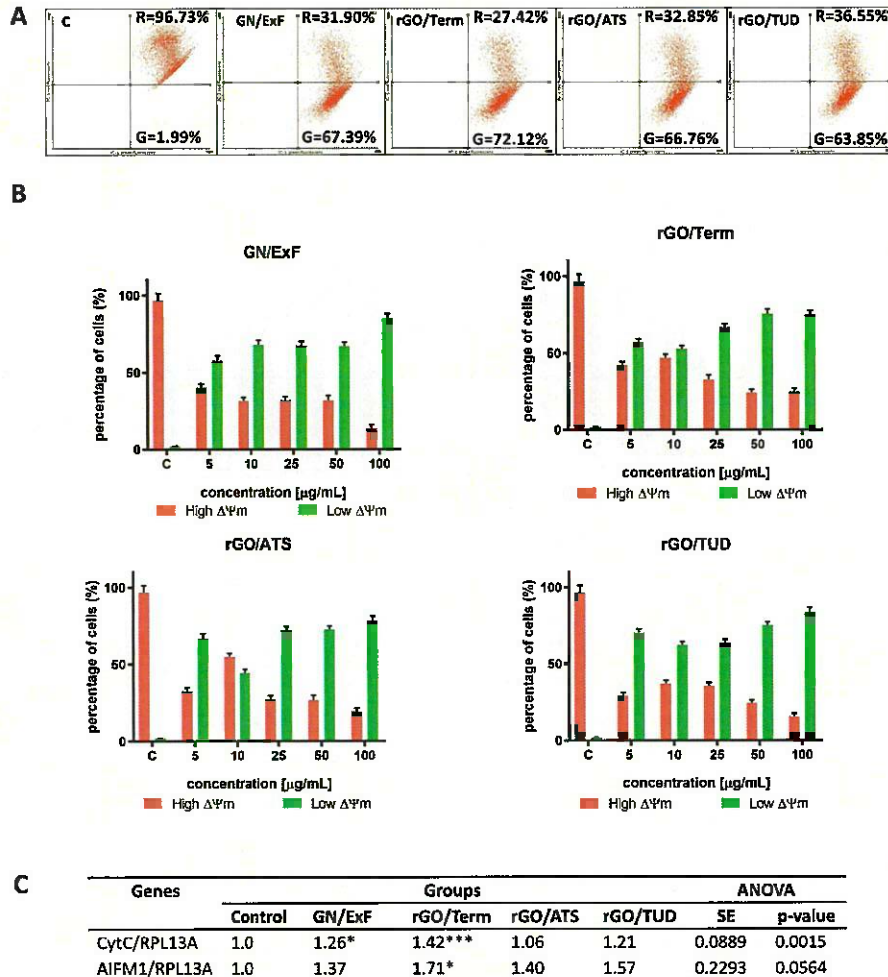


Figure 6. Mitochondrial membrane potential of U87 cells, untreated and treated with GN and rGO flakes, was evaluated using JC-1 dye and the expression of *cytc* and *aifm1* by $\Delta\Delta Ct$ method using real-time PCR. (A) $\Delta\Psi m$ depolarization was monitored using FACS and JC-1 as markers of mitochondrial membrane potential at 24 h post-exposure to treatment. Cytograms show cells treated with GN and rGO flakes at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Gated quadrant R (red and green fluorescence) includes cells with intact mitochondrial membranes (high $\Delta\Psi m$), and quadrant G (green fluorescence) depicts cells with loss of $\Delta\Psi m$. (B) Charts show percentages of cells with high and low $\Delta\Psi m$ for all the tested concentrations (5, 10, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of GN and rGOs. (C) The expression of *cytc* and *aifm1* in the glioblastoma cell line U87 untreated and treated with graphene (GN) or reduced graphene oxide (rGO) flakes. Bonferroni's multiple comparison test was used for statistical analysis. Values in rows marked with an asterisk (*) show statistically significant differences at p -value < 0.005. Values marked with one asterisk (*) indicate a p -value < 0.005, and three asterisks (***) a p -value < 0.001. Values were normalized to that of the reference house-keeping gene *rpl13a*. The expression level of the examined genes was expressed as the relative quantitation (RQ) value. **Abbreviations:** $\Delta\Psi m$, mitochondrial membrane potential; FACS, fluorescence assisted cell sorting; JC-1, 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide; C, control group (untreated cells); rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; *cytc*, cytochrome c; *aifm1*, apoptosis inducing factor mitochondrial associated 1; *rpl13a*, ribosomal protein L13a.

In healthy cells, cytochrome c (CytC) is located in the space between the outer and inner mitochondrial membrane, where it acts as an electron carrier in the respiratory chain and interacts with cardiolipin. Pro-apoptotic stimuli may lead to permeabilization of the mitochondrial membrane, which results in cytochrome c molecules being released into the cytosol [45]. In the cytosol, CytC combines with the protein factor Apaf-1 and procaspase 9. This three-element complex is called the “death circle” or the apoptosome. The main task of this complex is the activation of executive caspases (e.g., caspase 3, 6, and 7) [46]. In this study, the expression of the *cyt c* gene showed statistically significant increases in the groups treated with GN/ExF and rGO/Term at a concentration of 25 µg/mL (Figure 6C). Limited evidence shows that GO is smaller and less toxic than rGO because it possesses a high oxygen content, smoother edges, and hydrophilic properties [36]. The lowest oxygen content was shown by rGO/Term; this material induced apoptosis more strongly than the rest of the tested compounds. However, the most effective inducer of apoptosis was pure graphene (GN/ExF). This indicates that even a minimal oxygen content decreased the pro-apoptotic activity of graphene and its derivatives. Cells normally die and proliferate. Thus, cellular proliferative potential must also be taken into account in order to check for any compensatory mechanisms. Therefore, we then analyzed the cell cycle and expression of key genes in the regulation of cell cycle and proliferation.

For this, we conducted a cytometric analysis of DNA content using propidium iodide, RNase A and analyzed the expression of genes important in proliferation. Cytometric analysis (Figure 7A,B) showed no significant differences in the percentage of cells in the individual phases of the cell cycle. After treatment with rGO/Term at 100 µg/mL, a small increase in the percentage of cells in the S phase of the cycle was observed in comparison with that of the control cells. A small decrease in the percentage of cells in the G2/M phase was observed in the group treated with GN/ExF at a concentration of 100 µg/mL. Kang et al. showed that exposing PC12 cells (a traditional neural target cell line) to rGO at 20 and 50 µg/mL led to cell-cycle arrest in the G0/G1 phase. That study also showed a significant decrease in the number of cells in the G2/M phase, which may be associated with abnormal proliferation and altered mitotic ability [47]. In our study, only a small percentage of cells in the S phase of the cell cycle was observed after treatment with rGOs. These minor changes in the cell cycle prompted us to assess the expression of genes important in proliferation.

We evaluated the expression of *pcna*, *ki-67*, and *mcm2*, which are involved in regulation of the cell cycle and proliferation. Proliferating target nuclear antigen (PCNA) is a cell cycle regulatory protein; its expression increases significantly in the G1 phase, reaching a peak and decreasing in the G2/M phase. PCNA expression shows a periodic change with the replication of DNA in the transition from G1 phase into the S phase [48]. Expression of the Ki-67 protein is also closely related to cell proliferation. During interphase, this antigen is found within the nucleus when the chromosomes are relocated to the surface of the nucleus. The fact that the Ki-67 protein is present during the active cycle (G1, S, G2, and mitosis), but is absent in resting cells (G0), makes it an excellent marker for assessing the growth of a given cell population [49]. MCM2 is one of the minichromosomal maintenance proteins that is necessary for the initiation and regulation of DNA replication. The highest expression of MCM2 occurs in the G1 phase, when it is necessary to initiate DNA synthesis after each turn of the cell cycle. MCM proteins dissociate chromatin irreversibly during the S phase of the cell cycle [50]. The analysis of gene expression showed statistically significant changes (Figure 7). The expression of *pcna* was only significantly increased in the rGO/Term group, whereas *mcm2* expression in the rGO/TUD-treated group was decreased. Sawosz et al. showed a tendency for a decreased expression of *pcna* mRNA in the healthy brain tissue of chicken embryos treated with pure graphene in vivo. This may indicate decreased DNA synthesis during the cell cycle [51]. In this study, the gene expression of *pcna* increased by 26% in the rGO/Term-treated group and by 28% in the GN/ExF-treated group; this was likely due to cell-cycle arrest in the S phase occurring in U87 cells after treatment with GN and rGOs. The *ki-67* gene is highly expressed in glioblastoma and lymphatic metastasis tissues, and is closely related to cell division [52]. Our study is the first to report that treatment with GN and rGO affected the expression of the *ki-67* gene in glioblastoma multiforme cells. So far, there is only one published study

describing the effects of GO, functionalized with polyethylene glycol (PEG) and polyethylenimine (PEI), on the cell cycle in five tumor lines (HeLa, HEK293T, A549, HepG2, and MCF-7). The results of that study showed that GO-PEG-PEI nanosheets disrupt the S phase of the cell cycle, leading to a reduction in DNA synthesis [53]. However, our results indicate that cells treated with reduced graphene oxides showed a statistically significant increase in the expression of *ki-67*. The expression of *ki-67* increased by 49% in the rGO/Term-treated group and by 46% in the rGO/TUD-treated group, compared with GN/ExF-treated group, where the expression increased by 27%. The expression of *mcm2* was previously shown to be decreased by treatment with ionizing radiation in the glioblastoma line U251 [54]. In our study, *mcm2* gene expression exhibited a statistically significant decrease of 17% in the rGO/TUD-treated group of U87 cells. This may have occurred because the cell cycle had stopped in the S phase, and the highest expression of *mcm2* was recorded in the G1 phase, when the synthesis of DNA was initiated. In the GN/ExF-treated group, fewer cells were retained in the S phase; therefore, a smaller decrease in *mcm2* gene expression was observed. In rGO/Term-, rGO/ATS-, and rGO/TUD-treated groups, more cells were retained in the S phase; hence, a greater decrease in the expression of *mcm2* was observed.

In summary, the surface chemistry and size of graphene flakes play key roles in the toxicity, transport, and excretion of graphene. Thus, various graphene materials may exert different effects on the body [55]. Jaworski et al. observed that rGOs form aggregates, and flakes smaller than 200 nm gain entry into glioblastoma cells U87 and U118 [7]. Horvath et al. showed that rGO flakes of various sizes can be taken up by cells via endocytosis [56]. Mao et al. suggested that graphene flakes with a larger size and higher degree of oxidation may show a stronger cytotoxicity [57]. This was also confirmed in our study, showing that rGO/TUD, having the largest surface area and highest oxygen content, caused greater cytotoxicity at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ than GN/ExF did at the same concentration. We conclude that GN/ExF, in comparison to rGO/ATS and rGO/TUD, showed a stronger tendency to agglomerate within the cell body, indicating that these materials had a stronger affinity for the cells. However, flakes that did not have any oxygen groups, such as those of pure graphene, were the most cytotoxic [8]. We also confirmed that rGOs showed few toxicological effects in comparison with those of GN/ExF.

These results collectively show that the surface and function of graphene play key roles in its physico-chemical properties and in the biocompatibility of various graphene-derived materials. Apoptosis is a coordinated process triggered by three different pathways: the death receptor TNF α (tumor necrosis factor α) and FAS (fragment apoptosis simulating)-mediated extrinsic pathway, located on the cell membrane, and the intrinsic mitochondrial pathway. Theoretically, these pathways may be triggered because rGOs and GN interact with death receptors on the cell membrane. Jaworski et al. showed that entry of rGOs into the cell causes degradation of the mitochondria. rGOs may also interact with surface receptors on the cell membrane, blocking the transport of various substances into the cell, and causing cellular stress and apoptosis [7]. Li et al. suggested that the mitochondrial pathway may be the dominant mechanism underlying apoptosis induced by graphene [58]. Li et al. suggested that GN may alter mitochondrial integrity via a mechanism associated with the activation of pro-apoptotic agents from the Bcl-2 family (Bim, Bax, and Bcl-2). However, when mitochondria are damaged under the influence of rGO, there is no difference in the expression of Bcl-2, indicating that this protein is not involved in the activation of apoptosis [58]. Zhou et al. showed that exposing MDA-MB-231, PC3, and B16F10 cells to graphene platelets led to the direct inhibition of I, II, III, and IV complexes of the Krebs cycle, causing depolarization of the mitochondria and consequent disruption in ATP production [59].

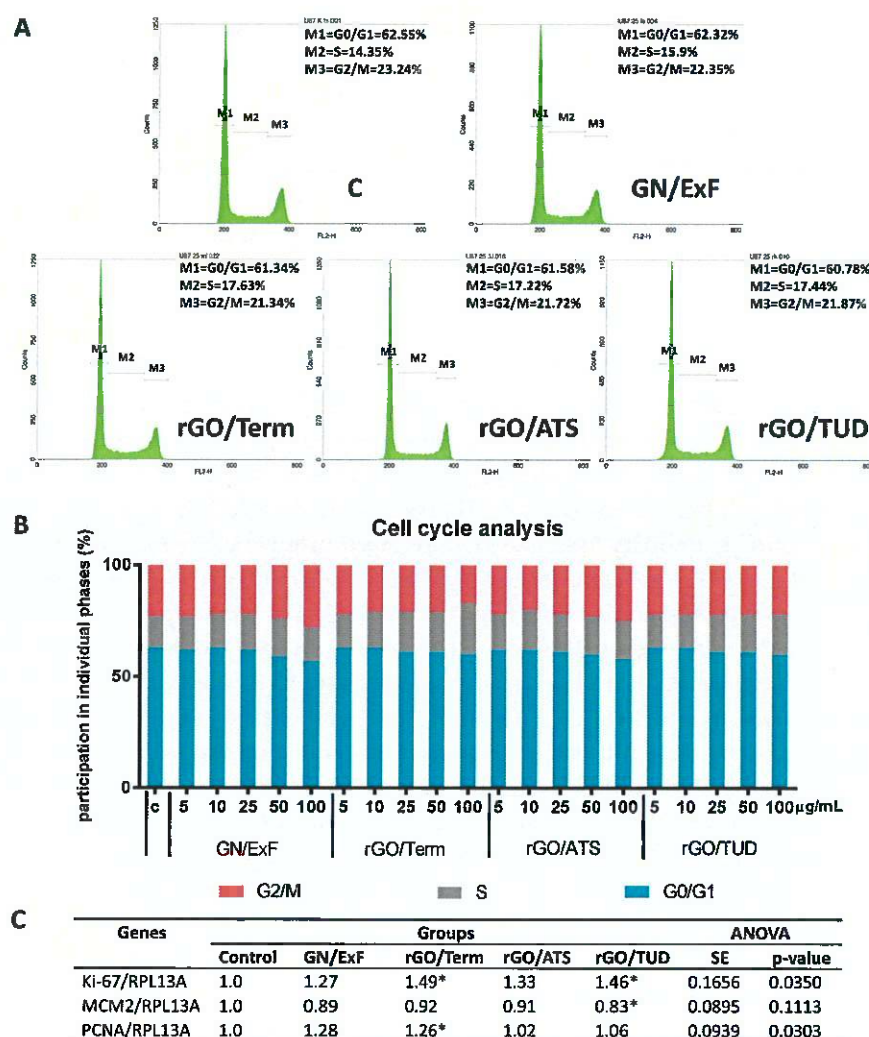


Figure 7. Cell cycle and proliferation in U87 cells untreated and treated with GN and rGO flakes as evaluated by flow cytometry and propidium iodide (PI). (A) Histograms were used to analyse the cell cycle in U87 cells untreated and treated with GN or rGO flakes at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. At 24 h post-treatment, cells were stained with propidium iodide after RNase A treatment and DNA content was evaluated by flow cytometry. Histograms show numerical values of individual phases of the cell cycle. M1 = G0/G1 (G0 indicates cells in the resting phase, while G1 indicates production of mRNA and proteins necessary for DNA synthesis); M2 = S (DNA replication phase); M3 = G2/M (G2 indicates preparing for entry into mitosis, and M indicates the mitotic phase). Histograms on the x-axis show the number of cells collected for analysis, while the y-axis shows the intensity of PI fluorescence on a linear scale. (B) Chart shows the percentage of cells in individual phases of the cell cycle at all tested concentrations (5, 10, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of GN and rGOs. (C) Gene expression profile in glioblastoma cell line U87, untreated and treated with graphene (GN) or reduced graphene oxide (rGO) flakes, was assessed using proliferation markers *ki-67*, *mcm2*, and *pcna*. Bonferroni's multiple comparison test was used for statistical analysis. Values in rows marked with an asterisk (*) show statistically significant differences at p -value < 0.005. Values marked with one asterisk (*) indicate p -value < 0.005. Values were normalized to that of the reference house-keeping gene *rpl13a*. The expression level of the examined genes was expressed as the relative quantitation (RQ) value. **Abbreviations:** C, control group (untreated cells); rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; *ki-67*, nuclear protein detected using monoclonal antibody Ki-67; *mcm2*, minichromosome maintenance complex component 2; *pcna*, proliferating cell nuclear antigen; ANOVA, analysis of variance; *rpl13a*, ribosomal protein L13a; SE, standard error.

One of the proposed mechanisms underlying the cytotoxicity of graphene involves reactive oxygen species [60,61]; other mechanisms are based on damage to the cell membrane, impaired mitochondrial activity, DNA damage, and interactions with cellular receptors that eventually lead to apoptotic and/or necrotic cell death [21,60,62]. The mechanism involved in the cytotoxicity of graphene and its derivatives is still not fully understood. However, it is assumed, and confirmed by our studies, that flakes of graphene and its derivatives likely induce cell death via the mitochondrial pathway. Therefore, it appears that the mitochondrion is key for the graphene-cell interactions.

3. Materials and Methods

3.1. Production and Preparation of GN and rGO

Graphene and reduced graphene oxides were supplied by the Institute of Electronic Materials Technology (ITME), Warsaw. Direct graphite exfoliation using Capstone (a fluorinated surfactant) was used to obtain graphene flakes, designated as GN/ExF. Flakes of rGO were produced by reducing previously prepared graphene oxide (GO). GO was obtained by graphite oxidation and exfoliation, according to a modified method by Marcano [63]. Reduced graphene oxide, designated as rGO/ATS, was created by reducing GO with ammonium thiosulphate for 20 h at 95 °C. The molar ratio of the reducing agent to GO was 3:1 and the reduction was conducted at neutral pH. rGO/Term was created by reducing GO powder in an oven at 1000 °C for 1 h under a nitrogen atmosphere. Reduced rGO/TUD graphene oxide was prepared by reducing GO via exposure to thiourea dioxide at 85 °C for 1.5 h. The molar ratio of the reducing agent to GO was 5:1 and pH was set as 9. rGO/ATS and rGO/TUD were purified through pressure filtration on a membrane and then dialysis was used. During these steps, a significant number of residue chemicals were removed from materials; however, there were still some sulfur ions. Then, 1 mg/mL aqueous suspensions were prepared from the GN powder (GN/ExF) and three types of rGO powders (rGO/ATS, rGO/Term, and rGO/TUD). Powders were gently sonicated for 30 min with ultrapure and sterile water. Then, each suspension was diluted to different concentrations, and each dilution was re-sonicated for 15 min immediately prior to being used to treat cells [33]. Appropriate dilutions of GN and rGO flakes (50, 100, 250, 500, and 1000 µg/mL) were prepared for further experiments.

3.2. Characterization of GN and rGOs

Elemental analysis and Raman spectroscopy were conducted at the Institute of Electronic Materials Technology (Warsaw, Poland). Elemental analysis of graphene flakes was performed using an O836 oxygen analyzer (LECO, Katowice, Poland) to assess the content of oxygen in the samples. Electrical conductivity of the samples was also examined. The samples were first pressed to form thin pellets (<100 µm). Resistance was determined in Ohm/square (Ω/\square) using a Hallotron (ECOPIA HMS 5500) with an external magnetic field of 0.55 T. Raman spectra were collected using a Reinshaw Invia confocal microscope with a 532-nm Nd-YAG laser, under a 100× objective with a 300-nm spot size and 1 mW laser. Measurements of the thickness of GO flakes were conducted with the use of Atomic Force Microscopy (Bruker, Stuttgart, Germany). Chemical characterization of graphene samples was performed with an FTIR Spectrophotometer (Vertex 80v, Bruker). Zeta potential and size of flakes in water were measured by light scattering using a ZetaSizer Nano ZS model ZEN3500 (Malvern Instruments, Malvern, UK). The shape and size of GN and rGO flakes were examined using a JEM-1220 (JEOL, Tokyo, Japan) transmission electron microscope (TEM) at 80 KeV, and a Morada eleven-megapixel camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany). Grids were inserted into the TEM immediately after drying the droplets in dry air.

3.3. Cell Cultures

Human glioblastoma U87 and normal Hs-5 cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's culture

medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Houston, TX, USA) and 1% antibiotic-antimycotic mixture containing penicillin and streptomycin (Life Technologies). Culture was performed at 37 °C under 5% CO₂ and at 95% humidity in an INCOMED153 (Memmert GmbH & Co., Germany).

3.4. Cell Morphology

U87 cells were seeded at 2×10^5 cells per well in six-well plates and cultured until confluence reached 70–80%. After 24 h, the culture medium was replaced with that containing 10% solutions of GN and rGO flakes at final concentrations of 5, 10, 25, 50, and 100 µg/mL; then, the cells were incubated for another 24 h. The control sample consisted of cells cultured without the addition of any flakes. Cell morphology was evaluated using an inverted light microscope (Leica DMi8, Cairn, Kent, UK) and a confocal microscope (Olympus FV1000, Tokyo, Japan). For confocal microscopy, U87 cell cultures were plated in six-well plates with sterile cover slips placed into each well. After incubation with graphene flakes, the cells were fixed using 4% aqueous paraformaldehyde for 10 min. After fixation, the cells were washed three times with phosphate buffered saline (PBS) without ions. The cells were stained with 4-(4-(didecylamino)styryl)-N-methylpyridinium iodide (4-Di-10-ASP; Life Technologies) at 5 mM, and with diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, St. Louis, MO, USA) at 1 µg/mL. After each staining, the cells were washed three times with PBS. A drop of Glass Antifade Mountant (Sigma, St. Louis, MO, USA) was applied to each glass slide and slides were stored in the dark. The images were analyzed using two fluorescence channels and differential interference contrast (DIC) on a FV10-ASW 4.2 (Olympus, Tokyo, Japan).

3.5. Viability Assays

Cell viability was assessed using an MTT assay. U87 glioblastoma and Hs-5 normal cells were cultured in 96-well plates. Approximately 1.2×10^4 cells were seeded onto each well. After incubating for 24 h, the culture medium was replaced with that containing 10% solutions of the flakes of GN and rGO at the concentrations of 5, 10, 25, 50, and 100 µg/mL. Cells incubated without the addition of any flakes were used as controls. After 24-h incubation, 10 µL MTT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added to the cultures and incubated for 4 h at 37 °C. After this time, 100 µL of lysis buffer (containing isopropanol, Tween-20, and HCl) was added to the cultures. The lysed cells and dissolved formazan crystals were centrifuged at $440 \times g$ for 5 min to deposit cell fragments and graphene and rGO flakes used in the test on the bottom of the plate. Then, 100 µL of supernatant was transferred into a new 96-well plate and measured using a spectrophotometer (Infinite M200, Tecan, Durham, NC, USA) at 570 nm excitation and 690 nm emission. The metabolic activity of the cells was expressed as a percentage compared to that of the control. Wells containing only DMEM were used as blanks. We used the formula $(ABS_{\text{test}} - ABS_{\text{blank}})/(ABS_{\text{control}} - ABS_{\text{blank}})$, where ABS_{test} is the absorbance of wells exposed to the treatment, ABS_{control} is the absorbance of control wells, and ABS_{blank} is the absorbance of wells without cells [64].

3.6. Apoptosis Assay

Apoptosis was evaluated using a FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). U87 cells were seeded at 2×10^5 cells per well in six-well plates and cultured until 70–80% confluence. After 24 h, the culture medium was changed to that containing 10% solutions of the flakes of GN and rGO at the final concentrations of 5, 10, 25, 50, and 100 µg/mL. The control sample consisted of cells cultured without the addition of any flakes. After 24-h incubation with the flakes, the cells were trypsinized, harvested, and washed with cold PBS containing calcium and magnesium ions. After rinsing and centrifugation, each cell pellet was suspended in 100 µL of Annexin binding buffer. Then, 5 µL of FITC (fluorescein isothiocyanate)-labelled Annexin V and 1 µL of propidium iodide were added to each cell suspension. The cells were incubated at 25 °C for 15 min. Then, 400 µL Annexin binding buffer was added to cell suspensions, gently mixed, and stored on ice until introduction

into the flow cytometer. Ten thousand events were recorded per sample. Plots were generated using Flowing Software 2.5.1 (Perttu Terho, Turku, Finland). Fluorescence emission intensity was measured using two FL1 channels for FITC at $E_m = 530$ nm and FL2 for PI at $E_m > 570$ nm.

3.7. Cell-Cycle Assay

A method based on staining DNA with propidium iodide was used to assess the cell cycle. U87 cells were seeded in six-well plates at 2×10^5 cells per well and cultured until they reached 70–80% confluence. After 24 h, the culture medium was changed to that containing 10% solutions of the flakes of GN and rGO at the final concentrations of 5, 10, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The control sample consisted of cells cultured without the addition of any flakes. After the cells were fixed and harvested, they were rinsed in 5 mL of PBS without calcium or magnesium ions, and then centrifuged at $200 \times g$ for 5 min at 4 °C. Cells were then suspended in 1 mL of ice-cold PBS. Each cell suspension was gently mixed and slowly dropped into 9 mL of previously chilled 70% ethanol in 15 mL Falcon tubes. The cells were stored for at least 24 h at -20 °C. Then, the cells were centrifuged at $200 \times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatant was carefully removed to leave the remaining loose pellet undisturbed, and the pellets were resuspended in 3 mL of cold PBS, gently mixed, and centrifuged again using the same parameters. Cell pellets were washed three times in 5 mL of cold PBS and centrifugation. The resulting pellet was resuspended in 0.5 mL of staining buffer [containing 10 mL of PBS buffer (*v/v*), 0.1% Triton X-100, 2 mg DNase-free RNase A, and 0.4 mL propidium iodide at a concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Cells were suspended in staining buffer, transferred to cytometric tubes, and incubated for 30 min at room temperature in the dark. The samples were filtered using a filter with a 40- μm pore size, and analyzed on a BDFacsCalibur™ cytometer at a flow rate not exceeding 400 objects/s. Analysis was performed within 2 h from the end of incubation. Data were analyzed using a histogram of fluorescence intensity on an FL2 channel and the number of cells introduced. PI was excited at 488 nm with a relatively large Stokes shift, and the emission wavelength was 617 nm.

3.8. Analysis of Mitochondrial Membrane Potential

JC-1 dye (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was used to determine the mitochondrial membrane potential. U87 cells were seeded in six-well plates at 2×10^5 cells per well and cultured until they reached 70–80% confluence. After 24 h, the culture medium was changed to that containing 10% solutions of the flakes of GN and rGO at the final concentrations of 5, 10, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The control sample consisted of cells cultured without the addition of any flakes. The 200 μM solution of JC-1 dye in DMSO was prepared by pre-heating the reagents to room temperature. The cells were suspended in 1 mL of working solution (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) of JC1 and incubated at 37 °C and at 5% CO_2 for 15 min. The prepared cell suspensions were analyzed in a BDFacsCalibur™ flow cytometer at 488 nm using the FL1 vs. FL2 channels. Plots were generated using Flowing Software 2.5.1 (Perttu Terho, Turku, Finland).

3.9. Isolation of Total RNA

For the isolation of total RNA, U87 cells were cultured in 25 cm^2 culture flasks. Each of the samples, both control and test (treated with flakes GN and rGO), was established in three independent biological repetitions. The solutions of the GN and rGO flakes were added to the cultures at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in a volume not exceeding 10% of the culture volume, and incubated for 24 h. Total RNA was isolated using a PureLink® RNA Mini Kit (Ambion™ Life Technologies, Foster City, CA, USA). The resulting cell pellet was resuspended in lysis buffer containing 1% 2-mercaptoethanol. Then, frozen metal balls were added to the probe and homogenized in a TissueLyser ball mill (Qiagen, Germantown, MD, USA) for 5 min at 50 Hz. The homogenate was centrifuged at $12,000 \times g$. The supernatant, containing total RNA, was transferred into a new tube, and one volume 70% ethanol was added into each volume of cell homogenate, following the manufacturer's instructions. Total RNA was eluted in a volume of 50 μL RNase-free water and stored at -80 °C. The isolated RNA was measured using a

NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). cDNA was synthesized with a cDNA High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to reverse-transcript the mRNA to cDNA, using 2200 ng per reaction. The obtained cDNA was measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer and stored for further analysis at -20°C .

3.10. Real-Time PCR

We used the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method to determine the expression of mRNA using real-time PCR: $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct test sample} - \Delta\text{Ct calibrator sample}$. The reaction was carried out using 48-well plates and Luminaris Color HiGreen reagents qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific); 100 ng of cDNA was used for each reaction. The following genes were examined: *casp3*, *casp9*, *cytc*, *aifm1*, *pcna*, *ki-67*, and *mcm2*. The primers used for this procedure are presented in Table 2. *rpl13a* was used as the reference house-keeping gene [65]. The reaction conditions were set as specified by the manufacturer. Each sample was analyzed in duplicate. The procedure was conducted using a StepOnePlus™ Real-Time PCR System.

Table 2. Primers used to assess the expression of genes involved in proliferation and type of cell death.

Genes	Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')
<i>ki-67</i>	CCACACTGTGTCGTCGTTTG	CCGTGCGCTTATCCATTCA
<i>mcm2</i>	GTGGATAAGGCTCGTCAGAT	GTCGTGGCTGAACCTGTT
<i>pcna</i>	GTCCTCTTCTCCTCCTCTGTT	CCATCCTCAAGAAGGTGTTGG
<i>casp3</i>	CAAACCTTTTTCAGAGGGGATCG	GCATACTGTTTCAGCATGGCAC
<i>casp9</i>	TGCAGGACACACACACAAGAAA	TCCTGGCTAAGACCCCCTT
<i>cytc</i>	GCGTGTCTTGGACTTAGAG	GGCGGCTGTGTAAGAGTATC
<i>aifm1</i>	TGCCTGAGCAGAACAAAGGT	CATGCTGCTCACCGTCTTA
<i>rpl13a</i>	CATAGGAAGCTGGGAGCAAG	GCCCTCCAATCAGTCTTCTG

Abbreviations: *ki-67*, marker of proliferation *ki-67*; *mcm2*, minichromosomal maintenance protein 2; *pcna*, proliferating target nuclear antigen; *casp3*, caspase 3; *casp9*, caspase 9; *cytc*, cytochrome c; *aifm1*, apoptosis inducing factor mitochondrial associated 1; *rpl13a*, ribosomal protein L13a.

3.11. Statistical Analysis

The data were analyzed with monofactorial analysis of variance using GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Differences between groups were tested using Bonferroni's multiple comparisons test. All mean values are presented using standard deviation or standard error. Differences with p -value < 0.05 were considered significant.

