

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
Instytut Biologii

mgr inż. Jaśmina Bałaban

Wpływ tlenku grafenu i wybranych białek na funkcjonalno-
morfologiczne cechy komórek mięśniowych. Badania modelowe.

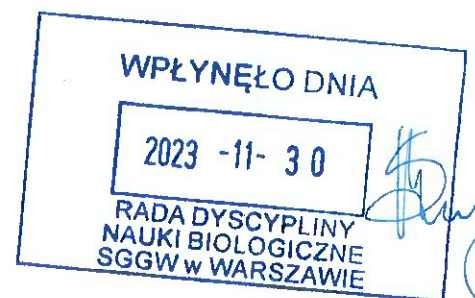
Effect of graphene oxide and selected protein on functional and
morphological status of muscle cells. Model studies.

Praca doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem:
Prof. dr hab. Ewy Sawosz Chwalibóg
Katedra Nanobiotechnologii
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Promotor pomocniczy:
dr hab. Mateusz Wierzbicki
Katedra Nanobiotechnologii
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2023 r.

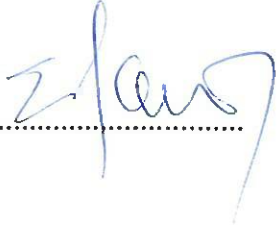


*Pragnę serdecznie podziękować
prof. dr hab. Ewie Sawosz – Chwalibóg
za możliwość realizacji niniejszej pracy, nieocenioną pomoc i wsparcie ogromem wiedzy i
doświadczenia,
prof. dr hab. Andre Chwalibog
za cenne komentarze, pracę edytorską oraz pełnienie obowiązków autora korespondencyjnego,
dr hab. Mateuszowi Wierzbickiemu
za wsparcie w kryzysowych sytuacjach,
kolegom i koleżankom ze studiów doktoranckich
za dzielenie trudów akademickiej codzienności,
Karolowi Nowakowskiemu
za codzienne wsparcie i motywację.*

*Przede wszystkim jednak chcę podziękować moim rodzicom
za nieustający entuzjazm i wiarę w powodzenie tego przedsięwzięcia.*

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 30.11.2023..... Podpis promotora pracy..... 

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska 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 30.11.2023..... Podpis autora pracy..... 

Streszczenie

Wpływ tlenku grafenu i wybranych białek na funkcjonalno-morfologiczne cechy komórek mięśniowych. Badania modelowe.

Tlenek grafenu jest alotropową formą węgla o strukturze płatków, których grubość wynosi ok. $1,1 \pm 0,2$ nm. Na powierzchni płatków tlenku grafenu obecne są liczne tlenowe grupy funkcyjne (epoksydowa, karbonylowa, karboksylowa, hydroksylowa), które nadają mu hydrofilowy charakter oraz powodują, że materiał ten łatwo ulega funkcjonalizacji różnymi związkami, szczególnie białkami - dając efekt tzw. korony białkowej. W badaniach *in vitro* i *in vivo* udowodniono względną biogodność oraz brak toksyczności tlenku grafenu. Wykazano wpływ tego materiału na wiele procesów komórkowych takich jak adhezja, proliferacja czy różnicowanie. Celem przeprowadzonych badań było wykorzystanie tlenku grafenu i ocena jego właściwości w różnych kontekstach biologicznych - w postaci nanofilmu jako niszy do wzrostu i różnicowania komórek mięśniowych, w postaci bio-kompleksu z ekstraktem białkowym podawanym drogą *in ovo*, a także w postaci aktywnego koloidu zdolnego do wiązania białek prozapalnych. Stosowany bio-kompleks składał się z tlenku grafenu oraz wodnego ekstraktu białkowego z mięśni 18-dniowych zarodków kury domowej. Czynnikiem wywołującym produkcję białek prozapalnych w hodowli komórek mięśniowych *in vitro* było białko kolca wirusa SARS-CoV-2. Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem modelu zarodka kury i hodowli *in vitro* komórek progenitorowych mięśni z zarodka, a także ludzkich nienowotworowych komórek mięśniowych. Uzyskane wyniki wykazały, że tlenek grafenu stanowi odpowiednią, biogodną niszę dla wzrostu i różnicowania komórek progenitorowych mięśni z zarodka kury. Dodatek ekstraktu z mięśni zarodka wspomaga proces różnicowania komórek progenitorowych mięśni w warunkach *in vitro*. Tlenek grafenu podawany metodą *in ovo* jest nietoksyczny, a dodatek ekstraktu białkowego z mięśni w stężeniu 2% pozytywnie wpływa na strukturę mięśni szkieletowych zarodków. Wyniki ostatecznego doświadczenia dowiodły, iż, obecność białka S wirusa SARS-CoV-2 w hodowli komórek mięśniowych wzmacnia produkcję białek prozapalnych biorących udział w burzy cytokinowej, a dodatek tlenku grafenu redukuje ilość białek prozapalnych do poziomu grupy kontrolnej. Zgromadzone wyniki potwierdzają korzystny efekt ekstraktu białkowego na rozwój komórek mięśniowych zarodka, a także dowodzą braku toksyczności tlenku grafenu w stosowanych stężeniach oraz szerokiej możliwości jego zastosowania.

Słowa kluczowe: tlenek grafenu, komórki mięśniowe, różnicowanie, białko kolca wirusa SARS-CoV-2, burza cytokinowa

Summary

Effect of graphene oxide and selected protein on functional and morphological status of muscle cells. Model studies.

Graphene oxide is an allotropic form of carbon with a structure of a flake, which thickness has a range 1.1 ± 0.2 nm. On the surface of graphene oxide flakes are numerous oxygen functional groups (epoxy, carbonyl, carboxyl, hydroxyl), which give it a hydrophilic character and cause GO can be easily functionalized with various compounds, especially proteins - the protein corona effect. In vitro and in vivo studies have proven the relative biocompatibility and lack of toxicity of graphene oxide. Graphene oxide effect on many cellular processes, such as adhesion, proliferation and differentiation, has been demonstrated. The aim of this research was to use graphene oxide and assess its properties in various biological contexts – in the form of nanofilm as a niche for the growth and differentiation of muscle cells, in the form of a bio-complex with protein extract as a carrier of nutritional proteins administered in ovo, and also in the form of an active colloid capable of binding pro-inflammatory proteins. In the bio-complex an aqueous protein extract from the muscles of 18-day-old chicken embryos was used. The factor causing the production of pro-inflammatory proteins in in vitro muscle cell culture was the spike protein of the SARS-CoV-2 virus. The experiments were performed with chicken embryo model and in vitro culture of muscle progenitor cells from the embryo, and human non-cancerous muscle cells. The obtained results showed that graphene oxide is a suitable, biocompatible niche for the growth and differentiation of muscle progenitor cells from the chicken embryo. The addition of chicken embryo muscle extract supports the differentiation process of muscle progenitor cells in vitro. Graphene oxide administered in ovo is non-toxic, and the addition of chicken embryo muscle extract at a concentration of 2% has a positive effect on the structure of the skeletal muscles of the embryos. The results of the latest experiment proved that the presence of the S protein of the SARS-CoV-2 virus in muscle cell cultures increases the production of pro-inflammatory proteins involved in the cytokine storm, and the addition of graphene oxide reduces the amount of pro-inflammatory proteins to the level of the control group. The collected results confirm the beneficial effect of the chicken embryo muscle extract on the development of chicken embryo muscle cells and prove the lack of toxicity of graphene oxide in applied concentration and its wide possibilities of applications.

Key words: graphene oxide, muscle cells, differentiation, spike protein of SARS-CoV-2 virus, cytokine storm

Spis treści	
Streszczenie	7
1. Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską	11
2. Wstęp	13
3. Materiały	18
3.1. Tlenek grafenu	18
3.2. Wodny ekstrakt z mięśni zarodków kury	19
3.3. Hodowle komórkowe <i>in vitro</i>	19
3.4. Zarodki kury	20
3.5. Białko kolca wirusa SARS-CoV-2	20
4. Metody	21
4.1. Charakterystyka GO	21
4.2. Charakterystyka CEME	21
4.3. Hodowle komórkowe <i>in vitro</i>	21
4.4. Eksperymenty <i>in ovo</i>	22
4.5. Metody statystyczne	22
5. Aparatura	23
6. Omówienie głównych wyników prac doświadczalnych	24
6.1. Doświadczenie I	24
6.2. Doświadczenie II	31
6.3. Doświadczenie III	36
7. Wnioski	42
7.1. Doświadczenie I	42
7.2. Doświadczenie II	43
7.3. Doświadczenie III	45
8. Podsumowanie	47
9. Bibliografia	48
10. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	50

1. Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską

1. **Balaban J.**, Wierzbicki M., Zielińska M., Szczepaniak J., Sosnowska M., Daniluk K., Cysewski D., Koczoń P., Chwalibog A., Sawosz E. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. *Molecules*, 2020, 25(8) 1991. <https://doi.org/10.3390/molecules25081991>; IF: 4,412 (140 pkt.)
2. **Balaban J.**, Zielińska M., Wierzbicki M., Ostaszewska T., Fajkowska M., Rzepkowska M., Daniluk K., Sosnowska M., Chwalibog A., Sawosz E., Effect of Muscle Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos. *Animals*, 2021, 11(12), 3467. <https://doi.org/10.3390/ani11123467>; IF: 3,231 (100 pkt.)
3. **Balaban J.**, Wierzbicki M., Zielińska-Górska M., Sosnowska M., Daniluk K., Jaworski S., Koczoń P., Cysewski D., Chwalibog A., Sawosz E., Graphene Oxide Decreases Pro-Inflammatory Proteins Production in Skeletal Muscle Cells Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2023, 16:1-18. <https://doi.org/10.2147/NSA.S391761>; IF: 4,9 (200 pkt.)

Łączna liczba punktów zgodnie z wydanym 17 lipca 2023r. przez Ministra Nauki i Edukacji wykazem czasopism naukowych wynosi 440 pkt.

Łączny Impact Factor czasopism na podstawie Journal Citation Reports wynosi 12,543.

2. Wstęp

Nanomateriały węglowe są obiecującymi materiałami do zastosowań biologiczno-medycznych. W świetle ostatnich badań, tlenek grafenu (GO, ang. Graphene Oxide) wydaje się wysoce biozgodnym materiałem, a jego właściwości fizyko-chemiczne sugerują możliwość zastosowania GO jako mimicznej macierzy zewnątrzkomórkowej, a także jako nośnika w systemie transportu białek. GO, z uwagi na wysoką zdolność adsorpcji białek na powierzchni płatków może być wykorzystany zarówno do „dostarczania białek” do systemów biologicznych jak również „usuwania białek” z ustroju.

Tlenek grafenu to alotropowa forma węgla zbudowana z płatków o grubości $1,1 \pm 0,2$ nm, które mają strukturę grafenu, ale posiadają liczne grupy tlenowe, takie jak grupa epoksydowa (= O), karbonyłowa (C = O), hydroksylowa (- OH) oraz na obrzeżach grupy karboksylowe (-COOH) [1]. Liczne grupy tlenowe nadają GO charakter hydrofilowy, dzięki czemu po dostarczeniu do organizmu ulega łatwo pasywacji przez różne związki chemiczne, zwłaszcza białka, dając efekt tzw. korony białkowej. GO może być stosowany w inżynierii tkankowej jako sztuczna nisza – imitacja natywnej macierzy zewnątrzkomórkowej – szkieletu dla rozwoju mięśni [2]. Obecność grup zawierających tlen na powierzchni płatków tlenku grafenu sprawia, że jest on materiałem stosunkowo nietoksycznym [3]. W badaniach z wykorzystaniem szczurów udokumentowano brak toksyczności dużych dawek GO podawanych do otrzewnej [4,5]. W innych badaniach jakkolwiek wykazano akumulację GO w różnych tkankach, zwłaszcza w płucach, wciąż jednak wskazuje się na względną biokompatybilność GO [6]. Co więcej, właściwości fizyczne GO takie jak chropowatość, topografia powierzchni, grubość, elastyczność i hydrofilowość mogą modulować zachowanie komórek i proces różnicowania poprzez mechaniczną lub chemiczną transdukcję sygnału [8]. Wiele badań wykazało wpływ GO na proliferację, adhezję i różnicowanie różnych typów komórek [9]. GO zwiększa ekspresję genu zaangażowanego w kardiomiogenne różnicowanie ludzkich embrionalnych komórek macierzystych *in vitro* [10]. Zatem GO może być donorem zewnątrzkomórkowych bodźców dla komórek progenitorowych mięśni.

Mięśnie szkieletowe wywodzą się z somitów, które powstają z mezodermy. Somity dają początek dermomiotomowi, miotomowi i sklerotomowi. Komórki o potencjale miogennym nazywane są mioblastami, które w wyniku fuzji tworzą wielojądrowe miotuby i włókna mięśniowe. Proces różnicowania komórek progenitorowych mięśni jest kontrolowany przez grupę miogennych czynników regulatorowych (MRF, ang. Myogenic Regulatory Factors) obejmującą Myf5, MyoD, MyoG i MRF4. MRF tworzą sieć autoregulacyjnych i krzyżowych interakcji, modulujących ekspresję poszczególnych czynników [12]. Z wyjątkiem Myf5, każdy czynnik może indywidualnie aktywować różnicowanie komórek progenitorowych mięśni [13], natomiast Myf5 i MyoD regulują proliferację komórek. MyoD związany jest również z promowaniem procesu miogenezy, podczas gdy MyoG ma kluczowe znaczenie w końcowej fazie dojrzewania mioblastów. Poziom ekspresji genów MRF, oprócz zauważalnych zmian morfologiczno-funkcjonalnych, jest markerem procesu różnicowania komórek mięśniowych.

Ekstrakty z zarodków kury są powszechnie stosowane w hodowlach komórkowych *in vitro*, między innymi jako czynnik stymulujący wzrost, który wzmaga proliferację

komórek miogennych i wpływa na tempo ich różnicowania [14]. Można zatem przypuszczać, że w mięśniach zarodka tuż przed wykluciem, gdy organizm skupia się na przygotowaniu układu mięśniowo-szkieletowego (mięśni nóg) do intensywnej pracy po wykluciu, znajduje się odpowiedni zestaw białek, niezbędnych do aktywacji samoistnych spontanicznych skurczów. W hodowli *in vitro* komórek mięśniowych wykorzystuje się naturalne substancje stymulujące proliferację lub różnicowanie takie jak surowica końska czy ekstrakt z całego zarodka, jednak ekstrakt z mięśni zarodka kury pobranych na końcu embriogenezy nie był wcześniej stosowany w hodowli *in vitro* komórek mięśniowych.

Inżynieria tkankowa stanowi ogromne wyzwanie, ale jednocześnie daje nadzieję na nowe, skuteczniejsze terapie po urazowych uszkodzeniach mięśni, ablacji guzów czy w chorobach mięśni. Medycyna regeneracyjna poszukuje skutecznej techniki regeneracji mięśni. Komórki macierzyste, czynniki wzrostu i sztuczne nisze są uznawane za podstawowe elementy dla inżynierii tkankowej [11], choć interakcja pomiędzy tymi czynnikami nie jest do końca jasna. Zastosowanie kompleksu uzupełniających się czynników wzrostu zamiast kilku ściśle określonych mogłoby zwiększyć efektywność dojrzewania tkanki mięśniowej. W badaniach, przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, wykorzystano komórki prekursorowe mięśni zarodków kury, ekstrakt z mięśni zarodka kury (CEME, ang. Chicken Embryo Muscle Extract), zawierający koktajl czynników wzrostu i nanofilm tlenku grafenu jako potencjalną sztuczną niszę do wzrostu komórek.

Celem podjętych badań w doświadczeniu I było określenie, czy zastosowanie ekstraktu z mięśni 18-dniowego zarodka kury domowej będzie miało wpływ na różnicowanie i dojrzewanie funkcjonalne komórek prekursorowych mięśni w warunkach *in vitro* oraz zdolność potencjalnej pseudo-tkanki do samoistnego kurczenia się. W badaniach *in vitro* wykorzystano dwa rodzaje powierzchni: standardowe płytki polistyrenowe do hodowli komórkowych oraz płytki pokryte nanofilmem GO, jako alternatywną biokompatybilną niszę do wzrostu komórek.

W doświadczeniu I wykazano korzystny wpływ ekstraktu z mięśni zarodka kury, jako biozgodnego stymulatora dojrzewania komórek prekursorowych mięśni, tworzenia pseudo-tkanki mięśniowej i jej samoistnego kurczenia się. Przeprowadzone eksperymenty udokumentowały również, że nanofilm GO był chętnie, a nawet preferencyjnie zasiedlany przez komórki mięśniowe. W konkluzji stwierdzono, że nanofilm GO może stanowić korzystną niszę dla komórek mięśniowych, które po podaniu ekstraktu CEME uzyskują dojrzałość fizjologiczną i są zdolne do samoistnego skurczu.

Wyniki uzyskane w doświadczeniu I stały się inspiracją do podjęcia kolejnych badań. Doświadczenie II miało na celu sprawdzenie możliwości modyfikacji rozwoju i kształtowania struktury mięśnia prądkowanego poprzez „odżywianie” zarodka metodą *in ovo*. Planowany system żywienia *in ovo* miał spełniać dwa warunki: 1. być rozłożony w czasie i minimalizować niekontrolowany rozkład składników pokarmowych, 2. być jak najbardziej kompleksowym źródłem składników pokarmowych. W związku z tym głównym celem było ustalenie czy ekstrakt z mięśni zarodka sprzężony z nośnikiem – GO, nie jest toksyczny i może stymulować tworzenie lepszej struktury mięśniowej zarodków, a w przyszłości rozwój mięśni kurcząt brojlerów. Podjęte badania modelowe mogą znaleźć

zastosowanie w żywieniu kurcząt brojlerów, a także w badaniach nad regeneracją mięśni u zwierząt i ludzi.

Selekcja genetyczna pozwoliła na zwiększenie produkcji mięsa drobiowego, ale jednocześnie nastąpiło znaczne pogorszenie struktury mięśni. Bardzo szybkie tempo wzrostu kurcząt brojlerów może prowadzić do zaburzenia prawidłowej budowy tkanki mięśniowej, zwłaszcza mięśni piersiowych, które stanowią 31% masy ciała. Coraz częstsze stany patologiczne mięśni, przede wszystkim miopatie mięśnia piersiowego, w dużej mierze mogą wynikać z niedoborów niektórych białek strukturalnych i funkcjonalnych. Zwyródnienie mięśni zwykle wiąże się z nagromadzeniem śródmiąższowej tkanki łącznej lub zwłóknieniem [4], co jest następstwem upośledzonej syntezy aminokwasów i białek. Ponadto pula aminokwasów egzogennych jest ograniczona ze względu na rozwój zarodka poza organizmem matki. Z drugiej strony, proliferacja komórek mięśniowych zmniejsza się przed wykluciem, a liczba komórek mięśniowych kształtuje się głównie w okresie embrionalnym. Dlatego suplementacja *in ovo* może mieć decydujący wpływ na kształtowanie się przyszłej prawidłowej struktury mięśniowej.

Badania wykazały, że podanie *in ovo* kompozycji aminokwasów [15] wzmacnia wzrost kurcząt. Tauryna podawana metodą *in ovo* zarodkom kury poprawiała strukturę mięśnia piersiowego poprzez zwiększenie ekspresji białka PCNA [16]. L-Arginina skoniugowana z nanocząstkami srebra aktywuje ekspresję miogeniny i MyoD, co może pozytywnie wpływać na wzrost mięśni [17]. Z uwagi na fakt, że rozwój embrionalny zajmuje ponad 1/3 życia kurcząt brojlerów i jest okresem kluczowym dla rozwoju mięśni, żywienie *in ovo* jest bardzo obiecującą metodą [18]. Wiąże się jednak z szeregiem trudności, do najważniejszych można zaliczyć szybką degradację składników odżywczo-funkcjonalnych dostarczanych. Szybki katabolizm suplementowanych tą metodą białek może mieć negatywne skutki wynikające z gromadzenia się szkodliwych produktów rozpadu. Dlatego optymalizacja suplementacji *in ovo* powinna uwzględniać nie tylko odpowiedni skład i dawkę podawanych związków, ale także ich metabolizm w czasie. Aby przeciwdziałać takim niekorzystnym skutkom, w przeprowadzonych badaniach ekstrakt CEME skoniugowano z GO i podawano *in ovo* w postaci kompleksu GO-CEME. Forma kompleksu zabezpiecza ekstrakt przed szybkim rozkładem i zapewnia powolne uwalnianie białek ekstraktu. Co więcej, GO jest strukturą węglową – pochodną grafitu –, która podana w odpowiednim stężeniu jest nietoksyczna i biokompatybilna [6,19–21].

Ogromna powierzchnia płatków grafenu oraz dostępność grup funkcyjnych sprzyjają tworzeniu korony białkowej na drodze samoorganizacji, szczególnie w obecności dużej liczby białek [22]. Korona białkowa jest strukturą aktywną, a jej skład zmienia się w zależności od warunków fizykochemicznych środowiska biologicznego. Przypuszczano, że CEME można transportować na płatkach GO, zwiększając aktywność koktajlu białkowego przy jednoczesnym ograniczeniu degradacji białek podawanych drogą *in ovo*. Biorąc pod uwagę aktywność CEME zaobserwowaną we wcześniejszych badaniach *in vitro* [3] oraz właściwości transportowe GO, postanowiono stworzyć system „dostarczania składników odżywczych” podobny do stosowanych w medycynie systemów „dostarczania leków”.