4. Conclusions

Every type of graphene derivative affects the particular cell type, triggering the activation of a different cellular pathway. Nevertheless, our results indicate that both GN and rGOs can activate the same apoptotic pathway in the U87 glioblastoma cells. The number of oxygen-containing functional groups and the associated number of defects in the carbon crystal structures are the distinguishing features of the investigated forms of graphene. The resistance appeared to be strongly related to the oxygen content in the reduced graphene oxide forms. A higher oxygen content leads to a higher resistance. In the presented study, we also measured other characteristics, like the zeta potential, approximate size of the flakes, and dispersiveness of graphene.

The presence of oxygen groups renders the reduced graphene oxide to be more hydrophilic. The reduced graphene oxides, produced by different methods, showed differences in surface functionalization in the range between 1 to 16%. Among the reduced graphene oxides investigated in the presented study, the oxygen content of rGO/Term (1% O_2) had the most similar characteristics to the control (GN/ExF). rGOs appeared to be less cytotoxic than GN in U87 glioblastoma cells in vitro. rGO caused cell death mainly via mitochondrial-dependent induction of apoptosis. Our results show that graphene derivatives exerted a scant influence on the cell cycles.

We hypothesized that rGOs has a stronger anticancer impact than GN, which was supported by our results. The cytotoxicity of rGOs may be mainly the result of their direct contact with the glioblastoma cell membrane. An increase in the reduction of oxygen content in rGOs caused an increase in the number of delocalized electrons on the surface of graphene flakes. This may lead to disruption of the signaling pathways in the cell membrane or the direct interaction within cellular structures that are sensitive to electrochemical potential (cell membrane, mitochondria).

In glioblastoma therapy, the most important feature of these flakes is the presence of oxygen-containing functional groups. Oxygen-containing functional groups are involved in the adherence of flakes to the cell body. Our previous studies showed many features of allotropic forms of carbon, which indicated the potential application of that biomaterial in cancer glioma therapy. It was shown, inter alia, that GN, GO, and rGO can induce cell death of the glioma in the process of apoptosis [7,8]. It was also demonstrated that diamond nanoparticles (DN) have excellent anti-angiogenic properties [3,4]. We confirmed that DN, GO, and GN are highly biocompatible and do not exert a significant effect on rat health status within twelve weeks after intraperitoneal administration [66]. Finally, we proved that GN and rGOs cause a strong effect by the decrease of the mitochondrial membrane potential in glioblastoma cells in the way of cell energy center corruption. In this study, for the first time, we confirmed that GN and rGOs can increase the expression of the *ki-67* gene in the glioblastoma cells of the multiform U87 line. Therefore, as continuation of that research, we plan to investigate the impact of GN and rGOs on the mitochondria-dependent energy pathways. The examination of these features will allow for the future application of different graphene forms in clinical trials and may allow for the effective treatment of the malignant brain tumors.

Author Contributions: Conceptualization, J.S. and M.G.; Formal analysis, J.S. and O.W.-P.; Funding acquisition, M.G.; Investigation, J.S., J.J., M.W., M.S., J.B., A.W., L.L., and O.W.-P.; Methodology, J.S., B.S., and M.G.; Project administration, M.G.; Resources, S.J., M.S., and J.B.; Supervision, E.S.C.; Validation, B.S. and M.Wie.; Visualization, J.S. and M.Wie.; Writing—original draft, J.S., M.S., and G.M.; Writing—review & editing, J.S., M.Sz., and M.G.

Funding: This research was funded by The National Centre for Research and Development grant number [LIDER/144/L-6/14/NCBR/2015].

Acknowledgments: The manuscript is a part of a Ph.D. thesis by Jarosław Szczepaniak. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interests related to this study.

Appendix A

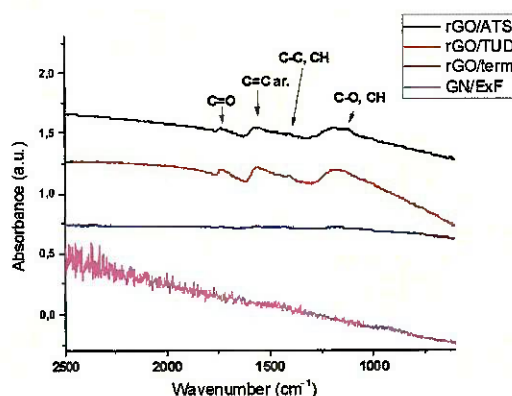


Chart A1. FTIR spectra of four graphene-like samples. Band at 1735 cm^{-1} refers to C=O modes of carbonyl groups. Peak that appears at around 1560 cm^{-1} indicates C=C bonding in aromatic structure of the materials. In the range of 1400 cm^{-1} and 1450 cm^{-1} there are overlapped bands corresponding to CH vibrations as well as to C-C (stretching) in aromatic structure and to OH groups. Peaks at around $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ correspond to C-O (stretching) and CH (aromatic) bonds. **Abbreviations:** FTIR, fourier transform infrared spectroscopy.

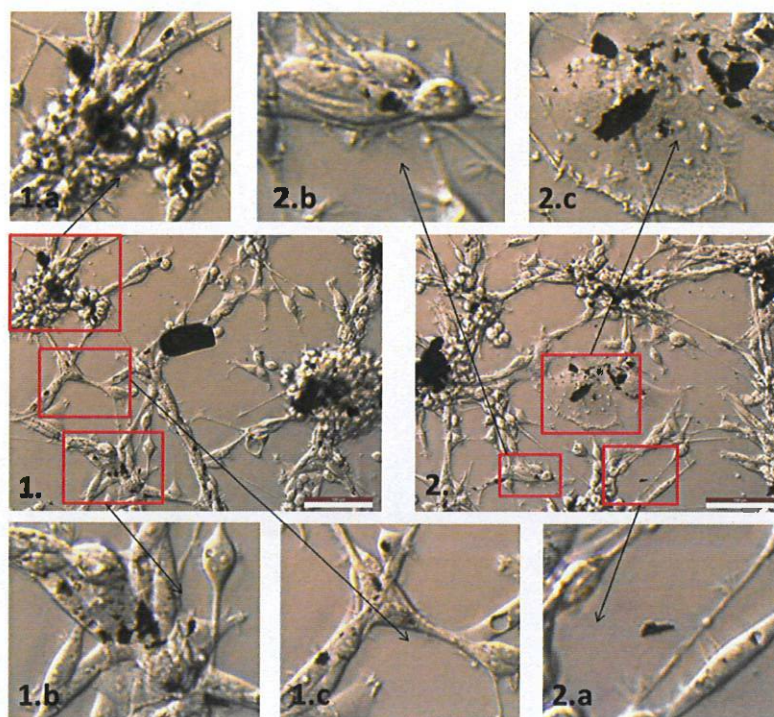


Figure A1. Morphology of U87 cells treated with GN flakes, as evaluated by optical microscopy. Cells treated with graphene flakes (at concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)—(1–2) GN/ExF. Regions of interest marked with red borders, are shown enlarged, and are indicated by black arrows. Scale bar: 100 μm .

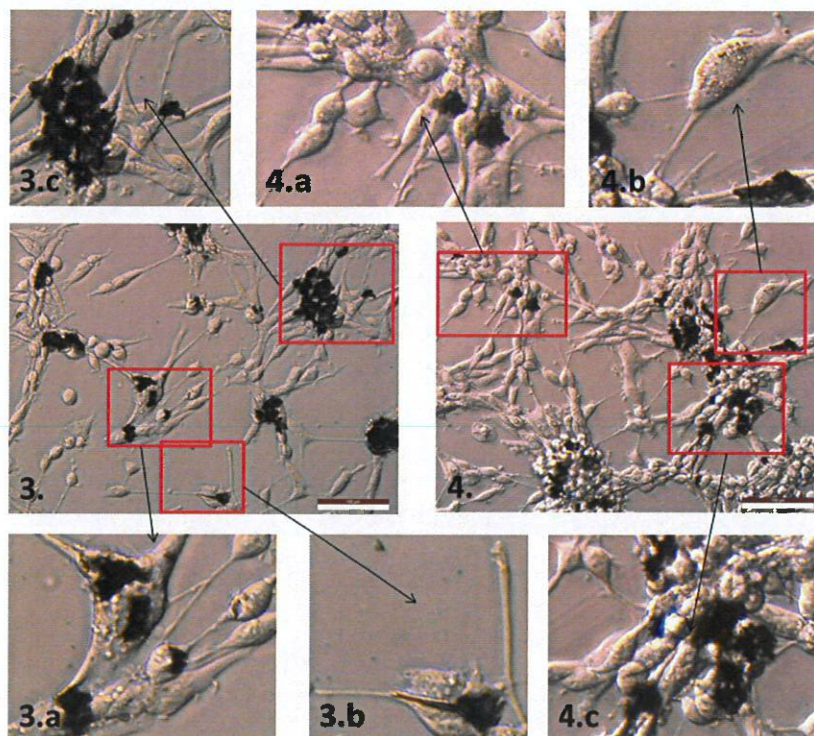


Figure A2. Morphology of U87 cells treated with rGO flakes, as evaluated by optical microscopy. Cells treated with graphene flakes (at concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)—(3–4) rGO/ATS. Regions of interest marked with red borders, are shown enlarged, and are indicated by black arrows. Scale bar: 100 μm .

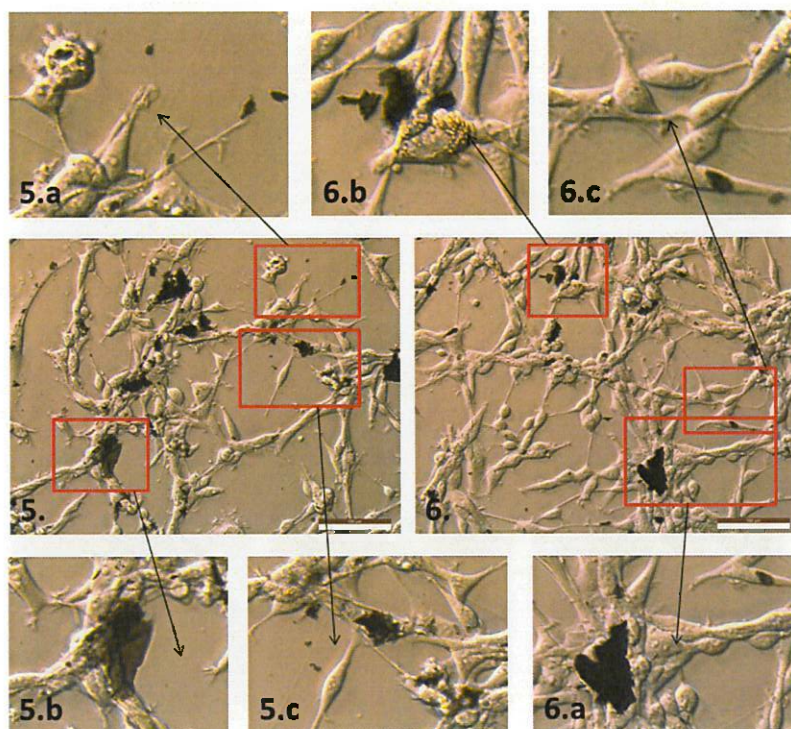


Figure A3. Morphology of U87 cells treated with rGO flakes, as evaluated by optical microscopy. Cells treated with graphene flakes (at concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)—(5–6) rGO/Term. Regions of interest marked with red borders, are shown enlarged, and are indicated by black arrows. Scale bar: 100 μm .

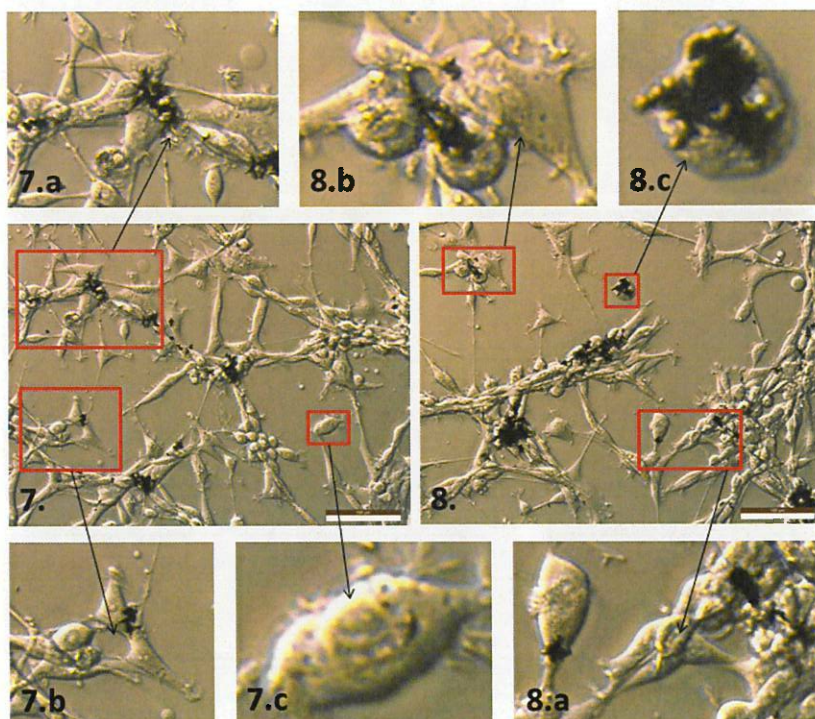


Figure A4. Morphology of U87 cells treated with rGO flakes, as evaluated by optical microscopy. Cells treated with graphene flakes (at concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)—(7–8) rGO/TUD. Regions of interest marked with red borders, are shown enlarged, and are indicated by black arrows. Scale bar: 100 μm .

References

1. Novoselov, K.S.; Geim, A.K.; Morozov, S.V.; Jiang, D.; Katsnelson, M.I.; Grigorieva, I.V.; Dubonos, S.V.; Firsov, A.A. Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene. *Nature* **2005**, *438*, 197–200. [CrossRef] [PubMed]
2. Gao, W. *The Chemistry of Graphene Oxide*; Springer International Publishing: Basel, Switzerland, 2015. [CrossRef]
3. Grodzik, M.; Sawosz, E.; Wierzbicki, M.; Orłowski, P.; Hotowy, A.; Niemieć, T.; Szmidt, M.; Mitura, K.; Chwalibog, A. Nanoparticles of carbon allotropes inhibit glioblastoma multiforme angiogenesis in ovo. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 3041–3048.
4. 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*, 195. [CrossRef] [PubMed]
5. Szala, S.; Jarosz, M.; Smolarczyk, R.; Cichoń, T. “Vicious circles” of glioblastoma tumors: Vascularization and invasiveness. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* **2012**, *66*, 888–900. [CrossRef] [PubMed]
6. Molenaar, R.J. Ion channels in glioblastoma. *ISRN Neurol.* **2011**, *2011*, 590249. [CrossRef] [PubMed]
7. Jaworski, S.; Sawosz, E.; Kutwin, K.; 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. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 1585–1596. [CrossRef]
8. Jaworski, S.; Sawosz, E.; Grodzik, M.; Winnicka, A.; Prasek, M.; Wierzbicki, M.; Chwalibog, A. In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 413–420. [CrossRef]
9. Skoda, M.; Dudek, I.; Jarosz, A.; Szukiewicz, D. Graphene: One Material, Many Possibilities—Application Difficulties in Biological System. *J. Nanomater.* **2014**, *2014*, 890246. [CrossRef]
10. Marchesan, S.; Melchionna, M.; Prato, M. Carbon Nanostructures for Nanomedicine: Opportunities and Challenges. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostruct.* **2014**, *22*, 190–195. [CrossRef]
11. McCallion, C.; Burthem, J.; Rees-Unwin, K.; Golovanov, A.; Pluen, A. Graphene in therapeutics delivery: Problems, solutions and future opportunities. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *104*, 235–250. [CrossRef]
12. Loh, K.P.; Ho, D.; Chiu, G.N.C.; Leong, D.T.; Pastorin, G.; Chow, E.K.-H. Clinical Applications of Carbon Nanomaterials in Diagnostics and Therapy. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1802368. [CrossRef] [PubMed]
13. Jarry, U.; Chauvin, C.; Joalland, N.; Leger, A.; Minault, S.; Robard, M.; Bonneville, M.; Oliver, L.; Vallette, F.M.; Vie, H.; et al. Stereotaxic administrations of allogeneic human Vγ9Vδ2 T cells efficiently control the development of human glioblastoma brain tumors. *Oncimmunology* **2016**, *5*, e1168554. [CrossRef] [PubMed]
14. Lan, Y.; Zondode, M.; Deng, H.; Yan, J.-A.; Ndaw, M.; Lisfi, A.; Wang, C.; Pan, Y.-L. Basic Concepts and Recent Advances of Crystallographic Orientation Determination of Graphene by Raman Spectroscopy. *Crystals* **2018**, *8*, 375. [CrossRef]
15. Sreekanth, P.; Pranitha, S.; Priya, R.; Reji, P. White light Z-scan measurements of ultrafast optical nonlinearity in reduced graphene oxide nanosheets in the 400–700 nm region. *Appl. Phys. Lett.* **2015**, *107*, 051104.
16. Dickson, J.; Nish, T.; Aabhash, G.; Geckeler, K. A direct route towards preparing pH-sensitive graphene nanosheets with anti-cancer activity. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 4085–4093. [CrossRef]
17. Araujo, P.T.; Terrones, M.; Dresselhaus, M.S. Defects and impurities in graphene-like materials. *Mater. Today* **2012**, *15*, 98–109. [CrossRef]
18. Cancado, L.G.; Jorio, A.; Martins Ferreira, E.H.; Stavale, F.; Achete, C.A.; Capaz, R.B.; Moutinho, M.V.O.; Lombardo, A.; Kulmala, T.S.; Ferrari, A.C. Quantifying defects in graphene via Raman spectroscopy at different excitation energies. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 3190–3196. [CrossRef]
19. Martins Ferreira, E.H.; Moutinho, M.V.O.; Stavale, F.; Lucchese, M.M.; Capaz, R.B.; Achete, C.A.; Jorio, A. Evolution of the Raman spectra from single-, few-, and many-layer graphene with increasing disorder. *Phys. Rev. B* **2010**, *82*, 124529. [CrossRef]
20. Oh, W.C.; Zhang, F.J. Preparation and characterization of graphene oxide reduced from a mild chemical method. *Asian J. Chem.* **2011**, *23*, 875–879.
21. Narksitipan, S.; Thongtem, S. Synthesis and Characterization of Transparent Graphene Oxide Nanosheets. *Ferroelectr. Lett.* **2014**, *41*, 94–99. [CrossRef]

22. Stobinski, L.; Lesiaka, B.; Malolepszy, A.; Mazurkiewicz, A.; Mierzwa, B.; Zemek, J.; Jiricek, P.; Bieloshapka, I. Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **2014**, *195*, 145–154. [CrossRef]
23. Gurunathan, S.; Woong, H.J.; Kim, E.; Kwon, D.N.; Park, J.K.; Kim, J.H. Enhanced green fluorescent protein-mediated synthesis of biocompatible graphene. *J. Nanobiotechnol.* **2014**, *12*, 41. [CrossRef] [PubMed]
24. Mindivan, F. The synthesis and characterization of graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO). *Mach. Technol. Mater.* **2016**, *2*, 51–54.
25. Yousefi, N.; Gudarzi, M.M.; Zheng, Q.; Aboutaleb, S.H.; Sharif, F.; Kim, J.-K. Self-alignment and high electrical conductivity of ultralarge graphene oxide—Polyurethane nanocomposites. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 12709–12717. [CrossRef]
26. Duan, G.; Zhang, Y.; Luan, B.; Weber, J.K.; Zhou, R.W.; Yang, Z.; Zhao, L.; Luo, J.; Zhou, R. Graphene-Induced Pore Formation on Cell Membranes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42767. [CrossRef] [PubMed]
27. Lammel, T.; Boisseaux, P.; Fernández-Cruz, M.L.; Navas, J.M. Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. *Part. Fibre Toxicol.* **2013**, *10*, 27. [CrossRef] [PubMed]
28. Zhang, B.; Wei, P.; Zhou, Z.; Wei, T. Interactions of graphene with mammalian cells: Molecular mechanisms and biomedical insights. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *105*, 145–162. [CrossRef]
29. Markovic, Z.M.; Harhaji-Trajkovic, L.M.; Todorovic-Markovic, B.M.; Kepić, D.P.; Arsikin, K.M.; Jovanović, S.P.; Pantovic, A.C.; Dramićanin, M.D.; Trajkovic, V.S. In vitro comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1121–1129. [CrossRef]
30. 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. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 2409–2417.
31. Mytych, J.; Wnuk, M. Nanoparticle technology as a double-edged sword: Cytotoxic, genotoxic and epigenetic effects on living cells. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2013**, *4*, 53–63.
32. Li, Y.; Yuan, H.; von dem Bussche, A.; Creighton, M.; Hurt, R.H.; Kane, A.B.; Gao, H. Graphene microsheets enter cells through spontaneous membrane penetration at edge asperities and corner site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 12295–12300. [CrossRef] [PubMed]
33. Sawosz, E.; Jaworski, S.; Kutwin, M.; Prasad Vadalasetty, K.; Grodzik, M.; Wierzbicki, M.; Kurantowicz, N.; Strojny, B.; Hotowy, A.; Lipińska, L.; et al. Graphene functionalized with arginine decreases the development of glioblastoma multiforme tumor in a gene-dependent manner. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 25214–25233. [CrossRef] [PubMed]
34. Zakrzewska, K.E.; Samluk, A.; Wierzbicki, M.; Jaworski, S.; Kutwin, M.; Sawosz, E.; Chwalibog, A.; Pijanowska, D.G.; Pluta, K.D. Analysis of the cytotoxicity of carbon-based nanoparticles, diamond and graphite, in human glioblastoma and hepatoma cell lines. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122579. [CrossRef] [PubMed]
35. Trpkovic, A.; Todorovic-Markovic, B.; Trajkovic, V. Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: Mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 1809–1827. [CrossRef] [PubMed]
36. Han, Y.G.; Xu, J.; Li, Z.G.; Ren, G.G.; Yang, Z. In vitro toxicity of multi-walled carbon nanotubes in C6 rat glioma cells. *Neurotoxicology* **2012**, *33*, 1128–1134. [CrossRef] [PubMed]
37. Moore, T.L.; Podilakrishna, R.; Rao, A.; Alexis, F. Systemic administration of polymer-coated nano-graphene to deliver drugs to glioblastoma. *Part. Part. Syst. Charact.* **2014**, *31*, 886–894. [CrossRef]
38. Markovic, Z.M.; Ristic, B.Z.; Arsikin, K.M.; Klisic, D.G.; Harhaji-Trajkovic, L.M.; Todorovic-Markovic, B.M.; Kepic, D.P.; Kravic-Stevovic, T.K.; Jovanovic, S.P.; Milenkovic, M.M.; et al. Graphene quantum dots as autophagy-inducing photodynamic agents. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7084–7092. [CrossRef]
39. Ou, L.; Song, B.; Liang, H.; Liu, J.; Feng, X.; Deng, B.; Sun, T.; Shao, L. Toxicity of graphene-family nanoparticles: A general review of the origins and mechanisms. *Part. Fibre Toxicol.* **2016**, *13*, 57. [CrossRef]
40. Ou, L.; Lin, S.; Song, B.; Liu, J.; Lai, R.; Shao, L. The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: A review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 6633–6646. [CrossRef]

41. Mukhtar, E.; Adhami, V.M.; Khan, N.; Mukhtar, H. Apoptosis and Autophagy Induction As Mechanism of Cancer Prevention by Naturally Occuring Dietary Agents. *Curr. Drug Targets* **2012**, *13*, 1831–1841. [CrossRef]
42. Perelman, A.; Wachtel, C.; Cohen, M.; Haupt, S.; Shapiro, H.; Tzur, A. JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.* **2012**, *3*, e430. [CrossRef] [PubMed]
43. Delettre, C.; Yuste, V.J.; Moubarak, R.S.; Bras, M.; Lesbordes-Brion, J.-C.; Petres, S.; Bellalou, J.; Susin, S.A. AIFsh, a novel apoptosis-inducing factor (AIF) pro-apoptotic isoform with potential pathological relevance in human cancer. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 6413–6427. [CrossRef] [PubMed]
44. Van Gurp, M.; Festjens, N.; Van Loo, G.; Saelens, X.; Vandenabeele, P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*, 487–497. [CrossRef]
45. Garrido, C.; Galluzzi, L.; Brunet, M.; Puig, P.E.; Didelot, C.; Kroemer, G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 1423–1433. [CrossRef] [PubMed]
46. Bratton, S.B.; Salvesen, G.S. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 3209–3214. [CrossRef] [PubMed]
47. Kang, Y.; Liu, J.; Wu, J.; Yin, Q.; Liang, H.; Chen, A.; Shao, L. Graphene oxide and reduced graphene oxide induced neural pheochromocytoma-derived PC12 cell lines apoptosis and cell cycle alterations via the ERK signaling pathways. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 5501–5510. [CrossRef] [PubMed]
48. Wang, X.; Wang, D.; Yuan, N.; Liu, F.; Wang, F.; Wang, B.; Zhou, D. The prognostic value of PCNA expression in patients with osteosarcoma. *Medicine* **2017**, *96*, e8254. [CrossRef] [PubMed]
49. Li, L.T.; Jiang, G.; Chen, Q.; Zheng, J.N. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *11*, 1566–1572. [CrossRef] [PubMed]
50. Hua, C.; Zhao, G.; Li, Y.; Bie, L. Minichromosome Maintenance (MCM) Family as potential diagnostic and prognostic tumor markers for human gliomas. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 526. [CrossRef] [PubMed]
51. Sawosz, E.; Jaworski, S.; Kutwin, M.; Hotowy, A.; Wierzbicki, M.; Grodzik, M.; Kurantowicz, N.; Strojny, B.; Lipinska, L.; Chwalibog, A. Toxicity of pristine graphene in experiments in a chicken embryo model. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 3913–3922. [CrossRef]
52. Miao, C.; Wang, Z.; Yang, J.; Li, J.; Gao, X. Expression and mutation analysis of Cyclin A and Ki67 in glioma and their correlation with tumor progression. *Oncol. Lett.* **2015**, *10*, 1716–1720. [CrossRef] [PubMed]
53. Wang, Y.; Xu, J.; Xu, L.; Tan, X.; Feng, L.; Luo, Y.; Liu, J.; Liu, Z.; Peng, R. Functionalized graphene oxide triggers cell cycle checkpoint control through both the ATM and the ATR signaling pathways. *Carbon* **2018**, *128*, 495–503. [CrossRef]
54. Ma, H.; Rao, L.; Wang, H.L.; Mao, Z.W.; Lei, R.H.; Yang, Z.Y.; Qing, H.; Deng, Y.L. Transcriptome analysis of glioma cells for the dynamic response to c-irradiation and dual regulation of apoptosis genes: A new insight into radiotherapy for glioblastomas. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e895. [CrossRef] [PubMed]
55. Yang, Y.; Rigdon, W.; Huang, X.; Li, X. Enhancing graphene reinforcing. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1–7. [CrossRef]
56. Horvath, L.; Magrez, A.; Burghard, M.; Kern, K.; Forro, L.; Schwaller, B. Evaluation of the toxicity of graphene derivatives on cells of the lung luminal surface. *Carbon* **2013**, *64*, 45–60. [CrossRef]
57. Mao, J.; Guo, R.; Yan, L.T. Simulation and analysis of cellular internalization pathways and membrane perturbation for graphene nanosheets. *Biomaterials* **2014**, *35*, 6069–6077. [CrossRef] [PubMed]
58. Li, Y.; Liu, Y.; Fu, Y.J.; Wei, T.T.; Le Guyader, L.; Gao, G.; Liu, R.S.; Chang, Y.Z.; Chen, C.Y. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials* **2012**, *33*, 402–411. [CrossRef]
59. Zhou, H.; Zhang, B.; Zheng, J.; Yu, M.; Zhou, T.; Zhao, K.; Jia, Y.; Gao, X.; Chen, C.; Wei, T. The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene via the impairment of mitochondrial respiration. *Biomaterials* **2014**, *35*, 1597–1607. [CrossRef] [PubMed]
60. Seabra, A.B.; Paula, A.J.; De Lima, R.; Alves, O.L.; Duran, N. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 159–168. [CrossRef]
61. Yuan, J.; Gao, H.; Ching, C.B. Comparative protein profile of human hepatoma HepG2 cells treated with graphene and single-walled carbon nanotubes: An iTRAQ-coupled 2D LCMS/MS proteome analysis. *Toxicol. Lett.* **2011**, *207*, 213–221. [CrossRef]
62. Pinto, A.M.; Gonc, I.C.; Magalhaes, F.D. Graphene-based materials biocompatibility: A review. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *111*, 188–202. [CrossRef] [PubMed]

63. Marcano, D.C.; Kosynkin, D.V.; Berlin, J.M.; Sinitskii, A.; Sun, Z.; Slesarev, A.; Lawrence, B.A.; Lu, W.; Tour, J.M. Improved synthesis of graphene oxide. *ACS Nano* **2010**, *4*, 4806–4814. [CrossRef] [PubMed]
64. Strojny, B.; Grodzik, M.; Sawosz, E.; Winnicka, A.; Kurantowicz, N.; Jaworski, S.; Kutwin, M.; Urbańska, K.; Hotowy, A.; Wierzbicki, M.; et al. 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*, e0164637. [CrossRef] [PubMed]
65. Aithal, M.G.S.; Rajeswari, N. Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Glioblastoma Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Brain Tumor Res. Treat.* **2015**, *3*, 24–29. [CrossRef] [PubMed]
66. 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] [PubMed]



© 2018 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/>).



Article

Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme

Jaroslav Szczepaniak ¹, Joanna Jagiello ², Mateusz Wierzbicki ¹, Dorota Nowak ³, Anna Sobczyk-Guzenda ⁴, Malwina Sosnowska ¹, Sławomir Jaworski ¹, Karolina Daniluk ¹, Maciej Szmidt ⁵, Olga Witkowska-Pilaszewicz ⁶, Barbara Strojny-Cieslak ^{1,*} and Marta Grodzik ^{1,*}

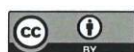
- ¹ Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; jaroslav_szczepaniak@sggw.edu.pl (J.S.); mateusz_wierzbicki@sggw.edu.pl (M.W.); malwina_sosnowska@sggw.edu.pl (M.S.); slawomir_jaworski@sggw.edu.pl (S.J.); karolina_daniluk@sggw.edu.pl (K.D.)
 - ² Department of Chemical Synthesis and Flake Graphene, Łukasiewicz Research Network–Institute of Microelectronics and Photonics, 01-919 Warsaw, Poland; joanna.jagiello@itme.edu.pl
 - ³ Tricomed SA, 5/9 Swiętojanska St., 93-493 Lodz, Poland; nowak.dora@gmail.com
 - ⁴ Institute of Materials Science and Engineering, Lodz University of Technology, 90-924 Lodz, Poland; anna.sobczyk-guzenda@p.lodz.pl
 - ⁵ Department of Morphologic Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; maciej_sznidt@sggw.edu.pl
 - ⁶ Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; olga_witkowska_pilaszewicz@sggw.edu.pl
- * Correspondence: barbara_strojny@sggw.edu.pl (B.S.-C.); marta_grodzik@sggw.edu.pl (M.G.)



Citation: Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbicki, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmidt, M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; et al. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 515. <https://doi.org/10.3390/ijms22020515>

Received: 8 December 2020
Accepted: 4 January 2021
Published: 6 January 2021

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



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

Abstract: The development of nanotechnology based on graphene and its derivatives has aroused great scientific interest because of their unusual properties. Graphene (GN) and its derivatives, such as reduced graphene oxide (rGO), exhibit antitumor effects on glioblastoma multiforme (GBM) cells in vitro. The antitumor activity of rGO with different contents of oxygen-containing functional groups and GN was compared. Using FTIR (fourier transform infrared) analysis, the content of individual functional groups (GN/exfoliation (ExF), rGO/thermal (Term), rGO/ammonium thiostuphate (ATS), and rGO/thiourea dioxide (TUD)) was determined. Cell membrane damage, as well as changes in the cell membrane potential, was analyzed. Additionally, the gene expression of voltage-dependent ion channels (*clcn3*, *clcn6*, *cacna1b*, *cacna1d*, *nalcn*, *kcne4*, *kcnc10*, and *kcnb1*) and extracellular receptors was determined. A reduction in the potential of the U87 glioma cell membrane was observed after treatment with rGO/ATS and rGO/TUD flakes. Moreover, it was also demonstrated that major changes in the expression of voltage-dependent ion channel genes were observed in *clcn3*, *nalcn*, and *kcne4* after treatment with rGO/ATS and rGO/TUD flakes. Furthermore, the GN/ExF, rGO/ATS, and rGO/TUD flakes significantly reduced the expression of extracellular receptors (uPar, CD105) in U87 glioblastoma cells. In conclusion, the cytotoxic mechanism of rGO flakes may depend on the presence and types of oxygen-containing functional groups, which are more abundant in rGO compared to GN.

Keywords: graphene; reduced graphene oxide; glioblastoma multiforme; voltage-gated ion channel; cell membrane receptor; membrane potential

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most common primary malignant brain tumor. GBM is associated with poor prognosis and a life expectancy of approximately 15 months despite optimal therapy, which includes surgery, chemotherapy, and radiotherapy [1]. The lack of therapeutic success has been attributed to a variety of factors, including rapid infiltration of brain tumor cells, inter- and intratumor heterogeneity, limited diffusion of therapeutic

drugs across the blood–brain barrier and brain parenchyma/tumor, and the presence of GBM stem cells (GSC) in the tumor, which are resistant to radiotherapy and chemotherapy and are capable of tumor formation and indefinite self-renewal [2].

Graphene is made up of a layer of carbon atoms arranged in a hexagonal pattern and consists purely of sp² hybridized bonds. It has gained enormous interest in various fields owing to its unique electrochemical properties, which include high thermal conductivity, high current, density, chemical volume, optical transmittance, and very high hydrophobicity [3,4]. It is the simplest form of carbon and the thinnest material ever produced [5]. The graphene family includes sheets and flakes of graphene as well as graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO) [6,7]. GO is highly hydrophilic because of the presence of a large number of oxygen groups on the surface (hydroxyl, carboxyl, epoxy). rGO has more oxygen functional groups than graphene (GN), but less than GO. Therefore, rGO is less hydrophilic than GO and, therefore, has higher electrical conductivity [8]. In addition to the numerous applications of graphene materials in electronics, their derivatives are also assessed for their use in medicine, for example, in anticancer therapy [9,10]. Our previous studies have shown that graphene and its derivatives can be cytotoxic to glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. GN, rGO, and GO induce apoptosis and lead to the reduction of viability and proliferation in U87 and U118 glioblastoma cell lines [11]. Jaworski et al. also showed that graphene flakes were too large (0.45–1.5 μm) to enter the glioblastoma cells [11,12]. However, both GN and rGO can activate the mitochondrial-dependent apoptotic pathway by reducing the mitochondrial membrane potential in U87 glioma cells. On the contrary, GO can regulate the expression of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) genes in GBM, thus leading to a decrease in the invasion potential of cancer cells [13]. The tested materials (GN/exfoliation (ExF), rGO/thermal (Term), rGO/ammonium thiosulphate (ATS), and rGO/thiourea dioxide (TUD)) showed no effect on the cell cycle [14]. Despite the fact that even minimal oxygen content on the surface of the flakes may reduce the proapoptotic abilities of graphene and its derivatives, oxygen-containing derivatives have a better affinity for GBM cells than pure graphene, which allows for better targeting of the intended effect [15].

An important finding seems to be the reduction of oxygen content in rGO in relation to the starting material, GO, which results in an increase of delocalized electrons on the surface of the graphene flakes. This can lead to a disruption of the signaling pathways in the plasma membrane or to direct interaction with cell structures, which are sensitive to electrochemical potential. Therefore, graphene and its derivatives are characterized by strong bioelectric properties; because of the presence of delocalized electrons and oxygen-containing functional groups on the surface of the flakes, this material can interact with structures that receive electrical signals, for example, receptors located on the cell surface, as well as proteins building voltage-dependent ion channels, ultimately causing changes in the potential of the cell membrane. Cell surface charge is a key biophysical parameter that depends on the composition of the cytoplasmic membrane and the physiological state of cells. In addition to the presence of ion channels and transporters, negative values of cell membrane potential at physiological pH values are also caused by the presence of nonionic groups in phospholipids (phosphatidylcholine; −62 mV), proteins, and their polysaccharide conjugates [16]. Direct comparisons of the *in vitro* and *in vivo* V_m levels of normal and cancer cells showed that the cancer cells were more depolarized (negative V_m) than their normal counterparts [17]. Therefore, the studied materials of graphene origin (GN and rGO) may prefer adhesion to neoplastic cells with depolarized cell membranes. Moreover, Fiorillo et al. proved that GO, characterized by the presence of many functional groups containing oxygen, preferred adhesion to U87 tumor cells rather than stem cells and normal fibroblasts [18]. Therefore, it has been hypothesized that graphene-derived flakes exert modulating and transducing effects on proteins contained in the membrane of U87 glioma cancer cells. These effects result from the unique structure and type of functional groups on the surface of graphene. GN flakes are characterized by several functional groups on the surface, and they possess a larger electron cloud than rGO.

Ion channels play an important role in the regulation of electrical excitability in normal and cancer cells [19]. Ion channels and transporters are also associated with GBM tumor growth and malignancy [20]. Genomic analysis revealed that the genes involved in Na, K, Ca transmission or transport belong to the most frequently mutated functional groups affecting GBM in 90% of the tested samples [21,22]. Therefore, the article discusses the subject of studying the expression of individual subunits that build ion channels (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-). The functioning of ion channels and pumps influences the migration and proliferation of GBM cells. For example, deregulated K^+ and Cl^- channels regulate the osmotic drive, allowing for cell shape and volume changes that promote glioblastoma cell migration [23], and Ca-activated K^+ (BK) channels, which control glioblastoma cell growth [24]. In this study, we hypothesize that flakes of graphene (GN) and reduced graphene oxides (rGOs) may affect the expression of voltage-dependent ion channel genes Cl^- (*clcn3* and *clcn6*), Ca^{2+} (*cacna1b* and *cacna1d*), Na^+ (*nalcn*), K^+ (*kcne4*, *kcnj10*, and *kcnb1*), resulting in an alteration of the potential of the glioblastoma cell membrane. It is also suspected that GN and rGO flakes may reduce the expression of extracellular receptors and further reduce the invasiveness of glioblastoma in vitro.

The aim of this study is to determine changes in the cell membrane caused by direct or indirect contact with bioelectric flakes of rGO with different degrees of reduction compared to GN in U87 glioblastoma multiforme cells in vitro.

2. Results

2.1. Physicochemical Characterization of GN and rGO Flakes

The physicochemical properties (inter alia, transmission electron microscopy, Raman spectroscopy, atomic force microscopy, zeta potential, oxygen content, and electrical resistance) of graphene (GN) and reduced graphene oxides (rGOs) have recently been published [14]. In this study, the physicochemical properties were complemented with an additional analysis of the tested materials. FTIR analysis allowed us to obtain detailed information about the functional groups.

SEM images were used to confirm the morphology of the graphene flakes. Microphotographs of thin layers of GN and rGO graphene sheets are shown in Figure 1. In GN/ExF (a1), irregular edges of graphene flakes were observed. Photos showing rGO/Term (b1), rGO/ATS (c1), and rGO/TUD (d1) samples showed wrinkled and complex textures with rough surfaces, resulting from collapse. SEM images, taken in the AEE (active emission element) mode (Figure 1(a2,b2,c2,d2)), allowed the scanning of graphene with the table current. Owing to this, the quality of the images was good for conductive materials.

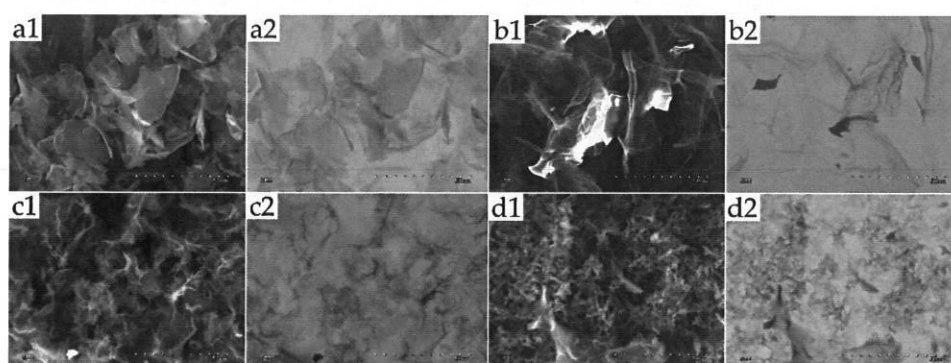


Figure 1. Morphology of GN and rGOs was examined using a scanning electron microscope (SEM). (a1) GN/ExF, (b1) rGO/Term, (c1) rGO/ATS, (d1) rGO/TUD—standard SEM images show 2D nanosheets morphologies. Scale bar: 50 μm . (a2) GN/ExF, (b2) rGO/Term, (c2) rGO/ATS, (d2) rGO/TUD—AEE mode showing conductive materials. Scale bar: 50 μm . **Abbreviations:** GN, graphene; rGO, reduced graphene oxide; SEM, scanning electron microscope; AEE, active emission element; ExF, exfoliation; Term, thermal; ATS, ammonium thiosulphate; TUD, thiourea dioxide.

The presence of functional groups was confirmed by FTIR analysis (Figure 2). Spectrum analysis showed the presence of aliphatic groups containing C-H bonds in their chemical structure. From the presented spectra, it can be concluded that the purest was graphene GN/ExF. The spectrum of this sample lacked absorption bands in the range of wave numbers between 3000–2800 cm^{-1} and 1470–1440 cm^{-1} . Graphene rGO/Term and rGO/ATS had similar amounts of these impurities. The most C-H bonds occurring in both the form of methyl and methylene groups were in graphene rGO/TUD. In the obtained spectra, bands originating mainly from O-H, C-H, C=O, and C-O bond vibrations were visible. The location and assignment of individual bands to specific bonds are shown and summarized in Table 1.

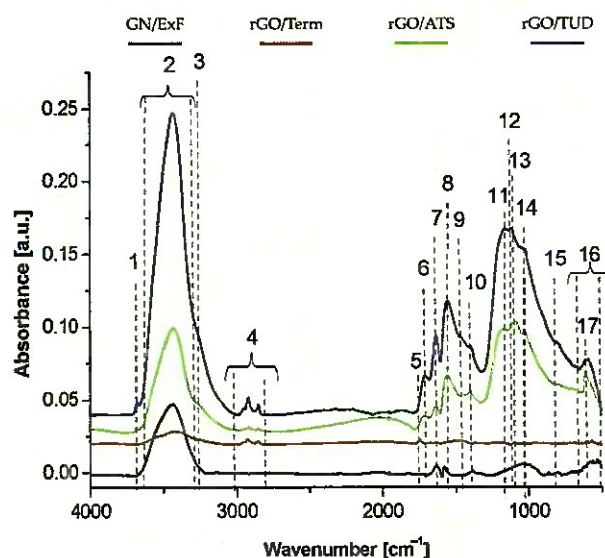


Figure 2. Fourier transform infrared (FTIR) spectra of graphene (GN/ExF; black line) and reduced graphene oxides (rGO/Term, red line; rGO/ATS, green line; rGO/TUD, blue line). The individual digital markings on the graph show the bands associated with the occurrence of individual functional groups; 1 (OH-), 2 (OH-), 3 (N-H), 4 (C-H), 5 (C=O), 6 (C=O), 7 (C=C), 8 (COO-), 9 (C-H), 10 (-OH), 11 (C-O-C), 12 (C-NH₂/C-N), 13 (C-S), 14 (carbon ring), 15 (CH₂=CH), 16 (carbon ring), 17 (C-S/S-O). **Abbreviations:** GN, graphene; rGO, reduced graphene oxide; FTIR, Fourier transform infrared; a.u., absorbance unit; ExF, exfoliation; Term, thermal; ATS, ammonium thiosulphate; TUD, thiourea dioxide.

Considering the quantity of oxidized carbon in its chemical structure as the criterion for assessing the quality of the tested material, the largest number of such connections was found in graphene rGO/TUD. Slightly less connection was observed in graphene rGO/ATS. Graphene GN/ExF had two characteristic low-intensity peaks belonging to C=O and COO⁻ bonds, which were also present in the spectra of samples rGO/ATS and rGO/TUD. The least number of C=O bonds occurred in the graphene rGO/Term. Only one peak with a maximum at 1747 cm^{-1} appeared in the spectrum of this material. Therefore, the rGO/Term material turned out to be the most hydrophobic, which was confirmed by macroscopic observation of the behavior of graphene flakes in this solution. The sharp maximum in graphene rGO/TUD was observed at 3680 cm^{-1} . Additionally, bands from the vibration of N-H and C-NH₂ bonds appear in the spectra of graphene rGO/ATS and rGO/TUD, which were found at 3280 and 1124 cm^{-1} , respectively. The sulfur component was also incorporated into the graphene structure, giving peaks at wave numbers 1100 and 617 cm^{-1} .

Table 1. Location of absorption bands exhibited by the functional groups in FTIR spectra obtained for individual GN and rGO samples.

No.	Wavenumber [cm ⁻¹]	Type of Bond	Sample			
			GN/ExF	rGO/Term	rGO/ATS	rGO/TUD
1	3680	O-H (stretch)	-	-	-	+ (w)
2	3600–3000	O-H (stretch)	+ (m)	+ (w)	+ (m)	+ (s)
3	3280	N-H (stretch)	-	-	+ (m)	+ (m)
4	3000–2800	C-H (stretch)	-	+ (m)	+ (m)	+ (s)
5	1747	C=O (stretch)	-	+ (w)	-	-
6	1711	C=O (stretch)	-	-	+ (m)	+ (s)
7	1640	C=C (stretch)	+ (m)	-	+ (m)	+ (s)
8	1563	COO- (stretch)	+ (w)	-	+ (m)	+ (s)
9	1465	C-H (deformation)	-	+ (w)	+ (w)	+ (m)
10	1400	-OH (in-plane bendig)	+ (w)	+ (w)	+ (w)	+ (s)
11	1174	C-O-C (stretch)	+ (w)	-	+ (m)	+ (s)
12	1124	C-NH ₂ /C-N (stretch)	-	-	+ (m)	+ (w)
13	1100	C=S (stretch)	-	-	+ (w)	+ (w)
14	1018	Carbon ring	-	+ (w)	+ (m)	+ (m)
15	800	CH ₂ =CH (deformation)	-	-	+ (w)	+ (m)
16	659–511	carbon ring	+ (w)	+ (m)	+ (m)	+ (m)
17	617	C-S (stretch)/S-O (scissors)	-	-	+ (s)	+ (m)

Notes: designations used in the table: w—weak; m—medium; s—strong; "+"—current; "-"—absent. Abbreviations: GN, graphene; rGO, reduced graphene oxide; ExF, exfoliation; Term, thermal; ATS, ammonium thiosulphate; TUD, thiourea dioxide.

2.2. Membrane Potential

In the next stage, changes in cell membrane potential were analyzed. The results are presented in the form of line graphs depicting changes in cell membrane potential (Figure 3). In glioblastoma U87 cells, a statistically significant decrease in cell membrane potential was observed only after treatment with rGO/ATS and rGO/TUD flakes. The first potential peak (decrease; 516.7–563 RFU (relative fluorescence units)) after rGO/TUD treatment was observed after 2 and 4 h ($p < 0.05$). Maximum potential reduction after rGO/TUD treatment (714.7 RFU) occurred after 24 h of treatment ($p < 0.05$). In U87 cells after rGO/ATS treatment (567 RFU), the maximum reduction in cell membrane potential was observed after 22 h. The strongest reduction was observed after 18 h for both rGO/ATS and rGO/TUD ($p < 0.05$). In Hs5 cells, a significant reduction in cell membrane potential was observed only for rGO/ATS flakes (maximum 297.7 RFU after 4 h of treatment; p -value < 0.05). The strongest reduction was observed after 8 h of rGO/ATS flake treatment ($p < 0.05$). Greater changes in the potential were observed in cancer cells (421 RFU, 561.7 RFU) than in healthy cells (258.4 RFU, 384.3 RFU) after rGO/ATS and rGO/TUD treatment.

2.3. Gene Expression of Voltage-Gated Ion Channels

Analysis of the expression of genes involved in the transport of chlorine, calcium, sodium, and potassium voltage-dependent ions was performed. The results are shown in Figure 4 and Table S1. Gene expression that was studied using real-time PCR was focused on the genes coding the individual subunits of proteins that cocreate ion channels, responsible for the transport of the aforementioned ions.

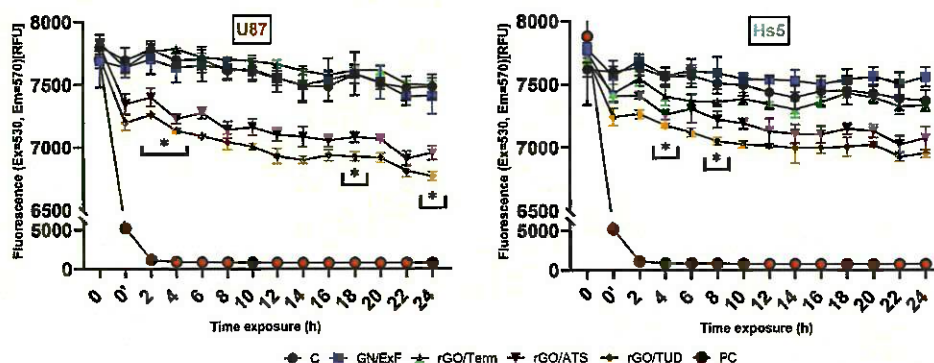


Figure 3. Effect of graphene flakes (GN/ExF) and three types of reduced graphene oxide flakes (rGO/Term, rGO/ATS, and rGO/TUD) on the membrane potential of U87 and Hs5 cell lines. The immediate reading after the addition is marked as 0 on the x-axis of the membrane potential sensor. PC represents the group after H_2O_2 (hydrogen peroxide) treatment as positive control. The reading after 30 min incubation with a membrane potential sensor is marked as 0' on the x-axis. The readings were taken for 24 h at 2 h intervals. Values are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical significance between the control and treated cells is indicated by an asterisk and was assessed using Bonferroni's multiple comparisons test. Differences with p -value < 0.05 were considered significant. One asterisk (*) means p -value < 0.05 . **Abbreviations:** rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; C, control group (untreated group); PC, positive control; h, hours; ExF, exfoliation; Term, thermal; ATS, ammonium thiosulphate; TUD, thiourea dioxide.

2.3.1. Chloride Channels

The expression of two subunits of chloride channels, *clcn3* and *clcn6*, was measured. In the U87 line, there was an increase in *clcn3* and *clcn6* expression 24 h after rGO/ATS ($\log_2RQ = 4.67 \pm 0.7158$) and rGO/TUD ($\log_2RQ = 6.89 \pm 0.7158$) treatment. There was an increase in *clcn3* expression after 6 h of treatment in all groups. The highest increase was observed in the rGO/ATS group ($\log_2RQ = 0.42 \pm 0.1063$). In Hs5 cells, there was no increase in *clcn3* and *clcn6* expression after 24 h treatment; however, there was higher expression after 6 h of treatment with rGO/ATS flakes ($\log_2RQ = 0.42 \pm 0.1063$).

2.3.2. Calcium Channels

In the noncancerous Hs5 cell line, there was an increase in *cacna1d* expression after 6 h of graphene rGO/Term treatment ($\log_2RQ = 0.7957 \pm 0.2863$), rGO/ATS ($\log_2RQ = 1.160 \pm 0.2863$), and rGO/TUD ($\log_2RQ = 1.387 \pm 0.2863$). After 24 h, there was a decrease in *cacna1d* expression in the rGO/ATS ($\log_2RQ = -0.7671 \pm 0.2863$) and rGO/TUD ($\log_2RQ = -1.029 \pm 0.2863$) groups. There was no expression of the *cacna1d* gene in the U87 glioblastoma line even in the control sample.

Comparing the expression of the *cacna1b* gene in both cell lines, a much higher expression was observed in the noncancerous Hs5 cells ($\log_2RQ = 7.757 \pm 1.492$). Additionally, in this cell line, under the influence of graphene flakes, a significant reduction in *cacna1b* expression was observed in all groups after 6 h of treatment. The highest reduction occurred in the rGO/Term treatment ($\log_2RQ = -2.953 \pm 0.2990$). After 24 h of treatment, no statistically significant changes were observed.

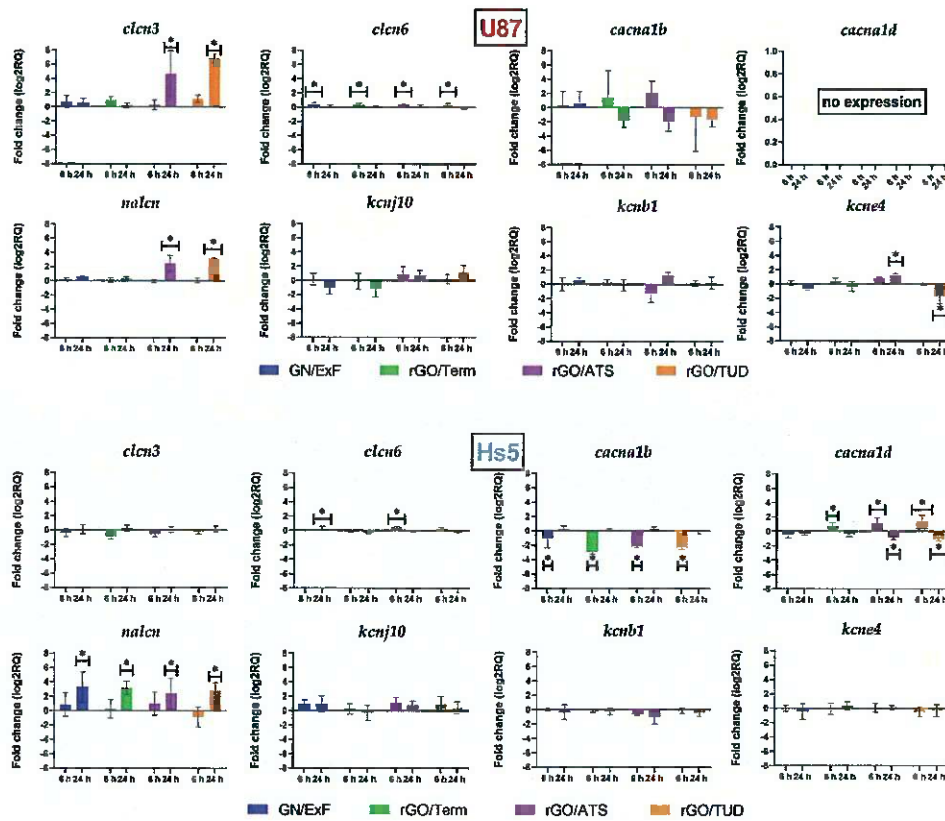


Figure 4. Analysis of the mRNA expression level of voltage-gated ion channels after treatment at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration for 6 and 24 h in U87 and Hs5 cells. The results are calculated relative to the control values. Log2RQ (log2 relative quantitation) values for all genes are normalized to the RPL13A housekeeping gene. Statistical significance between the control and the treated cells is indicated by an asterisk and was assessed using Bonferroni's multiple comparisons test. Differences with p -value < 0.05 were considered significant. One asterisk (*) means p -value < 0.05 . **Abbreviations:** rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; C, control group (untreated group); ExF, exfoliation; Term, thermal; ATS, ammonium thiosulphate; TUD, thiourea dioxide; *cIcn3*, chloride voltage-gated channel 3; *cIcn6*, chloride voltage-gated channel 6; *cacna1b*, calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 B; *cacna1d*, calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 D; *naIcn*, sodium leak channel, non-selective; *knj10*, potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 10; *knb1*, potassium voltage-gated Channel subfamily B member 1; *kcnk4*, potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 4; rpl13a, ribosomal protein L13a; log2RQ, log2 relative quantitation.

2.3.3. Sodium Channels

In the Hs5 cell line, there was an increase in *nalcn* expression in all examined groups after 24 h of flake treatment. The expression changes were as follows: GN/ExF ($\log_2\text{RQ} = 3.810 \pm 0.978$), rGO/Term ($\log_2\text{RQ} = 3.683 \pm 0.978$), rGO/ATS ($\log_2\text{RQ} = 2.904 \pm 0.978$), and rGO/TUD ($\log_2\text{RQ} = 3.338 \pm 0.978$). After 6 h of treatment, no significant changes were observed. In the U87 cell line, an increase in *nalcn* expression was observed after 24 h of treatment with rGO/ATS ($\log_2\text{RQ} = 2.472 \pm 0.978$) and rGO/TUD ($\log_2\text{RQ} = 3.200 \pm 0.978$) flakes. There were no significant changes in *nalcn* gene expression after 6 h of treatment in the U87 cell line.

2.3.4. Potassium Channels

In our study, we analyzed the expression of two potassium ion channel genes (*kcnb1* and *kcne4*). For both Hs5 fibroblast cells and U87 tumor cells, no statistically significant changes in *kcnb1* gene expression were observed. In Hs5 cells, there was no statistically significant change in *kcne4* expression in any of the studied groups. In U87, there was an increase in *kcne4* expression after 24 h treatment by rGO/ATS flakes ($\log_2\text{RQ} = 1.192 \pm 0.33452$) and a decrease ($\log_2\text{RQ} = -1.734 \pm 0.33452$) after 24 h of rGO/TUD treatment. No statistically significant changes in the expression of the *kcnj10* gene were observed in either Hs5 fibroblast cells or U87 tumor cells.

2.4. Expression of Membrane Receptors

Extracellular receptors expression was analyzed using Human Receptor Antibody Array (Targets: 4-1BB (TNFRSF9), ALCAM (CD166), CD80 (B7-1), BCMA (TNFRSF17), CD14, CD30 (TNFRSF8), CD40 Ligand (TNFSF5), CEACAM-1, DR6 (TNFRSF21), Dtk, Endoglin (CD105), ErbB3, E-Selectin, Fas (TNFRSF6), Flt-3 Ligand, GHR (TNFRSF18), HVEM (TNFRSF14), ICAM-3 (CD50), IL-1 R4 (ST2), IL-1 R1, IL10 Rbeta, IL-17RA, IL-1 R gamma, IL-21R, LIMP11, Lipocalin-2 (NGAL), L-Selectin (CD62L), LYVE-1, MICA, MICB, NRG1-beta 1, PDGF R beta, PECAM-1 (CD31), RAGE, TIM-1 (KIM-1), TRAIL R3 (TNFRSF10C), Trappin-2, uPar, VCAM-1 (CD106), XEDAR) (Table S2). The results are shown in Figure 5 and Figure S1. Significant changes in the expression of endoglin, MICA, and uPar receptors were seen in Hs5 cells. An increase in the expression of the uPar receptor in the Hs5 cell line occurred in all treatment groups. On the contrary, in U87 tumor cells, the effect is the opposite. A reduction in uPar receptor expression in all the studied groups was noticed. In Hs5, there was an increase in CD105 receptor expression in the rGO/ATS and rGO/TUD groups. In U87, there was a decrease in the expression of the CD105 receptor in all groups.

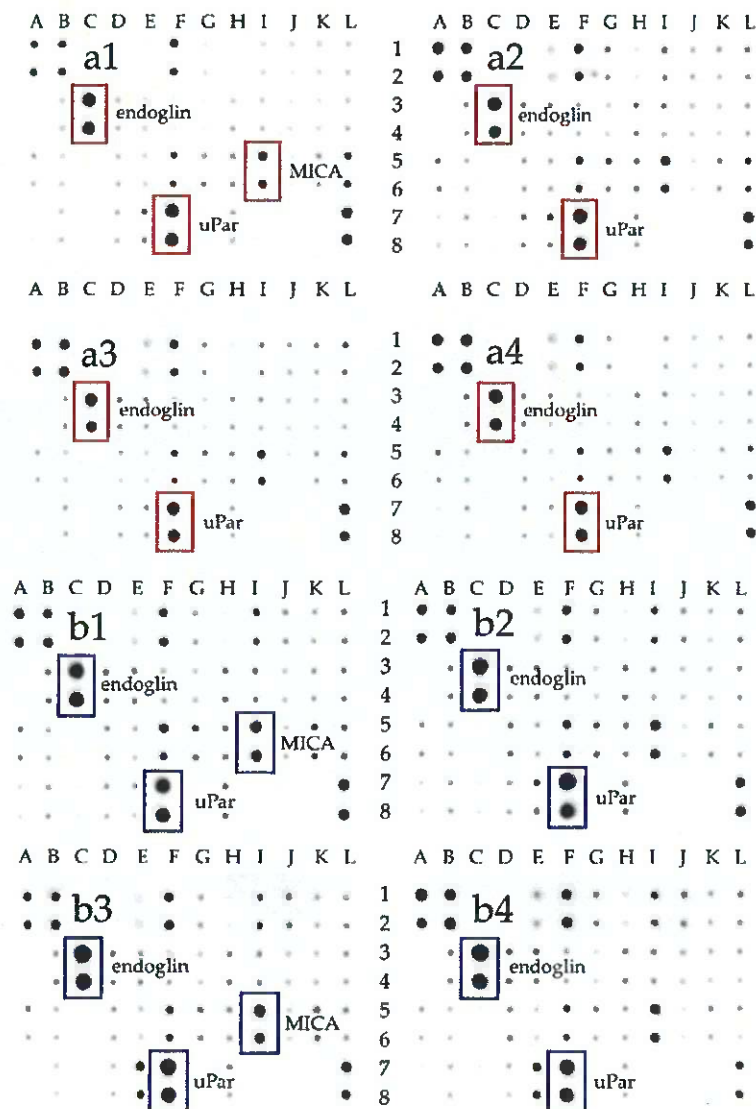


Figure 5. Antibody array analysis of human cell membrane receptor (original drafts) in U87 glioma cells (a1–a4) and Hs5 fibroblast cells (b1–b4), with or without 24 h treatment (C: control, a1,b1), with graphene flakes (GN/ExF: a2,b2) and two types of reduced graphene oxides (rGO/ATS: a3,b3; rGO/TUD: a4,b4). The full array map and uncropped images are available in the supplement material. Results were normalized and compared to a dots control sample. The dots with the location (C3, C4) indicate the expression of endoglin (CD105), (F7, F8) indicate uPar (CD87), and (I5, I6) indicate MICA. **Abbreviations:** rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; C, control group (untreated group); ExF, exfoliation; Term, thermal; ATS, ammonium thiosulphate; TUD, thiourea dioxide; CD105, endoglin; uPar, urokinase plasminogen activator surface receptor; MICA, major histocompatibility complex class I chain-related protein A.