Celem podjętych badań w doświadczeniu II było określenie, czy zastosowanie ekstraktu z mięśni 18-dniowego zarodka kury domowej w kompleksie z tlenkiem grafenu

GO, podawanych metodą *in ovo* na początku embriogenezy, będzie miało wpływ na prawidłowe kształtowanie struktury mięśni zarodka kury w 20 dniu rozwoju.

W doświadczeniu 2 potwierdzona została istotna biozgodność GO. Zastosowany kompleks GO-CEME nie wpłynął negatywnie na rozwój i żywotność zarodków. Nie obserwowano zmian w masie zarodków, kluczowych narządów a także w parametrach biochemicznych krwi. Ekstrakt CEME podany *in ovo* w stężeniu 2% miał korzystny wpływ na strukturę mięśni szkieletowych w 20 dniu rozwoju embrionalnego. GO pełniący rolę nośnika w kompleksie z odżywczym CEME nie zmienił jego aktywności.

Uzyskane wyniki zainspirowały podjęcie kolejnego cyklu doświadczeń, w których postanowiono wyjaśnić czy GO podany do medium hodowlanego komórek mięśniowych wpłynie na zmianę koncentracji wybranych białek w systemie. Systemem modelowym były prawidłowe ludzkie komórki mięśniowe hodowane w warunkach *in vitro* poddane działaniu stresu w postaci białka kolca wirusa SARS-CoV-2 (białko S, ang. Spike Protein). Ponadto, motywacją do badań było wyjaśnienie roli tkanki mięśniowej jako bardzo dużej puli komórek wydzielniczych w przebiegu i skutkach choroby COVID-19, szczególnie w indukcji burzy cytokinowej, oraz poszukiwanie skutecznego zmiatacza tych prozapalnych białek.

Globalny problem wywołany pandemią choroby koronawirusowej (COVID-19) był związany nie tylko z nieprzewidywalnym i trudnym do leczenia przebiegiem choroby, ale także z jej nieznanymi konsekwencjami. Jednym z charakterystycznych objawów COVID-19 jest burza cytokinowa (CS, ang. Cytokine Storm). CS objawia się nadmiernym wydzielaniem cytokin prozapalnych, które inicjują wiele szlaków biorących udział w rozprzestrzenianiu się stanu zapalnego prowadzącego do gorączki, upośledzenia przepuszczalności naczyń włosowatych, ostrej niewydolności oddechowej, niewydolności wielonarządowej, a w ciężkich przypadkach nawet do śmierci [23]. Za kluczowe chemokiny i cytokiny CS uważa się motyw chemokin C-X-C 10 (CXCL10), interferon gamma (IFN- γ), interleukinę 1 beta (IL-1 β), interleukiny: IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- α), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF); czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) i białko chemotaktyczne monocytów-1 (MCP-1) [23,24]. Obecnie COVID-19 określa się jako dysfunkcję wielonarządową sprzyjającą ogólnoustrojowemu zapaleniu [25].

Dysfunkcję mięśni szkieletowych obserwuje w trakcie jak i po chorobie COVID-19 i może ona być spowodowana CS indukowaną w innych tkankach [26]. Przeanalizowano ekspresję genów transbłonowej proteazy serynowej - TMPRSS2 i enzymu konwertującego angiotensynę II - ACE2 - czynników kluczowych w procesie wnikania wirusa do komórek gospodarza, w ludzkiej tkance mięśniowej i potwierdzono, że komórki śródbłonna, komórki mięśni gładkich, perycyty, komórki macierzyste mięśni (komórki satelitarne), makrofagi, komórki odpornościowe i włókna mięśniowe wykazują ekspresję TMPRSS2 i ACE2, a zatem zakażenie wirusem SARS-CoV-2 może mieć miejsce także w tkance mięśniowej [27].

Tkanka mięśniowa stanowi znaczną masę organizmu człowieka, średnio około 40% całkowitej masy ciała dorosłego człowieka, co oznacza, że jest ona ogromną pulą różnych białek, w tym również funkcjonalnych. Uważa się, że tkanka ta zawiera 50–70%

wszystkich białek organizmu [28]. Choć komórki mięśniowe nie stanowią najważniejszych komórek w zakresie indukcji cytokin, to jednak nawet ich minimalna produkcja, biorąc pod uwagę wielkość masy mięśniowej, może zapewnić potężną podaż prozapalnych białek. Zatem, paradoksalnie, młodzi i wysportowani mężczyźni mogą być znacznie bardziej wrażliwi na CS. Z drugiej strony ból i osłabienie mięśni obserwowane w trakcie i po chorobie COVID-19 oraz wynikający z tego brak aktywności fizycznej, a także ograniczenie aktywności związane z kwarantanną również są czynnikami sprzyjającymi CS. Dlatego konieczne jest znalezienie sposobu na ograniczenie zjawiska burzy cytokinowej. Wydaje się, że GO, supercienki materiał węglowy, podawany w niewielkiej ilości, może bez wywoływania toksyczności wiązać na swojej powierzchni białka związane z CS obecne w organizmie. Zastosowanie takiej terapii przeciwwzapalnej mogłoby w znaczący sposób ograniczyć niebezpieczne, dalsze skutki choroby COVID-19.

Celem doświadczenia III było wyjaśnienie kilku ważnych mechanizmów choroby COVID-19, zachodzących w komórkach mięśniowych i wstępna próba zastosowania GO jako leczenia wspomagającego. Przede wszystkim celem była chęć potwierdzenia kontrowersyjnej obecności receptora ACE2 na powierzchni ludzkich komórek mięśni szkieletowych, a także określenie skutków, jakie mogą wynikać z obecności fragmentu wirusa SARS-CoV-2 – białka kolca wirusa (białko S), bez zakażenia komórek wirusem. Co więcej, zakładając, że białko S indukuje CS w komórkach mięśniowych, ważne wydaje się zidentyfikowanie, które cytokiny i inne białka funkcjonalne zostaną aktywowane.

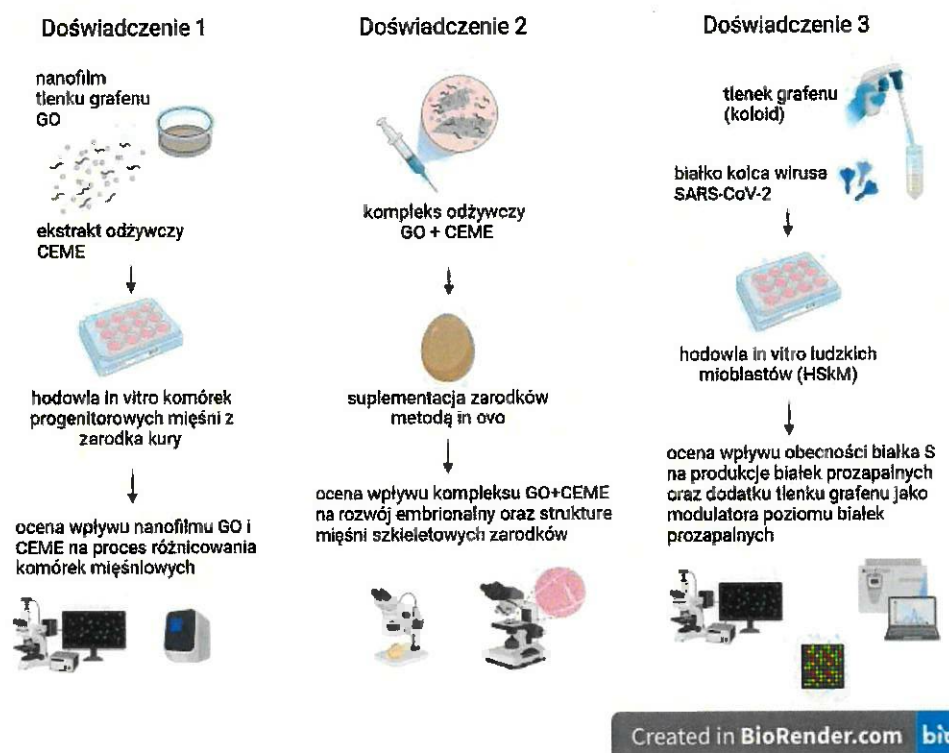
Przeprowadzone w doświadczeniu III eksperymenty potwierdziły obecność receptora ACE2 w komórkach mięśniowych. Ponadto, stwierdzono, że obecność białka kolca wirusa SARS-CoV-2 inicjuje w komórkach mięśniowych produkcję białek prozapalnych, charakterystycznych dla burzy cytokinowej i stresu oksydacyjnego. W Doświadczeniu III po raz pierwszy podjęto próbę zminimalizowania CS za pomocą GO. Badanie to było pierwszym na świecie eksperymentem dotyczącym potencjalnej możliwości wychwytywania białek CS przez GO w środowisku komórek mięśniowych.

3. Materiały

3.1. Tlenek grafenu

W badaniach wykorzystano wodny roztwór tlenku grafenu, pozyskany kolejno z NanoPoz (Poznań, Polska), US Research Nanomaterials, Inc (Houston, USA) oraz z Advanced Graphene Products (Zielona Góra, Polska). Tlenek grafenu wyprodukowano zmodyfikowaną metodą Hummersona, gdzie materiałem źródłowym był grafit. Wyjściowe stężenie zawiesiny GO z NanoPoz oraz Advanced Graphene Products wynosiło 4 mg/ml, a tlenku grafenu z US Research Nanomaterials Inc 2% w/o. Średnia wielkość płatków tlenku grafenu wynosiła powyżej $\sim 2 \mu\text{m}$, liczba warstw płatków sięgała od 1 do 3. Wszystkie zawiesiny rozcieńczano ultraczystą wodą Mili-Q w celu uzyskania pożądanego do dalszych badań koloidu. Przed użyciem roztwory robocze były sonifikowane w łaźni ultradźwiękowej, celem eliminacji agregatów nanocząstek. W czasie trwania doświadczeń nie zaobserwowano wizualnych zmian używanych roztworów.

W doświadczeniu I tlenek grafenu był stosowany w postaci nanofilmu. W doświadczeniu II i III wykorzystano tlenek grafenu w formie zawiesiny – jako kompleks z ekstraktem białkowym (doświadczenie II) oraz w medium hodowlanym (doświadczenie III) (Ryc. 1). Nanofilm z płatków tlenku grafenu przygotowywano na dnie płytek wielodołkowych przeznaczonych do hodowli komórkowych. W warunkach sterylnych roztwór tlenku grafenu o stężeniu 1mg/ml nanoszono na dno naczyń hodowlanych, następnie w temperaturze pokojowej powierzchnię suszono w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Po zakończeniu opisanej procedury otrzymywano jednorodny, silnie przylegający do polistyrenowych naczyń hodowlanych nanofilm tlenku grafenu.



Rycina 1. Schemat wszystkich doświadczeń wchodzących w skład pracy z uwzględnieniem wykorzystanych materiałów i modeli badawczych.

3.2. Wodny ekstrakt z mięśni zarodków kury

W doświadczeniu I i II wykorzystano wodny ekstrakt z mięśni 18-dniowych zarodków kury. Jaja wylęgowe kurcząt brojlerów linii Ross 308 inkubowano w standardowych warunkach - temperatura 37°C, wilgotność ~60%, jaja były automatycznie obracane co godzinę. W 18 dniu rozwoju zarodkowego jaja wyjęto z inkubatora, delikatnie usunięto skorupę, a zarodki poddano dekapitacji. Pobrano mięśnie szkieletowe z kończyn dolnych. Próbki mięśni zostały zawieszono w ultraczystej wodzie Mili-Q i homogenizowano w młynie kulowym. Otrzymany homogenat wirowano z prędkością 1400 x g przez 45 minut w temperaturze 4°C. Supernatant był przechowywany w temperaturze -80°C.

CEME w doświadczeniu I wykorzystano jako dodatek do medium hodowlanego (podawany w stężeniu 1%). W doświadczeniu II ekstrakt z mięśni zarodków, jako mieszanina białek funkcjonalnych wraz z GO, tworzył kompleks odżywczy, który podawany był zarodkom metodą *in ovo*.

3.3. Hodowle komórkowe *in vitro*

W doświadczeniach I i II wykorzystano progenitorowe komórki mięśni pozyskane z 8- i 9 -dniowych zarodków kury domowej linii Ross 308. Upřednio odkażone nadmanganianem potasu oraz wysterylizowane promieniami UV jaja inkubowano w standardowych warunkach. Po wyjęciu jaj z inkubatora delikatnie usuwano część skorupy, aby umożliwić dostęp do zarodka. Pobierano kończynę dolną. Uzyskaną próbkę umieszczano w roztworze trypsyny (Life Technologies, USA) na 24 h w temperaturze ~4°C w celu dezintegracji tkanki. Enzym neutralizowano dodatkiem medium hodowlanego, a zawiesinę komórek do hodowli przygotowywano poprzez delikatne pipetowanie. Progenitorowe komórki mięśni pobrane z zarodka kury hodowano *in vitro* w medium hodowlanym DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Life Technologies, USA) z 10% dodatkiem surowicy bydlęcej płodowej (Life Technologies, USA) oraz 1% dodatkiem penicyliny i streptomycyny (Life Technologies, USA).

W doświadczeniu III wykorzystano komercyjnie dostępne ludzkie prawidłowe mioblasty HSkM (ang. Human Skeletal Myoblast, Gibco, Invitrogen, USA) - adherentne komórki pierwotne, pozyskane od dorosłych, zdrowych dawców. Komórki HSkM hodowane były w warunkach standardowych, zgodnie z zaleceniami producenta (A12555, Gibco, Invitrogen, USA).

3.4. Zarodki kury

Doświadczenie II obejmowało eksperymenty *in ovo* prowadzone na zarodkach kury domowej linii Ross 308. Jaja inkubowano w standardowych warunkach – 37°C, wilgotność ~60%, jaja automatycznie obracane były raz na godzinę. Przed rozpoczęciem doświadczenia jaja były myte w roztworze KMnO₄ oraz sterylizowane przy użyciu promieni UV. Jaja losowo podzielono na grupy doświadczalne, pierwszego dnia inkubacji

drogą iniekcji podano do białka po 200 μ l roztworów badanych. Otwory po iniekcji zabezpieczono sterylną taśmą.

3.5. Białko kolca wirusa SARS-CoV-2

W doświadczeniu III wykorzystano pełnej długości, złożone z trzech podjednostek białko S kolca wirusa SARS-CoV-2 (PX-COV-P049, ProteoGenix, Francja), które dodawano w stężeniu 5 μ g/ml do medium hodowlanego komórek HSkM.

4. Metody

4.1. Charakterystyka GO

Tlenek grafenu w doświadczeniu I był stosowany w postaci nanofilmu, w doświadczeniu II i III w formie roztworu – jako kompleks z ekstraktem białkowym oraz jako zawiesina w medium hodowlanym. Tożsamość materiału potwierdzono przy użyciu spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR, ang. Fourier Transform Infrared Spectroscopy). Potwierdzono obecność charakterystycznych wiązań między atomami węgla, tlenu i wodoru i zidentyfikowano grupy funkcyjne na powierzchni GO. Stabilność dyspersji koloidu oceniano poprzez pomiar potencjału Zeta. Wielkość i kształt płatków grafenu wizualizowano przy pomocy elektronowej mikroskopii transmisyjnej (TEM, ang. Transmission Electron Microscopy). Powierzchnię nanofilmu jak i standardowej polistyrenowej płytki hodowlanej scharakteryzowano przy użyciu mikroskopii sił atomowych (AFM, ang. Atomic Force Microscopy), oceniano chropowatość a także ogólną topografię obu powierzchni.

4.2. Charakterystyka CEME

Profil białkowy wodnego ekstraktu z mięśni 18-dniowych zarodków kury metodą spektrometrii mas został przygotowany w Laboratorium Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Otrzymane wyniki były analizowane z użyciem platformy Max-Quant 1.6.3.4., jako referencji używano proteomu kury domowej *Gallus gallus* z bazy UniProt. Analizę interakcji między białkami wykonano w programie inBio Discover.

4.3. Hodowle komórkowe *in vitro*

Komórki hodowano w inkubatorze do hodowli *in vitro* – w temperaturze 37°C, przy wilgotności 95% i, zawartość CO₂ 5%. We wszystkich doświadczeniach używano jednorazowych naczyń hodowlanych - butelek, płytek wielodołkowych, insertów na szkiełkach podstawowych. W hodowli stosowano medium DMEM (Life Technologies, USA) z 10% dodatkiem surowicy bydlęcej płodowej (Life Technologies, USA) oraz 1% penicyliny i streptomycyny (Life Technologies, USA). Morfologię komórek obserwowano przy użyciu mikroskopii świetlnej oraz mikroskopii elektronowej skaningowej. Wykorzystano barwienie immunofluorescencyjne by przy użyciu mikroskopu konfokalnego zlokalizować jądra komórkowe (DAPI, Thermo Fisher Scientific, USA), aktyne (falloidyna, Sigma-Aldrich, USA) oraz receptor ACE2 (SAB3500978, Sigma-Aldrich, USA). Żywotność komórek oceniano testami kolorymetrycznymi Vybrant Cell Proliferation Assay Kit (MTT) (Thermo Fisher Scientific, USA), LDH - Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH, Niemcy), a także błękitem trypanu. Do oceny proliferacji komórek wykorzystano test Cell Proliferation ELISA BrdU kit (Roche Applied Science, USA). Profil białek w komórkach HSkM analizowano przy użyciu spektrometrii mas, a wyniki prezentowane były w postaci HeatMap przygotowanych przy użyciu

GraphPad Prism wersja 8.1.2. Poziom białek prozapalnych badano metodą immunochemiluminescencyjną na membranach zestawem Human Inflammation Antibody Array Membrane (Abcam, Wielka Brytania), uzyskane wyniki były analizowane z użyciem programu ImageJ (National Institutes of Health, USA). Ekspresję genów związanych z procesem miogenezy, a także metabolizmem energetycznym komórek analizowano metodą Real-Time PCR.

4.4. Eksperymenty *in ovo*

Doświadczenie II obejmowało eksperymenty *in ovo* prowadzone na zarodkach kury domowej linii Ross 308. W pierwszym dniu inkubacji do zarodków podawano drogą iniekcji *in ovo* roztwory badane, następnie w 20 dniu rozwoju zarodkowego jaja wazono, usunięto skorupę, zarodki uśmiercono poprzez dekapitację. Dokonano oceny morfometrycznej zarodków, pobrano w całości wątroby i serca, oraz mięśnie szkieletowe kończyn dolnych, a także próbki krwi obwodowej. Próbki krwi analizowane były w komercyjnym laboratorium diagnostycznym (VetLab, Warszawa) pod kątem zawartości: albumin, transaminazy alaninowej (ALT), fosfatazy alkalicznej (ALP), transaminazy asparaginianowej (AST), białka ogólnego, kreatyniny, mocznika, globulin, dehydrogenazy mleczanowej (LDH), glukozy i trójglicerydów.

Zgromadzone próbki mięśni utrwalono w roztworze formaliny, zatopiono w bloczki parafinowe, a następnie przygotowano preparaty mikroskopowe. Preparaty barwiono przy użyciu Periodic Acid–Schiff (PAS) Staining System (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Obecność jądrowego antygeny komórek proliferujących (PCNA) oznaczono metodą immunohistochemiczną. Zdjęcia przekrojów poprzecznych mięśni analizowano pod kątem liczby jąder komórkowych oraz komórek proliferujących. Obrazy analizowano przy użyciu programu ImageJ - Cell Counter (National Institutes of Health, USA).

W próbkach wątroby oznaczono poziom aktywności dysmutazy ponadtlenkowej zestawem Superoxide dismutase (SOD) Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

W ramach oceny hemotoksyczności wykonano test hemolizy krwinek czerwonych pochodzących z krwi kury poddanych ekspozycji na roztwory badane.

4.5. Metody statystyczne

Uzyskane w trakcie badań wyniki były analizowane przy pomocy programu StatGraphics Centurion version XVI - jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA).