3. Discussion

Previous studies have shown that reduced graphene oxides (rGOs), compared to graphene GN, does not exert identical effects on glioblastoma multiforme cancer cells. The

effectiveness of the tested materials was examined in terms of viability, metabolic activity, cell cycle dynamics, and the level of apoptosis. The results indicate that GN and rGOs activate the mitochondria-dependent apoptotic pathway by reducing the potential of the mitochondrial membrane. This study has proved that rGOs have a stronger cytotoxic effect than GN. We used the MTT assay to assess whether graphene and its derivatives also affect the viability and metabolic activity of fibroblast Hs5 and glioblastoma U87 cells. The highest decrease in metabolic activity in glioblastoma U87 cells, at $8.69\% \pm 12.88\%$, was found in the group treated with rGO/TUD at a concentration of $100 \mu\text{g/mL}$. Interestingly, in the group treated with rGO/ATS, the lowest viability, at $37.7\% \pm 12.55\%$, occurred at a concentration of $5 \mu\text{g/mL}$ rGO/ATS. In other groups treated with GN/ExF and rGO/Term, ~50% mortality was observed at concentrations ranging from 25 to $100 \mu\text{g/mL}$. Reducing the oxygen content and increasing defects in the connections between carbons in rGOs compared to GO resulted in an increase in the number of delocalized electrons on the surface of the graphene flakes and oxygen groups, including hydroxyl, carboxyl, and epoxy [14]. It was hypothesized that the cytotoxicity of rGOs may mainly result from direct contact with the glioblastoma cell membrane and may lead to the disruption of signaling pathways in the plasma membrane or direct interaction with cell structures, which are sensitive to electrochemical potential (cell membrane, e.g., ion channels and extracellular receptors). Studying the interactions between graphene materials and cell membranes may reveal the underlying mechanisms of the cytotoxicity of these materials.

Using FTIR analysis, a detailed examination was performed to compare the presence of characteristic functional groups in both reduced graphene oxides (rGO/Term, rGO/ATS, rGO/TUD) and graphene (GN/ExF). This analysis confirmed the results obtained in a previous study [14]. The FTIR analysis presented in this paper shows the presence of hydroxyl groups (-OH) on the surface of the flakes, derived from the native aqueous solution in which the flake suspensions were prepared. Further, the presence of C=O connections may be associated with a greater affinity of the material for the attachment of hydroxyl (OH-) groups. Thus, the more C=O bonds that are hydrophilic in nature, the more OH- hydroxyl groups. The presence of carbonyl groups (C=O) and carboxyl groups (COO-) was also observed. The highest expression was observed in the rGO/TUD treatment. In a study by Loryuenyong et al., the presence of hydroxyl (-OH), carbonyl (C=O), and epoxy (C-O) groups was confirmed in GO and rGO. Moreover, the high intensity of the main peaks in GO confirms the presence of a large number of oxygen functional groups after the oxidation process [25]. Emiru and Ayele obtained a similar band arrangement of the FTIR spectrum of GO and rGO, as presented in this article. Among other things, they observed such functional groups as OH-, COH-, COOH-, and CO- [26]. It showed that with the use of chemical methods, the content of functional groups is reduced. The most effective method for GO reduction is the thermal process because the obtained rGO/Term had the highest rate of reduction [14].

It is known that graphene materials can modulate electron transfer in redox reactions. The speed of the redox reactions on the graphene surface depends on the migration of electrons across the reactive surface and the subsequent transfer along the surface. Pan et al., during an analysis of the resistance in the studied graphene materials, proved that the higher the degree of graphene folding, the more difficult it was to transfer electrons [27]. The same relationship between the degree of folding and resistance was observed in a previous study [14]. Thus, the more corrugated the surface of the carbon material (rGO/Term < rGO/ATS < rGO/TUD), the lower the resistance of the graphene flakes.

The obtained selectivity of graphene flakes towards cancer cells could be determined by the differences in cell membrane potential (V_m) between cancer and noncancerous cells. Cell surface charge is a key biophysical parameter that depends on the composition of the cytoplasmic membrane and the physiological state of cells. Cone's theory [28] proposes a general correlation between proliferation and V_m , as he showed the significant depolarization of V_m during the malignant transformation of normal cells [29,30]. Direct comparisons of the in vitro and in vivo V_m levels of normal and cancer cells showed

that the cancer cells were more depolarized than their normal counterparts [17]. A cell depolarizes when V_m is relatively less negative (tumor cells, proliferating; 0 to -50 mV), while a hyperpolarized cell has more negative V_m (normal cells, nonproliferating; -50 to -90 mV) [31]. Glioblastoma cells express the potential of -14 mV of depolarized cell membrane, which determines the lower repulsive forces. Therefore, the flakes with reduced graphene (rGO/ATS and rGO/TUD in particular) possess a lower negative surface charge and can probably adhere to glioblastoma U87 cell membranes more easily.

When analyzing the results of the cell membrane potential (V_m) of U87 and Hs5, a decrease in cell membrane potential was observed over time after treatment with rGO/ATS and rGO/TUD flakes. However, the decrease in potential in fibroblast Hs5 cells was smaller than that in U87 cells: for rGO/ATS material, it was 258.4 RFU and 421 RFU, respectively, and for rGO/TUD material, 384.3 RFU and 561.7 RFU, respectively. Bondar et al. observed that the membrane potential in HeLa cells, in which apoptosis was thermally induced, shifted negatively by about 4.2 mV compared to control cells. This was probably the result of the redistribution of phosphatidylserine, containing a negatively charged carboxyl group, from the inner to the outer lipid layer of the cell membrane [16]. Therefore, the reduction of the U87 glioma cell membrane potential after treatment with rGO/ATS and rGO/TUD flakes may be partially secondary to the flakes due to the induction of apoptosis in cells.

Graphene flakes, apart from direct contact with the lipid double membrane, are in contact with channels, including ion channels. Ion channels are membrane proteins that open or close a plasmatic membrane, depending on a voltage gradient or ligand binding. They are essential for cell proliferation and play a key role in malignant glioma by influencing the shape and volume of glioblastoma cells, which, in turn, may influence the invasiveness and migration of tumors [32].

The effect of the graphene flakes on the expression of voltage-gated ion channels, participating in both electrical and chemical signaling pathways [33], was assessed. Wang et al. showed that between 18 genes of ion channels (voltage-gated and ligand-gated), the expression of 16 genes (*cacna1d*, *clcn6*, *glrb*, *gria2*, *grid1*, *kcnab1*, *kcnb1*, *kcnd2*, *kcnj10*, *kcnma1*, *kcnqn3*, *nalcn*, *p2rx7*, *scn1a*, and *vdac2*) was reduced compared to normal tissue [34]. Based on these studies, genes encoding voltage-dependent ion channel subunits (*cacna1d*, *clcn6*, *kcnab1*, *kcnb1*, *kcnj10*, and *nalcn*) were selected to determine the effect of graphene derivatives on channel gene expression. The following genes were also added for the analysis: *clcn3* [35], *cacna1b* [36], and *kcne4* [37].

The presented study shows that the expression of *nalcn* in U87 glioma tumor cells was significantly higher ($\log_2RQ = 6.15$) than in Hs5 fibroblasts. Ouwerkerk et al. reported that the concentration of Na^+ ions in malignant tumors increased in comparison to noncancer tissues [38]. Moreover, the expression of *nalcn* in astrocytes, the glial cells that glioblastoma is derived from, was markedly low [39]. The expression of *nalcn* in U87 glioma cells was significantly higher after treatment with rGO/ATS and rGO/TUD. In Hs5 cells, the same effect was observed in the case of each treatment with graphene derivative material. It was suggested that the increase of intracellular Na^+ occurs in the early phase of apoptosis [40,41]. Moreover, several studies also reported an elevation of cytoplasmic Na^+ in the late phase of apoptosis [42,43]. Thus, an increased expression of *nalcn*, induced by the graphene flakes, can provoke apoptosis in glioblastoma cells by stimulating sodium influx into the cells, which increases the cytoplasmic concentration of Na^+ .

clcn6 is predominantly localized in the intracellular vesicles of the endoplasmic reticulum (late endosomes) and the cell membrane. Our study showed a significant increase of *clcn6* during the initial treatment of U87 glioblastoma cells in all tested groups. On the contrary, Hs5 cells revealed a significant increase of *clcn6* expression in the GN/ExF and rGO/ATS treatment groups. The observed overexpression leads to lysosomal acidification [44]. Neagoe et al. clearly proved that ClC-6 mediates the Cl^-/H^+ exchange, which affects its coupling, conductivity, and ion selectivity features [45]. Increased expression of the *clcn6* gene in U87 glioma cells leads to cytoplasmic alkalization. In fact, intracellular

alkalization and extracellular acidification are commonly observed in malignant tumors. The altered activity of cell transporters, internal enzymes, and pH gradient in the cancer cell membrane plays a pivotal role in tumor progression and metastasis [46,47]. Acidification of the cytoplasm leads to the activation of apoptotic pathways in cancer cells [48]. Based on that, we conclude that graphene flakes (GN/ExF) and rGOs in U87 glioblastoma cells block Cl^-/H^+ transport. Consequently, it leads to the acidification of the cytoplasm and the activation of apoptosis. Simultaneously, in response to that blockage, an increase in *clcn6* gene expression can occur.

Four classes of potassium channels are distinguished: Kv channels (voltage-gated), KCa^{2+} channels (calcium-activated), Kir channels (inward-rectifier potassium channel), and K2P channels (two-pore channels) [49,50]. Based on these studies, selected markers of Kv and Kir classes were verified. In the channels of the Kv class, we analyzed expression *kcnb1* (Kv2.1) and *kcne4* channels, as well as *kcnj10*, which belongs to the Kir potassium channel class. Major changes were observed in the expression of the *kcne4* channel belonging to the Kv potassium channel class. This study confirmed a significant increase in the expression of the *kcne4* channel ($\log_2\text{RQ} = 1.192$) after 24 h treatment of U87 glioma cells with rGO/ATS. Meanwhile, the reduction in *kcne4* expression ($\log_2\text{RQ} = -1.734$) was observed after 24 h treatment by rGO/TUD. No changes in KCNE4 expression were noted in Hs5 fibroblasts. KCNE4 expression was characterized by a 2.9-fold increase in glioma compared to the healthy tissues [51]. The *kcne4* genes encode single proteins of the transmembrane domain with an extracellular N-terminus and an intracellular C-terminus. Therefore, the abovementioned proteins cannot form functional ion channels. They can function as the accessory subunits for various ion channels and regulate their biophysical and pharmacological properties in parallel [52–54].

The study confirmed no changes in *cacna1b* expression in U87 cells after treatment with different graphene materials. In Hs5 cells, the expression was decreased in all experimental groups in the initial treatment. The results confirmed that the expression of the *cacna1b* gene in the fibroblasts was significantly higher ($\log_2\text{RQ} = 7.52$) than in U87 cells. Wang et al. reported, based on brain and breast cancer studies, that *cacna1b* is expressed at a low level in tumor cells. Brain cancers, including glioblastoma, oligodendroglia, anaplastic astrocytoma, diffuse astrocytoma, and glioblastoma, show a significant reduction of *cacna1b* expression compared to the control groups [55].

In our studies, we did not observe the expression of the *cacna1d* gene encoding the subunit of calcium channels in U87 cells. Changes in *cacna1d* expression occurred only under rGO influence in Hs5 cells. At the initial 6 h treatment, an increase of *cacna1d* was observed after rGO/Term, rGO/ATS, and rGO/TUD treatment. However, 24 h of treatment decreased its expression in both rGO/ATS and rGO/TUD groups. The primary increase in *cacna1d* expression can induce a greater influx of Ca^{2+} ions into the cells. Therefore, after 24 h of treatment, we noticed the reduction in *cacna1d* expression, which equalized the earlier influx of Ca^{2+} ions.

Analysis of *clcn3* expression in U87 glioma cells showed an increase in expression after treatment with graphene flakes (GN/ExF) and reduced graphene oxide flakes (rGO/Term, rGO/ATS, rGO/TUD). In particular, significant changes were visible in the rGO/ATS and rGO/TUD groups. Recent studies have shown that *clcn3* is highly expressed in GBM, and it plays a significant role in cell survival, proliferation, and malignancy [56,57]. Sontheimer et al. showed that decreased expression of *clcn3* channels inhibits the migration of glioblastoma cells in vitro and in vivo [35]. An increase in *clcn3* expression can stimulate the invasiveness of U87 glioma cells. No parallel changes were observed in Hs5 fibroblasts after treatment with carbon flakes.

Additionally, using the protein matrix, which allows the determination of the expression of 40 different receptor proteins involved in different signaling pathways (Figure 5), we assessed the expression of selected extracellular receptors. As a result, it was noticed that the expression of the uPar protein was increased in U87 cells compared to Hs5 cells. Raghu et al. confirmed significantly higher uPar protein expression in U87 cells in

comparison to normal HMEC cells [58]. Analysis of uPar expression in U87 glioma cells after treatment with graphene flakes (GN/ExF) and reduced graphene oxide (rGO/ATS, rGO/TUD) showed a significant reduction of its expression. It was mainly affected by the treatment with reduced graphene oxides. uPar is responsible for the degradation of extracellular matrix (ECM) components attached to the cell surface [59]. It contains three domains connected to the concave structure, which is the binding site for vitronectin. However, since the binding sites of vitronectin and uPa are distinct, uPar can bind simultaneously to both ligands, regulating proteolysis, adhesion, and cell signaling [60]. The association between uPa and uPar can cause the cleavage of the adjacent uPar molecules. The cleaved uPar does not support plasminogen, which is mediated by the activation of uPa on the cell surface [61]. Thus, the flakes of graphene and reduced graphene oxides act similarly to uPa by activating the cleavage of adjacent uPar receptors. They can also block the attachment sites of uPar and vitronectin and, therefore, inhibit uPar signaling [61,62].

Endoglin (CD105) is the other factor that had a changed expression after treatment with GN and rGO flakes. It is transmembrane homodimeric protein localized in the endothelial cells of blood vessels. It is a component of the transforming growth factor β (TGF β) receptor signaling pathway. CD105 plays a pivotal role in angiogenesis and vasculogenesis processes, preventing apoptosis in hypoxic endothelial cells [63]. It was observed that CD105 is correlated with cancer prognosis (particularly in pediatric cases), but its role in high-grade gliomas remains unclear [64]. Our study showed a significantly higher endoglin expression in U87 glioma cells than in Hs5 fibroblasts. In other studies, a high expression of CD105 in neoplastic tissue, such as in meningiomas [65] or childhood brain tumors [64], was also confirmed. The presented study showed a decrease in CD105 expression in U87 glioma cells after treatment with GN and rGOs in all treatment groups. Muenzner et al. confirmed that the endoglin carboxy-terminal domain is required to inhibit cell detachment [66]. Therefore, treatment with GN and rGO, resulting in decreased endoglin expression, can stimulate cell adhesion and, consequently, leads to the reduction of the ability of cancer cell migration.

4. Materials and Methods

4.1. Production and Preparation of GN and rGO

Graphene and reduced graphene oxides were supplied by the Łukasiewicz Research Network—Institute of Microelectronics and Photonics, Warsaw. Direct graphite exfoliation using Capstone (a fluorinated surfactant) was used to obtain graphene flakes, designated as GN/ExF. Flakes of rGO were produced by reducing previously prepared graphene oxide (GO). GO was obtained by graphite oxidation and exfoliation, according to a modified Marciano method. Reduced graphene oxide, designated as rGO/ATS, was created by reducing GO with ammonium thiosulphate for 20 h at 95 °C. The molar ratio of the reducing agent to GO was 3:1, and the reduction was conducted at neutral pH. rGO/Term was created by reducing GO powder in an oven at 1000 °C for 1 h under a nitrogen atmosphere. Reduced rGO/TUD graphene oxide was prepared by reducing GO via exposure to thiourea dioxide at 85 °C for 1.5 h. The molar ratio of the reducing agent to GO was 5:1, and pH was set as 9. rGO/ATS and rGO/TUD were purified through pressure filtration on a membrane, and then dialysis was used. During these steps, a significant number of residue chemicals were removed from materials; however, there were still some sulfur ions [14].

4.2. Characterization of GN and rGOs

4.2.1. Fourier Transform IR (FT-IR) Spectrometer Analysis

The samples were processed in pellet form. Each pellet consisted of 0.007 g of graphene and 0.200 g of potassium bromide. Infrared absorption of the coatings in the spectral range of 400–4000 cm^{-1} was performed using a model iS50 Fourier transform IR (FT-IR) spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Spectra were recorded with a resolution of 4 cm^{-1} using a high sensitivity MCT-B detector (mercury cadmium

telluride). The measurements were performed in the transmission mode. In each case, data from 120 scans were collected to construct a single spectrum.

4.2.2. Scanning Electron Microscopy of Flakes

The morphology of graphene and reduced graphene oxides was examined using scanning electron microscopy (SEM, Hitachi S-3000 N, Minato-ku, Tokyo, Japan). SEM images were taken in the AEE mode to scan the graphene with the table current.

4.3. Cell Cultures

Human glioblastoma U87 MG (ATCC[®] HTB-14[™]) and bone marrow stromal Hs5 (ATCC[®] CRL-11882[™]) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Houston, TX, USA) and 1% antibiotic-antimycotic mixture containing penicillin and streptomycin (Life Technologies, Houston, TX, USA). Cultures were maintained at 37 °C under 5% CO₂ and 95% humidity in an INCOMED153 (Menmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany).

4.4. Cell Membrane Potential Assay

A Cellular Membrane Potential Assay Kit (ab176764, Abcam, Cambridge, UK) was used to detect changes in membrane potential. Cells were plated in 96-well black plates. Approximately 3×10^4 cells were seeded onto each well. After incubation for 24 h, the culture medium was replaced with medium containing GN and rGO at a final concentration of 25 µg/mL. After 24 h of incubation with graphene and graphene derivatives, the growth medium was removed from each well and replaced with 100 µL of diluted (1:10) assay buffer, with the addition of 1.5 µL MP sensor dye loading. The plate was incubated for 30 min at RT in the dark, and membrane potential change was analyzed using an ELISA reader (Infinite M200, Tecan, Durham, NC, USA) by measuring fluorescence at Ex/Em = 530/570 nm.

4.5. Isolation of Total RNA and cDNA Synthesis

For the isolation of total RNA, U87 and Hs5 cells (2×10^5) were cultured on a six-well plate in three independent replicates. A water solution of GN and rGO flakes was added to the cultures at a concentration of 25 µg/mL and incubated two independent times for 6 h and 24 h. Cells were detached from the plates by trypsinization, centrifuged for 5 min at $400 \times g$, and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). The cell pellet was resuspended in freshly prepared lysis buffer from a PureLink[™] RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) containing 1% 2-mercaptoethanol and vortexed at high speed until the cell pellet was completely dispersed and the cells were lysed. The supernatant was transferred to new tubes, mixed with one volume of 70% ethanol, and then transferred to a spin cartridge. Further steps were performed according to the manufacturer's protocol. The isolated RNA was measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). A cDNA High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used. The procedure was performed with the following cycle conditions: 10 min at 25 °C, 120 min at 37 °C, and 5 min at 4 °C using a 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). cDNA concentration was measured on a NanoDrop 2000 spectrophotometer and stored for further analysis at −80 °C.

4.6. Gene Expression

The reaction was carried out using 48-well plates and Power SYBR[™] Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA); 100 ng of cDNA was used for each reaction. The following genes were examined: *clcn3*, *clcn6*, *cacna1b*, *cacna1d*, *nalcn*, *kcnj10*, *kcnb1*, and *kcne4*. Gene-specific primers (Table 2) were purchased from Genomed

(Warsaw, Poland), and *rpl13a* was used as the reference gene [67]. The reaction was performed using the Step One™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Conditions of the reaction were set as specified by the manufacturer. Each sample was analyzed in duplicate. The $\Delta\Delta C_t$ method was used to determine mRNA expression by real-time PCR: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ test sample} - \Delta C_t \text{ calibrator sample}$. $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Table 2. Primers used to assess the expression of genes involved in voltage-dependant ion channels.

Genes	Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')	References
<i>clcn3</i>	CTGTGCCGCCTCTAAGCC	ACTGTAGTTCGACTCGCTGAA	Primer blast
<i>clcn6</i>	ACCTGGAAGTTTTGGAGACCAT	TGAGTTGGGTGAAGAGTCGC	Primer blast
<i>cacna1b</i>	CCCTTGCTGTCAACATCTGGT	GGATGGGTGAGGAGTTGGC	Primer blast
<i>cacna1d</i>	ACTCGGGCTATCCAGAAGTAG	CTTGCCCAAAGAAAAGACTGC	Primer blast
<i>nalcn</i>	CGCCGTAGACTGTGGTTTTG	AATGACGCTGATGATGGCAC	Primer blast
<i>kcnj10</i>	TCAGAAGACGGGCGAAACAA	GCGAGCCTAAGCAAGACTCA	Primer blast
<i>kcnb1</i>	CCATTCTGCCATACTATGTCACC	AGCAAGCCCAACTCATTGTAG	[68]
<i>kcne4</i>	CACCGCTACCTGAAAACCT	TTGATCGTGGCAGAGTGAGC	Primer blast
<i>rpl13a</i>	CATAGGAAGCTGGGAGCAAG	GCCCTCCAATCAGTCTTCTG	[67]

4.7. Human Receptor Antibody Array

For protein analysis, glioma cell line U87 and fibroblast cell line Hs5 were treated with graphene (GN) or reduced graphene oxides (rGOs) at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and incubated for 24 h. The cells were scraped off, centrifuged, and washed twice in PBS. Cells not treated with graphene flakes were used as a control. The cell pellet was resuspended in a diluted lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. Frozen metal balls and TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany) were used for homogenization at 50 Hz for 10 min on a shaking frozen cartridge. The samples were then centrifuged (30 min; $14,000 \times g$; 4°C), and the supernatant was collected. Protein concentration was determined using a bicinchoninic acid kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Analysis of receptor cell membranes was performed using an antibody array (ab211065; Abcam, Cambridge, UK). The assay was performed in accordance with the manufacturer's instructions, using lysates containing 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of total protein per membrane. Membranes were visualized using the Azure Biosystem C400 (Azure, Dublin, CA, USA) [63]. The results shown in Figure S1 were obtained by analysis in ImageJ. Results were normalized and compared to a dot control sample.

4.8. Statistical Analysis

The data were analyzed using a two-way analysis of variance with GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Differences between groups were tested using Bonferroni's multiple comparison test and Dunnett's multiple comparisons test. All mean values are presented using standard deviation or standard error. Differences at $p < 0.05$ were considered significant.

5. Conclusions

Different types of graphene derivatives may activate separate cell pathways. rGOs can affect cells as the result of contact with the glioblastoma cell membrane via its functional groups, which are presented on the surface of the examined flakes. This is the first study confirming that graphene flakes have a significant effect on the expression of voltage-dependent ion channel (VGIC) genes in U87 glioma cells. The mechanism of the effect of graphene-derived flakes on membrane proteins depends on the number of the specific structure of voltage-dependent ion channels and extracellular receptors. It was also demonstrated that major changes in the expression of voltage-dependent ion channel genes were observed in *clcn3*, *nalcn*, and *kcne4* after treatment with rGO/ATS and rGO/TUD flakes. Moreover, we present that the examined graphene forms or different types of

graphene derivatives (GN and rGOs) can affect the expression of extracellular receptors (uPar and endoglin) in U87 cells, significantly reducing their expression. We showed that GN and rGOs decrease uPar expression by acting as inhibitors of neoplastic-promoted proteolysis. Therefore, the mobility of mesenchymal-type cells may be inhibited. Moreover, GN and rGOs decrease the expression of endoglin (CD105) and probably provide an increase in cell adhesion, consequently reducing cancer cell migration. In conclusion, we suggest that the presence of oxygen-containing functional groups of rGO, including their number and types, may be the most important feature of the examined flakes for their future medical application.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/2/515/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.G. and J.S.; methodology, B.S.-C.; validation, K.D. and O.W.-P.; formal analysis, M.S. (Malwina Sosnowska); investigation, J.S., J.J., D.N., S.J., and A.S.-G.; resources, M.W.; writing—original draft preparation, J.S.; writing—review and editing, J.S., M.G., B.S.-C., and M.S. (Maciej Szmidt); visualization, M.W.; supervision, M.G.; project administration, M.S. (Maciej Szmidt); funding acquisition, M.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by The National Centre for Research and Development (grant number LIDER/144/L-6/14/NCBR/2015).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: The manuscript is a part of a Ph.D. thesis by Jaroslaw Szczepaniak.

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

References

1. Wen, P.Y.; Reardon, D.A. Neuro-oncology in 2015: Progress in glioma diagnosis, classification and treatment. *Nat. Rev. Neurol.* **2016**, *12*, 69–70. [CrossRef]
2. Zhang, Y.; Cruickshanks, N.; Yuan, F.; Wang, B.; Pahuski, M.; Wulfkühle, J.; Gallagher, I.; Koepfel, A.F.; Hatem, S.; Papanicolaou, C.; et al. Targetable T-type Calcium Channels Drive Glioblastoma. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 3479–3490. [CrossRef] [PubMed]
3. Chen, J.-H.; Jang, C.; Xiao, S.; Ishigami, M.; Fuhrer, M.S. Intrinsic and extrinsic performance limits of graphene devices on SiO₂. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 206–209. [CrossRef] [PubMed]
4. Choi, W.; Lahiri, I.; Seelaboyina, R.; Kang, Y.S. Synthesis of Graphene and Its Applications: A Review. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2010**, *35*, 52–71. [CrossRef]
5. Geim, A.K.; Novoselov, K.S. The rise of graphene. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 183–191. [CrossRef] [PubMed]
6. Compton, O.C.; Nguyen, S.T. Graphene Oxide, Highly Reduced Graphene Oxide, and Graphene: Versatile Building Blocks for Carbon-Based Materials. *Small* **2010**, *6*, 711–723. [CrossRef]
7. Acik, M.; Mattevi, C.; Gong, C.; Lee, G.; Cho, K.; Chhowalla, M.; Chabal, Y.J. The Role of Intercalated Water in Multilayered Graphene Oxide. *ACS Nano* **2010**, *4*, 5861–5868. [CrossRef]
8. Gao, W. The chemistry of graphene oxide. In *Graphene Oxide: Reduction Recipes, Spectroscopy, and Applications*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; ISBN 9783319155005.
9. Grodzik, M.; Sawosz, E.; Wierzbicki, M.; Orłowski, P.; Hotowy, A.; Niemiec, T.; Szmidt, M.; Mitura, K.; Chwalibog, A. Nanoparticles of carbon allotropes inhibit glioblastoma multiforme angiogenesis in ovo. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 3041–3048.
10. Wierzbicki, M.; Sawosz, E.; Grodzik, M.; Kutwin, M.; Jaworski, S.; Chwalibog, A. Comparison of anti-angiogenic properties of pristine carbon nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8*, 195. [CrossRef]
11. Chwalibog, A.; Jaworski, S.; Sawosz, E.; Grodzik, M.; Winnicka, A.; Prasek, M.; Wierzbicki, M. In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 413–420. [CrossRef]
12. Jaworski, S.; Sawosz, E.; Kutwin, M.; Wierzbicki, M.; Hinzmänn, M.; Grodzik, M.; Winnicka, A.; Lipińska, L.; Wlodyga, K.; Chwalibog, A. In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 1585–1596. [CrossRef]

13. Jaworski, S.; Strojny, B.; Sawosz, E.; Wierzbicki, M.; Grodzik, M.; Kutwin, M.; Dariluk, 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. [CrossRef]
14. Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; et al. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3939. [CrossRef] [PubMed]
15. Martelli, C.; King, A.; Simon, T.; Giamas, G. Graphene-Induced Transdifferentiation of Cancer Stem Cells as a Therapeutic Strategy against Glioblastoma. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 3258–3269. [CrossRef]
16. Bondar, O.V.; Saifullina, D.V.; Shakhmaeva, I.I.; Mavlyutova, I.I.; Abdullin, T.I. Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. *Acta Nat.* **2012**, *4*, 78–81. [CrossRef]
17. Marmo, A.A.; Morris, D.M.; Schwalke, M.A.; Iliev, I.G.; Rogers, S. Electrical Potential Measurements in Human Breast Cancer and Benign Lesions. *Tumor Biol.* **1994**, *15*, 147–152. [CrossRef]
18. Fiorillo, M.; Verre, A.F.; Iliut, M.; Peiris-Pagés, M.; Ozsvari, B.; Gandara, R.; Cappello, A.R.; Sotgia, F.; Vijayaraghavan, A.; Lisanti, M.P. Graphene oxide selectively targets cancer stem cells, across multiple tumor types: Implications for non-toxic cancer treatment, via “differentiation-based nano-therapy”. *Oncotarget* **2015**, *6*, 3553–3562. [CrossRef]
19. Pollak, J.; Rai, K.G.; Funk, C.C.; Arora, S.; Lee, E.; Zhu, J.; Price, N.D.; Paddison, P.J.; Ramirez, J.-M.; Rostomily, R.C. Ion channel expression patterns in glioblastoma stem cells with functional and therapeutic implications for malignancy. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0172884. [CrossRef]
20. Simon, O.J.; Müntefering, T.; Grauer, O.; Meuth, S.G. The role of ion channels in malignant brain tumors. *J. Neuro-Oncol.* **2015**, *125*, 225–235. [CrossRef]
21. Parsons, D.W.; Jones, S.; Zhang, X.; Lin, J.C.-H.; Leary, R.J.; Angenendt, P.; Mankoo, P.; Carter, H.; Siu, I.-M.; Gallia, G.L.; et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* **2008**, *321*, 1807–1812. [CrossRef]
22. Joshi, A.D.; Parsons, D.W.; Velculescu, V.E.; Riggins, G.J. Sodium ion channel mutations in glioblastoma patients correlate with shorter survival. *Mol. Cancer* **2011**, *10*, 17. [CrossRef] [PubMed]
23. Cuddapah, V.A.; Robel, S.; Watkins, S.; Sontheimer, H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat. Rev. Neurosci.* **2014**, *15*, 455–465. [CrossRef] [PubMed]
24. Weaver, A.K.; Liu, X.; Sontheimer, H. Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant glioma cells. *J. Neurosci. Res.* **2004**, *78*, 224–234. [CrossRef] [PubMed]
25. Loryuenyong, V.; Totepvimarn, K.; Eimburanapratvat, P.; Boonchompoo, W.; Buasri, A. Preparation and Characterization of Reduced Graphene Oxide Sheets via Water-Based Exfoliation and Reduction Methods. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2013**, *2013*, 923403. [CrossRef]
26. Emiru, T.F.; Ayele, D.W. Controlled synthesis, characterization and reduction of graphene oxide: A convenient method for large scale production. *Egypt. J. Basic Appl. Sci.* **2017**, *4*, 74–79. [CrossRef]
27. Pan, M.; Zhang, Y.; Shan, C.; Zhang, X.; Gao, G.; Pan, B. Flat Graphene-Enhanced Electron Transfer Involved in Redox Reactions. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 8597–8605. [CrossRef]
28. Cone, C.D. Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. *J. Theor. Biol.* **1971**, *30*, 151–181. [CrossRef]
29. Tokuoka, S.; Morioka, H. The membrane potential of the human cancer and related cells. I. *Gan* **1957**, *48*, 353–354. [CrossRef]
30. Johnstone, B.M. Micro-Electrode Penetration of Ascites Tumour Cells. *Nature* **1959**, *183*, 411. [CrossRef]
31. Yang, M.; Brackenbury, W.J. Membrane potential and cancer progression. *Front. Physiol.* **2013**, *4*, 185. [CrossRef]
32. Molenaar, R.J. Ion Channels in Glioblastoma. *ISRN Neurol.* **2011**, *2011*, 590249. [CrossRef] [PubMed]
33. Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed.; Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, MA, USA, 2001; ISBN 0878933212.
34. Wang, R.; Gurguis, C.I.; Gu, W.; Ko, E.A.; Lim, I.; Bang, H.; Zhou, T.; Ko, J.-H. Ion channel gene expression predicts survival in glioma patients. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11593. [CrossRef] [PubMed]
35. Sontheimer, H. An Unexpected Role for Ion Channels in Brain Tumor Metastasis. *Exp. Biol. Med.* **2008**, *233*, 779–791. [CrossRef] [PubMed]
36. Phan, N.N.; Wang, C.-Y.; Chen, C.-F.; Sun, Z.; Lai, M.-D.; Lin, Y.-C. Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 2059–2074. [CrossRef] [PubMed]
37. Solé, L.; Roura-Ferrer, M.; Pérez-Verdaguer, M.; Oliveras, A.; Calvo, M.; Fernández-Fernández, J.M.; Felipe, A. KCNE4 suppresses Kv1.3 currents by modulating trafficking, surface expression and channel gating. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 3738–3748. [CrossRef]
38. Ouwerkerk, R.; Jacobs, M.A.; Macura, K.J.; Wolff, A.C.; Stearns, V.; Mezban, S.D.; Khouri, N.F.; Bluemke, D.A.; Bottomley, P.A. Elevated tissue sodium concentration in malignant breast lesions detected with non-invasive ²³Na MRI. *Breast Cancer Res. Treat.* **2007**, *106*, 151–160. [CrossRef]
39. Cahoy, J.D.; Emery, B.; Kaushal, A.; Foo, L.C.; Zamanian, J.L.; Christopherson, K.S.; Xing, Y.; Lubischer, J.L.; Krieg, P.A.; Krupenko, S.A.; et al. A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 264–278. [CrossRef]
40. Fernández-Segura, E.; Cañizares, F.J.; Cubero, M.A.; Warley, A.; Campos, A. Changes in Elemental Content During Apoptotic Cell Death Studied by Electron Probe X-Ray Microanalysis. *Exp. Cell Res.* **1999**, *253*, 454–462. [CrossRef]

41. Skepper, J.N.; Karydis, I.; Garnett, M.R.; Hegyi, L.; Hardwick, S.J.; Warley, A.; Mitchinson, M.J.; Cary, N.R.B. Changes in elemental concentrations are associated with early stages of apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein: An X-ray microanalytical study. *J. Pathol.* **1999**, *188*, 100–106. [CrossRef]
42. Arrebola, F.; Fernández-Segura, E.; Campos, A.; Crespo, P.V.; Skepper, J.N.; Warley, A. Changes in intracellular electrolyte concentrations during apoptosis induced by UV irradiation of human myeloblastic cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2006**, *290*, C638–C649. [CrossRef]
43. Arrebola, F.; Zabiti, S.; Cañizares, F.J.; Cubero, M.A.; Crespo, P.V.; Fernández-Segura, E. Changes in intracellular sodium, chlorine, and potassium concentrations in staurosporine-induced apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *204*, 500–507. [CrossRef] [PubMed]
44. Poët, M.; Kornak, U.; Schweizer, M.; Zdebek, A.A.; Scheel, O.; Hoelter, S.; Wurst, W.; Schmitt, A.; Fuhrmann, J.C.; Planells-Cases, R.; et al. Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CLC-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13854–13859. [CrossRef]
45. Neagoe, I.; Stauber, T.; Fidzinski, P.; Bergsdorf, E.-Y.; Jentsch, T.J. The Late Endosomal CLC-6 Mediates Proton/Chloride Countertransport in Heterologous Plasma Membrane Expression. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 21689–21697. [CrossRef] [PubMed]
46. Webb, B.A.; Chimenti, M.S.; Jacobson, M.P.; Barber, D.L. Dysregulated pH: A perfect storm for cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 671–677. [CrossRef] [PubMed]
47. Damaghi, M.; Wojtkowiak, J.W.; Gillies, R.J. pH sensing and regulation in cancer. *Front. Physiol.* **2013**, *4*, 370. [CrossRef] [PubMed]
48. Matsuyama, S.; Reed, J.C. Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death Differ.* **2000**, *7*, 1155–1165. [CrossRef]
49. Liu, J.; Qu, C.; Han, C.; Chen, M.-M.; An, L.-J.; Zou, W. Potassium channels and their role in glioma: A mini review. *Mol. Membr. Biol.* **2019**, *35*, 76–85. [CrossRef]
50. Du, J.; Haak, L.L.; Phillips-Tansey, E.; Russell, J.T.; McBain, C.J. Frequency-dependent regulation of rat hippocampal somato-dendritic excitability by the K⁺ channel subunit Kv2.1. *J. Physiol.* **2000**, *522*, 19–31. [CrossRef]
51. Biasiotta, A.; D’Arcangelo, D.; Passarelli, F.; Nicodemi, E.M.; Facchiano, A. Ion channels expression and function are strongly modified in solid tumors and vascular malformations. *J. Transl. Med.* **2016**, *14*, 285. [CrossRef]
52. McCrossan, Z.A.; Abbott, G.W. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* **2004**, *47*, 787–821. [CrossRef]
53. Li, Y.; Sung, Y.U.; McDonald, T.V. Voltage-Gated Potassium Channels: Regulation by Accessory Subunits. *Neuroscientist* **2006**, *12*, 199–210. [CrossRef]
54. Kanda, V.A.; Abbott, G.W. KCNE Regulation of K⁺ Channel Trafficking—A Sisyphean Task? *Front. Physiol.* **2012**, *3*, 231. [CrossRef] [PubMed]
55. Wang, C.-Y.; Lai, M.-D.; Phan, N.N.; Sun, Z.; Lin, Y.-C. Meta-Analysis of Public Microarray Datasets Reveals Voltage-Gated Calcium Gene Signatures in Clinical Cancer Patients. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125766. [CrossRef] [PubMed]
56. Hong, S.; Bi, M.; Wang, L.; Kang, Z.; Ling, L.; Zhao, C. CLC-3 channels in cancer (Review). *Oncol. Rep.* **2015**, *33*, 507–514. [CrossRef] [PubMed]
57. Lui, V.C.H.; Lung, S.S.S.; Pu, J.K.S.; Hung, K.N.; Leung, G.K.K. Invasion of human glioma cells is regulated by multiple chloride channels including CLC-3. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 4515–4524.
58. Montuori, N.; Cosimato, V.; Rinaldi, L.; Rea, V.E.A.; Alfano, D.; Ragno, P. uPAR regulates pericellular proteolysis through a mechanism involving integrins and mMLF-receptors. *Thromb. Haemost.* **2013**, *109*, 309–318. [CrossRef]
59. Raghu, H.; Lakka, S.S.; Gondi, C.S.; Mohanam, S.; Dinh, D.H.; Gujrati, M.; Rao, J.S. Suppression of uPA and uPAR Attenuates Angiogenin Mediated Angiogenesis in Endothelial and Glioblastoma Cell Lines. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12458. [CrossRef]
60. Huai, Q.; Zhou, A.; Lin, L.; Mazar, A.P.; Parry, G.C.; Callahan, J.; Shaw, D.E.; Furie, B.; Furie, B.C.; Huang, M. Crystal structures of two human vitronectin, urokinase and urokinase receptor complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 422–423. [CrossRef]
61. Høyer-Hansen, G.; Rønne, E.; Solberg, H.; Behrendt, N.; Ploug, M.; Lund, L.R.; Ellis, V.; Danø, K. Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 18224–18229.
62. Høyer-Hansen, G.; Behrendt, N.; Ploug, M.; Danø, K.; Preissner, K.T. The intact urokinase receptor is required for efficient vitronectin binding: Receptor cleavage prevents ligand interaction. *FEBS Lett.* **1997**, *420*, 79–85. [CrossRef]
63. Smith, S.J.; Tilly, H.; Ward, J.H.; MacArthur, D.C.; Lowe, J.; Coyle, B.; Grundy, R.G. CD105 (Endoglin) exerts prognostic effects via its role in the microvascular niche of paediatric high grade glioma. *Acta Neuropathol.* **2012**, *124*, 99–110. [CrossRef] [PubMed]
64. Birlik, B.; Canda, S.; Ozer, E. Tumour vascularity is of prognostic significance in adult, but not paediatric astrocytomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2006**, *32*, 532–538. [CrossRef] [PubMed]
65. Barresi, V.; Cerasoli, S.; Vitarelli, E.; Tuccari, G. Density of microvessels positive for CD105 (endoglin) is related to prognosis in meningiomas. *Acta Neuropathol.* **2007**, *114*, 147–156. [CrossRef] [PubMed]
66. Muenzner, P.; Rohde, M.; Kneitz, S.; Hauck, C.R. CEACAM engagement by human pathogens enhances cell adhesion and counteracts bacteria-induced detachment of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **2005**, *170*, 825–836. [CrossRef] [PubMed]
67. Aithal, M.G.S.; Rajeswari, N. Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Glioblastoma Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Brain Tumor Res. Treat.* **2015**, *3*, 24–29. [CrossRef] [PubMed]
68. Wang, H.-Y.; Wang, W.; Liu, Y.-W.; Li, M.-Y.; Liang, T.-Y.; Li, J.-Y.; Hu, H.-M.; Lu, Y.; Yao, C.; Ye, Y.-Y.; et al. Role of KCNB1 in the prognosis of gliomas and autophagy modulation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14. [CrossRef]

Article

Reduced Graphene Oxide Modulates the FAK-Dependent Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Cells In Vitro

Jaroslav Szczepaniak ¹, Malwina Sosnowska ¹, Mateusz Wierzbicki ¹, Olga Witkowska-Pilaszewicz ², Barbara Strojny-Cieslak ¹, Joanna Jagiello ³, Wiktoria Fraczek ¹, Marcin Kusmierz ⁴ and Marta Grodzik ^{1,*}

¹ Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences (WULS-SGGW), 02-787 Warsaw, Poland

² Department of Large Animal Diseases and Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland

³ Graphene and Composites Research Group, Lukaszewicz Research Network-Institute of Microelectronics and Photonics, 01-919 Warsaw, Poland

⁴ Analytical Laboratory, Institute of Chemical Sciences, Faculty of Chemistry, Maria Curie-Skłodowska University, 3 Maria Curie-Skłodowska Square, 20-031 Lublin, Poland

* Correspondence: marta_grodzik@sggw.edu.pl



Citation: Szczepaniak, J.; Sosnowska, M.; Wierzbicki, M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Strojny-Cieslak, B.; Jagiello, J.; Fraczek, W.; Kusmierz, M.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxide Modulates the FAK-Dependent Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Cells In Vitro. *Materials* **2022**, *15*, 5843. <https://doi.org/10.3390/ma15175843>

Academic Editors: Agustín Francisco Pérez-Cadenas, María Pérez-Cadenas, Esther Bailón-García and Stefano Bellucci

Received: 13 May 2022

Accepted: 19 August 2022

Published: 24 August 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Aggressive invasiveness is a common feature of malignant gliomas, despite their high level of tumor heterogeneity and possible diverse cell origins. Therefore, it is important to explore new therapeutic methods. In this study, we evaluated and compared the effects of graphene (GN) and reduced graphene oxides (rGOs) on a highly invasive and neoplastic cell line, U87. The surface functional groups of the GN and rGO flakes were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy. The antitumor activity of these flakes was obtained by using the neutral red assay and their antimigratory activity was determined using the wound healing assay. Further, we investigated the mRNA and protein expression levels of important cell adhesion molecules involved in migration and invasiveness. The rGO flakes, particularly rGO/ATS and rGO/TUD, were found highly toxic. The migration potential of both U87 and Hs5 cells decreased, especially after rGO/TUD treatment. A post-treatment decrease in mobility and FAK expression was observed in U87 cells treated with rGO/ATS and rGO/TUD flakes. The rGO/TUD treatment also reduced β -catenin expression in U87 cells. Our results suggest that rGO flakes reduce the migration and invasiveness of U87 tumor cells and can, thus, be used as potential antitumor agents.

Keywords: graphene; reduced graphene oxide; glioblastoma; FAK; β -catenin; cell mobility; invasiveness; migration; cell membrane receptors; U87 cell line

1. Introduction

Gliomas are the most common primary malignancy of the central nervous system [1]. Stage IV glioblastoma (GBM) is one of the most aggressive and lethal types of cancer, with an average survival time of 15 months from diagnosis [2], GBM is characterized by diffusive growth hindering complete resection, genetic changes conditioning immunity to apoptosis, high proliferation and invasion, and poor responses to current therapy. Standard treatment is limited and consists of surgical resection of the tumor followed by chemotherapy and radiotherapy. The most commonly used chemotherapy is the oral alkylating agent, temozolomide [3]. All these features contribute to relapse of the neoplastic disease and a very poor prognosis for the patient [4].

Moreover, the common feature of gliomas is high invasiveness, despite strong biological heterogeneity [5]. Thus the development of the new effective therapies is a very important issue. The distinction between migration and invasiveness is essential. Migration is mostly limited to certain stages of cell cycle. In addition, it is a physiological reaction performed by many cell types, for example by neural stem cells (NSCs), which bud along

the brain tissue boundary. This process is regulated by highly invasive cells. In addition, tissue damage can occur in both cases, and invasion is an undesirable, anatomically inadequate, and a non-physiological reaction [6]. Several complex cellular and molecular processes which are connected with the damage of extracellular matrix (ECM) components, cell separation, and diapedesis through the basement membrane and stroma influence tumor cell invasion. ECM degradation is due to overexpression of key proteases co-related to increased invasion (e.g., uPA, uPAR, cathepsin B, MMP, and ADAM), whose activity in healthy tissue is controlled by endogenous inhibitors (e.g., PAI1, PAI2, cystatin C, stefin A, stefin B), which may not function properly in neoplastic cells [7,8].

Moreover, fibronectin, the dominant component of the extracellular matrix (ECM), is involved in the development of GBM intrusion. GBM shows increased invasion activity in the presence of fibronectin [9]. However, recently it was confirmed that the upregulation of fibronectin (FNMA) may result in reduced mobility and tumor cell aggressiveness [10]. They are likely made possible by increased cell–cell and cell–ECM adhesion abilities. This process may be connected with the upregulation of $\alpha 5$ integrin expression, which can be activated by dexamethasone [6]. ECM transition is a highly regulated process that requires a balance between cell connections as well as between annihilation and remodeling of the ECM. Interactions between ECM and individual cells are essential in attributing the nature of invasiveness. Many different brain ECM components may influence the creation of a favorable migration environment for GBM cells [11]. Many receptors are involved in the process of invasiveness, including integrins, which are involved in cell–cell and cell–matrix interactions. For example, in GBM, the $\beta 1$ integrin is usually highly expressed, which activates an invasiveness of the GMB cells [12]. The $\alpha 5$ subunit of the integrins may bind to fibronectin, one of the extracellular ligands, which leads to an activation of intracellular signaling cascades influencing an increased cell motion [9]. In addition, cadherins are believed to be important cellular components because these transmembrane proteins influence the creation of the adjacent junctions (AJs) in cell–cell adhesion by, for example, indirectly regulating apoptosis, gene expression, and cell proliferation and migration [13–16]. In addition, cadherins also take part in cell–cell attachment by N-cadherin downregulation, which influences cell polarity and motion, with significant increases in tumor cell migration and invasiveness [17]. Other researchers have demonstrated that aggressiveness of GMB correlates with N-cadherin expression and is connected with the Ki-67 labeling index, thus influencing cell proliferation and differentiation [18]. Moreover, some protein tyrosine kinases play a key role in migration, proliferation, and survival of several different cell types [19]. One of them, called FAK (focal adhesion kinase), is activated by ligand binding and clustering of cell-surface integrin receptors [20]. It promotes neoplasm progression and metastasis by affecting the tumor microenvironment. Some FAK functions include control of cell motion, invasiveness, gene expression, and self-renewal of tumor stem cells [21]. Because all aforementioned molecules are related to migration and invasiveness mechanisms, and the invasion of GBM cells is one of the biggest challenges associated with the therapeutic management of GBM, it seems justified to study the influence of new materials, such as graphene (GN) and reduced graphene oxides (rGO) flakes in our case.

Therefore, when it comes to rGO flakes, a crucial discovery may be the reduction in the content of oxygen-containing functional groups that may disrupt signaling pathways in the cell membrane or directly interact with cellular structures such as integrin $\alpha 5$, integrin $\beta 1$, β -catenin, N-cadherin, PAN-cadherin, and FAK in comparison to GO. Fiorillo et al. demonstrated that the presence of multiple oxygen-containing functional groups in GO favors an adhesion to U87 tumor cells [22]. We previously showed that the allotropic forms of carbon (C60, nfND) could cause cell cycle arrest and thus reduce cell proliferation and virulence as well as the invasion of the hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and C3A [23,24]. We also showed that the use of the nfGO and CELE cocktail (chicken embryo liver extract) reduced proliferation by arresting the cell cycle, increasing the expression of adhesion genes such as FAK, E-cadherin, and N-cadherin, and decreasing β -catenin

expression [24]. Further, we showed that ND (nano diamond), NG (nano graphene), and nGO (nano graphene oxide) nanoparticles reduced the adhesion and invasiveness of U87 and U118 GBM cell lines and thereby affected the activity of the EGFR/AKT/mTOR and β -catenin pathways [25]. These results indicate that the tested carbon allotropes may act as potential anticancer therapeutic agents by inhibiting cell proliferation and invasion. Therefore, in this study, we analyzed the influence of other allotropic forms of carbon, including rGO, on the phenomenon of adhesion and invasiveness in neoplastic cells of glioblastoma multiforme. The main aim of the study was to determine the effect of rGO/ATS and rGO/TUD flakes in comparison with GN/ExF in exerting modulating and transducing effects on the mechanisms of adhesion and related invasiveness in U87 glioblastoma multiforme cells. For this purpose, migration and mobility assessment tests were used, as well as molecular analyses examining the expression of adhesion and invasiveness markers [α 5 integrin, β 1 integrin, β -catenin, N-cadherin, PAN-cadherin, and FAK (focal adhesion kinase)] responsible for cell–cell and cell–ECM junctions, both at the mRNA and protein levels.

2. Materials and Methods

2.1. GN and rGO Specimens

The Łukasiewicz Research Network—Institute of Microelectronics and Photonics, Warsaw prepared the GN and rGO. To obtain the GN/ExF graphene flakes, direct graphite exfoliation using Capstone (a fluorinated surfactant) was adopted. The graphite oxidation and exfoliation were used for obtaining the GO, according to a modified Marcano method. Marcano et al. found that excluding NaNO_3 increases the amount of KMnO_4 and performs the reaction in a 9:1 mixture of $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, which improves the efficiency of the oxidation process. This improved method provides a greater amount of hydrophilic oxidized graphene material. Moreover, the GO produced by Marcano et al.'s method is more oxidized than that prepared by Humme et al.'s method and does not generate toxic gas [26]. Then the reduction at neutral pH of GO with ammonium thiosulphate for 20 h at 95 °C in ratio 3:1 leads to creation of the rGO/ATS flakes. The exposure to thiourea dioxide at 85 °C for 1.5 h at pH 9 of GO was used for rGO/TUD preparation with a 5:1 molar ratio. Then pressure filtration on a membrane and dialysis were used for rGO/ATS and rGO/TUD purification.

2.2. X-ray Photoelectron Spectroscopy of GN and rGO

The multi-chamber ultra-high vacuum (UHV) system PREVAC [PREVAC, Rogów, Poland] was used for X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The spectra were obtained by using a hemispherical Scienta R4000 electron analyzer [Scienta, Sweden]. Complementary equipment such as the Scienta SAX-100 X-ray source (Al $K\alpha$, 1486.6 eV, 0.8 eV band) equipped with the XM 650 X-ray Monochromator [Scienta, Sweden] (0.2 eV band) was used. The pass energy of the analyzer was set to 200 eV for survey spectra (with 500 meV steps), and 50 eV for regions (high-resolution spectra): C1s, O1s, N1s, S2p, and F1s (with 50–100 meV step). The base pressure in the analysis chamber was 5–109 mbar. During the spectra collection, it was not higher than 2×10^{-8} mbar.

2.3. Cell Culture

For cell culturing [27], the human glioblastoma U87 MG (ATCC[®] HTB-14[™]) and bone marrow stromal Hs5 (ATCC[®] CRL-11882[™]) cell lines were used from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Houston, TX, USA) and 1% antibiotic-antimycotic mixture containing penicillin and streptomycin (Life Technologies, Houston, TX, USA) at 37 °C under 5% CO_2 and 95% humidity in an INCOMED153 (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany).

2.4. Cell Viability Assay—Neutral Red

For the cell viability studies, the neutral red assay was used. A total of 2×10^4 cells were cultured in 96-well plates for 24 h. Then the culture medium was replaced by another containing 10% solutions of GN and rGO flakes at the concentrations of 10, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As controls, the cells incubated without flakes were used. After 24 h, 10 μL of 0.33% neutral red solution in DPBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added for 4 h at 37 °C. Subsequently, the culture medium with neutral red was removed, and the cells were washed with 200 μL of fixative solution (0.1% CaCl_2 in 0.5% formaldehyde) for 3 min. The wells were then supplemented with 100 μL of solubilization solution (1% acetic acid in 50% ethanol), incubated for 10 min at room temperature, and mixed gently by pipetting. Measurements were performed at a wavelength of 540 nm using a spectrophotometer (Infinite M200, Tecan, Durham, NC, USA) and a reference 690 nm. Cell viability was expressed as a percentage compared with the control.

2.5. Wound Healing Assay

Cell invasion was assessed using two-well culture-inserts (No. 80209, Animalab, Germany) in 6-well plates. A total of 2×10^4 cells/well cells were seeded and cultivated in two-well culture-inserts and grown until a monolayer was obtained. The growth area in the culture-insert was 0.22 cm^2 per well. The cell-free gap width was $500 \pm 100 \mu\text{m}$. After a few days of incubation, inserts were removed and the cell layer was washed with PBS (Life Technologies, Houston, TX, USA). The plate was filled with 1.8 mL of the medium in each well. Two hundred microliters of aqueous solutions of GN and rGO flakes at a concentration of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were added to the appropriate wells. Cells were cultured for 48 h and then fixed after 0, 12, 24, and 48 h with 4% paraformaldehyde and stained with May-Grünwald Giemsa stain. Photographs were taken at the same area at $2.5\times$ magnification of the wound using an inverted light microscope. Images were analyzed using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.6. Motility Cells in Co-Culture

For the selectivity assay, we used two dyes: Cell Tracking Dye Kit (Green) for the Hs5 line (ab138891, Abcam, Cambridge, UK) and Cell Tracking Dye Kit (Orange) for the U87 line (ab138892, Abcam, Cambridge, UK). Approximately 2×10^5 cells were used for labelling. Tracking dye green was diluted 1:1000 in assay buffer and 500 μL was added to 500 μL Hs5 cell suspension. Tracking dye orange was diluted 1:50 in assay buffer and 100 μL was added to 900 μL U87 cell suspension. Cells were incubated for 30 min at 37 °C. After staining, the cells were washed thrice with 20 mM HEPES buffer (HBBS). Cell pellets were suspended in 1 mL of growth medium DMEM and applied to the IBIDI dish 35 mm (Cat. No:81156) in a ratio of 1:1. A co-culture was incubated for 24 h (after the culture medium was replaced with that containing 10% solutions of the flakes of GN and rGOs at the concentrations of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and visualized on a FV10-ASW 4.2 (Olympus, Tokyo, Japan) in 200 repetitions every 5 min—Multi Area Time Lapse. The images were analyzed using two fluorescence channels for Ex/Em = 490/520, Ex/Em = 540/570, and differential interference contrast (DIC). After visualization, a film was created using the software FV3000 (Olympus, Tokyo, Japan), and the selectivity of the studied cell flakes in the co-cultures was analyzed. For more detailed analysis, films in the oib format were analyzed using the (Fiji Is Just) ImageJ program with the TrackMate overlay [28]. Cell mobility was analyzed after separating the cells into green (Hs5) and red (U87) channels. Enhanced contrast was used with a value of 0.5%, and in the LoG detector window, the value was 30,000 microns for the estimated blob diameter and for the threshold. Then, based on the values of track duration and tracking distance traveled from the track statistics window, the values of the cell motility of individual populations were calculated.

2.7. Total RNA Isolation and cDNA Synthesis

U87 and Hs5 cells were cultured in six-well plates in three independent replicates in the aqueous solutions of the GN and rGO flakes (25 µg/mL) for 24 h. After trypsinization, cells were centrifuged for 5 min at 400× g and washed twice with PBS. For the total RNA isolation, the NucleoSpin RNA Mini Kit for RNA Purification (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG Allentown, PA, USA) was used according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration and purification were measured using a NanoDrop OneC spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used for the cDNA that was synthesized. The procedure was performed under the following cycling conditions: 10 min at 25 °C, 120 min at 37 °C, and 5 min at 4 °C using a 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). The cDNA concentration and purification were measured by a NanoDrop OneC spectrophotometer and stored for further analysis at −20 °C [29].

2.8. Gene Expression

The $\Delta\Delta Ct$ method was used to determine mRNA expression: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ test sample— ΔCt calibrator sample. The Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) was used; 100 ng of cDNA was prepared for each reaction. Gene-specific primers (Table 1) were prepared by Genomed (Warsaw, Poland), and *rpl13a* was used as the housekeeping [29,30].

Table 1. Primers used to assess the expression of genes involved in cell adhesion and migration.

Genes	Forward Primers (5' to 3')	Reverse Primers (5' to 3')	References
<i>ITGA5</i>	TGCAGTGTGAGGCTGTGTACA	GTGGCCACCTGACGCTCT	[31]
<i>ITGB1</i>	GAAGGGTTGCCCTCCAGA	GCTTGAGCTTCTCTGCTGTT	[31]
<i>CDH2</i>	ACAGATGTGGACAGGATTGTGGGT	TATCCCGGCGTTTCATCCATACCA	[32]
<i>CTNNB1</i>	CCTATGCAGGGGTGGTCAAC	CGACCTGGAAAACGCCATCA	[33]
<i>PTK2</i>	CCCACCAGAGGAGTATGTCC	CCCAGGTCAGAGTTCAATAG	[34]
<i>rpl13a</i>	CATAGGAAGCTGGGAGCAAG	GCCCTCCAATCAGTCTTCTG	[30]

2.9. Immunoblotting—Protein Expression

Immunoblotting was used to evaluate integrin $\alpha 5$, integrin $\beta 1$, N-cadherin, β -catenin, and focal adhesion kinase (FAK) expression. The cells were cultured as described in the section "Cell cultures". Ice-cold lysis buffer TX100 (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM TRIS pH 8) supplemented with protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a ratio of 100:1 (TX100: protease) was used for whole-cell protein extracts isolation. Cells were centrifuged for 30 min at 12,000× g at 4 °C. The protein concentration in supernatant was measured using a Bicinchoninic Acid Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Proteins were denatured for 5 min using the β -mercaptoethanol (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). Equal amounts of protein from each sample were loaded onto a 7.5% polyacrylamide gel. Electrophoresis was performed at 100 mA and 120 V for 1.5 h in 25 mM TGS [Tris-glycine-sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer]. Then the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) was used for protein transfer to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and blocked with I-BLOCK™ reagent (0.2%) (Applied Biosystems, Bedford, MA, USA) in PBS with Tween-20 (0.1%) for 60 min. The primary antibodies such as integrin $\alpha 5$ monoclonal antibody (ab150361, Cambridge, UK), integrin $\beta 1$ monoclonal antibody (ab179471, Cambridge, UK), N-cadherin monoclonal antibody (MA1-159, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), β -catenin polyclonal antibody (PA5-19469, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and FAK monoclonal antibody (ab40794, Cambridge, UK) were incubated with the membranes overnight at 4 °C. Then they were washed in PBS with Tween-20 (0.1%) and incubated with the diluted secondary antibodies such as goat anti-mouse IgG H&L (AP, ab97020 Cambridge, UK) and goat anti-rabbit IgG H&L (AP, ab97048, Cambridge, UK) for 1 h. The

Novex™ AP chemiluminescent substrate (CDP-Star™) (WP20002, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used for protein detection and then visualized using Azure c400 (Azure Biosystems, Dublin, CA, USA). For protein normalization, the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, MA5-15738, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used as the loading control. The background corrections were performed using ImageJ® 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [23].

2.10. Statistical Analysis

GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used for the data analysis. Differences between the groups were tested using Bonferroni's tests and Dunnett's multiple comparison tests. All mean values are presented as standard deviations or standard errors. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. X-ray Photoelectron Spectroscopy of GN and rGO

The XPS survey spectra of the samples are shown in Figure 1A. Carbon and oxygen were the major contributors to the surface composition (81.5 and 85.3 atomic%, respectively). The presence of nitrogen (rGO/TUD and rGO/ATS) and sulfur in the rGO/ATS sample was due to the different substrates and preparation methods employed. The presence of fluorine in the GN/ExF and rGO/ATS samples was caused by the use of Capstone FS-30 during the preparation procedure. The high-resolution spectra of the C1s region are presented in Figure 1B–D. The peak model for this region was based on the works of Koinuma [35], Morais [36], Rabchinskii [37], Radaelli [38], and Barinov [39]. The GN/ExF spectrum featured a well-developed narrow (FWHM = 0.56 eV) peak at 284.5 eV, corresponding to aromatic sp² carbon. Defective graphene structures were visible at 284.1 eV, and aliphatic moieties C–C sp³ and C–H sp³ were visible at 285.0 and 285.5 eV, respectively [35,39,40]. The surface of GN/ExF flakes was partially oxidized. Epoxy groups were the most abundant ones (5.7 atomic%). Other oxygen species such as hydroxyl, carbonyl, and carboxyl groups, were also present and reach 12.6% at. in total [35,36,38]. The results are in line with literature data [35,36,41]. The reduction of GO using ammonium thiosulfate (rGO/ATS) and thiourea dioxide (rGO/TUD) leads to the production of more defective forms of graphene. The HR spectra of rGO/ATS and rGO/TUD are shown in Figure 1C,D, respectively. The main sp² carbon peaks are well developed, but less pronounced (46.7 and 46.6% at., respectively). Compared to sample GN/ExF, peaks at ~284.1 eV and ~283.5 eV, corresponding to defective structures [39,42], are higher: 13.3% at. (rGO/ATS) and 12.6% at. (rGO/TUD) compared to 2.3% at. High resolution spectra of O1s region are presented in Figure A2. The spectra were fitted with five peaks, corresponding to the following moieties: quinones (~530.6 eV), carbonyl oxygen (~531.5), epoxy (~532.6), aromatic hydroxyl and carboxyl groups (~533.4) and adsorbed oxygen species (H₂O/O₂) [39,43–45]. On the GN/ExF surface, the C–O–C epoxy groups were most abundant (80% of all the oxygen species); however, it should be kept in mind that the total oxygen amount in this sample was the lowest: 6% at., compared to 11.5% at. for rGO-ATS and 13.3% at. for rGO/TUD. The reduced graphene oxides (rGO/ATS and rGO/TUD) contained considerable amounts of other oxygen species. Most notably, the amounts of carbonyl oxygen were more than tenfold higher (27.1% at. for rGO/ATS and 25.4% at. for rGO/TUD) compared to GN/ExF (2.5% at.). The amounts of hydroxyl oxygen were almost two-fold higher (25.1% at. for rGO/ATS and 28.6% at. for rGO/TUD) versus the exfoliated graphene (13.3% at. for GN/ExF) and the amounts of quinone oxygen were more than sevenfold higher (12.1% at. for rGO/ATS and 12.4% at. for rGO/TUD vs. 1.7% at. for GN/ExF). GN/ExF and rGO/TUD samples contained tiny amounts of sulphur—less than 0.2% at. On the contrary, the rGO/ATS sample contained more than 4% at. of this element, due to non-ideal removal of the reducing agent (ammonium tiosulphate). The reduced graphene oxide samples contained less than 1.5% at. of nitrogen. The high-resolution spectra show that its main forms were pyridinic nitrogen at ~398.2 eV, amines at ~399.9 eV, and quarternary nitrogen [40,46,47].