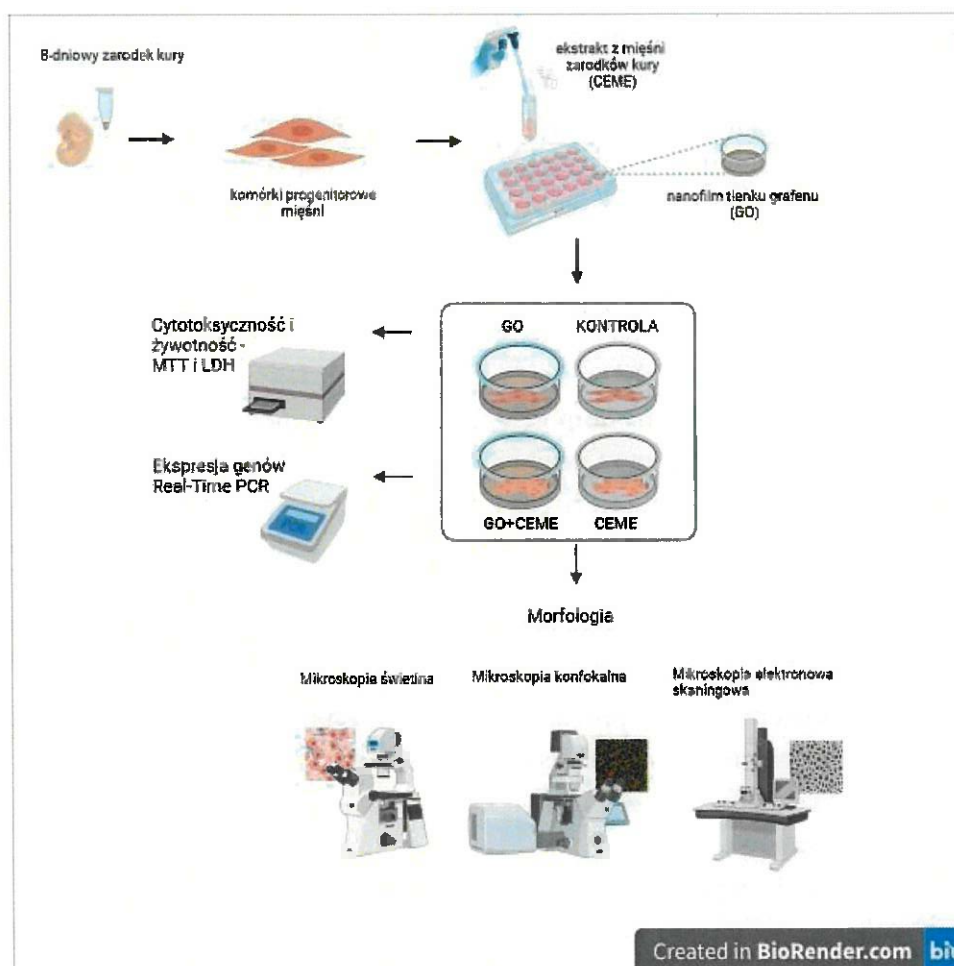
5. Aparatura

- Charakterystyka tlenku grafenu metodą FTIR (Perkin Elmer System 2000).
- Wizualizacja morfologii płatków tlenku grafenu przy użyciu elektronowego mikroskopu transmisyjnego JEM-1220 (JEOL, Japonia).
- Analiza potencjału Zeta roztworu tlenku grafenu aparatem ZetaSizer Nano ZS model ZEN3500 (Malvern Instruments, Wielka Brytania).
- Analiza topografii powierzchni i chropowatości nanofilmu tlenku grafenu za pomocą mikroskopu sił atomowych MFP 3D BioAFM (MPLCT, Bruker, USA).
- Homogenizacja tkanki mięśniowej podczas przygotowania ekstraktu CEME oraz próbek wątroby zarodków młynem kulowym TissueLyser ball mill (Qiagen, USA).
- Analiza proteomiczna ekstraktu z mięśni zarodków oraz komórek z hodowli *in vitro* spektrometrem mas Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, USA) połączonym z Water Acquity HPLC.
- Prowadzenie hodowli komórkowych *in vitro* przy użyciu inkubatora Memmert ICO150med (Mettler, Niemcy).
- Liczenie komórek oraz ocena żywotności komórek w trakcie hodowli *in vitro* przy użyciu licznika automatycznego EVE (NanoEnTek, USA).
- Wizualizacja przyżyciowa morfologii komórek przy pomocy mikroskopu świetlnego TL-LED (Leica Microsystems, Niemcy).
- Obserwacja barwionych immunofluorescencyjnie wybranych elementów komórkowych i wybranych białek przy pomocy mikroskopu konfokalnego FV1000 IX81 (Olympus, Japonia).
- Wizualizacja morfologii komórek mięśniowych przy pomocy elektronowego mikroskopu skaningowego Quanta 200 (FEI, USA).
- Ocena parametrów metabolicznych komórek za pomocą testów kolorymetrycznych z wykorzystaniem czytnika płytkowego Tekan Infinite 200 microplate reader (Tecan, USA).
- Analiza ekspresji genów metodą Real-Time PCR aparatem StepOnePlus™ Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, USA).
- Detekcja poziomu białek prozapalnych metodą immunochemiluminescencyjną na membranie aparatem Azure Biosystem C400 (Azure, USA).
- Obserwacja morfologii zarodków kury mikroskopem stereoskopowym SZX10 (Olympus, Japonia).
- Obserwacja i wykonanie zdjęć preparatów histologicznych przy pomocy mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse Ni light z kamerą Nikon DS-Fi3 (Nikon Corporation, Japonia).

6. Omówienie głównych wyników prac doświadczalnych

6.1. Doświadczenie I

Celem doświadczenia I było określenie wpływu dodatku ekstraktu z mięśni zarodków oraz zastosowania nanofilmu tlenku grafenu na proces różnicowania progenitorowych komórek mięśniowych z zarodka kury hodowanych w warunkach *in vitro*. Tlenek grafenu zastosowano jako modyfikację powierzchni wzrostu komórek w postaci nanofilmu, pełniącego funkcję biozgodnej niszy do wzrostu i różnicowania komórek progenitorowych mięśni oraz tworzenia pseudo-tkanki mięśniowej; Dodatek wodnego ekstraktu z mięśni 18-dniowych zarodków kury do medium hodowlanego służył jako kompleksowa mieszanina białek stymulujących komórki mięśniowe do różnicowania, dojrzewania tkanki mięśniowej i wywołania skurczu w warunkach *in vitro* (Ryc. 2).



Rycina 2. Schemat doświadczenia I.

Tlenek grafenu po wysuszeniu tworzył nanofilm o grubości 1-3 płatków tlenku grafenu, wielkości 2-4 μm . Analiza z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych wykazała zmniejszenie średniej chropowatości płytki pokrytej nanofilmem tlenku grafenu do 1,5 - 2,1 nm, gdzie chropowatość samej polistyrenowej płytki hodowlanej wynosiła 7,2 nm. Modyfikacja powierzchni płytki hodowlanej spowodowała, że materiał stał się bardziej

pofałdowany, jednak powstałe struktury były bardziej zaokrąglone i mniej ostro zakończone, niż w przypadku standardowej płytki polistyrenowej.

Analiza proteomiczna ekstraktu z mięśni zarodka kury wskazała obecność 1470 białek, z czego 249 było charakterystycznych dla tkanki mięśniowej. Z tej grupy wytypowano 59 potencjalnych białek związanych ze skurczem będących głównymi stymulatorami różnicowania i dojrzewania komórek mięśniowych *in vitro*. W grupie wybranych 59 wyróżniono 14 będących elementami macierzy zewnątrzkomórkowej, 20 powiązanych ze strukturą i komunikacją między komórkami, 11 związanych z aparatem kurczliwym komórek mięśniowych, 6 związanych z komunikacją nerwową i nerwowo-mięśniową i 9 zaangażowanych w metabolizm (Tab. 1).

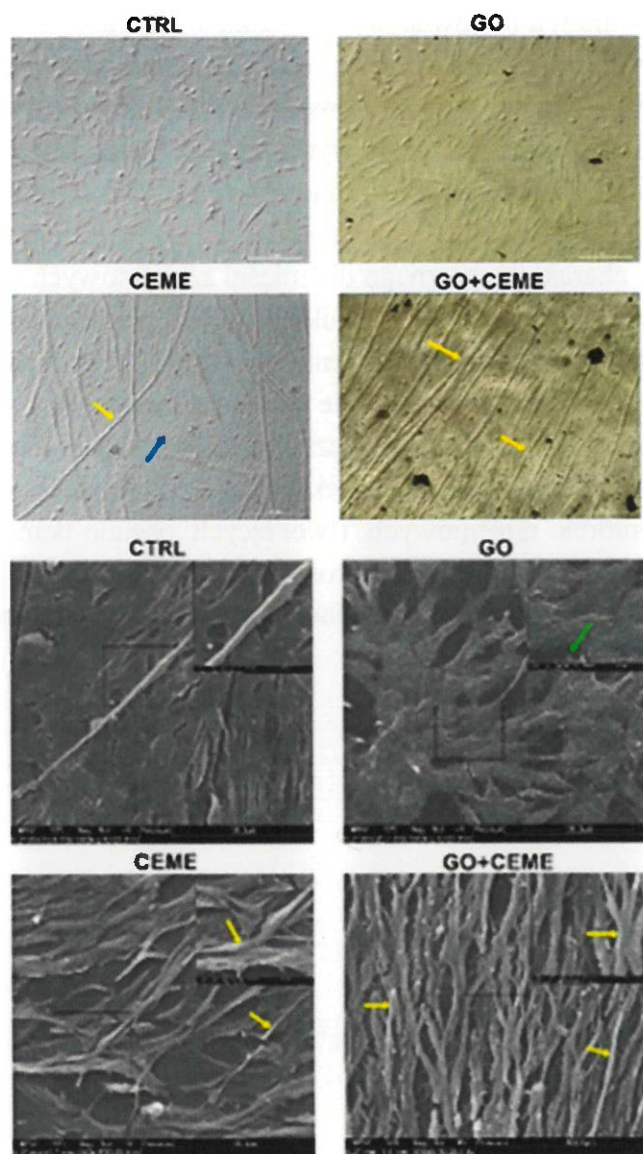
Tabela 1. Wybrane białka ekstraktu z mięśni zarodków kury najistotniejsze w kontekście aktywności komórek mięśniowych

Gene name	Protein name	Molecular weight [kDa]
Extracellular matrix component		
DCN	Decorin	61.2
LAMB1	Laminin subunit beta-1	59.4
COL6A2	Collagen alpha-2 (VI) chain	58.7
A0A1D5PME9	Leucine rich repeat containing 15	50.3
FMOD	Fibromodulin	44.7
OGN	Mimecan/Osteoglycin	42.8
A0A1D5PVT6	Collagen type XI alpha 1 chain	36.4
LMNB1	Lamin-B1	31.6
PLOD1	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	22.0
COL1A1	Collagen alpha-1 (I) chain	16.1
COL6A3	Collagen alpha-3 (VI) chain	14.6
LOC107050758	Collagen alpha-1 (II) chain	13.1
COL14A1	Collagen alpha-1 (XIV) chain	11.2
LABM1	Laminin subunit beta-1	10.4
Cell structure and communication		
PXN	Paxillin	66.6
P09652	Tubulin beta-4 chain	61.7
PTK7	Inactive tyrosine-protein	53.7
MAPT	Microtubule-associated protein	51.3
CRYAB	Alpha-crystallin B chain	50.3
MAPRE2	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	41.7
CDH13	Cadherin-13	40.4
COTL1	ADF actin binding protein	36.9
DMD	Dystrophin	24.1
ZYX	Zyxin	20.5
WIPF1	WAS/WASL interacting protein family member 1	18.8
CTNNA2	Catenin alpha-2	18.4

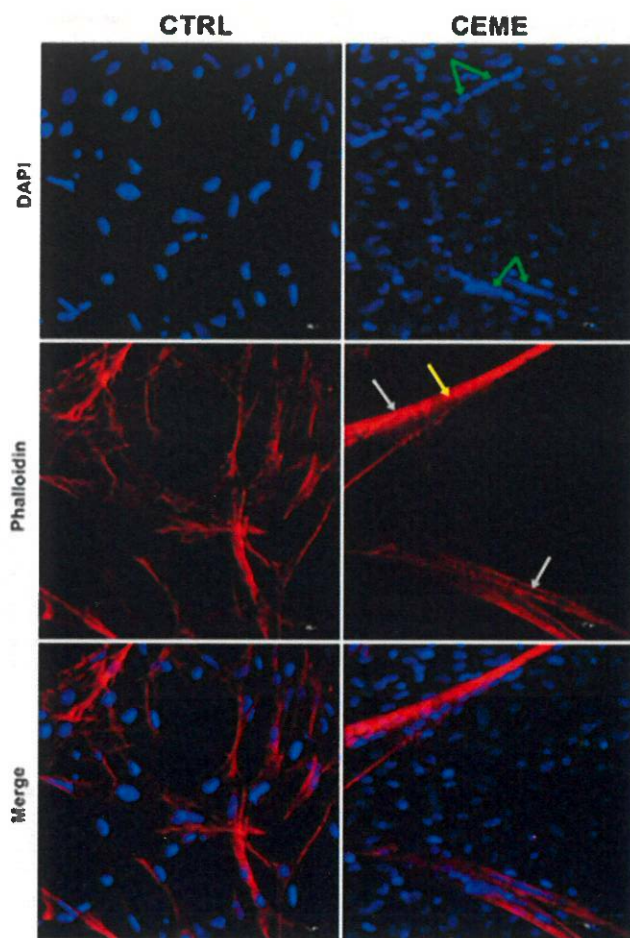
	Tubulin alpha chain	13.0
NHLRC2	NHL repeat-containing protein 2	12.4
CAP2	Adenylyl cyclase-associated protein	11.7
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	11.7
SPTB	Spectrin beta chain	10.4
JUP	Plakoglobin	9.92
DBN1	Drebrin	9.37
ACTN2	Alpha-actinin-2	8.02
Contractile apparatus		
MYL3	Myosin light chain	62.2
CALD1	Caldesmon	61.4
CAMK2D	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta chain	55.3
CNN3	Calponin	51.3
MYLK	Myosin light chain kinase, smooth muscle	40.5
MYLPP	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	37.0
TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	20.7
CASQ2	Calsequestrin	19.5
TNNC2	Troponin C, skeletal muscle	19.3
MYH1B	Myosin-1B	11.4
Neural and neuromuscular communication		
NEFM	Neurofilament medium polypeptide	46.2
AGRN	Agrin	46.1
TXLNB	Beta-taxilin	31.8
FABP5	Fatty acid binding protein 5	23.4
GAP43	Neuromodulin	18.8
NCAM1	Neural cell adhesion molecule	15.1
Metabolism		
ATP5C1	ATP synthase subunit gamma	53.3
GMPR	GMP reductase	49.9
GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	45.5
PFKM	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	43.8
ADSSL1	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	43.6
CKM	Creatine kinase M-type	43.3
AMPD1	AMP deaminase	25.2
A0A1D5PIQ5	Mitogen-activated protein kinase	11.4
CKB	Creatine kinase B-type	5.62

Hodowle komórkowe podzielono na grupy doświadczalne: (1) kontrola (CTRL), (2) komórki hodowane na nanofilmie tlenku grafenu (GO), komórki hodowane z dodatkiem 1% CEME (CEME), (4) komórki hodowane na nanofilmie GO z dodatkiem 1% CEME do medium (GO+CEME).

Morfologia komórek hodowanych z dodatkiem ekstraktu z mięśni zarodków kury w medium wskazywała na zróżnicowanie komórek progenitorowych mięśni. Widoczne były wydłużone, rozgałęzione, wielojądrowe miotuby. Długość miotub niejednokrotnie przekraczała 1000 μm , średnia szerokość wynosiła 10-20 μm . Miotuby osadzone były na kilku warstwach niezróżnicowanych komórek (Ryc. 3). Obrazowanie z użyciem mikroskopii konfokalnej potwierdziło obecność wielojądrowych komórek mięśniowych, a także występowanie charakterystycznego dla mięśni szkieletowych prążkowania (Ryc. 4). Komórki hodowane w obecności obu czynników, nanofilmu i ekstraktu z mięśnia zarodka kury, wykazywały lepszą organizację ułożenia miotub, niż w przypadku dodatku samego ekstraktu. Komórki hodowane na nanofilmie tlenku grafenu wykazywały silną adhezję do podłoża, były bardziej wypłaszczone z licznymi filopodiami, w porównaniu do grupy kontrolnej. W obu grupach z dodatkiem ekstraktu obserwowano spontaniczne skurcze wielojądrowych komórek mięśniowych (tworzących pseudo-tkanę), co sugeruje, że dodatek ekstraktu jako koktajlu białek wzrostowych jest odpowiedzialny za wystąpienie fizjologicznej aktywności komórek mięśniowych w większym stopniu, niż właściwości powierzchni wzrostu.



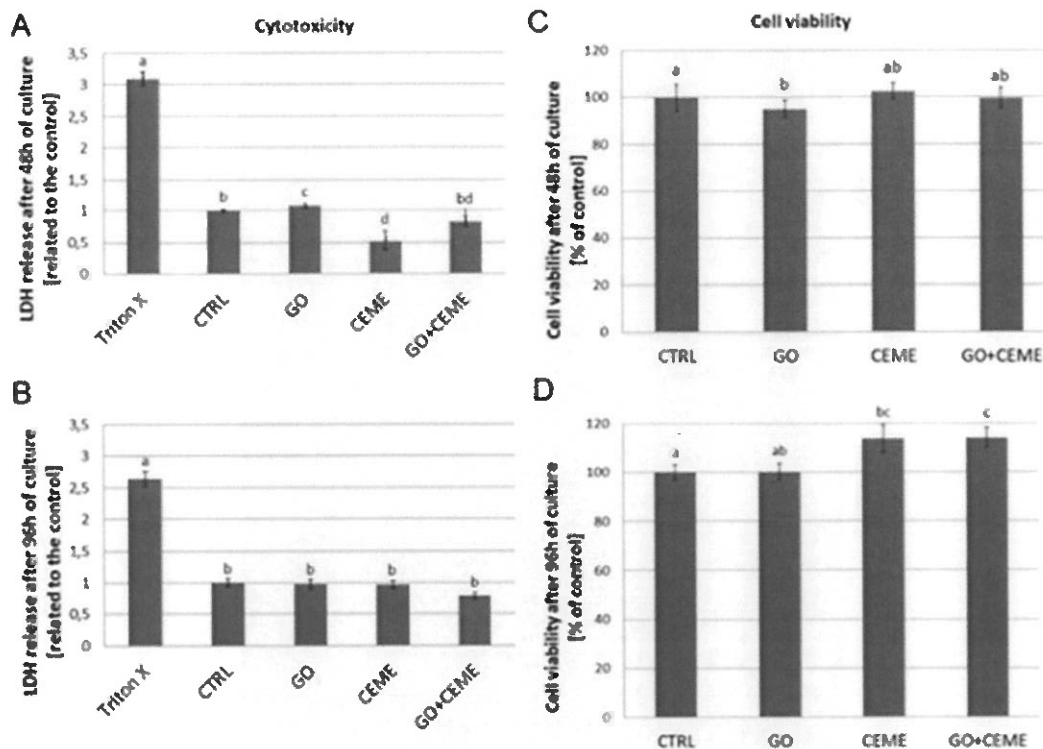
Rycina 3. Morfologia komórek wizualizowana przy pomocy mikroskopii świetlnej (górny panel) i elektronowej mikroskopii skaningowej (dolny panel); zdjęcia przedstawiają grupę kontrolną (CTRL), komórki hodowane na nanofilmie GO (GO), komórki hodowane z dodatkiem ekstraktu (CEME), komórki hodowane na nanofilmie GO z dodatkiem ekstraktu (GO+CEME); żółta strzałka - miotuby, zielona strzałka - filopodia; niebieska strzałka - wielowarstwa nieodróżnicowanych komórek.



Rycina 4. Zdjęcia komórek mięśniowych z mikroskopu konfokalnego z wyznakowanymi fluorescencyjnie jądrami (niebiski) i aktyną (czerwony); grupa kontrolna (CTRL), komórki hodowane z dodatkiem ekstraktu (CEME); zielona strzałka - jądra w miotubach; szara strzałka - miotuby, żółta strzałka - prążkowanie komórki mięśniowej.

Analiza żywotności komórek oceniona na podstawie zdolności dehydrogenazy mitochondrialnej do redukcji soli tetrazolowej do nierozpuszczalnego formazanu testem MTT wykazała, iż po 48 h hodowli obecność nanofilmu tlenku grafenu ma nieznacznie negatywny wpływ na żywotność komórek względem kontroli, jednak efekt ten nie był obserwowany po 96 h hodowli (Ryc. 5).

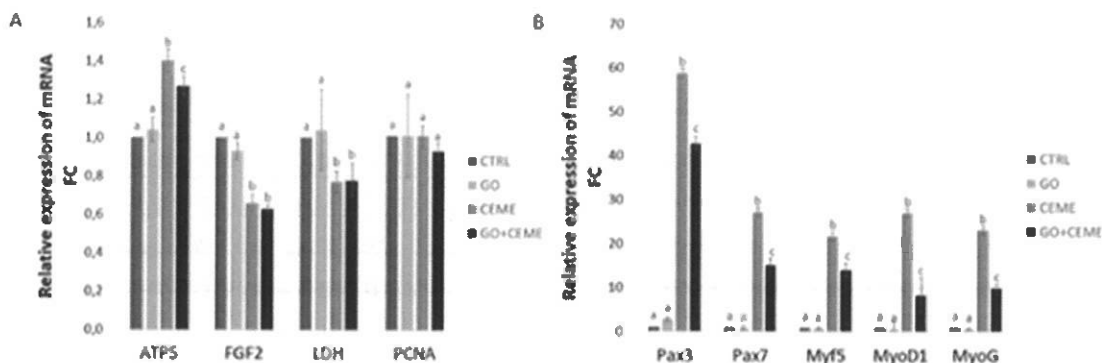
Integralność błon komórkowych analizowano przy pomocy testu LDH, sprawdzającego ilość i aktywność uwolnionej dehydrogenazy mleczanowej (LDH, ang. Lactate Dehydrogenase), na podstawie której oceniono cytotoksyczność nanofilmu oraz dodatku ekstraktu, wykazała podwyższony poziom LDH w grupie z nanofilmem po 48 h hodowli. Po 96 h hodowli nie stwierdzono podwyższonego poziomu LDH w żadnej z grup badanych (Ryc. 5). Potwierdza to, że tlenek grafenu jest nietoksyczny dla komórek mięśniowych i stanowi biogodną niszę do ich wzrostu.