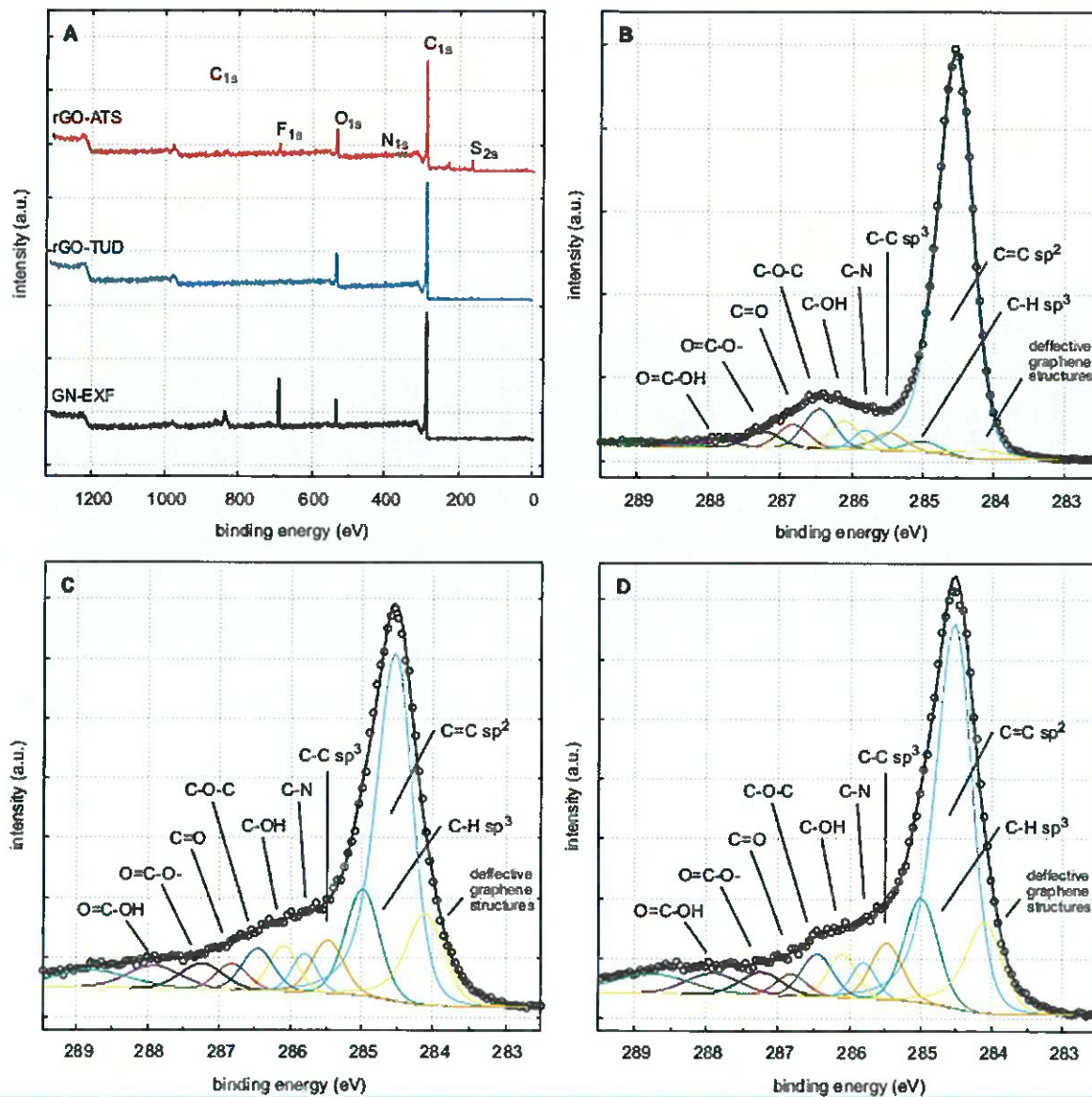


Figure 1. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) results: survey spectra of GN/ExF, rGO/TUD, and rGO/ATS (A), C1s high-resolution spectra (HR) of GN-EXF (B), rGO-TUD (C), and rGO-ATS (D). Abbreviations: rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; C, control group (untreated group); ExF, exfoliation; ATS, ammonium thiosulphate; TUD, thiourea dioxide.

3.2. Cell Viability Assay—Neutral Red

First, we assessed the effect of GN and rGO flakes on the viability and cytotoxicity of glioblastoma multiforme (U87) and normal (Hs5) cell lines using a neutral red assay (Figure 2). In the case of neoplastic cells of the U87 line in all groups treated with GN and rGO flakes, statistically significant changes in viability were observed at all concentrations tested. In healthy Hs5 cells, the most statistically significant changes were observed after treating the cells with rGO/ATS and rGO/TUD flakes at 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In the U87 cell line, a highly statistically significant ($p < 0.0001$) reduction in viability was observed

in the groups treated with rGO/ATS flakes at concentrations of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($29.16\% \pm 2.54$) and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($7.98\% \pm 1.25$) and in the groups treated with rGO/TUD flakes at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($58.31\% \pm 2.06$). In healthy Hs5 cells, the most significant reduction in viability ($p < 0.0001$) was observed in the groups treated with rGO/ATS at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($29.95\% \pm 5.27$), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($29.98\% \pm 4.58$), and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($13.55\% \pm 4.13$). Interestingly, in the groups treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rGO/TUD, a greater reduction in viability was observed in healthy Hs5 cells ($31.8\% \pm 5.6$), compared to the U87 tumor cells. Based on the results of the neutral red test, the optimal concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GN and rGO flakes was selected for further experiments.

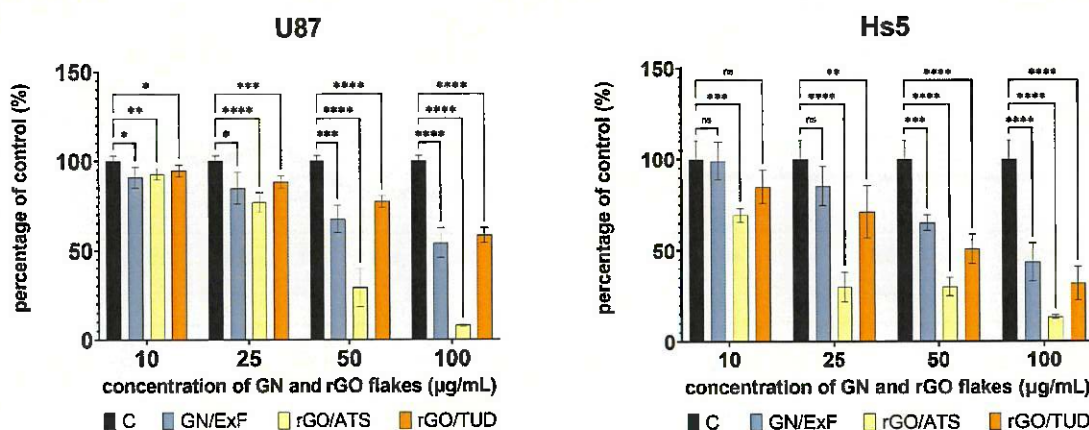
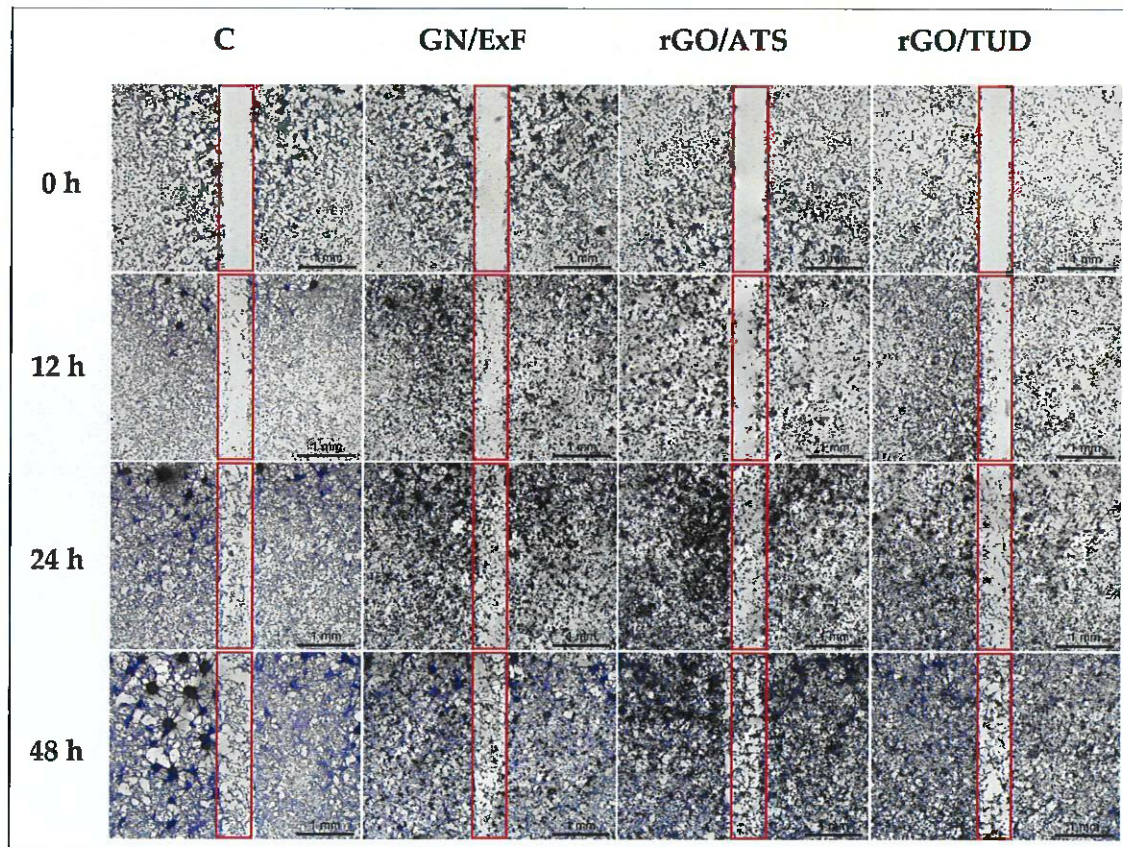


Figure 2. Cell viability of U87 and Hs5 cells treated and untreated with GN and rGO flakes, as evaluated by the neutral red assay. U87 and Hs5 cells were exposed to GN and rGO flakes at concentrations of 10, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. Values are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical significance between the control and treated cells is indicated by an asterisk and was assessed using Bonferroni's multiple comparison test. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant. One asterisk (*) indicates $p < 0.01$, two asterisk (**) indicates $p < 0.005$, three asterisks (***) indicate $p < 0.001$, four asterisk (****) indicate $p < 0.0001$. Abbreviations: rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; C, control group (untreated group); ExF, exfoliation; ATS, ammonium thiosulphate; TUD, thiourea dioxide; ns, not significant.

3.3. Wound Healing Assay

A wound healing assay (Figure 3) was performed to evaluate the migration and proliferation of the U87 and Hs5 cells treated with the GN and rGO flakes. U87 cells (Figure 3A) migrated faster than healthy Hs5 cells (Figure 3B) and completely covered the free space of the scratch after 24 h. However, Hs5 cells did not completely cover the scratch even after 48 h. The results of the wound healing assay indicate that the treatment with rGO/TUD flakes reduced the migration of U87 cells compared to the control cells. Moreover, in the case of U87 cells, a decrease in spheroid formation was observed, especially after 48 h of incubation in the groups treated with rGO flakes compared to the control cells. In healthy Hs5 cells, reduced cell migration was observed after treatment with rGO/TUD flakes for 48 h.



(A)

Figure 3. Cont.

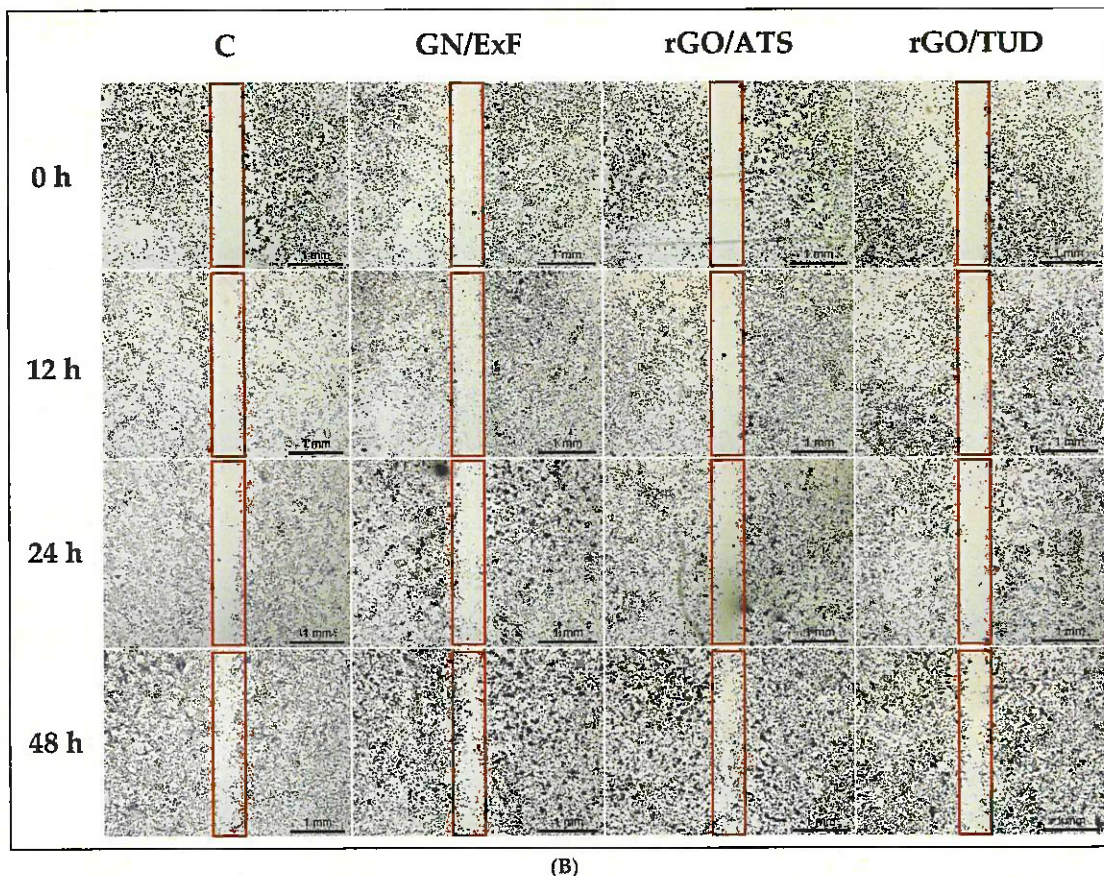


Figure 3. Analysis of U87 (A) and Hs5 (B) cell invasion and migration after 0, 12, 24 and 48 h of cultivation. U87 and Hs5 cells were exposed to GN and rGO flakes at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Notes: For better contrast, cells were fixed and stained with the May Grünwald–Giemsa method. The scratch area is marked with a red frame. Scale bar: 1 mm. Abbreviations: rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; C, control group (untreated group); ExF, exfoliation; ATS, ammonium thiosulphate; TUD, thiourea dioxide.

3.4. Motility

Next, we analyzed the motility (Figure 4, Tables 2 and 3) of U87 glioma tumor cells and healthy Hs5 cells in co-cultures after treatment with GN/ExF graphene flakes and rGO/ATS and rGO/TUD. First, based on the obtained results, it can be observed that the speed of tumor (U87: 11.73 $\mu\text{m}/\text{s}$) and healthy (Hs5: 10.08 $\mu\text{m}/\text{s}$) cells differed in the control co-cultures. U87 cells were found to be faster than Hs5 cells, and their mobility decreased significantly by 51.2% ($p < 0.0001$) and 30.86% ($p < 0.01$) upon treatment with rGO/ATS and rGO/TUD flakes, respectively. In the case of healthy Hs5 cells, mobility decreased significantly by 13.41% ($p < 0.05$), 36.06% ($p < 0.0001$), and 28.36% ($p = 0.0001$) after treatment with GN/ExF, rGO/ATS, and rGO/TUD, respectively, compared to control cells.

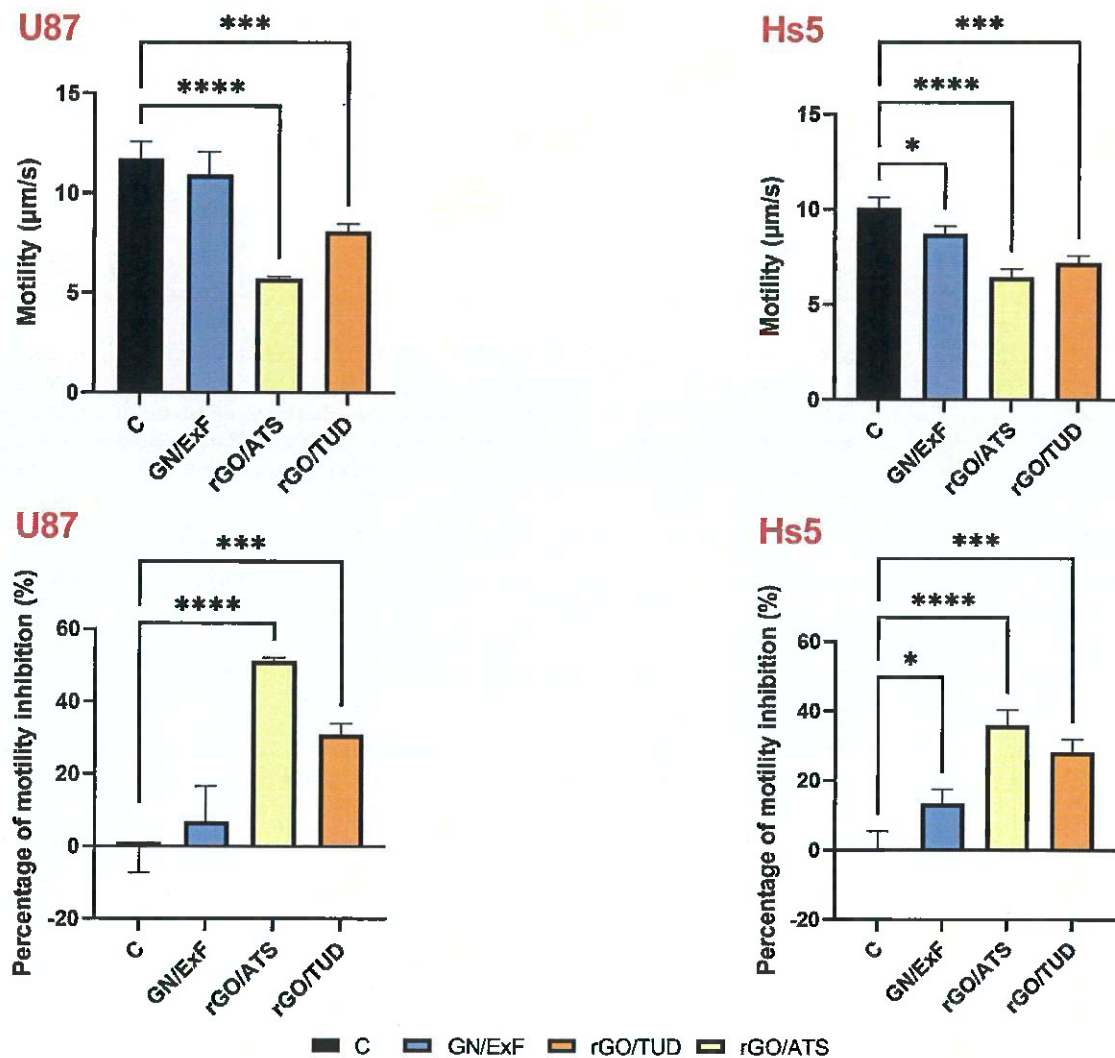


Figure 4. Analysis of U87 and Hs5 cell motility ($\mu\text{m/s}$) and percentage of motility inhibition (%) in co-culture treated with graphene (GN) and reduced graphene oxide (rGO). Statistical significance between the control and treated cells is indicated by an asterisk and was assessed using Bonferroni's multiple comparisons test. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant. One asterisk (*) indicates $p < 0.05$, three asterisk (***) indicates $p < 0.001$ and four asterisk (****) indicate $p < 0.0001$. Abbreviations: rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; C, control group (untreated group); ExF, exfoliation; ATS, ammonium thiosulfate; TUD, thiourea dioxide. Notes: Cell mobility data were analyzed from three independent cultures. Within each co-culture, 100 cell pathways were analyzed in ImageJ using the TrackMate overlay. The average track duration and distance traveled were obtained from the 100 paths. Three independent means from 100 paths were used for statistical calculations.

Table 2. Analysis of U87 and Hs5 cell motility in co-culture treated with graphene (GN) and reduced graphene oxide (rGO) expressed in $\mu\text{m/s}$. Statistical significance between the control and the treated cells is indicated by an asterisk and was assessed using Bonferroni's multiple comparisons test. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant. One asterisk (*) indicates $p < 0.05$, three asterisk (***) indicates $p < 0.001$ and four asterisks (****) indicate $p < 0.0001$.

	Motility ($\mu\text{m/s}$)			
	C	GN/ExF	rGO/ATS	rGO/TUD
U87	11.73	10.92	5.72 ****	8.11 ***
Hs5	10.08	8.73 *	6.44 ****	7.22 ***

Table 3. Analysis of U87 and Hs5 cell motility inhibition in co-culture treated with graphene (GN) and reduced graphene oxide (rGO) expressed in percentage of mobility inhibition (%). Statistical significance between the control and the treated cells is indicated by an asterisk and was assessed using Bonferroni's multiple comparisons test. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant. One asterisk (*) indicates $p < 0.05$, three asterisk (***) indicates $p < 0.001$ and four asterisks (****) indicate $p < 0.0001$.

	Percentage of Mobility Inhibition (%)			
	C	GN/ExF	rGO/ATS	rGO/TUD
U87	0	6.86	51.20 ****	30.86 ***
Hs5	0	13.41 *	36.06 ****	28.35 ***

3.5. Gene Expression

The next stage of this study was to evaluate the influence of the studied forms of GN and rGO on the expression of the selected adhesion and cell migration markers in U87 glioma cells and healthy Hs5 cells (Figure 5). A statistically significant increase in integrin $\alpha 5$ expression was observed in U87 glioma cells (Figure 5A) after treatment with GN/ExF ($\log_2\text{RQ} = 0.38 \pm 0.1121$) and rGO/TUD ($\log_2\text{RQ} = 0.46 \pm 0.1121$) and in healthy Hs5 cells (Figure 5B) after treatment with rGO/ATS ($\log_2\text{RQ} = 0.49 \pm 0.1173$) and rGO/TUD ($\log_2\text{RQ} = 0.43 \pm 0.1173$). Compared with U87 glioma cells, no change in integrin $\alpha 5$ expression was observed in Hs5 cells after treatment with GN/ExF flakes. Subsequently, the expression analysis of integrin $\beta 1$ revealed no statistically significant changes in its expression in U87 glioma cells treated with GN and rGO graphene flakes. However, a statistically significant increase in integrin $\beta 1$ expression was observed in Hs5 cells treated with rGO/ATS ($\log_2\text{RQ} = 0.49 \pm 0.1335$). Next, β -catenin expression was analyzed after treatment with GN/ExF flakes ($\log_2\text{RQ} = -0.25 \pm 0.08658$), rGO/ATS ($\log_2\text{RQ} = -0.39 \pm 0.08658$) and rGO/TUD ($\log_2\text{RQ} = -0.54 \pm 0.08658$). A statistically significant reduction in β -catenin expression was observed in U87 glioma cells, with the most significant reduction in cells treated with rGO/TUD flakes ($\log_2\text{RQ} = -0.54 \pm 0.08658$). In healthy Hs5 cells treated with GN/ExF flakes, the expression of β -catenin decreased, but this was not a statistically significant change. However, a greater reduction in β -catenin expression was observed in Hs5 cells treated with rGO/ATS ($\log_2\text{RQ} = -0.85 \pm 0.1025$) and rGO/TUD ($\log_2\text{RQ} = -1.04 \pm 0.1025$), compared with that in U87 glioma cells. Further, a statistically significant increase in N-cadherin expression was observed in U87 glioma cells ($p < 0.01$) after treatment with GN/ExF ($\log_2\text{RQ} = 0.39 \pm 0.09812$), rGO/ATS ($\log_2\text{RQ} = 0.4 \pm 0.09812$), and rGO/TUD ($\log_2\text{RQ} = 0.41 \pm 0.09812$), whereas in healthy Hs5 cells ($p < 0.0001$), it was observed only after rGO/ATS treatment ($\log_2\text{RQ} = 0.64 \pm 0.09322$). Expression analysis of FAK showed a statistically significant ($p < 0.01$) reduction in its expression in U87 glioma cells after treatment with rGO/ATS ($\log_2\text{RQ} = -0.36 \pm 0.09078$) and rGO/TUD ($\log_2\text{RQ} = -0.34 \pm 0.09078$), whereas in healthy Hs5 cells, it was observed after treatment with all tested flakes: GN/ExF ($\log_2\text{RQ} = -0.31 \pm 0.1084$), rGO/ATS ($\log_2\text{RQ} = -0.49 \pm 0.1084$), and rGO/TUD ($\log_2\text{RQ} = -0.65 \pm 0.1084$).

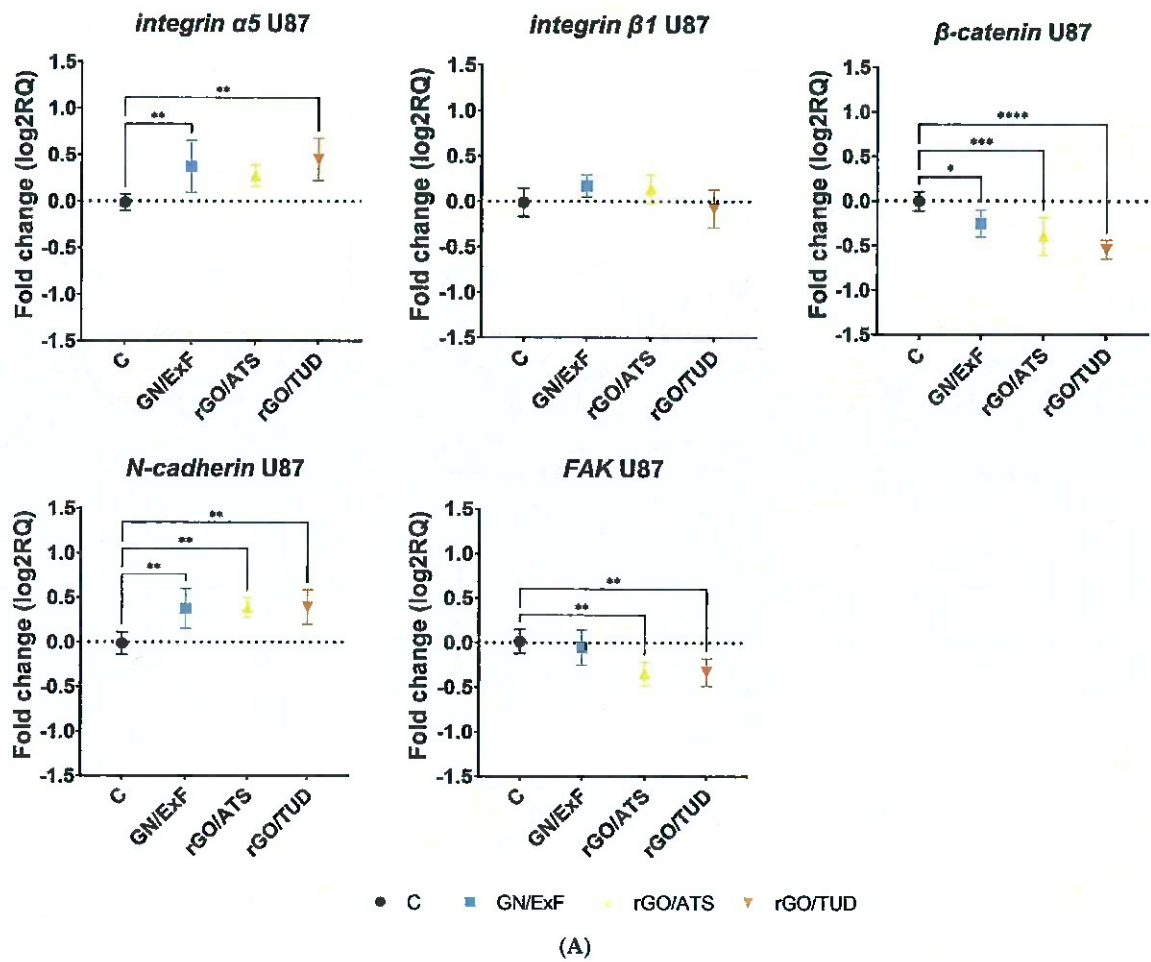
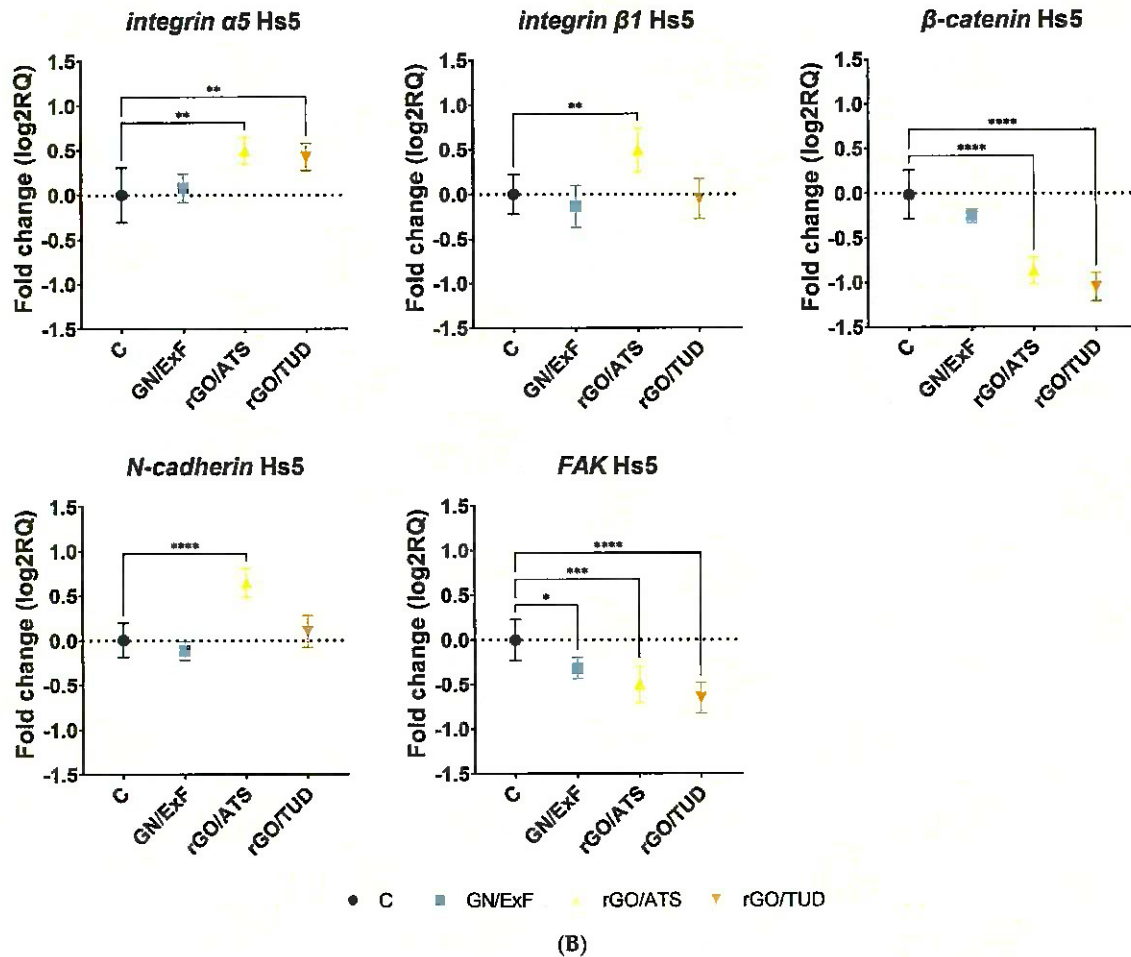


Figure 5. Cont.