Rycina 5. (A, B) Poziom dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i (C,D) żywotności komórek oceniane testem LDH i MTT po 48 h i 96 h hodowli *in vitro* komórek mięśniowych; kontrola negatywna maksymalnego uwolnienia LDH (Triton X), grupa kontrolna (CTRL), komórki hodowane na nanofilmie GO (GO), komórki hodowane z dodatkiem ekstraktu (CEME), komórki hodowane na nanofilmie GO z dodatkiem ekstraktu (GO+CEME); słupki błędów reprezentują odchylenie standardowe; litery nad kolumnami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy grupami ($p \leq 0.05$).

Zmiany ekspresji genów na poziomie mRNA badano metodą real-time PCR. W porównaniu z grupą kontrolną nanofilm GO nie miał istotnego wpływu na ekspresję genów związanych w podstawowym metabolizmem komórki - ATP5B, FGF2, LDH5 i PCNA, jak i procesem różnicowania i dojrzewania komórek mięśniowych - Myf5, MyoD1, MyoG, Pax3 i Pax7. Dodatek ekstraktu skutkowało istotnie zwiększonym poziomem ekspresji genu ATP5B, natomiast ekspresja genów FGF2 i LDH5 była obniżona w porównaniu z kontrolą. Obecność nanofilmu GO w połączeniu z ekstraktem miała wpływ na zwiększenie ekspresji genu ATP5B. Ekspresja genów FGF2 i LDH5 była obniżona w porównaniu z kontrolą, co jest zbliżone do wyników uzyskanych z dodatkiem samego ekstraktu (Ryc. 6). Wyniki te są zgodne ze zmianami w metabolizmie komórek mięśniowych podczas różnicowania, kiedy intensywna glikoliza w mioblastach ustępuje na rzecz fosforylacji oksydacyjnej, zachodzącej w dojrzałych komórkach mięśniowych.

Dodatek ekstraktu do medium znacząco podniósł poziom mRNA genów Myf5, MyoD1, MyoG, Pax3 i Pax7. Profil ekspresji genów w komórkach hodowanych na nanofilmie z dodatkiem ekstraktu był również istotnie podwyższony we wszystkich badanych genach związanych z miogenezą, jednak krotność zmiany była niższa niż w grupie z samym ekstraktem (Ryc. 6).



Rycina 6. Analiza ekspresji genów na poziomie mRNA metodą real-time PCR w komórkach progenitorowych mięśni z zarodka kury po 5 dniach hodowli *in vitro*; ekspresja genów związanych z proliferacją i podstawowy metabolizm (A) oraz procesem różnicowania komórek mięśniowych (B); grupa kontrolna (CTRL), komórki hodowane na nanofilmie GO (GO), komórki hodowane z dodatkiem ekstraktu (CEME), komórki hodowane na nanofilmie GO z dodatkiem ekstraktu (GO+CEME); względną ekspresję była obliczona z użycie genów ACTB i GAPDH; wyniki zaprezentowano jako wartości $2^{-\Delta\Delta CT}$ porównane do grupy kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenie standardowe; litery nad kolumnami oznaczają istotność statystyczną pomiędzy grupami ($p \leq 0.05$).

6.2. Doświadczenie II

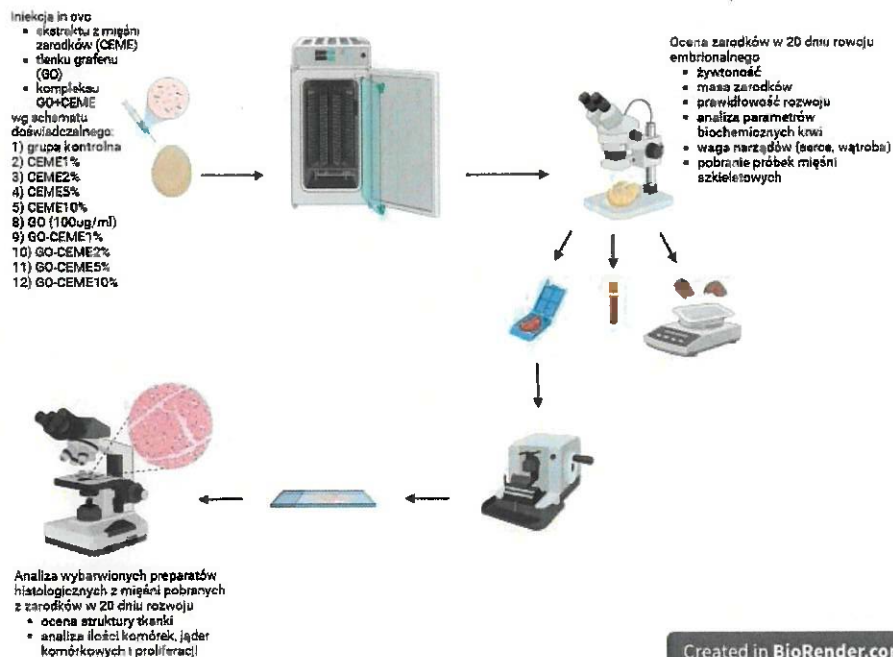
Celem doświadczenia II było sprawdzenie wpływu ekstraktu CEME i jego kompleksów z GO, jako nośnika białek wzrostowych zawartych w CEME, na rozwój mięśni zarodków brojlerów linii Ross 308. Właściwości fizykochemiczne płatków tlenku grafenu, a zwłaszcza obecność dużej liczby grup funkcyjnych na powierzchni, sprawiają, że ma on zdolność wiązania na swojej powierzchni różnych związków i cząstek w tym także, molekuł biologicznie czynnych, w szczególności białek, efekt ten nazywany jest koroną białkową. Kompleks nanonośnika z koktajlem białek stymulujących rozwój mięśni miał zapobiec szybkiej degradacji podanych *in ovo* białek i zapewnić przedłużone w czasie działanie.

Wstępny etap doświadczenia polegał na analizie czynników badanych w warunkach *in vitro*. Oceniono poziom proliferacji komórek i cytotoksyczność badanych czynników w grupach doświadczalnych: (1) kontrola, (2) CEME0.1%, (3) CEME0.2%, (4) CEME0.5%, (5) CEME1%, (6) CEME2%, (7) CEME5%, (8) CEME10%, (9) GO, (10) GO-CEME0.1%, (11) GO-CEME0.2%, (12) GO-CEME0.5%, (13) GO-CEME1%, (14) GO-CEME2%, (15) GO-CEME5%, and (16) GO-CEME10%. Dodatek tlenku grafenu stosowany był w stałym stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$. Proliferację komórek *in vitro* analizowano za pomocą testu BrdU, opartego na ilościowym pomiarze syntezy DNA poprzez wykrywanie wbudowanego analogu nukleozydu tymidyny do DNA dzielących się komórek w fazie S. Uzyskane wyniki wykazały, że ekstrakt podawany w stężeniu 0,5%, 1% i 2% zwiększał proliferację komórek mięśniowych. Dodatek tlenku grafenu do medium hodowlanego nie wpływał na proliferację komórek. Jednak ekstrakt w stężeniach 1, 2 i 5% w kompleksie z tlenkiem grafenu powodował znaczny wzrost proliferacji komórek w porównaniu z podaniem samego ekstraktu. Badanie cytotoksyczności *in vitro* tlenku grafenu i ekstraktu wykonano testem MTT. Wyniki wykazały toksyczność ekstraktu w stężeniu 10%, GO i kompleksu

GO z ekstraktem w stężeniu 10% oraz w niewielkim stopniu GO z ekstraktem w stężeniu 5%.

Przeprowadzono test hemokompatybilności, aby ocenić potencjalne właściwości hemolityczne badanych czynników. Nie stwierdzono lizy krwinek czerwonych krwi kury po 15, 30 i 60 minutach ekspozycji na czynniki badane, co wskazuje na brak hemotoksyczności stosowanych materiałów we wszystkich stężeniach i kombinacjach.

W drugim etapie doświadczenia do jaj na początku embriogenezy podano kompleks CEME z GO (Ryc. 7), jako źródło białek stymulujących rozwój i wzrost mięśni wraz z nośnikiem zapewniającym przedłużone działanie CEME po iniekcji. Jaja losowo podzielono na grupy doświadczalne, które obejmowały różne stężenia CEME, GO oraz kompleks GO-CEME: (1) kontrola (nie traktowana), (2) CEME1%, (3) CEME2%, (4) CEME5%, (5) CEME10%, (8) GO (100 µg/ml), (9) GO-CEME1%, (10) GO-CEME2%, (11) GO-CEME5%, (12) GO-CEME10%. Stężenie GO w kompleksach było stałe i wynosiło 100 µg/ml. W 20 dniu rozwoju zarodkowego oceniono rozwój zarodków, a także porównano masy jaj, zarodków, wątroby i serca. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w porównaniu do grupy kontrolnej w żadnym z badanych parametrów. Nie odnotowano zwiększonej śmiertelności zarodków w grupach badanych. Podczas sekcji nie obserwowano żadnych widocznych wad rozwojowych czy patologicznych zmian w anatomii zarodków.

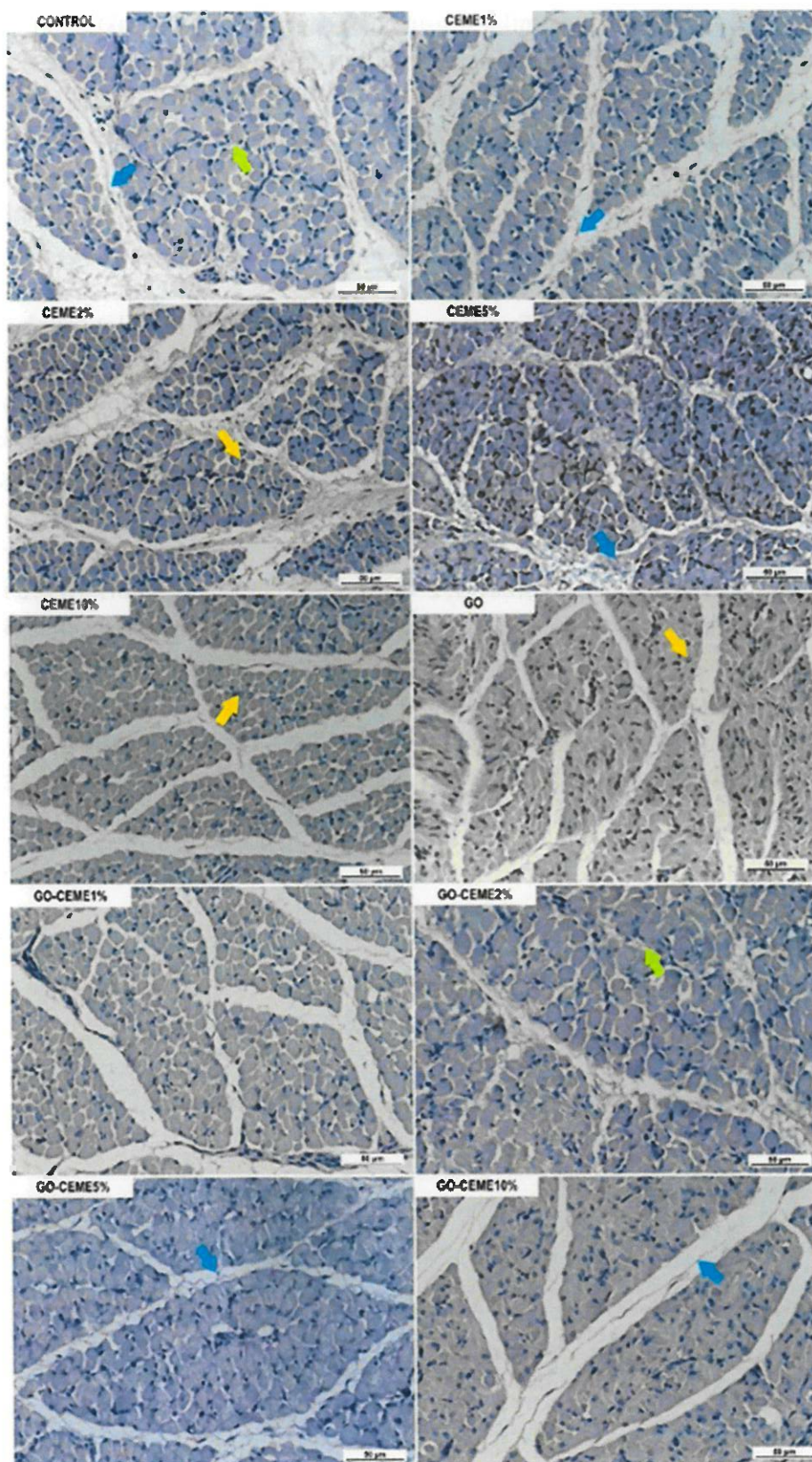


Rycina 7. Schemat doświadczenia II

Analiza wybranych parametrów biochemicznych krwi pobranej z 20-dniowych zarodków nie wykazała wpływu tlenku grafenu, ekstraktu oraz kompleksów obu czynników na aktywność enzymów wątrobowych ALT, AP, AST i LDH oraz na stężenie albumin, białka całkowitego, globulin, trójglicerydów i kreatyniny. Zaobserwowano

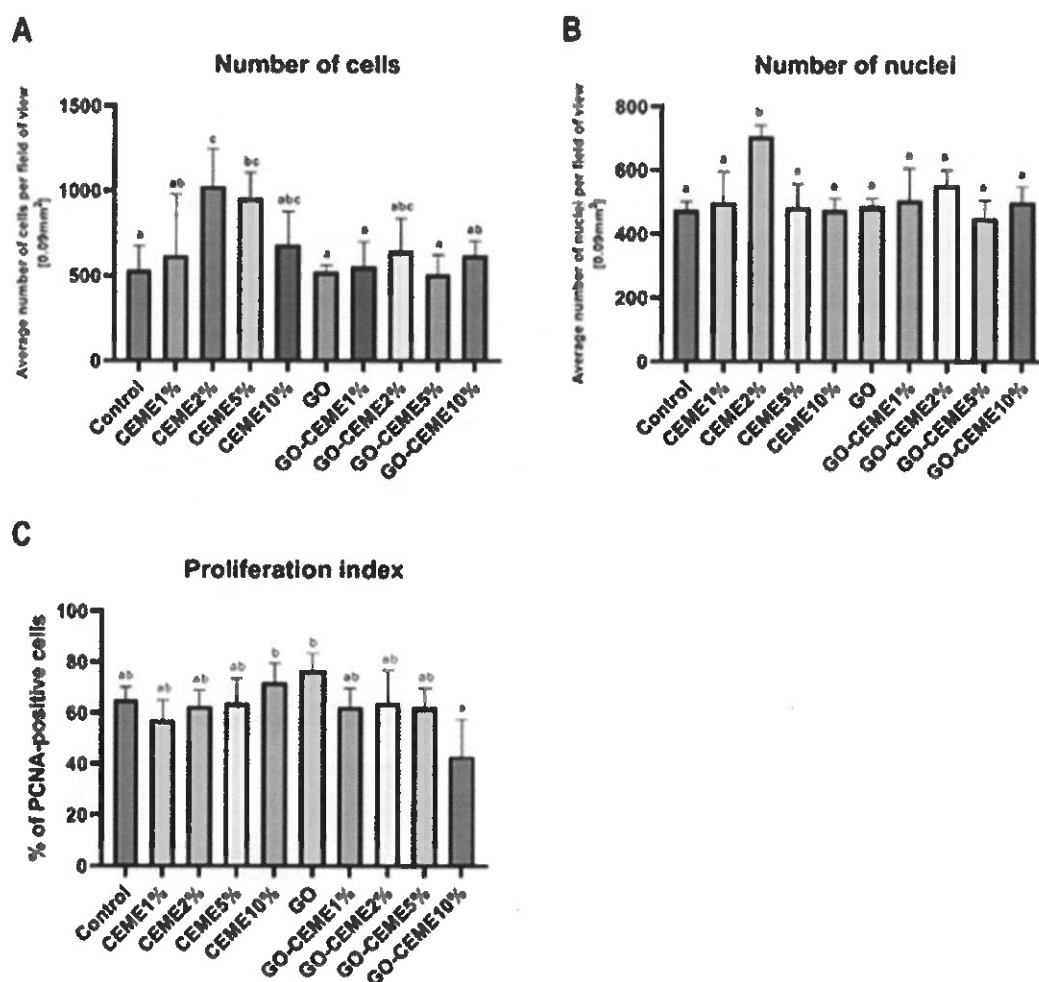
wzrostowy trend zawartości mocznika w grupach z samym GO i ekstraktem oraz obniżony poziom mocznika po podaniu kompleksu tlenku grafenu z ekstraktem. Istotnie statystycznie różnice stwierdzono jedynie pomiędzy grupami z tlenkiem grafenu, ekstraktem w stężeniu 5% i 10% a grupą z kompleksem GO i ekstraktu w stężeniu 5%. Zaobserwowano obniżone stężenie glukozy we krwi przy podawaniu GO, ekstraktu w stężeniu 10% i kompleksu tlenku GO z ekstraktem 10%. Zaobserwowane tendencje nie były jednak istotne statystycznie, a wszystkie wyniki mieściły się w zakresie wartości referencyjnych.

Ocena histologiczna przekroju poprzecznego mięśni szkieletowych kończyny tylnej 20-dniowego zarodka kury nie wykazała patologicznych zmian w strukturze mięśni w żadnej z grup. Jednakże, w obrazie przekroju poprzecznego mięśnia między grupami wystąpiły istotne różnice w strukturze mięśni. Mięśnie zarodków z grupy kontrolnej charakteryzowały się rozległą omięsnią (perymysium) z dużą ilością tkanki łącznej, jak również wyraźnie zaznaczonym endomysium, komórki były luźno upakowane. W grupach, którym podano ekstrakt, zwłaszcza w stężeniu 2% i 5%, mięśnie były lepiej rozwinięte, obserwowano gęsto upakowane komórki, z większą ilością jąder komórkowych i mniejszą ilością tkanki łącznej. W grupach z tlenkiem grafenu i kompleksem GO z ekstraktem 10% komórki były słabiej rozwinięte, obserwowano mniej zaznaczone endomysium, podczas, gdy w grupach z kompleksem tlenku grafenu i ekstraktu 1, 2 i 5% obserwowano okrągłe, lepiej rozwinięte komórki. Najkorzystniejszą budową charakteryzowały się komórki mięśniowe zarodków z grup, którym podano ekstrakt w stężeniu 2 i 5%, w przekrojach widoczne były gęsto upakowane okrągłe komórki o dużej liczbie jąder (Ryc. 8).



Rycina 8. Zdjęcia przekroju poprzecznego próbek mięśni 20-dniowych zarodków wybarwionych metodą PAS; grupa kontrolna (CONTROL), dodatek ekstraktu 1% (CEME1%), dodatek ekstraktu 2% (CEME2%), dodatek ekstraktu 5% (CEME5%), dodatek ekstraktu 10% (CEME10%); dodatek tlenku grafenu (GO), dodatek kompleksu GO z ekstraktem 1% (GO-CEME1%), dodatek kompleksu GO z ekstraktem 2% (GO-CEME2%), dodatek kompleksu GO z ekstraktem 5% (GO-CEME5%), dodatek kompleksu GO z ekstraktem 10% (GO-CEME10%); żółta strzałka - jądra, zielona strzałka - endomysium, niebieska strzałka - perimysium (omięśnia).

Analiza próbek wykazała znaczny wzrost liczby komórek w grupach z ekstraktem w stężeniu 2% i 5% (Ryc. 9A). Analiza opierała się na zliczaniu komórek w polu widzenia w przeliczeniu na jednostkę powierzchni (0,09 mm²). W grupie z ekstraktem 2% obserwowano większą liczbę jąder komórkowych (Ryc. 9B). Współczynnik proliferacji, mierzony przez określenie liczby jąder PCNA-pozytywnych względem całkowitej liczby jąder, nie zwiększył się w żadnej grupie w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 9C).



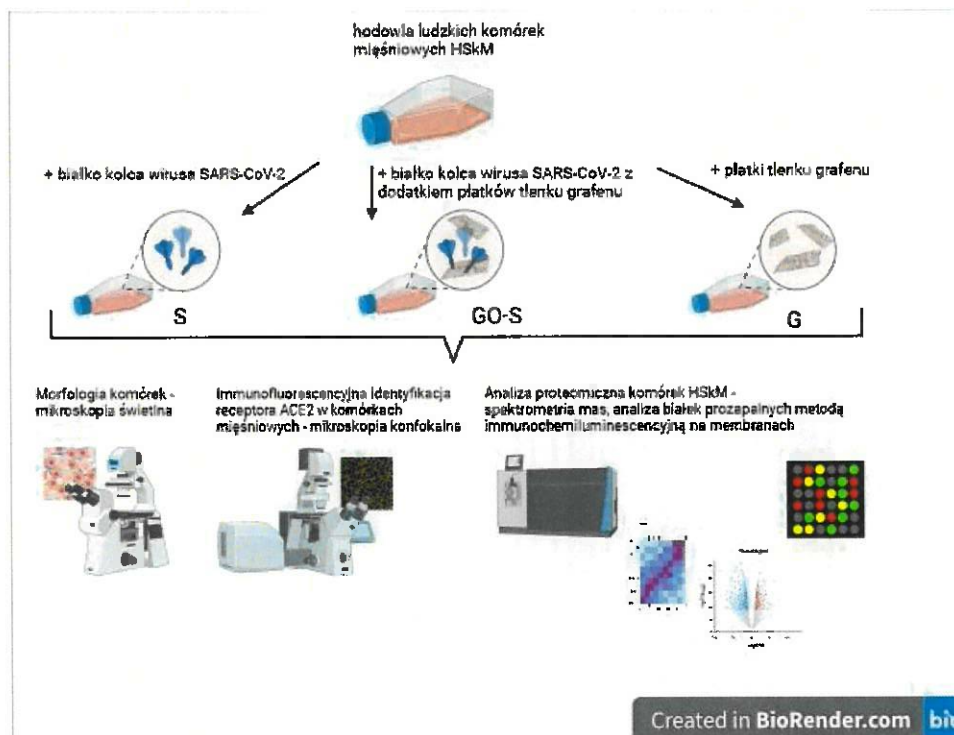
Rycina 9. (A) Średnia liczba komórek zliczona w polu widzenia mikroskopu (0,09 mm²) z preparatów histologicznych wybarwionych metodą PAS; (B) średnia ilość jąder zliczona w polu widzenia mikroskopu (0,09 mm²) z preparatów barwionych hematoksyliną; (C) współczynnik proliferacji przedstawiony jako procent jąder PCNA-pozytywnych do całkowitej liczby jąder widocznych w polu widzenia mikroskopu (0,09 mm²) z preparatów po immunohistochemicznej detekcji PCNA z barwieniem hematoksyliną.

W doświadczeniu analizowano również aktywność kluczowego enzymu antyoksydacyjnego - dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, ang. Superoxide Dismutase) w wątrobie. Nie stwierdzono wpływu zastosowanych czynników na aktywność SOD. Średnia aktywność była bliska 100% we wszystkich grupach badanych.

6.3. Doświadczenie III

Celem III doświadczenia było potwierdzenie obecności receptora ACE2 w ludzkich komórkach mięśniowych oraz określenie wpływu białka S kolca wirusa SARS-CoV-2 na komórki mięśniowe, a zwłaszcza ekspresję białek prozapalnych oraz potencjalne zastosowanie płatków tlenku grafenu jako modulatora stanu zapalnego (Ryc. 10).

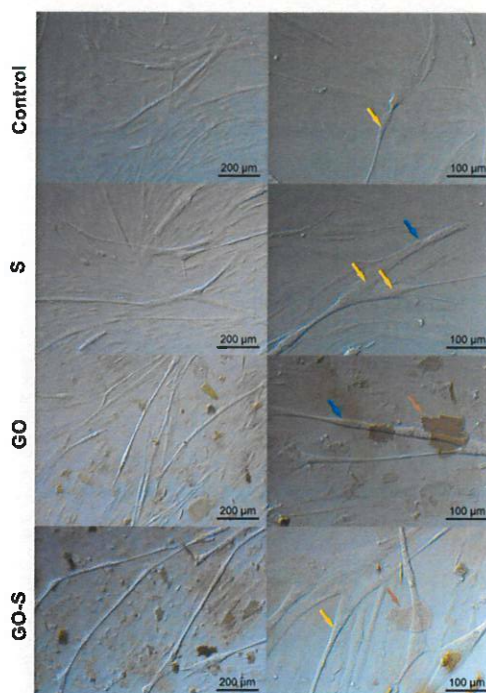
Białko S jest silnym antygenem, pobudzającym odpowiedź odpornościową, jednak również zdolnym do wywołania burzy cytokinowej. Receptor ACE2 wraz z białkiem S kolca wirusa SARS-CoV-2 jest odpowiedzialny za wnikanie wirusa do komórek, co w konsekwencji skutkuje wystąpieniem COVID-19. Duża powierzchnia czynna płatków GO, obecność licznych grup funkcyjnych (hydroksylowych, epoksydowych, karbonylowych, karboksylowych) zdolnych do tworzenia niekowalencyjnych wiązań i przyłączania np. białek (efekt korony białkowej), sprawia, że płatki tlenku grafenu mogłyby efektywnie wiązać białka prozapalne, generujące burzę cytokinową.



Rycina 10. Schemat doświadczenia III.

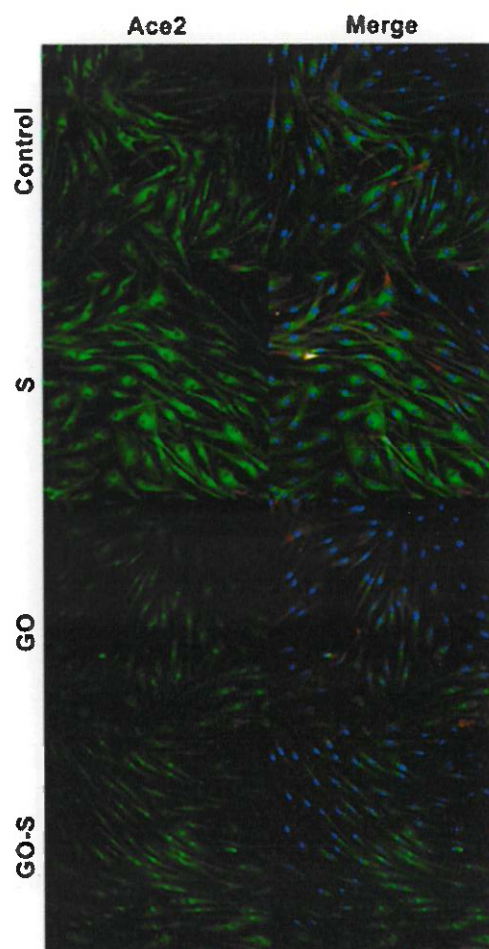
Hodowle komórkowe podzielono na grupy doświadczenia: (1) kontrola (Control), (2), komórki hodowane w obecności białka S w medium (S), (3) komórki hodowane z dodatkiem GO (GO), (4) komórki hodowane w obecności białka S i dodatkiem GO (GO-S). Morfologię komórek obserwowano za pomocą mikroskopu świetlnego. Nie odnotowano znaczących różnic między grupami po 24 godzinach hodowli (Ryc. 11). We wszystkich grupach obserwowano charakterystyczne wydłużone komórki, jak również wielojądrowe miotuby. W żadnej z grup nie było oznak apoptozy czy innego niekorzystnego wpływu czynników badanych na morfologię komórek HSkM. Płatki tlenku grafenu były wyraźnie widoczne w pożywce hodowlanej, obserwowano przyleganie

płatków do komórek, jednak nie wpływało to na zmianę morfologii komórek w tych obszarach.



Rycina 11. Morfologia komórek HSKM po 24 h hodowli *in vitro*; grupa kontrolna (Control), grupa z dodatkiem białka S (S), grupa z dodatkiem tlenku grafenu (GO), grupa S z dodatkiem tlenku grafenu i białka S (GO-S); żółta strzałka - jądra, brązowa strzałka - płatki tlenku grafenu, niebieska strzałka - miotuby.

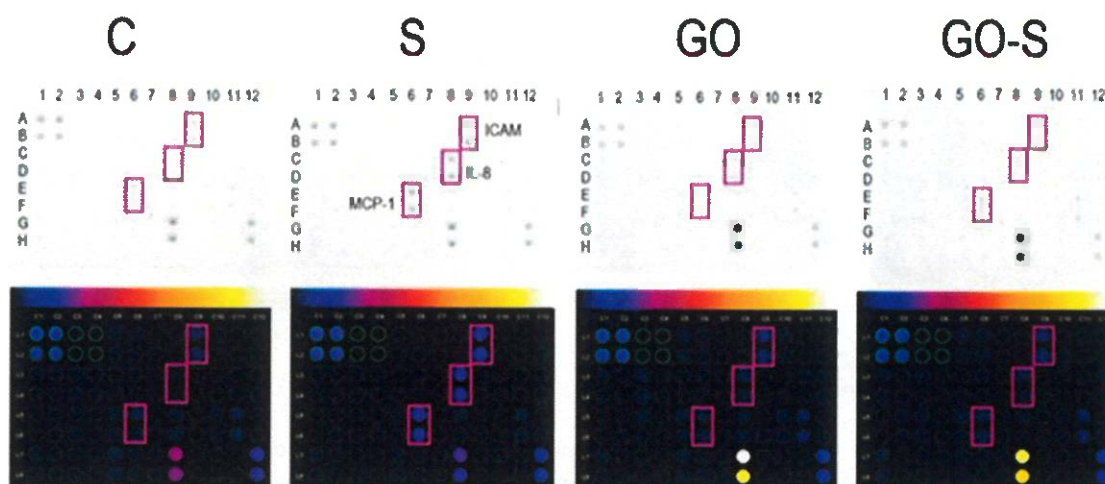
Preparaty z wybarwionymi fluorescencyjnie jądrami (DAPI), aktyną (falloidyna) i receptorem ACE2 obserwowano za pomocą mikroskopu konfokalnego (Ryc. 12). Na podstawie zdjęć preparatów wyznakowanych immunofluorescencyjnie oszacowano powierzchnię aktyny i receptorów ACE. Podczas obserwacji nie odnotowano niekorzystnych zmian w obrazie morfologicznym aktyny. Średnia powierzchnia aktyny, w przeliczeniu na pojedynczą komórkę, nie różniła się istotnie między grupami, jedynie przypadku całkowitej powierzchni aktyny w grupie z tlenkiem grafenu i białkiem S była ona istotnie większa. Jednak nie zaobserwowano zmian wskazujących na cytotoksyczność czy zakłócenia integralności cytoszkieletu lub polimeryzacji aktyny. Komórki mięśniowe barwiono również pod kątem obecności receptora konwertazy angiotensyny 2 (ACE2). Jest to receptor, przez który wirus SARS-CoV-2 wywołujący COVID-19 wnika do komórek organizmu gospodarza. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa również białko kolca wirusa - białko S, które łączy się z ACE2 na powierzchni komórek gospodarza. Interakcja białka S wirusa SARS-CoV-2 z receptorem ACE2 jest procesem, na którym koncentrują się badania nad leczeniem COVID-19 i zapobieganiem infekcji. Silnie wyrażona obecność receptora ACE2 obserwowana była w komórkach mięśniowych we wszystkich grupach badanych. Średnia, jak i całkowita powierzchnia receptora ACE2 nie różniła się między grupami, podobnie jak liczba jąder komórkowych. W trakcie analizy morfologii i liczby jąder komórkowych nie zaobserwowano zmian w obrazie jąder komórkowych.



Rycina 12. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego przedstawiające morfologię komórek HSKM po 24 h hodowli; grupa kontrolna (Control), grupa komórek hodowanych z białkiem S (S), grupa z dodatkiem tlenku grafenu (GO), grupa komórek hodowana z białkiem S z dodatkiem tlenku grafenu (GO-S); barwienie immunofluorescencyjne: ACE2 - zielony, jądra komórkowe - DAPI - niebieski, aktyna - falloidyna - czerwony.

W eksperymencie przeanalizowano ekspresję 40 białek zaangażowanych w stan zapalny metodą immunochemiluminescencyjną z zastosowaniem membran. Komórki hodowane z białkiem S wykazały wzrost poziomu białek ICAM-1, MCP-1 i IL-8 (Ryc. 13). Zastosowanie tlenku grafenu w hodowli z dodatkiem białka S spowodowało obniżenie poziomu tych białek do poziomu grupy kontrolnej. Ponadto, zastosowanie samego GO nie zwiększało ilości białek prozapalnych. Białka ICAM-1, MCP-1 i IL-8 są zaangażowane w proces zapalny, u pacjentów z COVID-19 obserwowano podwyższony poziom w surowicy krwi wszystkich trzech białek. Interleukina-8 jest chemokina o silnym działaniu chemotaktycznym, aktywuje neutrofile w miejscu stanu zapalnego. Niewielkie ilości IL-8 mogą mieć lokalne działanie proangiogenne, jednak przy zakażeniu SARS-CoV-2 efekt ten może działać niekorzystnie, niejako zwiększając pulę receptora ACE2 w komórkach nowopowstających naczyń krwionośnych. Poziom MCP-1 we krwi pacjentów był wykorzystywany jako marker ciężkiego przebiegu choroby COVID-19 i podwyższonego

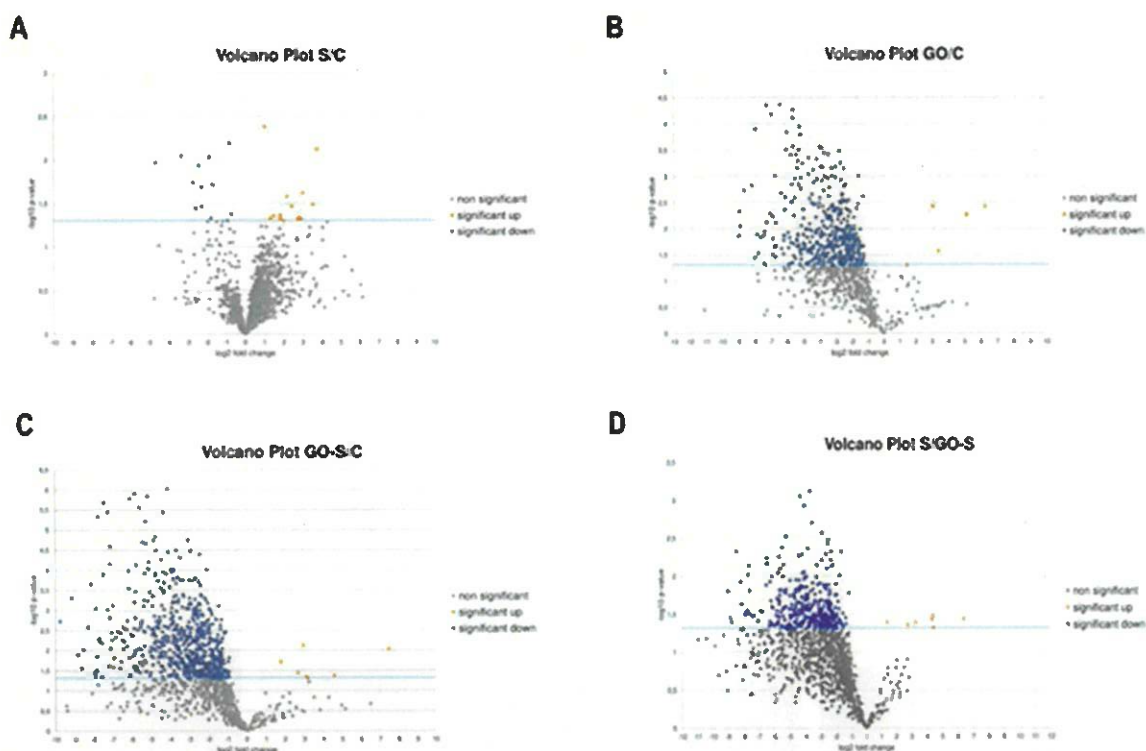
ryzyka zgonu. Jest to białko sprzyjające zmianom miażdżycowym, a także jednym z głównych czynników powodujących zakrzepice. U wielu pacjentów z COVID-19 podczas sekcji zwłok w drobnych naczyniach płuc znajdowano niewielkie skrzepy. Badania na myszach potwierdziły, że podwyższony poziom MCP-1 w mięśniach szkieletowych jest związany ze stanem zapalnym. Zwiększenie poziomu MCP-1 występuje również podczas intensywnego wysiłku fizycznego, a także przy poważnych uszkodzeniach mięśni. ICAM-1, podobnie jak MCP-1, wykorzystywany był jako marker ciężkiego przebiegu choroby COVID-19. Jest to czynnik odpowiedzialny za gromadzenie się białych krwinek w miejscu zapalenia. Zwiększone stężenie ICAM-1 obserwuje się po wyczerpującym wysiłku, powodującym przeciążenie i hipertrofię mięśni. Uzyskane wyniki wskazują na aktywację burzy cytokinowej w komórkach mających styczność z białkiem S. Ponadto, wyniki sugerują, że białko S wirusa SARS-CoV-2 może wywoływać efekt podobny do bardzo intensywnego wysiłku mięśni. Stan przeciążenia mięśni prowadzi do stresu oksydacyjnego, który jest czynnikiem sprzyjającym powstawaniu burzy cytokinowej. Obecność różnych cytokin i chemokin w komórkach mięśniowych dowodzi aktywności immunologicznej i endokrynnej tej tkanki, co biorąc pod uwagę udział masy mięśni w całym organizmie może mieć znaczenie w propagacji procesu zapalnego w organizmie. Na uwagę zasługuje fakt, że dodatek tlenku grafenu do komórek hodowanych w obecności białka S spowodował, iż poziom białek prozapalnych był porównywalny z grupą kontrolną.



Rycina 13. Analiza immunochemiluminescencyjna z wykorzystaniem membran 40 białek prozapalnych w komórkach HSKM; grupa kontrolna (C), grupa traktowana białkiem S (S), grupa z dodatkiem tlenku grafenu (GO), grupa traktowana białkiem S z dodatkiem tlenku grafenu (GO-S); ICAM1 - intercellular adhesion molecule 1, MCP-1 - monocyte chemoattractant protein 1, IL-8 – interleukin 8; wyniki zostały znormalizowane z wykorzystaniem punktów kontrolnych testu.

Analizę proteomiczną przeprowadzono również za pomocą spektrometrii mas. Stwierdzono istotne statystycznie zmiany w poziomie 667 białek w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza danych wykazała, że białko S zwiększyło ekspresję białek w stosunku do grupy kontrolnej, podczas gdy zastosowanie GO w grupie komórek inkubowanych z białkiem S obniżyło ich poziom, jednak największy spadek poziomu ekspresji wielu białek zaobserwowano w grupie z dodatkiem samego tlenku grafenu.

Trendy zobrazowano przy pomocy wykresów wulkanowych, ukazując wzrost 13 białek i obniżenie 13 innych, w grupie z białkiem S. Dodatek GO do medium komórek inkubowanych z białkiem S znacznie zwiększył poziom 5 białek i obniżyły poziom 638 białek. Dodatek samego GO w medium hodowlanym zwiększył poziom 5 białek, zmniejszył 431 (Ryc. 14).



Rycina 14. Wykresy wulkanowe obrazujące poziom białek zidentyfikowanych w analizie spektrometrią mas; fioletowy – istotnie obniżony poziom białka, pomarańczowy – istotnie zwiększony poziom białka; oś x wyraża \log_2 krotności zmian w poziomie białek, oś y wyraża $-\log_{10}$ p-values; niebieska linia wyraża granicę istotności.

Wybrano 10 białek, których poziom pod wpływem białka S wzrósł w największym stopniu (co najmniej dwukrotnie) w porównaniu z grupą kontrolną.

Stwierdzono, iż białko S najbardziej zwiększyło poziom deacetylazy histonowej 2 (HDAC2). Co ciekawe, obecność GO dodatkowo zwiększyła poziom tego białka. Zastosowanie samego GO również zwiększyło ilość HDAC2, ale w mniejszym stopniu. Poziom mitochondrialnego białka podobnego do stomatyny 2 (STOML2) znacząco wzrosła pod wpływem białka S, ale w obecności GO jego ilość wróciła do poziomu grupy kontrolnej. Białko S również znacznie zwiększyło poziom białek związanych ze stresem

oksydacyjnym i stanem zapalnym: mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD2), peroksysomalnego wielofunkcyjnego enzymu typu 2 (HSD17B4), cyklooksigenazy-1 (COX-1/PTGS1), glikoproteiny CD59 (CD59), kalponiny-3 (CNN3), białka związanego z kaweolami 4 (CAVIN4), tytyny (TTN) i białka rybosomalnego 40S S3 (RPS3). Co istotne, we wszystkich przypadkach dodatkowe zastosowanie GO spowodowało zmniejszenie poziomu tych białek. Obecność białka S również spowodowała znaczące, ponad dwukrotne zmniejszenie ilości 2 białek – keratyny typu I cytoszkieletu 9 (KRT9) i horneryny (HRNR).

7. Wnioski

7.1. Doświadczenie I

Doświadczenie miało na celu zbadanie wpływu ekstraktu z mięśni 18-dniowych zarodków kury podanego do hodowli *in vitro* komórek progenitorowych mięśni z zarodka kury oraz nanofilmu tlenku grafenu, jako powierzchni wzrostu komórek, na proces różnicowania i tworzenia pseudo-tkanki mięśniowej.