(B)

Figure 5. Analysis of the mRNA expression levels of the integrin $\alpha 5$, integrin $\beta 1$, β -catenin, N-cadherin, and FAK genes after GN and rGO treatment at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration for 24 h in U87 (A) and Hs5 (B) cells. The results are calculated relative to the control values. Log₂RQ (log₂ relative quantitation) values for all genes are normalized to the housekeeping gene RPL13A. Statistical significance between the control and the treated cells is indicated by an asterisk and was assessed using Bonferroni's multiple comparisons test. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant. One asterisk (*) indicates $p < 0.05$, two asterisk (**) indicates $p < 0.01$, three asterisk (***) indicates $p < 0.001$ and four asterisks (****) indicate $p < 0.0001$. Abbreviations: rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; C, control group (untreated group); ExF, exfoliation; Term, thermal; ATS, ammonium thiosulfate; TUD, thiourea dioxide; rpl13a, ribosomal protein L13a; log₂RQ, log₂ relative quantitation.

3.6. Protein Expression

Changes in expression at the protein level were confirmed using Western blotting. Expression levels of proteins involved in cell adhesion and migration (integrin $\alpha 5$, integrin $\beta 1$, β -catenin, PAN-cadherin, and FAK) were analyzed in U87 glioma cells and compared with the corresponding protein levels in healthy Hs5 cells treated with different graphene flakes (GN and rGO) (Figure 6). No significant changes in integrin $\alpha 5$ expression were observed in Hs5 cells treated with GN and rGO flakes. In U87 glioma cells, only a slight increase in integrin $\alpha 5$ expression was observed after treatment with rGO/TUD flakes. In

healthy Hs5 cells, a slight increase in integrin $\beta 1$ expression was observed after treatment with GN/ExF and rGO/ATS flakes, but the greatest increase was observed after treatment with rGO/TUD flakes. In U87 glioma cells, we observed an increase in integrin $\beta 1$ expression after treatment with rGO/ATS and rGO/TUD flakes. In normal Hs5 cells, no change in β -catenin expression was observed upon treatment with all tested flakes. In U87 glioma cells, a slight decrease in β -catenin expression was observed after treatment with rGO/ATS flakes, while a strong decrease was observed after treatment with rGO/TUD flakes. PAN-cadherin expression increased in healthy Hs5 cells treated with GN/ExF and rGO/ATS flakes; however, the greatest increase was observed in cells treated with rGO/TUD flakes. In U87 glioma cells, no changes in PAN-cadherin expression were observed. A significant increase in FAK expression was observed in Hs5 cells after treatment with all tested GN/ExF, rGO/ATS, and rGO/TUD flakes. However, U87 glioma cells had the opposite effect, with the group treated with GN/ExF flakes showing a decrease in FAK expression and the groups treated with rGO/ATS and rGO/TUD flakes showing a much greater reduction in FAK expression.

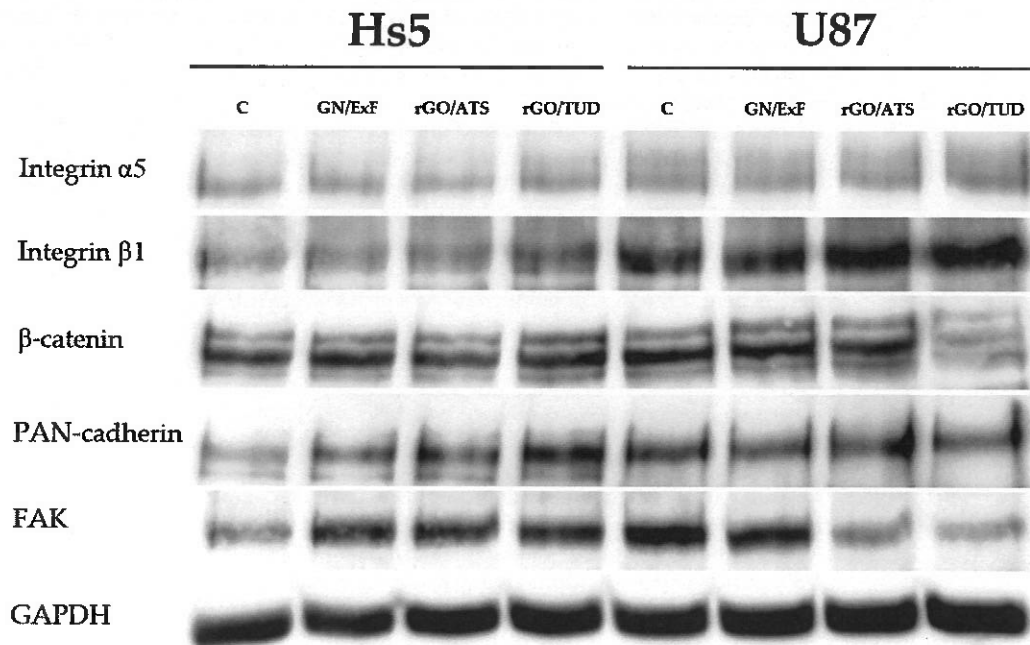


Figure 6. Western blot analysis of integrin $\alpha 5$, integrin $\beta 1$, β -catenin, PAN-cadherin, and FAK after GN and rGO treatment at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration for 24 h in U87 and Hs5 cells. GAPDH was used as a loading control. Abbreviations: rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene; C, control group (untreated group); ExF, exfoliation; term, thermal; ATS, ammonium thiosulfate; TUD, thiourea dioxide; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

4. Discussion

In the present investigation, we hypothesized that the cytotoxicity of rGOs may result mainly from the direct contact of their surface functional groups with the GBM cell membrane and may lead to the disruption (activation/inhibition) of signaling pathways in the plasma membrane and inside the cell, thus modifying the mRNA and protein expression of molecules related to migration and adhesion. The study of the interaction between the GN materials and the expression of selected proteins was thought to reveal the mechanisms underlying the cytotoxicity of these materials in the cell membrane and their innovative

application potential in therapy. Therefore, the present study focused on elucidating the migration and adhesion mechanisms of U87 GMB cells treated with GN and rGO flakes in comparison to normal Hs5 cells.

During a first stage of this study, the cytotoxicity of GN and rGO flakes was analyzed using the neutral red test (Figure 2). Having regard to the fact that living cells incorporate weakly cationic dyes into lysosomes, which first cross the cell membranes by non-ionic passive diffusion compared to damaged or dead cells [48], the dose-dependent cytotoxicity of GN and rGO can be determined by the neutral red uptake assay. Neutral red analysis showed the cytotoxicity of the tested GN materials against U87 glioma tumor cells and Hs5 healthy cells (Figure 2). RGO flakes were more toxic to both lines than GN flakes. Particular differences in the sensitivity of cells to the tested materials were observed in the case of the rGO/ATS flakes at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In U87 glioma cells, viability was 76.76%, while in healthy Hs5 cells, viability after treatment decreased to 29.95%. Another significant difference in the sensitivity of the tested materials was observed in the case of the rGO/TUD flakes at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In U87 glioma cells, we observed a viability of 58.31%, while in the case of healthy Hs5 cells, the viability decreased to 31.81%, indicating the greater toxicity of the examined flakes against healthy cells. In our previous studies, Szczepaniak et al. used the MTT metabolic activity test in healthy Hs5 cells and showed a smaller decrease in metabolic activity than in U87 tumor cells after treatment with the same materials [49]. For example, in the group treated with rGO/TUD flakes at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the U87 glioma cells showed a decrease in viability of $8.69 \pm 12.88\%$, while in the case of healthy Hs5 cells at the same concentration, the decrease in viability was approximately 65%. Moreover, in the case of the treatment with rGO/ATS flakes, a 57.03% viability was observed at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in U87 glioma cells, whereas in healthy Hs5 cells at the same concentration, the decrease in viability was approximately 65% [49]. Neutral red uptake depends on the ability of the cell to maintain a pH gradient through ATP production. At a physiological pH, the dye shows a charge close to zero, allowing it to penetrate the cell membranes. In contrast, a proton gradient at the center of lysosomes maintains its pH lower than that of the cytoplasm. In this way, the dye becomes charged inside the lysosomes [48]. Therefore, the differences in the cytotoxicity results of the presented neutral red and MTT assays may be caused, among others, by GN and rGO flakes blocking the non-ionic diffusion of passive neutral red through the cell membrane, and the flakes can also disrupt the proton gradient, keeping the pH of lysosomes lower than that of the cytoplasm. Our MTT and neutral red assay results are consistent with those of previous studies, which indicate that GN and rGO flakes show significant toxicity against several glioblastoma multiforme cell lines, among others, U251, U87, and U118 [50–53]. Muthoosamy et al. observed a significant difference in the viability of U87 cells, starting from a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.01$) for GO and rGO; GO had an IC50 of 26.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which turned out to be more toxic to U87 cells than rGO, with an IC50 of 132.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. They also showed that rGO showed no toxicity against normal cell lines, with cell viability above 90%, even at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [54].

Next, we performed a wound healing assay to assess the migration of U87 and Hs5 cells after treatment with GN and rGO flakes (Figure 3). We observed that U87 cells migrated faster than normal Hs5 cells and almost completely covered the free gap after 24 h, which is consistent with the observations of Formolo et al., who showed that the level of invasiveness of the U87 glioma line was 29 times higher than that of the T98G, LN18, and U118 cell lines [55]. Treatment of cells with rGO/TUD flakes reduced the migration of U87 glioma cells, leading to slower crack growth. Hs5 cells showed low mobility, and additional treatment with the tested flakes did not change mobility in relation to the control group. Cancer cells migrate by gradually degrading their surrounding extracellular matrix (ECM) to create their own migration tracks by following ‘leader’ cancer cells or cancer-associated stromal cells that open up paths for migration or by moving through pre-existing channel-like tracks created by anatomical structures [56]. Xiao et al. observed that U87 cells in co-cultivation conditions with healthy neurons and glium had significantly

higher mobility [57]. Wierzbicki et al. also observed that treatment with NG and nGO nanoparticles at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduced the two-dimensional migration of U87 and U118 GBM cells [25]. These results were confirmed by the mobility analysis of the co-culture of U87 tumor cells and healthy Hs5 cells (Figure 4). It was observed that the materials with the strongest properties that inhibited the mobility of U87 glioma cells were rGO/ATS flakes (difference between the control (11.73 $\mu\text{m}/\text{s}$) and rGO/ATS-treated cells (5.72 $\mu\text{m}/\text{s}$) was 6.01 $\mu\text{m}/\text{s}$) followed by rGO/TUD flakes (difference between the control (11.73 $\mu\text{m}/\text{s}$) and rGO/TUD-treated cells (8.11 $\mu\text{m}/\text{s}$) was 3.62 $\mu\text{m}/\text{s}$). In normal Hs5 cells, the treatment with rGO/ATS and rGO/TUD flakes reduced the mobility to 3.64 $\mu\text{m}/\text{s}$ and 2.86 $\mu\text{m}/\text{s}$, respectively, which was lower than that of the corresponding treated U87 glioma cells. Overall, the flakes tested inhibited the mobility of both normal and tumor cells; however, for tumor cells that naturally have higher mobility, this change was stronger.

The factors that regulate cell mobility are cell adhesion molecules and ECM receptors [58]. These include the integrins $\alpha 5$ and $\beta 1$, β -catenin, N-cadherin, PAN-cadherin, and FAK, which were analyzed in the present study. Integrins are the principal ECM receptors in animal cells. Integrin $\alpha 5\beta 1$ is a receptor for fibronectin (a glycoprotein found in the extracellular matrix) that plays a very important role in tumor progression, metastasis, and/or resistance to therapy [59–61]. Integrin $\alpha 5\beta 1$ is expressed at a much higher level in GBM cells than in normal brain tissue, suggesting its potential role in GBM development or progression [62]. The results of our study showed a statistically significant increase in the expression of integrin $\alpha 5$ mRNA levels after treatment with GN/ExF flakes ($\log_2\text{RQ} = 0.38 \pm 0.1121$) and rGO/TUD ($\log_2\text{RQ} = 0.46 \pm 0.1121$) in the U87 cell line. No statistically significant changes were observed in the expression of integrin $\beta 1$ mRNA upon treating U87 cells with GN flakes. In contrast, in healthy Hs5 cells, the expression of integrin $\beta 1$ mRNA increased significantly in the group treated with rGO/ATS flakes ($\log_2\text{RQ} = 0.49 \pm 0.1335$). Analysis of integrin $\alpha 5$ expression at the protein level showed no difference after treatment with GN flakes. Integrin $\beta 1$ protein expression increased when U87 glioma cells were treated with rGO/ATS and rGO/TUD flakes. Moreover, the expression of integrin $\beta 1$ was much higher in U87 cells than in healthy Hs5 cells. Janouskova et al. showed that high expression of integrin $\alpha 5\beta 1$ is associated with worse prognosis in patients with GBM [63]. Thus, an increase in integrin $\alpha 5$ expression after treatment with GN/ExF and rGO/TUD flakes may be detrimental to invasiveness and patient survival. Riemenschneider et al. observed integrin $\alpha 5\beta 1$ overexpression at the protein level in a significant percentage of human glioblastoma biopsies [64]. Moreover, Janouskova et al. showed that p53 activation by nutlin-3a inhibits the expression of integrin $\alpha 5\beta 1$ [63]. Therefore, we suspect that the expression of integrin $\beta 1$ at the mRNA level after treatment with GN flakes did not change in U87 glioma cells because of the activation of p53, which inhibits the expression of integrin $\beta 1$. It is likely that the GN flakes act on the signaling pathway, similar to nutlin-3a. Moreover, ECM components, such as vitronectin, collagen, and fibronectin, are natural integrin ligands. Each pair of $\alpha\beta$ integrins contains a specific set of ECM proteins [65]. Therefore, GN flakes attached to the ECM can actively block access to ligands of integrin $\beta 1$, such as fibronectin, and by binding to the GBM cell membrane, actively blocking integrin $\beta 1$ itself and indirectly increasing the expression of integrin $\beta 1$ at the protein level. Thus, after flake treatment, tumor cells showed no alteration in the expression of integrin $\beta 1$ at the mRNA level, but showed increased expression at the protein level after rGO/ATS and rGO/TUD treatment. This may be due to the fact that tumor cells have a stock of integrin $\beta 1$ mRNA and use it under unfavorable conditions to increase integrin $\beta 1$ expression at the protein level, compensating for the stress of blocking fibronectin ligands in the ECM and integrin $\beta 1$ itself, thereby increasing cell–ECM interaction and reducing migration.

β -catenin is a key component of the canonical Wnt/ β -catenin pathway. It accumulates in the nucleus, where it interacts with transcriptional co-regulators, including Tcf-4 and Lef-1, to form the β -catenin/Lef/Tcf complex, which regulates the transcription of several genes involved in proliferation, differentiation, survival, and apoptosis [66]. It appears that β -catenin expression is higher in glioma cells than in healthy brain cells. Silencing of

β -catenin by siRNA in human GBM cells inhibits cell proliferation and invasiveness and induces apoptotic death [66]. Abnormal activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway is a hallmark of many cancers [67] and may contribute to the formation and maintenance of stem cell-like phenotypes [68]. The results of our analysis show a statistically significant decrease in β -catenin mRNA expression after treatment with GN/ExF flakes ($\log_2\text{RQ} = -0.25 \pm 0.08658$), rGO/ATS ($\log_2\text{RQ} = -0.39 \pm 0.08658$), and rGO/TUD ($\log_2\text{RQ} = -0.54 \pm 0.08658$) in U87 glioma cells. The greatest decrease in β -catenin expression after treatment with rGO/TUD flakes was confirmed by Western blot analysis in U87 glioma cells. Wierzbicki et al. also observed a reduction in the expression of cytoplasmic β -catenin at the protein level after treatment with NG and nGO nanoparticles in U118 glioma cells [25]. The reduction in β -catenin expression due to the promotion of proliferation and stem cell renewal may contribute to lowering the invasiveness of neoplastic cells, making them more sensitive to other therapies, including radiotherapy, and reducing tumor relapse after resection [69].

β -catenin, a component of the cell adhesion complex, binds to cadherin and thus regulates cell–cell adhesion. Changing the binding of β -catenin to cadherin reduces cell adhesion while promoting cell migration and epithelial-mesenchymal transition [70]. In the present study, the mRNA and protein expression levels of N-cadherin and PAN-cadherin (an antibody reactive with all types of cadherin proteins, including N-cadherin, E-cadherin, P-cadherin, and R-cadherin) were analyzed. The results of our mRNA analyses show a statistically significant increase in N-cadherin expression after treatment with all tested GN/ExF flakes ($\log_2\text{RQ} = 0.39 \pm 0.09812$), rGO/ATS ($\log_2\text{RQ} = 0.4 \pm 0.09812$), and rGO/TUD ($\log_2\text{RQ} = 0.41 \pm 0.09812$). A feedback phenomenon probably occurred here because a slight decrease in PAN-cadherin expression at the protein level was observed after treatment with GN/ExF flakes, but no visible changes were observed after treatment with rGO/ATS and rGO/TUD flakes in U87 glioma cells. Wierzbicki et al. also observed a decrease in PAN-cadherin expression at the protein level after nGO treatment in U118 glioma cells. For the U87 lineage, no changes in expression were observed for both N-cadherin and PAN-cadherin. Wierzbicki et al. suggested that nanoparticles may change cell migration by hindering interaction between cells and ECM [25]. As the level of cadherins did not change, it should be assumed that the reduction in mobility of glioma cells and fibroblasts occurred because the proposed mechanism of changes in intercellular connections did not occur.

Focal adhesion kinase (FAK) is a multifunctional regulator of cell signaling in the tumor microenvironment [71]. During the development of various types of cancer, FAK promotes cell mobility, survival, and proliferation through kinase-dependent and independent mechanisms. In addition, pharmacological inhibition of FAK activity increases the strength of cell–cell adhesion, which may prevent cancer cells from spreading more rapidly [72]. Our mRNA-level expression analyses show a statistically significant decrease in expression following treatment with rGO/ATS ($\log_2\text{RQ} = -0.36 \pm 0.09078$) and rGO/TUD ($\log_2\text{RQ} = -0.34 \pm 0.09078$) flakes. Moreover, analysis of FAK expression at the protein level clearly confirmed and showed a decrease in FAK protein expression after treatment with rGO/ATS and rGO/TUD flakes in U87 glioma cells. In contrast, in Hs5 cells, an increase in FAK protein expression was observed after treatment with all GN/ExF, rGO/ATS, and rGO/TUD flakes. Lipinski et al. found that increased FAK activity was correlated with high proliferation and low migration rates in four different human GBM cell lines, suggesting that FAK is an important signaling effector in gliomas, and its regulation may be a determinant of proliferative development or migratory phenotype [73]. Thus, the reduction in the expression of FAK in U87 cells may be the reason for the decreased proliferation of U87 glioma cells after treatment with rGO/ATS and rGO/TUD flakes. The mechanism of interaction with normal cells might be different, as a decrease in FAK expression at the mRNA level and an increase in FAK expression at the protein level, with a simultaneous decrease in mobility, were observed. Canel et al. observed that alternative splicing or increased FAK mRNA expression does not always translate to increased protein

levels [74]. Therefore, in normal Hs5 cells, we observed no relationship between FAK expression at the mRNA and protein levels. Moreover, FAK is involved in the formation of integrin receptor clusters upon binding of cells to ECM proteins, which may include FAK dimerization [75]. The interaction between the C-terminal domain of FAK and integrins in focal adhesion (FA) is mediated by integrin/FAK binding because the overexpression of the C-terminal fragment of FAK blocks integrin-mediated activation of FAK [76]. Therefore, we suppose that in U87 glioblastoma cells treated with rGO flakes, the reduction in FAK expression at both mRNA and protein levels may be caused by the rGO-induced increase in the expression of integrin $\beta 1$.

Analyzing the results in terms of the differences between the tested materials, it is evident that rGO/ATS causes a strong decrease in viability, mobility, and mRNA expression of β -catenin and FAK, as well as an increase in the expression of N-cadherin mRNA in U87 cells. At the protein level, after treatment with rGO/ATS flakes, an increase in the expression of integrin $\beta 1$ and a decrease in the expression of FAK in U87 cells was observed. In contrast, rGO/TUD caused a decrease in viability in U87 glioblastoma cells, but lower than in the case of the aforementioned flakes, as well as inhibition of migration, reduced mobility, an increase in mRNA expression of integrin $\alpha 5$ and N-cadherin, and a decrease in the extrusion pressure of β -catenin and FAK. After treatment with rGO/TUD flakes, an increase in the expression of integrin $\beta 1$ and a decrease in the expression of β -catenin and FAK were observed at the protein level. For comparison, GN/ExF flakes in U87 glioma cells caused a lower cytotoxic effect, did not inhibit migration, decreased cell mobility to a lesser extent, and, at the mRNA level, increased integrin $\alpha 5$ and N-cadherin expression, and decreased β -catenin expression. At the protein level, there was a slight reduction in the expression of PAN-cadherin and FAK. These differences probably result from the structure of these flakes (first, the examined flakes differed in the presence of oxygen-containing surface functional groups as well as in a number of physicochemical properties). It seems that flakes with more oxygen-containing functional groups have relatively high potential and hydrophilicity, which is directly related to the size of the GN flakes that can more easily adhere to the cell wall.

5. Conclusions

This study expands our knowledge about the functional mechanism of carbon flakes. We showed that they can affect cell mobility by interacting with cell membrane receptors, such as integrins $\alpha 5$ and $\beta 1$, β -catenin, cadherins, and FAK, through their surface functional groups. However, they are not selective for tumor cells and interact similarly with normal cells, although the strength of this interaction is weaker, or have an opposite effect on normal cells compared to the tumor cells. To the best of our knowledge, we observed for the first time a significant decrease in FAK expression at both mRNA and protein levels in U87 glioma cells treated with rGO/ATS and rGO/TUD flakes. Moreover, although the final effect is similar in normal and cancerous cells (i.e., reduced motility), it must follow different pathways because the expression of key proteins related to mobility (i.e., integrins, β -catenin, cadherin, and FAK) is not consistent in these cells. Further research should be carried out on a more advanced research model, which would verify whether changes in the expression of the studied molecules responsible for migration and invasiveness increase/decrease the virulence of these tumors.

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

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request to the corresponding author.

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

Appendix A

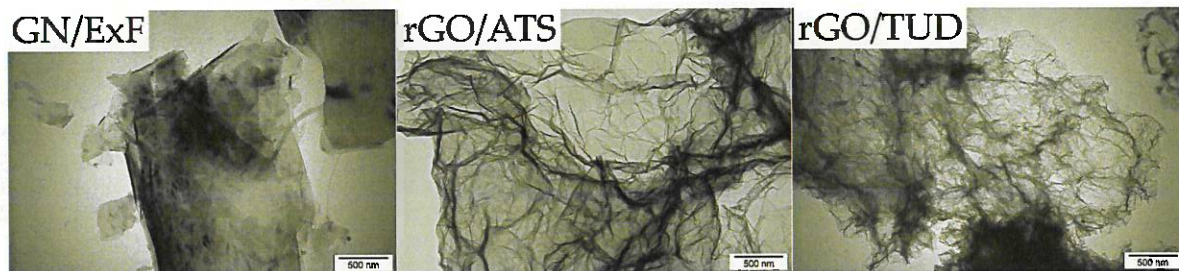


Figure A1. Transmission electron microscopy (TEM) images. Images of GN/ExF flakes and two types of rGO (rGO/ATS, and rGO/TUD). Abbreviations: rGO, reduced graphene oxide; GN, graphene. Notes: All necessary analyses regarding the characteristics of graphene and reduced graphene oxides (including TEM, SEM, FTIR, Raman, etc.) can be found in the works of Szczepaniak et al. 2018, 2021 [29,49].

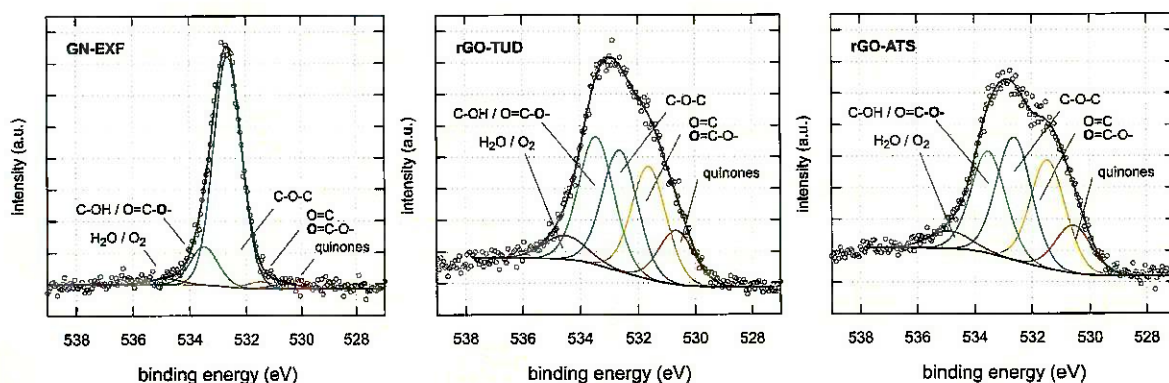


Figure A2. XPS results: O1s high resolution spectra of GN/ExF, rGO/TUD and rGO/ATS.