Ekstrakt jest optymalnym dodatkiem białek wzrostowych stymulujących różnicowanie i dojrzewanie progenitorowych komórek mięśniowych zarodka kury hodowanych w warunkach *in vitro*. Ekstrakt z 18-dniowych zarodków jest bogaty w białka produkowane przez komórki mięśniowe jak i inne, towarzyszące im komórki, m.in. komórki nerwowe. Z kolei 18 dzień rozwoju zarodkowego jest to moment, w którym mięśnie zarodka przygotowują się do intensywnej pracy w trakcie i tuż po wykluciu. Obserwacja morfologii komórek dowodzi, iż proces różnicowania i dojrzewania został zainicjowany przez dodatek ekstraktu. Analiza ekspresji genów na poziomie mRNA wykazała istotny wzrost ekspresji genów związanych z miogenezą, a także charakterystyczne dla dojrzewających komórek mięśniowych zmiany w metabolizmie energetycznym. Ogół obserwowanych zmian na poziomie morfologicznym jak i metabolicznym, wskazuje, że w grupach z dodatkiem ekstraktu wykształciły się dojrzałe włókna mięśniowe. Zaobserwowane spontaniczne skurcze komórek dowodzą ich pełnej fizjologicznej dojrzałości. Na uwagę zasługuje także fakt, iż było to pierwsze doniesienie o spontanicznych skurczach komórek mięśniowych w warunkach *in vitro* bez obecności zewnętrznych bodźców fizycznych indukujących skurcz. Ponadto, zgromadzone wyniki dowodzą braku toksycznego efektu nanofilmu tlenku grafenu na komórki mięśniowe w warunkach *in vitro*, dzięki czemu może on stanowić odpowiedni, biozgodny materiał do tworzenia niszy do wzrostu komórek mięśniowych - mimicznego matriksu zewnątrzkomórkowego. Obserwowano silną adhezję do powierzchni nanofilmu, który był chętnie zasiedlany przez komórki. Nie stwierdzono wpływu nanofilmu na stymulację różnicowania komórek mięśniowych z zarodka kury w warunkach *in vitro*. Jednak to dodatek białek wzrostowych zdaje się być decydującym czynnikiem indukującym proces różnicowania.

Wnioski:

- Analiza proteomu ekstraktu z mięśni kończyny dolnej 18-dniowego zarodka kury wykazała obecność 1470 białek, z czego 249 jest charakterystycznych dla tkanki mięśniowej, w wśród nich; 14 białek stanowi element macierzy zewnątrzkomórkowej, 20 jest powiązanych ze strukturą i komunikacją między komórkami, 11 jest związanych z aparatem kurczliwym komórek mięśniowych, 6 jest związanych z komunikacją nerwową i nerwowo-mięśniową i 9 jest zaangażowanych w metabolizm.
- Dodatek ekstraktu z mięśni 18-dniowych zarodków kury domowej do medium hodowli *in vitro* komórek progenitorowych mięśni (pobranych z 8-dniowego zarodka) wspomaga proces miogenezы komórek, pojawienie się wielojądrowych,

wydłużonych, rozgałęzionych miotub zdolnych do samoistnego, spontanicznego skurczu, bez obecności zewnętrznych bodźców.

- Nanofilm tlenku grafenu utworzony na dnie naczynia hodowlanego nie wpływa negatywnie na żywotność komórek progenitorowych mięśni z zarodka kury w hodowli *in vitro* po 96 godzinach.
- Obecność nanofilmu tlenku grafenu nie wpływa na proces różnicowania komórek progenitorowych mięśni z zarodka kury w warunkach *in vitro*.
- Nanofilm tlenku grafenu utworzony na dnie naczynia hodowlanego jest chętnie zasiedlany przez komórki progenitorowe mięśni zarodka kury, które wykazują silną adhezję, liczne filopodia oraz znaczne wypłaszczenie, w porównaniu do komórek grupy kontrolnej.

7.2. Doświadczenie II

Celem doświadczenia była ocena możliwości poprawy struktury mięśni zarodków kury domowej poprzez dodatek kompleksu odżywczego będącego połączeniem ekstraktu z mięśni 18-dniowych zarodków kury z tlenkiem grafenu, podawanego metodą *in ovo* na początku embriogenezy.

Wstępne analizy *in vitro* z wykorzystaniem komórek mięśniowych z 9-dniowych zarodków kury nie wykazały negatywnego efektu badanych czynników (CEME i GO) na proliferację komórek. W teście żywotności jedynie zastosowanie najwyższego stężenia ekstraktu (10%) oraz samego tlenku grafenu wpłynęło na istotnie gorsze wyniki w porównaniu do kontroli. Efekt obniżenia aktywności metabolicznej komórek po podaniu GO można tłumaczyć aktywnością grup tlenowych na powierzchni materiału i wygenerowaniem niewielkiej ilości wolnych rodników. W kompleksie z ekstraktem podobny efekt nie był obserwowany, za co odpowiada najprawdopodobniej powstała korona białkowa - warstwa białek ekstraktu związanych na powierzchni płatków tlenku grafenu.

W badaniach *in ovo* badane czynniki nie wpłynęły na masę jaj, zarodków, żywotność czy masę poszczególnych narządów (serce, wątroba). W grupach badanych nie zaobserwowano odchyleń w zakresie parametrów biochemicznych krwi, a podczas sekcji zarodków nie odnotowano żadnych patologicznych zmian ani nieprawidłowości w rozwoju. Zastosowany dodatek *in ovo* nie wpłynął na podwyższenie aktywności jednego z najistotniejszych enzymów antyoksydacyjnych - dysmutazy nadadtlenkowej, badanej w próbkach wątroby. W obrazie histologicznym widocznie istotny pozytywny wpływ na rozwój mięśni zarodków kury miało podanie *in ovo* ekstraktu o stężeniu 2%. W preparatach mięśni szkieletowych obserwowano dobrze rozwiniętą tkankę, z gęsto upakowanymi komórkami i mniejszą ilości tkanki łącznej. Niemniej, skompleksowanie ekstraktu z GO nie zwiększyło pozytywnego efektu samego ekstraktu. Uzyskane wyniki potwierdzają brak toksyczności samego tlenku grafenu stosowanego *in ovo* w badanym stężeniu. Ekstrakt był bogatym źródłem białek związanych m.in. z metabolizmem energetycznym (glikoliza, synteza ATP, NADPH) czy z rozwojem struktury komórek mięśniowych i macierzy zewnątrzkomórkowej (organizacja struktury kolagenu, macierzy zewnątrzkomórkowej,

adhezji komórek, struktury cytoszkieletu i aparatu kurczliwego) oraz z aktywnością układu nerwowego, nierozzerwalnie połączonego z działalnością mięśni. Jest on wysoce odpowiednią mieszaniną białek, przeznaczoną do suplementacji *in ovo*, wspierającą rozwój tkanki mięśniowej zarodków kury domowej.

Wnioski:

- Ekstrakt z mięśni 18-dniowych zarodków kury, GO jak i kompleksy obu czynników są biozgodne - nie powodują hemolizy czerwonych krwinek krwi kury domowej po 60 minutach ekspozycji.
- Podawany na początku embriogenezy *in ovo* ekstrakt z mięśni 18-dniowych zarodków kury jak również jego kompleksy z płatkami tlenku grafenu nie wpływają negatywnie na żywotność, prawidłowy rozwój, masę zarodków, parametry biochemiczne krwi zarodka kury, oceniane w 20 dniu rozwoju.
- Podawanie metodą *in ovo*, na początku embriogenezy, roztworu 2% ekstraktu z mięśni zarodków kury wpływa korzystnie na strukturę mięśni szkieletowych 20-dniowych zarodków, poprzez zmniejszenie ilości tkanki łącznej i zagęszczenie komórek mięśniowych.
- Podanie *in ovo* tlenku grafenu na początku embriogenezy nie wpływa na żywotność, prawidłowy rozwój, masę ciała, parametry biochemiczne krwi zarodków w 20 dniu rozwoju embrionalnego.
- Dodatek tlenku grafenu do ekstraktu podawanego *in ovo* na początku embriogenezy nie modyfikuje działania ekstraktu.

7.3. Doświadczenie III

Celem badania było zbadanie wpływu białka S kolca wirusa SARS-CoV-2 na ludzkie, nienowotworowe komórki mięśniowe hodowane *in vitro*, w zakresie aktywacji burzy cytokinowej, a także zastosowania płatków tlenku grafenu, jako potencjalnego „zmiatacza” białek prozapalnych.

Uzyskane w doświadczeniu III wyniki potwierdziły obecność receptora ACE2 w ludzkich komórkach mięśniowych i tym samym możliwość ich infekowania przez wirusa SARS-CoV-2. Nie zaobserwowano toksycznego wpływu płatków tlenku grafenu na komórki mięśniowe hodowane *in vitro*. Wykazano wpływ białka S wirusa na poziom białek prozapalnych zaangażowanych w burzę cytokinową w komórkach mięśniowych (ICAM-1, MCP-1 i IL-8). Z uwagi na masę mięśni w ludzkim organizmie efekt ten może powodować bardzo niekorzystne konsekwencje, zwłaszcza u ludzi młodych i sportowców. Obecność płatków tlenku grafenu zredukowała poziom białek prozapalnych, aktywowanych przez białko S do poziomu grupy kontrolnej.

Analiza proteomiczna metodą spektrometrii mas wykazała istotne zwiększenie poziomu deacetylazy histonowej (HDAC2), która powiązana jest ze wzrostem ekspresji ACE2 w komórkach, co w przypadku zakażenia wirusem SARS-CoV-2 stanowi duże ryzyko zwiększając dostępność komórek dla wirusa. Ponadto, szereg białek związanych ze stresem oksydacyjnym również miało podwyższoną ekspresję (STOML2, COX-1, SOD2, HSD17B4, RPS3). Świadczyć może to o generowaniu stresu oksydacyjnego przez obecność białka S, co może być również czynnikiem promującym burzę cytokinową i rozwój stanu zapalnego. Podwyższony poziom po ekspozycji na białko S odnotowano także w przypadku białka CAVIN4, pełniącego rolę ważnego modulatora procesu zapalnego, a także związanego z patologicznymi zmianami w tkance mięśniowej, w tym z dystrofią. Poziom kalponiny, regulującej organizację i kurczliwość włókien stresowych, również był podwyższony. Podobnie jak poziom titiny, związanej z elastycznością i siłą włókien mięśniowych, co może łączyć się z tezą o wywoływaniu przez białko S efektów podobnych do przeciążenia mięśni. Poziom ekspresji wszystkich tych białek, z wyjątkiem HDAC2, był niższy w grupie z białkiem S, gdzie równocześnie zastosowano dodatek GO. Efekt ten był niespecyficzny i można przypuszczać, że mechanizm ten związany jest z utworzeniem korony białkowej - warstwy białek związanych na powierzchni płatków tlenku grafenu. Można przypuszczać, że obniżony poziom białek prozapalnych w grupie z dodatkiem białka S i G wynika właśnie z immobilizacji tych białek na powierzchni GO. Te wstępne wyniki mogą świadczyć o potencjale płatków GO jako czynnika wyciszającego burzę cytokinową wywołaną białkiem S.

Wnioski:

- Enzym konwertujący angiotensynę II (ACE2) jest obecny w ludzkich prawidłowych komórkach mięśniowych HSkM.
- Tlenek grafenu, podawany w ilości 100 µg/ml do medium hodowlanego nie wpływa na zwiększenie poziomu żadnego z 40 badanych białek prozapalnych, oznaczanych w ludzkich prawidłowych komórkach mięśniowych HSkM metodą immunochemiluminescencyjną na membranach.

- Białko S kolca wirusa SARS-CoV-2 wprowadzone do hodowli *in vitro* komórek mięśniowych HSkM inicjuje zwiększenie poziomu białek prozapalnych, zaangażowanych w burzę cytokinową (ICAM-1, MCP-1 i IL-8), oznaczanych metodą immunochemiluminescencyjną na membranach.
- Ludzkie komórki mięśniowe HSkM hodowane *in vitro* poddane działaniu białka S kolca wirusa SARS-CoV-2 wykazują zwiększenie poziomu 13 białek, a zwłaszcza związanych z ekspresją receptora ACE2, stresem oksydacyjnym i przeciążeniem mięśni, oraz zmniejszenie poziomu 13 białek w analizie metodą spektrometrii mas.
- Dodatek tlenku grafenu do hodowli *in vitro* komórek HSkM inkubowanych w obecności białka S kolca wirusa SARS-Cov-2 wpływa na zmniejszenie poziomu 431 białek, a w tym białek związanych ze stanem zapalnym, generowanych pod wpływem białka S, analizowanych metodą spektrometrii mas.
- Proteom ludzkich komórek mięśniowych HSkM hodowanych *in vitro* w obecności tlenku grafenu (100 µg/ml) wykazuje zwiększenie poziomu 5 białek, oraz zmniejszenie poziomu 638 białek w analizie metodą spektrometrii mas.

8. Podsumowanie

Dodatek ekstraktu wodnego z mięśni 18-dniowych zarodków daje znaczący efekt w postaci stymulacji procesu miogenezy i różnicowania progenitorowych komórek mięśniowych zarodka kury hodowanych *in vitro*. Pełną dojrzałość funkcjonalną powstałych włókien mięśniowych potwierdziła obserwacja spontanicznych, samoistnych skurczów powstałej pseudo-tkanki mięśniowej. Efekt prorozwojowy ekstraktu obserwowany w badaniach *in vitro* zastosowany został w doświadczeniach *in ovo*. Zastosowanie ekstraktu (2%), jako dodatku stymulującego rozwój mięśni, podanego drogą *in ovo* na początku embriogenezy, korzystnie wpływa na strukturę mięśni szkieletowych w 20 dniu rozwoju zarodkowego. Dodatek CEME wpływa na zmniejszenie objętości tkanki łącznej, przy jednoczesnym większym zagęszczeniu komórek mięśniowych. Zgromadzone wyniki potwierdzają skuteczność dodatku ekstraktu z mięśni zarodka kury we wspomaganiu procesu różnicowania i dojrzewania komórek mięśniowych. Badania te stanowią podstawę poszukiwania dalszych zastosowań ekstraktu w hodowlach *in vitro* komórek, w hodowli drobiu, a w dalszej perspektywie także w kontekście terapeutycznym w zakresie regeneracji mięśni.

Tlenek grafenu, niezależnie od wykorzystanego modelu badawczego (hodowle komórkowe *in vitro*, zarodek kury, erytrocyty z krwi kury), nie wykazuje toksyczności. Zastosowany w postaci nanofilmu w hodowli *in vitro* jest chętnie zasiedlany przez komórki, które ulegają silnej adhezji do jego powierzchni. Jednocześnie nanofilm nie hamuje korzystnego działania ekstraktu z mięśni 18-dniowych zarodków kury dodanego do medium hodowlanego. Nanofilm grafenowy może spełniać rolę sztucznej niszy, mimicznego ECM, a ogólniej skafoldu pozwalającego na bezpieczną hodowlę komórek mięśniowych. Podobnie jak w przypadku nanofilmu, tlenek grafenu jako roztwór w kompleksie z ekstraktem, nie hamuje działania ekstraktu na zarodki po podaniu drogą *in ovo*. GO, dodany do medium hodowlanego ludzkich komórek mięśni szkieletowych nie wpływa na ekspresję białek prozapalnych.

Dodatek tlenku grafenu do komórek poddanych ekspozycji na czynnik stresowy w postaci białka kolca wirusa SARS-CoV-2 sprawia, że poziom aktywowanych przez białko S białek prozapalnych jest skutecznie zmniejszony (do poziomu z grupy kontrolnej). Sugeruje to, że tlenek grafenu ze względu na swoje fizyko-chemiczne właściwości może służyć zarówno jako transporter substancji korzystnych jak białkowy ekstrakt odżywczy CEME, ale także jako materiał „wychwytyjący” niepożądane białka, zaangażowane w burzę cytokinową. Mechanizm tworzenia korony białkowej nadaje GO unikalne cechy biologiczne, co może dawać bardzo szerokie możliwości potencjalnego zastosowania, poczynając od możliwości tworzenia kompleksów w systemach „drug delivery”, a także jako związek usuwający niepożądane związki, w tym białka prozapalne, a wreszcie jako biozgodny skafold w inżynierii tkankowej.

9. Bibliografia

1. Schniepp, H.C.; Li, J.-L.; McAllister, M.J.; Sai, H.; Herrera-Alonso, M.; Adamson, D.H.; Prud'homme, R.K.; Car, R.; Saville, D.A.; Aksay, I.A. Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide. *J. Phys. Chem. B* 2006, *110*, 8535–8539.
2. Hu, W.; Peng, C.; Lv, M.; Li, X.; Zhang, Y.; Chen, N.; Fan, C.; Huang, Q. Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. *ACS Nano* 2011, *5*, 3693–3700.
3. Bałaban, J.; Wierzbicki, M.; Zielińska, M.; Szczepaniak, J.; Sosnowska, M.; Daniluk, K.; Cysewski, D.; Koczoń, P.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Effects of graphene oxide nanofilm and chicken embryo muscle extract on muscle progenitor cell differentiation and contraction. *Molecules* 2020, *25*.
4. 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.
5. Zielińska-Górska, M.; Sawosz, E.; Sosnowska, M.; Hotowy, A.; Grodzik, M.; Górski, K.; Strojny-Cieślak, B.; Wierzbicki, M.; Chwalibog, A. Molecular Biocompatibility of a Silver Nanoparticle Complex with Graphene Oxide to Human Skin in a 3D Epidermis In Vitro Model. *Pharm.* 2022, *14*.
6. Zhang, X.; Yin, J.; Peng, C.; Hu, W.; Zhu, Z.; Li, W.; Fan, C.; Huang, Q. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. *Carbon N. Y.* 2011, *49*, 986–995.
7. Jaworski, S.; Strojny-Cieślak, B.; Wierzbicki, M.; Kutwin, M.; Sawosz, E.; Kamaszewski, M.; Matuszewski, A.; Sosnowska, M.; Szczepaniak, J.; Daniluk, K.; et al. Comparison of the Toxicity of Pristine Graphene and Graphene Oxide, Using Four Biological Models. *Mater. (Basel, Switzerland)* 2021, *14*.
8. Tan, G.W.; Kondo, T.; Imamura, K.; Suga, M.; Enami, T.; Nagahashi, A.; Tsukita, K.; Inoue, I.; Kawaguchi, J.; Shu, T.; et al. Simple derivation of skeletal muscle from human pluripotent stem cells using temperature-sensitive Sendai virus vector. *J. Cell. Mol. Med.* 2021, *25*, 9586–9596.
9. Motta-Santos, D.; dos Santos, R.A.S.; Oliveira, M.; Qadri, F.; Poglitsch, M.; Mosienko, V.; Kappes Becker, L.; Campagnole-Santos, M.J.; M Penninger, J.; Alenina, N.; et al. Effects of ACE2 deficiency on physical performance and physiological adaptations of cardiac and skeletal muscle to exercise. *Hypertens. Res.* 2016, *39*, 506–512.
10. He, Q.; Sudibya, H.G.; Yin, Z.; Wu, S.; Li, H.; Boey, F.; Huang, W.; Chen, P.; Zhang, H. Centimeter-long and large-scale micropatterns of reduced graphene oxide films: fabrication and sensing applications. *ACS Nano* 2010, *4*, 3201.
11. Knight, M.A.F.; Evans, G.R.D. Tissue engineering: Progress and challenges. *Plast. Reconstr. Surg.* 2004, *114*, 26–37.
12. Asfour, H.; Allouh, M.; Said, R. Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery. *Exp. Biol. Med.* 2018, *243*, 118–128.
13. Valdez, M.R.; Richardson, J.A.; Klein, W.H.; Olson, E.N. Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4. *Dev. Biol.* 2000, *219*, 287–298.
14. Ichio, I.; Kimura, I.; Ozawa, E. Promotion of Myoblast Proliferation by Hypoxanthine and RNA in Chick Embryo Extract. *Dev. Growth Differ.* 1985, *27*, 101–110.

15. Shafey, T.M.; Mahmoud, A.H.; Alsobayel, A.A.; Abouheif, M.A. Effects of in ovo administration of amino acids on hatchability and performance of meat chickens. *South African J. Anim. Sci.* **2014**, *44*, 123–130.
16. Zielińska, M.K.; Sawosz, E.; Chwalibog, A.; Ostaszewska, T.; Kamaszewski, M.; Grodzik, M.; Skomial, J. Nano-nutrition of chicken embryos. Effect of gold and taurine nanoparticles on muscle development. *J. Anim. Feed Sci.* **2010**, *19*, 277–285.
17. Subramaniyan, S.; Kang, D.; Siddiqui, S.H.; Park, J.; Tian, W.; Park, B.; Shim, K. Effects of In Ovo Supplementation with Nanonutrition (L-Arginine Conjugated with Ag NPs) on Muscle Growth , Immune Response and Heat Shock Proteins at Different Chicken Embryonic Development Stages. *animals* **2020**, *10*.
18. Givisiez, P.E.N.; Moreira Filho, A.L.B.; Santos, M.R.B.; Oliveira, H.B.; Ferket, P.R.; Oliveira, C.J.B.; Malheiros, R.D. Chicken embryo development: metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 6774–6782.
19. Chang, Y.; Yang, S.T.; Liu, J.H.; Dong, E.; Wang, Y.; Cao, A.; Liu, Y.; Wang, H. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol. Lett.* **2011**, *200*, 201–210.
20. Ali-Boucetta, H.; Bitounis, D.; Raveendran-Nair, R.; Servant, A.; Van den Bossche, J.; Kostarelos, K. Purified Graphene Oxide Dispersions Lack In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Pathogenicity. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 433–441.
21. Kurantowicz, N.; Strojny, B.; Sawosz, E.; Jaworski, S.; Kutwin, M.; Grodzik, M.; Wierzbicki, M.; Lipińska, L.; Mitura, K.; Chwalibog, A. Biodistribution of a High Dose of Diamond, Graphite, and Graphene Oxide Nanoparticles After Multiple Intraperitoneal Injections in Rats. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10*, 398.
22. Jastrzębska, A.M.; Kurtycz, P.; Olszyna, A.R. Recent advances in graphene family materials toxicity investigations. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14*.
23. Yang, L.; Xie, X.; Tu, Z.; Fu, J.; Xu, D.; Zhou, Y. The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 255.
24. Chen, Y.; Wang, J.; Liu, C.; Su, L.; Zhang, D.; Fan, J.; Yang, Y.; Xiao, M.; Xie, J.; Xu, Y.; et al. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. *Mol. Med.* **2020**, *26*, 97.
25. Long, B.; Carius, B.M.; Chavez, S.; Liang, S.Y.; Brady, W.J.; Koyfinan, A.; Gottlieb, M. Clinical update on COVID-19 for the emergency clinician: Presentation and evaluation. *Am. J. Emerg. Med.* **2022**, *54*, 46–57.
26. Suh, J.; Amato, A.A. Neuromuscular complications of coronavirus disease-19. *Curr. Opin. Neurol.* **2021**, *34*, 669–674.
27. Hikmet, F.; Méar, L.; Edvinsson, Å.; Micke, P.; Uhlén, M.; Lindskog, C. The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Mol. Syst. Biol.* **2020**, *16*, e9610.
28. Frontera, W.R.; Ochala, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif. Tissue Int.* **2015**, *96*, 183–195.

10. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

Article

Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction

Jaśmina Bałaban ¹, Mateusz Wierzbicki ¹, Marlena Zielińska ¹, Jarosław Szczepaniak ¹, Malwina Sosnowska ¹, Karolina Daniluk ¹, Dominik Cysewski ², Piotr Koczon ³, André Chwalibog ^{4,*} and Ewa Sawosz ¹

¹ Department of Nanobiotechnology and Experimental Ecology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; jasmina_balaban@sggw.pl (J.B.); mateusz_wierzbicki@sggw.pl (M.W.); marlena_zielinska_gorska@sggw.pl (M.Z.); jaroslaw_szczepaniak@sggw.pl (J.S.); malwina_sosnowska@sggw.pl (M.S.); karolina_daniluk@sggw.pl (K.D.); ewa_sawosz@sggw.pl (E.S.)

² Spectrometry Laboratory, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Science, 02-106 Warsaw, Poland; dominikcysewski@gmail.com

³ Department of Chemistry, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; piotr_koczon@sggw.pl

⁴ Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Copenhagen, 1870 Frederiksberg, Denmark

* Correspondence: ach@sund.ku.dk

Received: 14 March 2020; Accepted: 22 April 2020; Published: 23 April 2020



Abstract: Finding an effective muscle regeneration technique is a priority for regenerative medicine. It is known that the key factors determining tissue formation include cells, capable of proliferating and/or differentiating, a niche (surface) allowing their colonization and growth factors. The interaction between these factors, especially between the surface of the artificial niche and growth factors, is not entirely clear. Moreover, it seems that the use of a complex of complementary growth factors instead of a few strictly defined ones could increase the effectiveness of tissue maturation, including muscle tissue. In this study, we evaluated whether graphene oxide (GO) nanofilm, chicken embryo muscle extract (CEME), and GO combined with CEME would affect the differentiation and functional maturation of muscle precursor cells, as well as the ability to spontaneously contract a pseudo-tissue muscle. CEME was extracted on day 18 of embryogenesis. Muscle cells obtained from an 8-day-old chicken embryo limb bud were treated with GO and CEME. Cell morphology and differentiation were observed using different microscopy methods. Cytotoxicity and viability of cells were measured by lactate dehydrogenase and Vybrant Cell Proliferation assays. Gene expression of myogenic regulatory genes was measured by Real-Time PCR. Our results demonstrate that CEME, independent of the culture surface, was the main factor influencing the intense differentiation of muscle progenitor cells. The present results, for the first time, clearly demonstrated that the cultured tissue-like structure was capable of inducing contractions without externally applied impulses. It has been indicated that a small amount of CEME in media (about 1%) allows the culture of pseudo-tissue muscle capable of spontaneous contraction. The study showed that the graphene oxide may be used as a niche for differentiating muscle cells, but the decisive influence on the maturation of muscle tissue, especially muscle contractions, depends on the complexity of the applied growth factors.

Keywords: graphene oxide; in vitro; muscle contraction; myotube formation; tissue extract

1. Introduction

Tissue engineering is hugely challenging but offers hope for better therapeutic processes after traumatic muscle injury, tumor ablation, or muscle disease [1]. There is a pressing need within regenerative medicine to find an effective muscle regeneration technique. Stem cells, growth factors, and artificial niches are recognized as fundamental elements for tissue engineering [2]. The interaction between these factors is not entirely clear. Furthermore, the use of a complex of complementary growth factors instead of a few strictly defined ones could increase the effectiveness of muscle tissue maturation. In our research, we used chicken embryo muscle precursor cells; chicken embryo muscle extract (CEME), containing a cocktail of growth factors; and graphene oxide (GO) nanofilm as a potential niche.

1.1. Muscle Precursor Cells

Skeletal muscles are derived from somites, which are formed from the mesoderm. Somites give rise to the dermomyotome, myotome, and sclerotome [3]. The cells with myogenic potential are known as myoblasts, and after they exit the cell cycle, a multinucleated myotube and myofiber form by fusion [4]. The process of progenitor muscle cell differentiation is controlled by myogenic regulatory factors (MRFs)—a group of transcription factors comprising Myf5, MyoD, MyoG, and MRF4. MRFs create a network of auto- and cross-regulatory interactions between factors, which modulate expression levels [5]. With the exception of Myf5, each factor can individually activate the differentiation of muscle progenitor cells [6], while Myf5 and MyoD regulate cell proliferation. MyoD is also associated with the promotion of the myogenic determination process, whereas MyoG is crucial for the terminal maturation of myoblasts, and inhibition of MyoG expression results in a loss of skeletal muscle [7]. The paired-box transcription factors, Pax3 and Pax7, play an important role in early myogenesis, and are specific for dermomyotome-derived muscle progenitor cells [8,9]. After activation of MRFs, Pax3 expression is downregulated [10]. Expression of Pax7 is also distinctive for muscle satellite cells in mature tissue [11].

1.2. Growth Factors

Tissue and embryo extracts have been commonly used in cell cultures in vitro. Skeletal muscle extract applied to a motoneuron culture enhanced cell survival [12,13] and induced differentiation in vitro [14]. Extracts from a chicken embryo and chicken embryo eye ensured the survival of embryo ciliary ganglionic neurons [15]. Chicken embryo extract is widely used as a growth-promoting factor, as it enhances the proliferation of myogenic cells and affects the timing of the final differentiation [16–18]. It can, therefore, be assumed that the composition of growth factors contained in the muscle of the embryo, just before hatching, when the body focuses on the preparation of the musculoskeletal system (leg muscles) for intensive work after hatching, will contain a set of proteins necessary to activate spontaneous contractions. In the culture of muscle cells, natural substances that stimulate proliferation or differentiation, such as horse serum [19] or whole embryo extract [16–18,20], are used, but the extract from the embryo muscle taken at the end of embryogenesis has not been previously used in muscle cell culture.

1.3. Niches

Carbon-based nanomaterials are promising substrates for reinforcing artificial niches and mimicking native muscle extracellular matrix [21]. The presence of oxygen-containing groups on the carbon sheet surface makes GO a non-toxic and biocompatible material [22]. However, the other physicochemical features of GO can significantly modify its biocompatibility [23,24]. In our studies on rats, we documented the lack of toxicity of high doses of GO administered into the peritoneum [25,26]. Other authors, although they demonstrated the location of GO in various tissues, especially in the lungs, nevertheless, pointed to its relative biocompatibility [27].

Moreover, the physical properties of GO, such as its roughness, surface topography, thickness, elasticity, and hydrophilicity, can modulate cell behavior and the differentiation process via mechanical or chemical signaling [28]. Thus, GO can provide authentic extra-cellular stimuli for muscle progenitor cells. However, this requires GO is kept outside of the cell as part of the matrix.

Many studies have demonstrated the effects of GO on proliferation, adhesion, and the differentiation of various types of cells [29]. GO enhances the expression of the gene involved in cardiomyogenic differentiation of human embryonic stem cells *in vitro* [30]. The application of the GO complex with a conductive polymer improved neural cell *in vitro* differentiation [31]. GO implanted together with chitosan or polylactic acid scaffold were an excellent, biocompatible matrix for bone mineralization in the process of their regeneration [32,33]. *In vivo* studies with the nanocomposite containing 1% GO, introduced as a subcutaneous implant to rats, it was biocompatible, and interestingly, exhibited antibacterial properties [34].

GO encapsulated in alginate increased the viability of C2C12 cells [35]. A combination of peptide-decorated polylactic glycolic acid (PLGA) nanofibers and GO stimulated the differentiation of C2C12 cells [36], and a nanocomposite of polycaprolactone (PCL) with GO promoted adhesion and proliferation. Fibroblasts cultured on GO film showed different expression profiles for a focal adhesion protein, indicating a high affinity of the cells to the GO substrate [37]. A study with a gelatin-GO nanocomposite demonstrated an improvement in the differentiation process in C2C12 cells by scaffold-cell interactions only [38], and a similar result was obtained with a PCL-GO scaffold [39].

The aim of this study was to determine whether the use of muscle extract obtained from chicken embryos prior to hatching would affect the differentiation and functional maturation of muscle precursor cells and the ability of potential pseudo-tissue muscle to spontaneously contract. The study used two types of surfaces to perform *in vitro* culture: standard polystyrene culture plates and plates covered with GO nanofilm, mimicking a biocompatible niche.

2. Results

2.1. GO Characterization

GO was purchased in the form of an aqueous solution with high stability, a dark brown color, and a concentration of 4 mg/mL. No tendency for GO to agglomerate or precipitate was observed after 6 months. The zeta potential of GO suspended in water at a concentration of 1 mg/mL was 27.1 mV. Transmission Electron Microscopy (TEM) imaging was used to assess the morphology of the flakes of GO (Figure 1A). After drying, GO formed flakes one to three layers thick and 2 to 4 μm in size.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) analysis revealed a broad, very intense, structured band that was located at 3457 cm^{-1} with shoulder maximum at 3217 cm^{-1} in the graphene IR spectrum. There were two bands generated by C-H stretching at 2817 and 2779 cm^{-1} . The region at $1800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ contained two distinct bands generated by C=O stretching (1728 cm^{-1}) and C=C ring stretching (1621 cm^{-1}). Bending vibrations generally located at a lower energy in the fingerprint spectral region were at 1367 and 1061 cm^{-1} (Figure 1B).

2.2. GO Nanofilm Characterization

An aqueous GO solution with a concentration of 1 mg/mL was used to prepare the nanofilm for *in vitro* studies. Atomic Force Microscopy (AFM) analysis of GO as a nanofilm on the bottom of a culture-plate well was performed. Numerous sharp peaks were present on the surface of the culture plate (Figure 2A). GO nanofilm caused a decrease in the average roughness of the culture plate surface. The average roughness of GO nanofilm was 1.5 to 2.1 nm, whereas the roughness of the standard polystyrene culture plate was 7.2 nm. The topography of the nanofilm was irregular and crested (Figure 2B). The surface coated with GO nanofilm was more aligned and the peaks were rounded and less jagged compared to the surface of the culture plate.

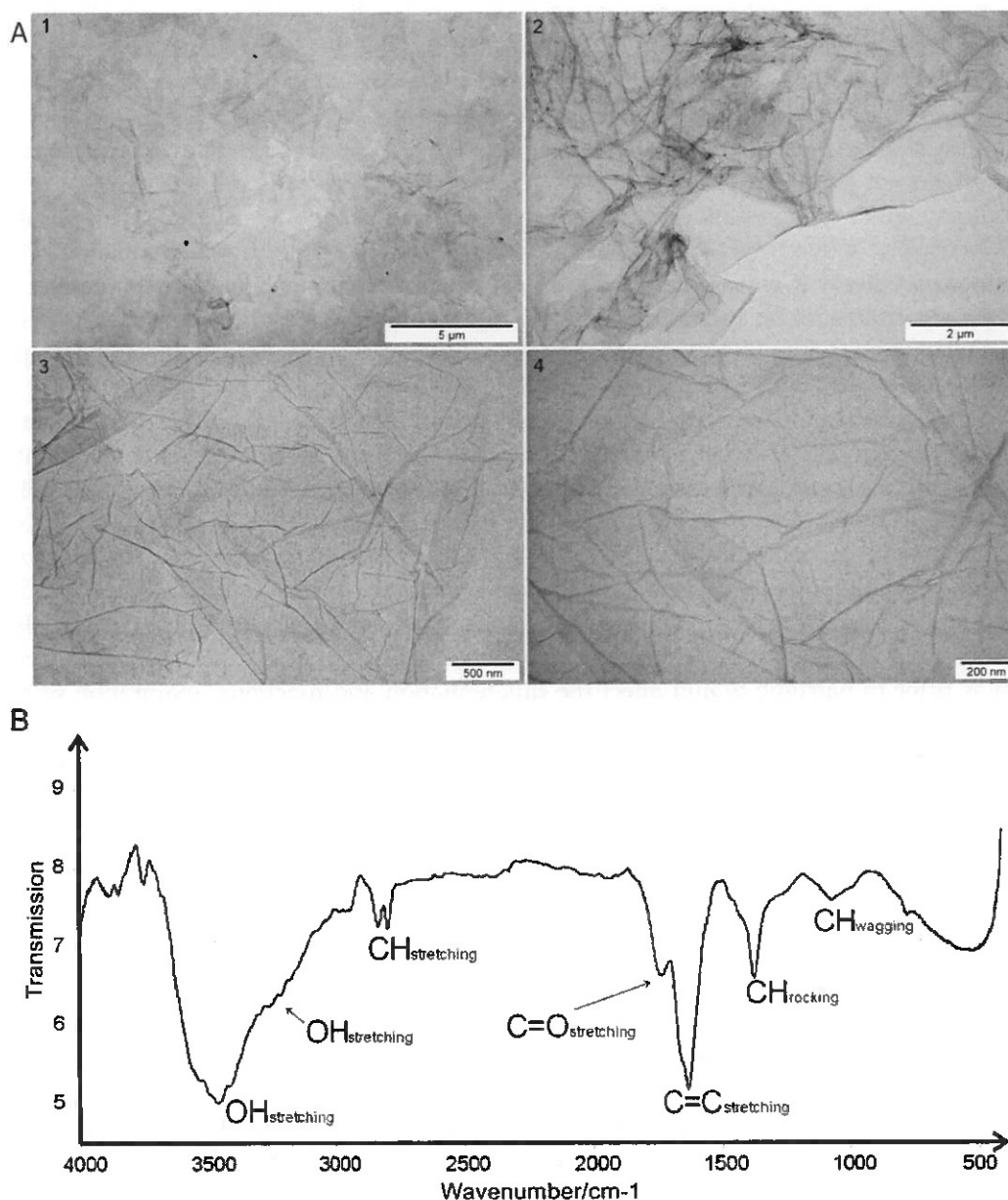


Figure 1. (A) Transmission electron microscopic images of graphene oxide flakes at increasing magnification: 1) 5,000, 2) 8,500, 3) 34,000, 4) 70,000; (B) Fourier Transform Infrared Spectroscopic spectrum of graphene oxide with the assignment of bands to appropriate vibrations of groups and bonds present in the sample.

2.3. Chicken Embryo Muscle Extract Analysis

The mass spectrometry analysis of muscle samples identified 1470 proteins and 6893 unique peptides (Table S2), which are available in the PRIDE repository under PXD015146. In preliminary studies, which allowed the emergence of spectacular pro-contraction activity of CEME, various substances and extracts were studied, which were a cocktail of growth factors, including horse serum, embryo brain extract, embryo extract, or liver extract. The spontaneous contraction was observed only under the influence of CEME, none of the mentioned substances had the effect on contractions of embryonic muscle cells. Consequently, further morphological and molecular studies were conducted using a functionally effective factor, which CEME proved to be.

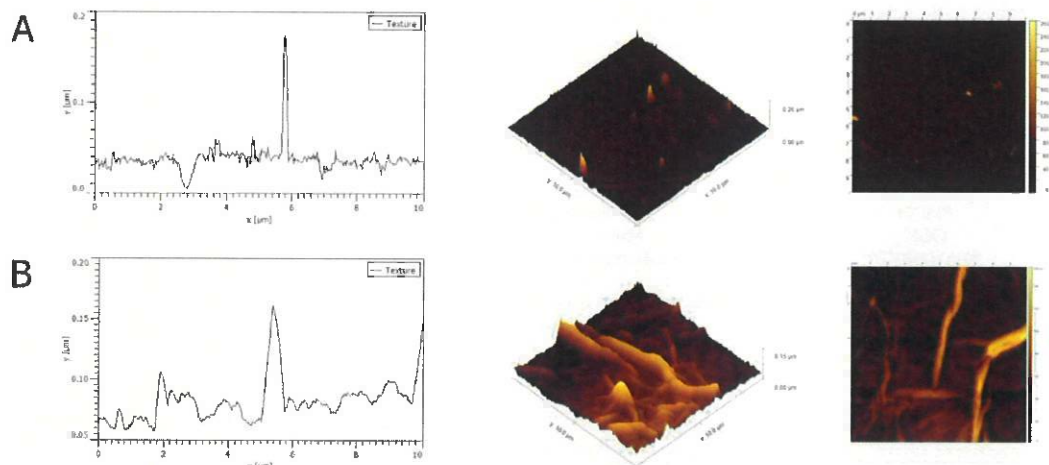


Figure 2. Atomic Force Microscopy (AFM) images and a topography model of the surface of a culture plate (A) and graphene oxide nanofilm (B).

However, in order to identify the potential proteins responsible for muscle cell contraction, the proteins common to CEME and liver extract were rejected, resulting in the number of 249 protein candidates for top proteins in the muscle cell contraction process. Table 1 presents 59 selected top proteins associated with muscle contractions to the greatest extent.

Proteins specific only for CEME were selected and grouped according to the relationship of their function to extracellular matrix (ECM) components, cell structure and communication, and contraction phenomenon and enzymes related to muscle cell energy metabolism (Table 1). These proteins were selected as potential stimulators of muscle progenitor cell differentiation and maturation.

2.4. Assessment of Proper Concentration of Chicken Embryo Muscle Extract Supplement for *in Vitro* Experiment

To assess the optimum concentration of extract added to the culture media, a Trypan Blue assay was performed. The number of live cells after 48 h of culture with different concentrations of extract (5%, 2.5%, and 1%) was measured. In the control group, the viability was 75.5%. In the group with 5% extract, the viability was 42%. A decrease in the concentration of extract resulted in increased the live cell count. In the groups with 2.5% and 1% extract addition to the culture media, cell viabilities of 62% and 82.5% were observed, respectively. The viability of cells with 1% supplementation of CEME was the highest. Consequently, in further experiments 1% CEME addition was applied.

2.5. Cell Morphology

The microscopic images of the experimental cultured cells show several morphological changes compared to the control group (Figure 3). Cells cultured on the GO nanofilm were strongly attached to the substrate; they were more stretched and flatter with numerous filopodia (Figure 3C, [GO]), and the cell surfaces were gently corrugated. Cells cultured with the extract formed several dense layers, and there were numerous long, branched, multinucleated myotubes at the top (Figure 3A, [CEME]). The myotubes were positioned in an unorganized manner, crossing at various angles (Figure 3A, [CEME]). Myotubes were often longer than 1000 μm and were 10–20 μm wide. Fluorescent images revealed the striated structure of the myotubes and confirmed the presence of multinucleated muscle cells (Figure 4A, [CEME]). Fusion index increased significantly in cultures with CEME supplementation, compared to that in the control group (Figure 4B). The combination of the GO nanofilm with the extract induced the presence of an undifferentiated multilayer of cells with multinucleated myotubes on the top. The myotubes on GO nanofilms were positioned in a more organized manner (Figure 3A, [GO]).

Table 1. Selected top proteins (59) from chicken embryo muscle extract specific for muscle cell activity.