References

- Louis, D.N. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2006**, *1*, 97–117. [CrossRef]
- Zhu, Y.; Parada, L.F. The Molecular and Genetic Basis of Neurological Tumours. *Nat. Cancer* **2002**, *2*, 616–626. [CrossRef] [PubMed]
- Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, National Cancer Institute of Canada W. Wu et al. *Pharmacol. Res.* **2021**, *171*, 10578017.
- Quail, D.F.; Joyce, J.A. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* **2017**, *31*, 326–341. [CrossRef] [PubMed]
- Verhaak, R.G.; Hoadley, K.A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M.D.; Miller, C.R.; Ding, L.; Golub, T.; Mesirov, J.P.; et al. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 98–110. [CrossRef] [PubMed]
- Hatoum, A.; Mohammed, R.; Zakieh, O. The unique invasiveness of glioblastoma and possible drug targets on extracellular matrix. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 1843–1855. [CrossRef]
- Rao, J.S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: The role of proteases. *Nat. Cancer* **2003**, *3*, 489–501. [CrossRef]
- Levičar, N.; Nutall, R.; Lah, T. Proteases in Brain Tumour Progression. *Acta Neurochir.* **2003**, *145*, 1023. [CrossRef]

9. Ohnishi, T.; Arita, N.; Hiraga, S.; Taki, T.; Izumoto, S.; Fukushima, Y.; Hayakawa, T. Fibronectin-mediated cell migration promotes glioma cell invasion through chemokinetic activity. *Clin. Exp. Metastasis* **1997**, *15*, 538–546. [CrossRef]
10. Shannon, S.; Vaca, C.; Jia, D.; Entersz, I.; Schaer, A.; Carcione, J.; Weaver, M.; Avidar, Y.; Pettit, R.; Nair, M.; et al. Dexamethasone-Mediated Activation of Fibronectin Matrix Assembly Reduces Dispersal of Primary Human Glioblastoma Cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135951. [CrossRef]
11. Meleis, A.M.; Mahtabfar, A.; Danish, S.; Foty, R.A. Dexamethasone-mediated inhibition of Glioblastoma neurosphere dispersal in an ex vivo organotypic neural assay. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0186483. [CrossRef] [PubMed]
12. Kwiatkowska, A.; Symons, M. Signaling Determinants of Glioma Cell Invasion. *Glioma Signal.* **2012**, *986*, 121–141. [CrossRef]
13. Hulpiau, P.; van Roy, F. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 349–369. [CrossRef]
14. Cavallaro, U.; Cristofori, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Cancer* **2004**, *4*, 118–132. [CrossRef] [PubMed]
15. Ratheesh, A.; Yap, A. A bigger picture: Classical cadherins and the dynamic actin cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 673–679. [CrossRef]
16. Wheelock, M.J.; Johnson, K.R. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 509–514. [CrossRef]
17. Camand, E.; Peglion, F.; Osmani, N.; Sanson, M.; Etienne-Manneville, S. N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 844–857. [CrossRef]
18. Utsuki, S.; Oka, H.; Miyajima, Y.; Kijima, C.; Yasui, Y.; Fujii, K. Adult cerebellar glioblastoma cases have different characteristics from supratentorial glioblastoma. *Brain Tumor Pathol.* **2011**, *29*, 87–95. [CrossRef]
19. Parsons, J.T.; Martin, K.H.; Slack, J.K.; Taylor, J.M.; Weed, S.A. Focal Adhesion Kinase: A regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* **2000**, *19*, 5606–5613. [CrossRef]
20. Kornberg, L.; Earp, H.; Parsons, J.; Schaller, M.; Juliano, R. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 23439–23442. [CrossRef]
21. Sulzmaier, F.J.; Jean, C.; Schlaepfer, D.D. FAK in cancer: Mechanistic findings and clinical applications. *Nat. Cancer* **2014**, *14*, 598–610. [CrossRef] [PubMed]
22. Fiorillo, M.; Verre, A.F.; Iliut, M.; Peiris-Pagés, M.; Ozsvári, B.; Gandara, R.; Cappello, A.R.; Sotgia, F.; Vijayaraghavan, A.; Lisanti, M.P. Graphene oxide selectively targets cancer stem cells, across multiple tumor types: Implications for non-toxic cancer treatment, via “differentiation-based nano-therapy”. *Oncotarget* **2015**, *6*, 3553–3562. [CrossRef] [PubMed]
23. Sosnowska, M.; Kutwin, M.; Jaworski, S.; Strojny, B.; Wierzbicki, M.; Szczepaniak, J.; Łojkowski, M.; Świążkowski, 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] [PubMed]
24. Sosnowska, M.; Kutwin, M.; Strojny, B.; Wierzbicki, M.; Cysewski, D.; Szczepaniak, J.; Ficek, M.; Koczoń, P.; Jaworski, S.; Chwalibog, A.; et al. Diamond Nanofilm Normalizes Proliferation and Metabolism in Liver Cancer Cells. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2021**, *14*, 115–137. [CrossRef]
25. 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. Nanomed.* **2017**, *12*, 7241–7254. [CrossRef]
26. Marcano, D.C.; Kosynkin, D.V.; Berlin, J.M.; Sinitskii, A.; Sun, Z.; Slesarev, A.; Alemany, L.B.; Lu, W.; Tour, J.M. Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano* **2010**, *4*, 4806–4814. [CrossRef]
27. Segeritz, C.P.; Vallier, L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems in Vitro. *Basic Sci. Methods Clin. Res.* **2017**, 151–172. [CrossRef]
28. Tinevez, J.-Y.; Perry, N.; Schindelin, J.; Hoopes, G.M.; Reynolds, G.D.; Laplantine, E.; Bednarek, S.Y.; Shorte, S.L.; Eliceiri, K.W. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* **2017**, *115*, 80–90. [CrossRef]
29. Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbicki, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmids, M.; Witkowska-Pilasiewicz, O.; et al. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 515. [CrossRef]
30. Aithal, M.G.S.; Rajeswari, N. Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Glioblastoma Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Brain Tumor Res. Treat.* **2015**, *3*, 24–29. [CrossRef]
31. Dingemans, A.-M.C.; Boogaart, V.V.D.; Vosse, B.A.; Van Suylen, R.-J.; Griffioen, A.W.; Thijssen, V.L. Integrin expression profiling identifies integrin alpha5 and beta1 as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 152. [CrossRef] [PubMed]
32. Mao, Y.; Xu, J.; Li, Z.; Zhang, N.; Yin, H.; Liu, Z. The Role of Nuclear β -Catenin Accumulation in the Twist2-Induced Ovarian Cancer EMT. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e78200. [CrossRef] [PubMed]
33. Ishii, P.L.; Oliveira, R.J.; Mauro, M.D.O.; Zorretto-Pinheiro, V.A.; Sartori, D.; Lepri, S.R.; Baranoski, A.; Mantovani, M.S.; Ribeiro, L.R. The α -Tomatine Exhibits Antiproliferative Activity, Rupture of Cell Membranes and Induces the Expression of APC Gene in the Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (Ht-29). *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2020**, *63*, e20190395. [CrossRef]
34. Chen, T.-C.; Chang, S.-W. Moxifloxacin Modulated TGF- β 1-Related Interleukin-12 Secretion in Corneal Fibroblasts. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2017**, *58*, 5692. [CrossRef]

35. Koinuma, M.; Tateishi, H.; Hatakeyama, K.; Miyamoto, S.; Ogata, C.; Funatsu, A.; Taniguchi, T.; Matsumoto, Y. Analysis of Reduced Graphene Oxides by X-ray Photoelectron Spectroscopy and Electrochemical Capacitance. *Chem. Lett.* **2013**, *42*, 924–926. [CrossRef]
36. Morais, A.; Alves, J.P.C.; Lima, F.A.S.; Lira-Cantu, M.; Nogueira, A.F. Enhanced photovoltaic performance of inverted hybrid bulk-heterojunction solar cells using TiO₂/reduced graphene oxide films as electron transport layers. *J. Photon. Energy* **2015**, *5*, 057408. [CrossRef]
37. Rabchinskii, M.K.; Dideikin, A.T.; Kirilenko, D.A.; Baidakova, M.V.; Shnitov, V.V.; Roth, F.; Konyakhin, S.V.; Besedina, N.; Pavlov, S.L.; Kuricyn, R.A.; et al. Facile reduction of graphene oxide suspensions and films using glass wafers. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14154. [CrossRef]
38. Radaelli, G.; Heredia-Guerrero, J.A.; Masood, M.T.; Ceseracciu, L.; Davis, A.; Carzino, R.; Prato, M.; Bayer, I.S.; Athanassiou, A. Highly Effective Antiadhesive Coatings from pH-Modified Water-Dispersed Perfluorinated Acrylic Copolymers: The Case of Vulcanizing Rubber. *Adv. Mater. Interfaces* **2016**, *3*, 1600069. [CrossRef]
39. Barinov, A.; Gregoratti, L.; Dudin, P.; La Rosa, S.; Kiskinova, M. Imaging and Spectroscopy of Multiwalled Carbon Nanotubes during Oxidation: Defects and Oxygen Bonding. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1916–1920. [CrossRef]
40. Maddi, C.; Bourquard, F.; Barnier, V.; Avila, J.; Asensio, M.-C.; Tite, T.; Donnet, C.; Garrelie, F. Nano-Architecture of nitrogen-doped graphene films synthesized from a solid CN source. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3247. [CrossRef]
41. Bordes, E.; Morcos, B.; Bourgogne, D.; Andanson, J.-M.; Bussière, P.-O.; Santini, C.C.; Benayad, A.; Gomes, M.C.; Pádua, A.A.H. Corrigendum: Dispersion and Stabilization of Exfoliated Graphene in Ionic Liquids. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 556. [CrossRef] [PubMed]
42. Ganesan, K.; Ghosh, S.; Krishna, N.G.; Ilango, S.; Kamruddin, M.; Tyagi, A.K. A comparative study on defect estimation using XPS and Raman spectroscopy in few layer nanographitic structures. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 22160–22167. [CrossRef] [PubMed]
43. Oh, Y.J.; Yoo, J.J.; Kim, Y.I.; Yoon, J.K.; Yoon, H.N.; Kim, J.-H.; Park, S.B. Oxygen functional groups and electrochemical capacitive behavior of incompletely reduced graphene oxides as a thin-film electrode of supercapacitor. *Electrochim. Acta* **2014**, *116*, 118–128. [CrossRef]
44. Stobinski, L.; Lesiak, B.; Malolepszy, A.; Mazurkiewicz, M.; Mierzwa, B.; Zemek, J.; Jiricek, P.; Bieloshapka, I. Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **2014**, *195*, 145–154. [CrossRef]
45. Arrigo, R.; Hävecker, M.; Wrabetz, S.; Blume, R.; Lerch, M.; McGregor, J.; Parrott, E.P.J.; Zeitler, J.A.; Gladden, L.F.; Knop-Gericke, A.; et al. Tuning the Acid/Base Properties of Nanocarbons by Functionalization via Amination. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9616–9630. [CrossRef] [PubMed]
46. Gupta, N.K.; Peng, B.; Haller, G.L.; Ember, E.E.; Lercher, J.A. Nitrogen Modified Carbon Nano-Materials as Stable Catalysts for Phosgene Synthesis. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 5843–5855. [CrossRef]
47. Raicopol, M.; Andronescu, C.; Atasiei, R.; Hanganu, A.; Pilan, L. Post-Polymerization Electrochemical Functionalization of a Conducting Polymer: Diazonium Salt Electroreduction at Polypyrrole Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* **2014**, *161*, G103–G113. [CrossRef]
48. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125–1131. [CrossRef]
49. Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Chwalibog, E.S.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; et al. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3939. [CrossRef]
50. Jaworski, S.; Sawosz, E.; Kutwin, M.; Wierzbicki, M.; Hinzmann, M.; Grodzik, M.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Wlodyga, K.; Chwalibog, A. In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 1585–1596. [CrossRef]
51. Jaworski, S.; Sawosz, E.; Grodzik, M.; Winnicka, A.; Prasek, M.; Wierzbicki, M.; Chwalibog, A. In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 413–420. [CrossRef]
52. Markovic, Z.M.; Harhaji-Trajkovic, L.; Marković, B.T.; Kepić, D.; Arsić, K.M.; Jovanović, S.P.; Pantović, A.C.; Dramicanin, M.; Trajkovic, V. In vitro comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1121–1129. [CrossRef]
53. Hinzmann, M.; Jaworski, S.; Kutwin, M.; Jagiello, J.; Kozirski, R.; Wierzbicki, M.; Grodzik, M.; Lipińska, L.; Sawosz, E.; Chwalibog, A. Nanoparticles containing allotropes of carbon have genotoxic effects on glioblastoma multiforme cells. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 2409–2417. [CrossRef]
54. Manickam, S.; Muthoosamy, K.; Bai, R.G.; Abubakar, I.B.; Sudheer, S.M.; Hongngue, L.; Hwei-San, L.; Nayming, H.; Ch, C. Exceedingly biocompatible and thin-layered reduced graphene oxide nanosheets using an eco-friendly mushroom extract strategy. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 1505–1519. [CrossRef] [PubMed]
55. Formolo, C.A.; Williams, R.; Gordish-Dressman, H.; MacDonald, T.J.; Lee, N.H.; Hathout, Y. Secretome Signature of Invasive Glioblastoma Multiforme. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 3149–3159. [CrossRef]
56. Paul, C.D.; Mistriotis, P.; Konstantopoulos, K. Cancer cell motility: Lessons from migration in confined spaces. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 131–140. [CrossRef]

57. Xiao, M.; Li, X.; Song, Q.; Zhang, Q.; Lazzarino, M.; Cheng, G.; Severino, F.P.U.; Torre, V. A Fully 3D Interconnected Graphene–Carbon Nanotube Web Allows the Study of Glioma Infiltration in Bioengineered 3D Cortex-Like Networks. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, e1806132. [CrossRef]
58. Aoudjit, F.; Vuori, K. Integrin Signaling in Cancer Cell Survival and Chemoresistance. *Chemother. Res. Pract.* **2012**, *2012*, 283181. [CrossRef]
59. Roman, J.; Ritzenthaler, J.D.; Roser-Page, S.; Sun, X.; Han, S. $\alpha 5\beta 1$ -Integrin Expression Is Essential for Tumor Progression in Experimental Lung Cancer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2010**, *43*, 684–691. [CrossRef]
60. Sawada, K.; Mitra, A.K.; Radjabi, A.R.; Bhaskar, V.; Kistner, E.O.; Tretiakova, M.; Jagadeeswaran, S.; Montag, A.; Becker, A.; Kenny, H.A.; et al. Loss of E-Cadherin Promotes Ovarian Cancer Metastasis via $\alpha 5$ -Integrin, which Is a Therapeutic Target. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2329–2339. [CrossRef]
61. Nam, J.-M.; Onodera, Y.; Bissell, M.J.; Park, C.C. Breast Cancer Cells in Three-dimensional Culture Display an Enhanced Radioresponse after Coordinate Targeting of Integrin $\alpha 5\beta 1$ and Fibronectin. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 5238–5248. [CrossRef]
62. Gingras, M.-C.; Roussel, E.; Bruner, J.M.; Branch, C.D.; Moser, R.P. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J. Neuroimmunol.* **1995**, *57*, 143–153. [CrossRef]
63. Janouskova, H.; Maglott, A.; Leger, D.Y.; Bossert, C.; Noulet, F.; Guerin, E.; Guenot, D.; Pinel, S.; Chastagner, P.; Plenat, F.; et al. Integrin $\alpha 5\beta 1$ Plays a Critical Role in Resistance to Temozolomide by Interfering with the p53 Pathway in High-Grade Glioma. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 3463–3470. [CrossRef] [PubMed]
64. Riemenschneider, M.J.; Mueller, W.; Betensky, R.A.; Mohapatra, G.; Louis, D.N. In Situ Analysis of Integrin and Growth Factor Receptor Signaling Pathways in Human Glioblastomas Suggests Overlapping Relationships with Focal Adhesion Kinase Activation. *Am. J. Pathol.* **2005**, *167*, 1379–1387. [CrossRef]
65. Hynes, R.O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* **2002**, *110*, 673–687. [CrossRef]
66. Zhang, J.; Huang, K.; Shi, Z.; Zou, J.; Wang, Y.; Jia, Z.; Zhang, A.; Han, L.; Yue, X.; Liu, N.; et al. High β -catenin/Tcf-4 activity confers glioma progression via direct regulation of AKT2 gene expression. *Neuro-Oncology* **2011**, *13*, 600–609. [CrossRef]
67. Reya, T.; Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **2005**, *434*, 843–850. [CrossRef]
68. Nager, M.; Bhardwaj, D.; Cantí, C.; Medina, L.; Nogués, P.; Herreros, J. β -Catenin Signalling in Glioblastoma Multiforme and Glioma-Initiating Cells. *Chemother. Res. Pract.* **2012**, *2012*, 192362. [CrossRef]
69. Chen, M.S.; Woodward, W.; Behbod, F.; Peddibhotla, S.; Alfaro, M.P.; Buchholz, T.A.; Rosen, J.M. Wnt/ β -catenin mediates radiation resistance of Sca1+ progenitors in an immortalized mammary gland cell line. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 468–477. [CrossRef]
70. Nelson, W.J.; Nusse, R. Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science* **2004**, *303*, 1483–1487. [CrossRef]
71. Schaller, M.D. Cellular functions of FAK kinases: Insight into molecular mechanisms and novel functions. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 1007–1013. [CrossRef] [PubMed]
72. Canel, M.; Serrels, A.; Miller, D.; Timpson, P.; Serrels, B.; Frame, M.C.; Brunton, V.G. Quantitative in vivo imaging of the effects of inhibiting integrin signaling via Src and FAK on cancer cell movement: Effects on E-cadherin dynamics. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 9413–9422. [CrossRef] [PubMed]
73. Lipinski, C.A.; Tran, N.L.; Bay, C.; Kloss, J.M.; McDonough, W.S.; Beaudry, C.; Berens, M.E.; Loftus, J.C. Differential role of proline-rich tyrosine kinase 2 and focal adhesion kinase in determining glioblastoma migration and proliferation. *Mol. Cancer Res. MCR* **2003**, *1*, 323–332. [PubMed]
74. Canel, M.; Secades, P.; Rodrigo, J.-P.; Cabanillas, R.; Herrero, A.; Suarez, C.; Chiara, M.-D. Overexpression of Focal Adhesion Kinase in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Independent of *fak* Gene Copy Number. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 3272–3279. [CrossRef] [PubMed]
75. Brami-Cherrier, K.; Gervasi, N.; Arsenieva, D.; Walkiewicz, K.; Boutterin, M.; Ortega, A.; Leonard, P.G.; Seantier, B.; Gasmil, L.; Bouceba, T.; et al. FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. *EMBO J.* **2014**, *33*, 356–370. [CrossRef]
76. Mitra, S.K.; Hanson, D.A.; Schlaepfer, D.D. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 56–68. [CrossRef]

.....Warszawa 11.05.2023

Data i miejsce

Jarosław Szczepaniak

.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Witkowska Pilaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI: 10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w projektowaniu układu doświadczalnego, wykonywaniu doświadczeń, interpretacji wyników i analizie statystycznej wyników oraz pisaniu manuskryptu (64% wkładu)

Jarosław Szczepaniak

Podpis

24.04.2023 Warszawa

Data i miejsce

Barbara Strojny

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Witkowska Pilaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI: 10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w projektowaniu układu doświadczalnego i walidacji wyników (2% wkładu)

Barbara Strojny Ciszek

Podpis

.....10.05.2023.....Warszawa

Data i miejsce

Ewa Sawosz-Chwalibóg

.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Witkowska Pilaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI: 10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w nadzorze nad przebiegiem prac eksperymentalnych (2% wkładu)

..........

Podpis

10.05.2018 Warszawa

Data i miejsce

Sławomir Jaworski

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Witkowska Pilaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI: 10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w części doświadczalnej dotyczącej analizy potencjału błony mitochondrialnej oraz zapewnieniu części reagentów (3% wkładu)

Sławomir Jaworski

Podpis

11.05.2023, Wornawa

Data i miejsce

Joanna Jagiełło

.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Syntezy Chemicznej i Grafenu Płatkowego, Instytut Technologii Materiałów
Elektronicznych w Warszawie

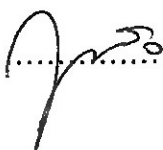
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Witkowska Pilaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI: 10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

produkcji płatków grafenowych i zredukowanych tlenków grafenu i wykonaniu części doświadczalnej dotyczącej ich charakterystyki (3% wkładu)

.....


Podpis

11.05.2023, Warszawa

Data i miejsce

Magdalena Winkowska

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Syntezy Chemicznej i Grafenu Płatkowego, Instytut Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Witkowska Pilaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI: 10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

wykonaniu części doświadczalnej dotyczącej charakterystyki płatków grafenowych i zredukowanych tlenków grafenu (2% wkładu)



Podpis

11 maja 2023 Warszawa

Data i miejsce

Maciej Szmidt

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nauk Morfologicznych, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, SGGW w Warszawie

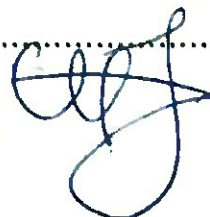
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Witkowska Pilaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI: 10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w pisaniu manuskryptu, jego przeglądzie i edycji (2% wkładu)



Podpis

10.05.2023 Warszawa

Data i miejsce

Mateusz Wierzbicki

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

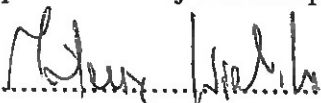
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Witkowska Pilaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI: 10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w części doświadczalnej dotyczącej mikroskopii konfokalnej oraz interpretacji wyników (2% wkładu)

..........

Podpis

.....12.05.2023..... Warszawa.....

Data i miejsce

Malwina Sosnowska

.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Witkowska Pilaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI: 10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w części doświadczalnej dotyczącej analizy cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (2% wkładu)

.....Sosnowska Malwina.....

Podpis

10.05.2023r. Warszawa

Data i miejsce

Jaśmina Balaban

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

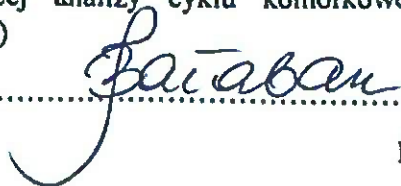
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Witkowska Pilaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI: 10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w części doświadczalnej dotyczącej analizy cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (2% wkładu)


.....

Podpis

Warszawa 10.05.2023

Anna Winnicka

Afiliacja

Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Witkowska Pilaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI: 10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w części doświadczalnej dotyczącej analiz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (2% wkładu)

Anna Winnicka

10.05.2023, Warszawa

Data i miejsce

Ludwika Lipińska

.....
Imię i nazwisko

Afiliacja

Zakład Syntezy Chemicznej i Grafenu Płatkowego, Instytut Technologii Materiałów
Elektronicznych w Warszawie

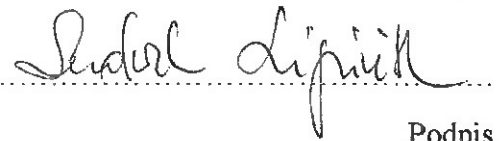
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.;
Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipinska, L.;
Witkowska Pilaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis
and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI:
10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w części doświadczalnej dotyczącej charakterystyki materiałów grafenowych
(2% wkładu)



Podpis

10.05.2023

.....
Data i miejsce

Olga Witkowska-Piłaszewicz
.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Chorób Dużych Zwierząt i Klinika, Instytut Medycyny Weterynaryjnej,
SGGW w Warszawie (dawniej Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbiński, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipińska, L.; Witkowska Piłaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI: 10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

wykonywaniu oznaczeń laboratoryjnych, analizie wyników, uczestniczeniu w korekcie merytorycznej i językowej manuskryptu (2% wkładu).

Witkowska-Piłaszewicz Olga
.....
Podpis

.....10.05.2013.....Warszawa

Data i miejsce

Marta Grodzik

.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; Winnicka, A.; Lipinska, L.; Witkowska Pilaszewicz, O.; Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3939. DOI: 10.3390/ijms19123939 (IF= 4,183; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w konceptualizacji oraz projektowaniu doświadczenia i analizie części wyników, pracy nad manuskrytem oraz wykonywaniu obowiązków autora korespondencyjnego i pozyskaniu finansowania (10% wkładu)

.....M. Grodzik.....

Podpis

.....Warszawa 11.05.2023

Data i miejsce

Jarosław Szczepaniak

.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbicki, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmidt, M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Strojny-Cieslak, B.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 515. DOI:10.3390/ijms22020515 (IF= 6,208; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w projektowaniu układu doświadczalnego, wykonywaniu doświadczeń, interpretacji wyników i analizie statystycznej wyników oraz pisaniu manuskryptu (70% wkładu)

Jarosław Szczepaniak

Podpis

..11.05.2023, Wawne..

Data i miejsce

Joanna Jagiełło

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Syntezy Chemicznej i Grafenu Płatkowego, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Mikroelektroniki i Fotoniki w Warszawie

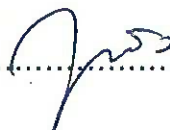
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbicki, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmidt, M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Strojny-Cieslak, B.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 515. DOI:10.3390/ijms22020515 (IF= 6,208; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

produkcji płatków grafenowych i zredukowanych tlenków grafenu (2% wkładu)

.....


Podpis

10.05.2023 Warszawa

Data i miejsce

Mateusz Wierzbicki

.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbicki, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmidt, M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Strojny-Cieslak, B.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 515. DOI:10.3390/ijms22020515 (IF= 6,208; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w części doświadczalnej dotyczącej membran białkowych (2% wkładu)

.....
Mateusz Wierzbicki

Podpis

.....M.05.2023.tcdk'.....

Data i miejsce

Dorota Nowak

.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Tricomed SA

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbicki, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmidt, M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Strojny-Cieslak, B.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 515. DOI:10.3390/ijms22020515 (IF= 6,208; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

wykonaniu części doświadczalnej dotyczącej charakterystyki materiałów grafenowych – SEM, FTIR (2% wkładu)

.....Dorota Nowak.....

Podpis

Łódź, dnia 11.05.2023 r.

Data i miejsce

Anna Sobczyk-Guzenda

.....
Imię i nazwisko

Afiliacja

Instytut Inżynierii Materiałowej, Politechnika Łódzka

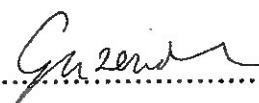
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbicki, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmidt, M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Strojny-Cieslak, B.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 515. DOI:10.3390/ijms22020515 (IF= 6,208; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

wykonaniu części doświadczalnej dotyczącej charakterystyki materiałów grafenowych – FTIR wraz z opracowaniem wyników (2% wkładu)

.....


Podpis

..... 12.05.2023 Nowosiedle

Data i miejsce

Malwina Sosnowska

.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbicki, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmidt, M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Strojny-Cieslak, B.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 515. DOI:10.3390/ijms22020515 (IF= 6,208; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w części doświadczalnej dotyczącej membran białkowych (2% wkładu)

..... Sosnowska Malwina

Podpis

10.05.2023, Włocławek.....

Data i miejsce

Sławomir Jaworski
.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbicki, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmidt, M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Strojny-Cieslak, B.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 515. DOI:10.3390/ijms22020515 (IF= 6,208; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w części doświadczalnej dotyczącej analizy potencjału błony komórkowej (2% wkładu)

Jaworski.....

Podpis

11.05.2023

Data i miejsce

Karolina Daniluk

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbiński, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmidt, M.; Witkowska-Pilasiewicz, O.; Strojny-Cieslak, B.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 515. DOI:10.3390/ijms22020515 (IF= 6,208; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w części doświadczalnej dotyczącej analizy ekspresji genów (2% wkładu)

Karolina Daniluk

Podpis

11 maja 2023 Warszawa

Data i miejsce

Maciej Szmidt

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nauk Morfologicznych, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, SGGW w Warszawie

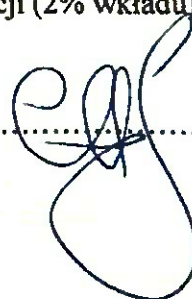
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbicki, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmidt, M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Strojny-Cieslak, B.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 515. DOI:10.3390/ijms22020515 (IF= 6,208; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w pisaniu manuskryptu, jego przeglądzie i edycji (2% wkładu)



Podpis

10.05.2023

.....
Data i miejsce

Olga Witkowska-Piłaszewicz
.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Chorób Dużych Zwierząt i Klinika, Instytut Medycyny Weterynaryjnej,
SGGW w Warszawie (dawniej Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbicki, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmidt, M.; Witkowska-Piłaszewicz, O.; Strojny-Cieslak, B.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 515. DOI:10.3390/ijms22020515 (IF= 6,208; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

walidacji, uczestniczeniu w korekcie merytorycznej i językowej manuskryptu (2% wkładu).

Witkowska-Piłaszewicz Olga

Podpis

24.04.2023 Warszawa

Data i miejsce

Barbara Strojny-Cieślak

.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbicki, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmidt, M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Strojny-Cieslak, B.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 515. DOI:10.3390/ijms22020515 (IF= 6,208; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w poprawkach merytorycznych manuskryptu oraz poprawkach językowych (2% wkładu)

Barbara Strojny-Cieślak

Podpis

.....12.05.2023.....Warszawa.....

Data i miejsce

Marta Grodzik

.....
Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Jagiello, J.; Wierzbicki, M.; Nowak, D.; Sobczyk-Guzenda, A.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Daniluk, K.; Szmidt, M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Strojny-Cieslak, B.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 515. DOI:10.3390/ijms22020515 (IF= 6,208; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w konceptualizacji oraz projektowaniu doświadczenia i analizie części wyników, pracy nad manuskryptem oraz wykonywaniu obowiązków autora korespondencyjnego i pozyskaniu finansowania (10% wkładu)

.....


Podpis

Warszawa 11.05.2023

Data i miejsce

Jarosław Szczepaniak

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Sosnowska, M.; Wierzbicki M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Strojny-Cieślak, B.; Jagiello, J.; Frączek, W.; Kuśmierz, M.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxide Modulates the FAK-dependent Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Cells in vitro. *Materials*, 2022,15, 5843. DOI:10.3390/ma15175843 (IF= 3,748; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w projektowaniu układu doświadczalnego, wykonywaniu doświadczeń, interpretacji wyników i analizie statystycznej wyników oraz pisaniu manuskryptu (71% wkładu)

Jarosław Szczepaniak

Podpis

.....10.05.2023 Warszawa.....

Data i miejsce

Malwina Sosnowska

.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Sosnowska, M.; Wierzbicki M.; Witkowska-Piłaszewicz, O.; Strojny-Cieślak, B.; Jagiełło, J.; Frączek, W.; Kuśmierz, M.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxide Modulates the FAK-dependent Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Cells in vitro. *Materials*, 2022,15, 5843. DOI:10.3390/ma15175843 (IF= 3,748; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w projektowaniu układu doświadczalnego dotyczącego analizy wound healing assay (3% wkładu)

.....Sosnowska Malwina.....

Podpis

10.05.2023 Warszawa

Data i miejsce

Mateusz Wierzbicki
.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Sosnowska, M.; Wierzbicki M.; Witkowska-Piłaszewicz, O.; Strojny-Cieślak, B.; Jagiełło, J.; Frączek, W.; Kuśmierz, M.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxide Modulates the FAK-dependent Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Cells in vitro. *Materials*, 2022,15, 5843. DOI:10.3390/ma15175843 (IF= 3,748; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w części doświadczalnej dotyczącej mikroskopii konfokalnej i analizy western blot oraz interpretacji wyników (5% wkładu)

.....*Mateusz Wierzbicki*.....

Podpis

10.05.2023

.....
Data i miejsce

Olga Witkowska-Piłaszewicz
.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Chorób Dużych Zwierząt i Klinika, Instytut Medycyny Weterynaryjnej,
SGGW w Warszawie (dawniej Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Sosnowska, M.; Wierzbicki M.; Witkowska-Piłaszewicz, O.; Strojny-Cieślak, B.; Jagiełło, J.; Frączek, W.; Kuśmierz, M.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxide Modulates the FAK-dependent Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Cells in vitro. *Materials*, 2022,15, 5843. DOI:10.3390/ma15175843 (IF= 3,748; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

dobieraniu metodologii, wykonywaniu oznaczeń laboratoryjnych, uczestniczeniu w korekcie merytorycznej i językowej manuskryptu (2% wkładu).

Witkowska-Piłaszewicz Olga
.....

Podpis

24.04.2023 Warszawa

Data i miejsce

Barbara Strojny-Cieślak

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Sosnowska, M.; Wierzbicki M.; Witkowska-Piłaszewicz, O.; Strojny-Cieślak, B.; Jagiełło, J.; Frączek, W.; Kuśmierz, M.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxide Modulates the FAK-dependent Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Cells in vitro. *Materials* 2022, 15, 5843. DOI:10.3390/ma15175843 (IF= 3,748; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w części doświadczalnej dotyczącej analizy western blot (2% wkładu)

Barbara Strojny-Cieślak

Podpis

11.05.2023, Warszawa

Data i miejsce

Joanna Jagiełło

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Syntezy Chemicznej i Grafenu Płatkowego, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Mikroelektroniki i Fotoniki w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Sosnowska, M.; Wierzbiński M.; Witkowska-Piłaszewicz, O.; Strojny-Cieślak, B.; Jagiełło, J.; Frączek, W.; Kuśmierz, M.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxide Modulates the FAK-dependent Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Cells in vitro. *Materials*, 2022,15, 5843. DOI:10.3390/ma15175843 (IF= 3,748; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

produkcji płatków grafenowych i zredukowanych tlenków grafenu (2% wkładu)



Podpis

.....10.05.2022, Warszawa.....

Data i miejsce

Wiktoria Frączek

.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Sosnowska, M.; Wierzbicki M.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Strojny-Cieślak, B.; Jagiełło, J.; Frączek, W.; Kuśmierz, M.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxide Modulates the FAK-dependent Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Cells in vitro. *Materials*, 2022,15, 5843. DOI:10.3390/ma15175843 (IF= 3,748; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w części doświadczeń (2% wkładu)

.....Wiktoria Frączek.....

Podpis

LUBLIN 2023.04.11

.....
Data i miejsce

Marcin Kuśmierz
.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Laboratorium Analityczne, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, UMCS w Lublinie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Sosnowska, M.; Wierzbicki M.; Witkowska-Piłaszewicz, O.; Strojny-Cieślak, B.; Jagiełło, J.; Frączek, W.; Kuśmierz, M.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxide Modulates the FAK-dependent Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Cells *in vitro*. *Materials* 2022, 15, 5843. DOI:10.3390/ma15175843 (IF= 3,748; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

wykonaniu, analizie i interpretacji charakterystyki płatków GN i rGO metodą XPS (3% wkładu)

Marcin Kuśmierz
.....

Podpis

.....10.05.2023.....Warszawa.....

Data i miejsce

Marta Grodzik

.....

Imię i nazwisko

Afiliacja

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Szczepaniak, J.; Sosnowska, M.; Wierzbicki M.; Witkowska-Piłaszewicz, O.; Strojny-Cieślak, B.; Jagiełło, J.; Frączek, W.; Kuśmierz, M.; Grodzik, M. Reduced Graphene Oxide Modulates the FAK-dependent Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Cells in vitro. *Materials*, 2022,15, 5843. DOI:10.3390/ma15175843 (IF= 3,748; MNiSW: 140 pkt)

mój udział polegał na

uczestniczeniu w konceptualizacji oraz projektowaniu doświadczenia i analizie części wyników, pracy nad manuskrytem oraz wykonywaniu obowiązków autora korespondencyjnego i pozyskaniu finansowania (10% wkładu)

.....
M. Grodzik

Podpis