Gene Name	Protein Name	Molecular Weight [kDa]
Extracellular matrix component		
DCN	Decorin	61.2
LAMB1	Laminin subunit beta-1	59.4
COL6A2	Collagen alpha-2 (VI) chain	58.7
A0A1D5PME9	Leucine rich repeat containing 15	50.3
FMOD	Fibromodulin	44.7
OGN	Mimecan/Osteoglycin	42.8
A0A1D5PVT6	Collagen type XI alpha 1 chain	36.4
LMNB1	Lamin-B1	31.6
PLOD1	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	22.0
COL1A1	Collagen alpha-1 (I) chain	16.1
COL6A3	Collagen alpha-3 (VI) chain	14.6
LOC107050758	Collagen alpha-1 (II) chain	13.1
COL14A1	Collagen alpha-1 (XIV) chain	11.2
LAMB1	Laminin subunit beta-1	10.4
Cell structure and communication		
PXN	Paxillin	66.6
P09652	Tubulin beta-4 chain	61.7
PTK7	Inactive tyrosine-protein	53.7
MAPT	Microtubule-associated protein	51.3
CRYAB	Alpha-crystallin B chain	50.3
MAPRE2	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	41.7
CDH13	Cadherin-13	40.4
COTL1	ADF actin binding protein	36.9
DMD	Dystrophin	24.1
ZYX	Zyxin	20.5
WIPF1	WAS/WASL interacting protein family member 1	18.8
CTNNA2	Catenin alpha-2	18.4
	Tubulin alpha chain	13.0
NHLRC2	NHL repeat-containing protein 2	12.4
CAP2	Adenylyl cyclase-associated protein	11.7
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	11.7
SPTB	Spectrin beta chain	10.4
JUP	Plakoglobin	9.92
DBN1	Drebrin	9.37
ACTN2	Alpha-actinin-2	8.02
Contractile apparatus		
MYL3	Myosin light chain	62.2
CALD1	Caldesmon	61.4
CAMK2D	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta chain	55.3
CNN3	Calponin	51.3
MYLK	Myosin light chain kinase, smooth muscle	40.5
MYLFP	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	37.0
TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	20.7
CASQ2	Calsequestrin	19.5
TNNC2	Troponin C, skeletal muscle	19.3
MYH1B	Myosin-1B	11.4
Neural and neuromuscular communication		
NEFM	Neurofilament medium polypeptide	46.2
AGRN	Agrin	46.1
TXLNB	Beta-taxilin	31.8
FABP5	Fatty acid binding protein 5	23.4
GAP43	Neuromodulin	18.8
NCAM1	Neural cell adhesion molecule	15.1
Metabolism		
ATP5C1	ATP synthase subunit gamma	53.3
GMPR	GMP reductase	49.9
GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	45.5
PFKM	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	43.8
ADSSL1	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	43.6
CKM	Creatine kinase M-type	43.3
AMPD1	AMP deaminase	25.2
A0A1D5PIQ5	Mitogen-activated protein kinase	11.4
CKB	Creatine kinase B-type	5.62

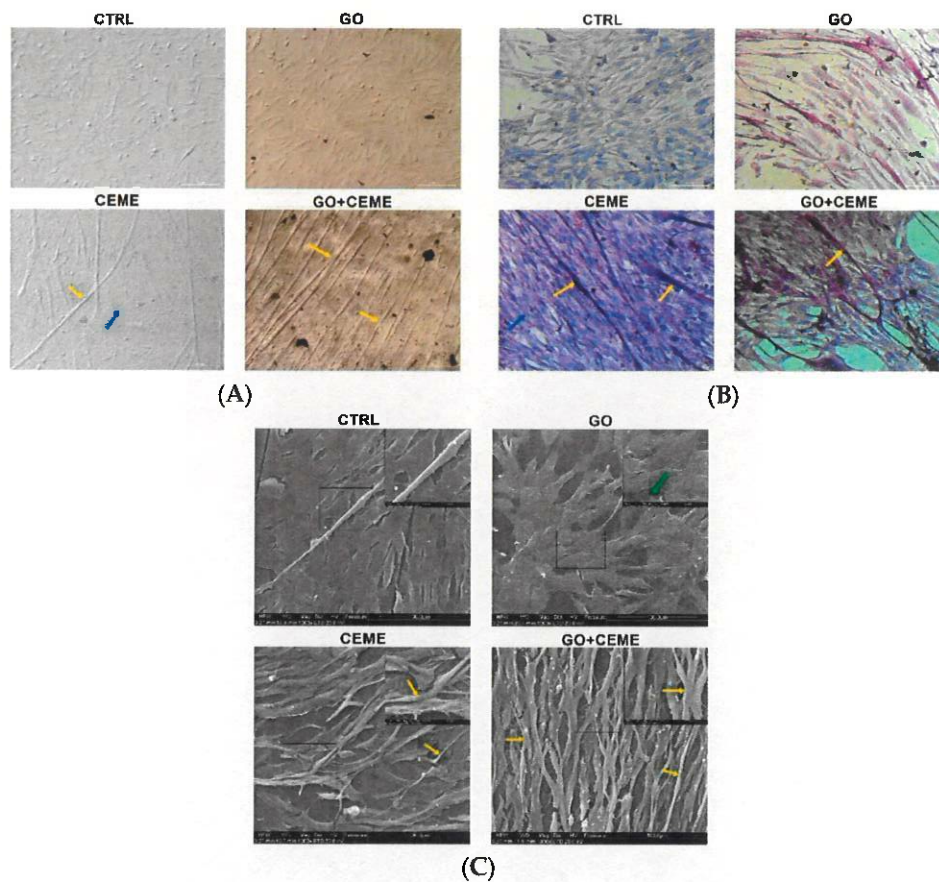


Figure 3. Cell morphology evaluated by optical microscopy (A,B) and scanning electron microscopy (C); the images show the control group (CTRL), cells cultured on graphene oxide nanofilm (GO), cells cultured with the addition of the extract (CEME), and cells cultured on GO nanofilm with addition of the extract (GO + CEME); cells were stained with eosin/hematoxylin for visualization of nucleic acids and proteins (B); myotubes (yellow arrows), filopodia (green arrow); multilayer of undifferentiated cells (blue arrows).

The key result was the spontaneous contraction activity of myotubes in the cultures with extract supplementation (Video S1). One to three contractions per minute were noted, an average of 1.7 contraction per minute. Rhythmic contractions of primary muscle fibers were observed under the influence of CEME, both in the group without the GO nanofilm as well as with the GO nanofilm. Moreover, there was no difference in contractions between the cells of the CEME and GO + CEME groups. There were no contractions in the control and GO groups. Thus, only the growth factor cocktail (CEME), not the substrate characteristics, generated the physiological activity of cells involved in myogenesis.

2.6. Cytotoxicity and Viability of Muscle Cells

To evaluate the cytotoxicity of GO nanofilm and the addition of the extract, the lactate dehydrogenase (LDH) assay was performed after 48 and 96 h of culture (Figure 5A,B). The test was based on the enzymatic reduction of NAD^+ by LDH released from damaged cells into the culture media. LDH levels reflect the integrity of the cell membrane. Compared to the control group, the presence of GO nanofilm slightly elevated LDH release from cells after 48 h of culture, but there were no significant differences after 96 h.

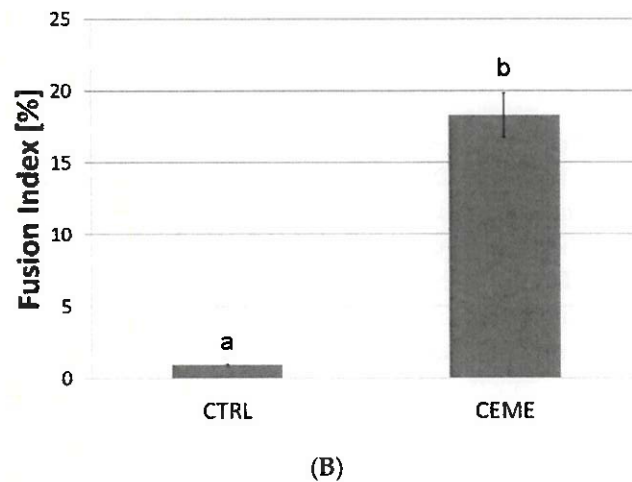
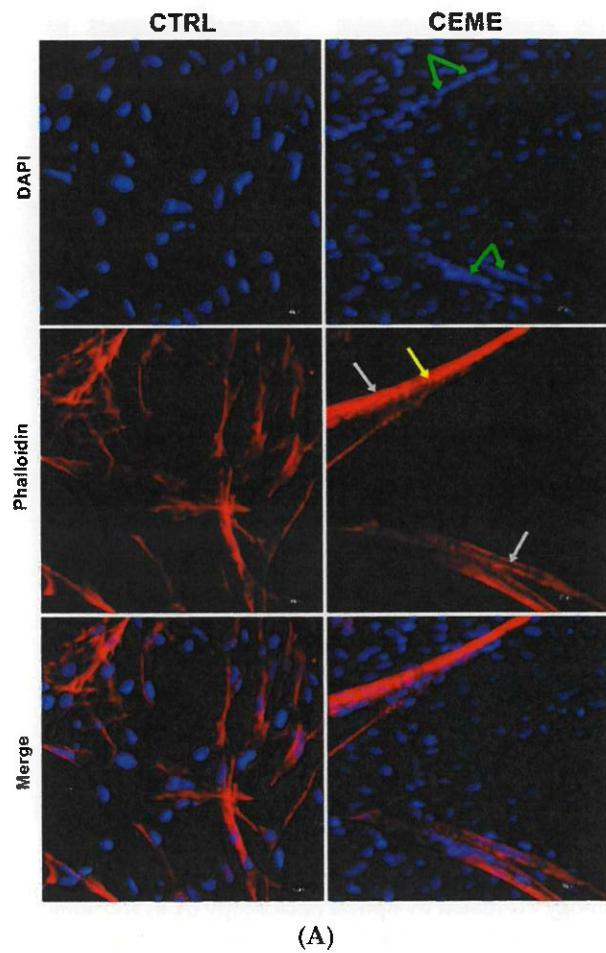


Figure 4. (A) Fluorescent images with labeled nuclei (blue) and actin (red) of cells after 5 days of culture: control group (CTRL); culture with chicken embryo muscle extract supplementation (CEME); nuclei in myotubes (green arrows), myotubes (grey arrows), striated sarcomeric structure (yellow arrow); quantitative analysis of the fusion index of the differentiating cells (B). The error bars represent standard deviations. Different letters (a, b) above the columns indicate statistically significant differences between the groups ($p \leq 0.05$).

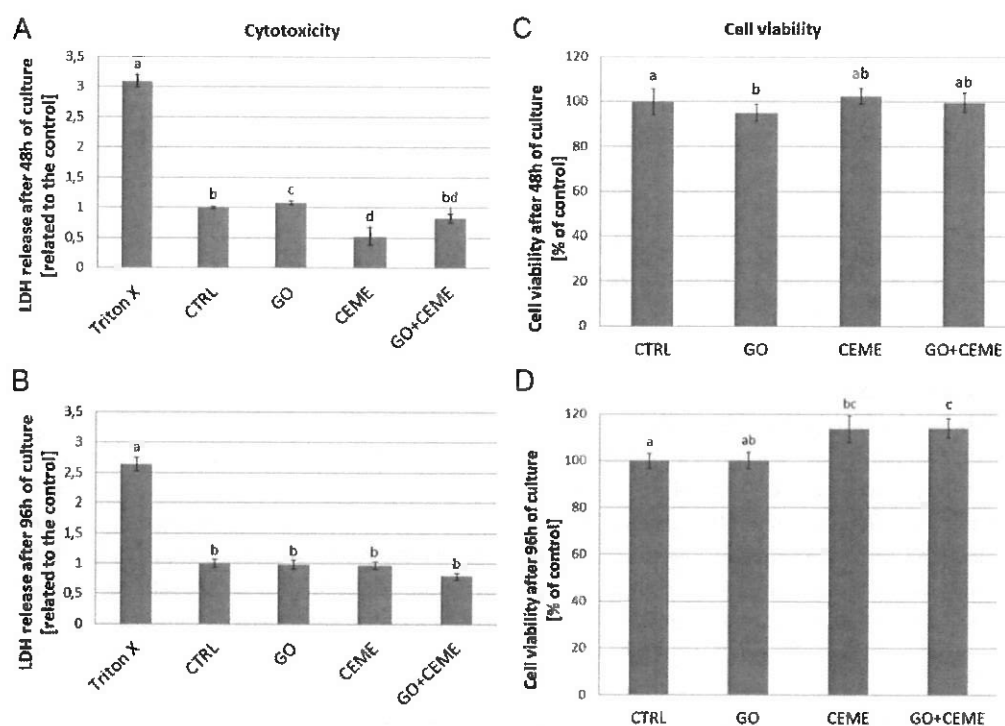


Figure 5. Lactate dehydrogenase (LDH) release (A,B) and cell viability (C,D) were determined using LDH and MTT assays, respectively. Tests were performed after 48 and 96 h of primary culture. Negative control for LDH maximum release (Triton X), control group (CTRL), cells cultured on graphene oxide nanofilm (GO), cells cultured with addition of the extract (CEME), and cells cultured on GO nanofilm with addition of the extract (GO + CEME). The error bars represent standard deviations. Different letters (a, b, c, d) above the columns indicate statistically significant differences between the groups ($p \leq 0.05$).

To compare the effect of GO nanofilm and CEME on cell viability, the ability of cells to reduce tetrazolium salt (MTT) and produce insoluble formazan crystals was tested. MTT reduction was measured after 48 and 96 h of culture (Figure 5C,D). Compared to the control group, GO nanofilm slightly affected cell viability but the differences were negligible.

2.7. Expression of Genes

Changes in gene expression at the mRNA level were examined using the Real-Time PCR method. Compared to the control group, GO nanofilm had no significant effect on the expression of genes related to basic metabolism and proliferation—*ATP5B*, *FGF2*, *LDH5*, and *PCNA*. The extract supplementation resulted in a significantly increased level of *ATP5B* gene expression, whereas *FGF2* and *LDH5* gene expression was downregulated in comparison to the control. *PCNA* gene expression was not influenced by any factor. The combined presence of the GO nanofilm and the CEME had a significant positive effect on *ATP5B* gene expression. *FGF2* and *LDH5* genes were downregulated in comparison to the control group, which is similar to the results obtained with the addition of extract only (Figure 6A).

Compared to the control group, the presence of GO nanofilm had no significant effect on expression at the mRNA level for all genes associated with the differentiation process—*Myf5*, *MyoD1*, *MyoG*, or *Pax3* and *Pax7* genes. The addition of extract to the culture media significantly increased the level of mRNA of *Myf5*, *MyoD1*, *MyoG*, *Pax3*, and *Pax7*. The expression profile of cells cultured on GO nanofilm with the addition of extract was also upregulated in all investigated genes; however, the fold change was lower than that in the extract-only group (Figure 6B).

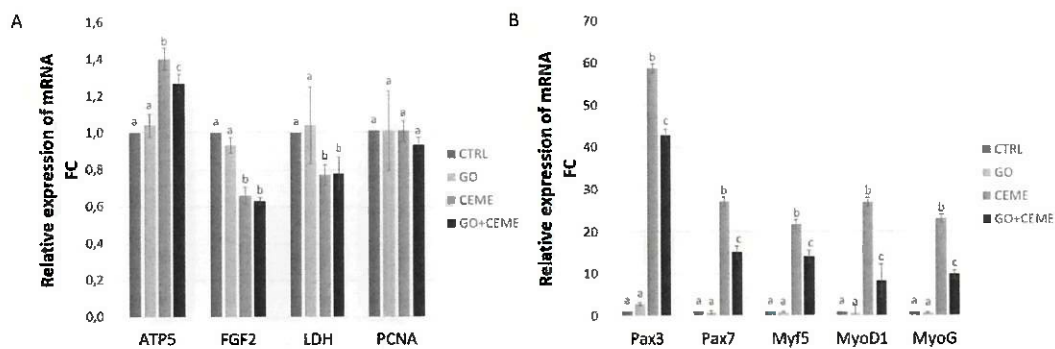


Figure 6. Real-Time PCR analysis of gene expression at the mRNA level in muscle progenitor cells from the chicken embryo after 5 days of primary culture. Expression of genes related to proliferation, basic metabolism (A), and muscle cells differentiation (B) was investigated; the figure shows the results for the control group (CTRL), cells cultured on GO nanofilm (GO), cells cultured with addition of the extract (CEME), and cells cultured on GO nanofilm and extract (GO + CEME); Relative expression was calculated using housekeeping genes, ACTB and GAPDH; the results are presented as $2^{-\Delta\Delta CT}$ values compared to the control group; different letters above the columns indicate statistically significant differences between the groups ($p \leq 0.05$). The error bars represent standard deviations.

3. Discussion

Physiologically fully mature muscle cells that form muscle-like tissue through muscle fiber cooperation should be capable of spontaneous contractions. Previous research has demonstrated that it is possible to create muscle-like tissue that is capable of twitching under the influence of externally applied electrical impulses [22,40,41]. The study presented here is the first to document the generation of in vitro muscle cell contraction using only selected growth and regulatory factors. Furthermore, we found that this effect did not depend on the physicochemical characteristics of the cell culture surface but solely on the availability of protein molecules, i.e., growth factors and their regulators. To verify our findings, we used two variables for in vitro culture: a differentiated surface and a differentiated medium.

The surface of the in vitro culture plate was modified by covering with a thin layer of GO. When the surface of the plate and the GO layer were compared, the GO layer presented a smoother surface with a lower density of wrinkles and moderate roughness [42]. However, the roughness of GO depends on many factors and is likely to be variable [43,44]. Using a thin layer of GO, the carbonaceous biocompatible material can be coated onto the surface of an in vitro culture vessel, and this has proven to be a reliable, repeatable, and sterile method.

In general, cells maintained on GO nanofilm exhibit normal muscle cell and muscle-cell precursor morphology. However, we observed more stretched and wrinkled cell surfaces and numerous protrusions, which could be related to the structure of the GO nanofilm [29] or to the surface chemistry.

A toxic effect and the reduction of proliferation of GO cultured cells were observed only after 48 h. After 96 h of incubation, no harmful effect on GO surface was observed. This phenomenon may have resulted from the interaction between cells and GO, and as a result of depositing on the GO surface proteins secreted by muscle precursor cells and by the optimization of the niche conducive to colonization. The lack of a negative GO effect on muscle and myogenic cells is also confirmed by other studies [39,44–47].

The presence of GO nanofilm in cell culture did not affect *LDH* or *ATP5B* gene expression at the mRNA level. These basic markers of metabolism, particularly oxygen and anaerobic metabolism, indicate that the GO nanofilm is neutral to muscle cells and precursors despite the presence of oxygen groups on the surface. However, in a study on the MFC-10A cancer cell line, the presence of PEG-modified GO nanosheets downregulated the expression of proteins involved in the oxidative phosphorylation, but this effect was not observed in non-cancerous cells [48]. Furthermore, our research

demonstrated that the presence of GO nanofilm has no effect on *MyoD1*, *Myf5*, *MyoG*, *Pax3*, and *Pax7* gene expression. Expression of these genes is an important determinant of myogenesis—the basic role of muscle cells and their precursors. This indicates that GO biological activity is probably influenced by the type of cells.

The second experimental factor was the modification of the culture medium. CEME was used as an additive to improve the standard medium (DMEM). We expected the extract from an 18-day-old chicken embryo hind limb to complement the stimulation of muscle progenitor cell differentiation and physiological maturation. This speculation was based on the fact that the extract contained proteins involved in the differentiation of muscle cells, which is at a very advanced stage on the 18th day of embryonic development. Furthermore, the extract contained proteins produced by muscle cells and their precursors, as well as all other cells present in the developing muscle tissue that cooperate with the muscle cells. The extract contained proteins involved in preparing the muscles for intense work, which must occur just before and immediately after hatching, and these proteins are released by muscle cells particularly [49]. In addition, muscle cells secrete hundreds of proteins and peptides upon contraction [50].

The addition of the extract strongly affected chicken muscle progenitor cell morphology. A significantly higher fusion index was noted. We observed elongated, multinucleated, branched, and striated myotubes, which exhibit spontaneous contractile activity, and these features are typical of differentiated cell morphology [29,51,52]. These results clearly show that the differentiation process occurred and that the addition of extract to the culture media led to the formation of a tissue-like structure of muscle cells and their precursors. However, the resulting myostructure exhibited two layers: *in vivo*-like muscle fibers and flat, round, mononuclear cells lining the bottom of the culture vessel. These cells probably had myogenic potential, as was seen when an undifferentiated subpopulation of cells was added to a primary culture of rat muscle cells [53].

The observation of cell morphology has been confirmed by cytotoxicity and viability results. The LDH release from cells did not decrease, while the addition of extract significantly increased the number of viable muscle cells and their precursors after 96 h of culture. This was also noted after treatment of a skeletal muscle cell culture with extract that was obtained from 12-day-old chicken embryo brain and liver [54]. In a muscle cell culture obtained from 10-, 11-, and 12-day-old chicken embryos, the addition of chicken embryo extract showed a stimulatory effect on proliferation and differentiation [17,55]. Moreover, the addition of chicken embryo extract in combination with high serum content in the culture media enhanced the proliferation and growth of murine myoblasts [56].

In cells maintained in culture media with CEME, *Pax7* expression was strongly upregulated. *Pax7* is a key factor in satellite cell myogenic determination. Deletion of the *Pax7* gene resulted in a significant decrease [57] or complete elimination of satellite cell populations [58], but inactivation of the *Pax7* gene did not affect adult myogenesis [48]. An analysis of the expression profile of *Pax3* and *Pax7* in rat muscle cells indicated that the level of *Pax7* gene expression decreased during the maturation of myoblasts and formation of myotubes, contrary to our observation that *Pax7* was stimulated in parallel with the up-regulation of the genes responsible for differentiation. In an experiment with rat muscle cells, a subpopulation of undifferentiating, proliferating cells with *Pax3* and *Pax7* expression was also observed [58]. This phenomenon could explain the high expression of *Pax3* and *Pax7*, which could be related to the dense multilayer of undifferentiated cells that were observed on the bottom of the culture plate and became a renewable source of differentiating myoblasts. This would explain the simultaneous and strong increase in the expression of genes responsible for the differentiation of muscle cells and their precursors into muscle fibers, together with the self-renewal of the pool of cells that are the early precursors of myocytes.

The addition of CEME to the culture media has a strong effect on MRFs expression. The results obtained in this study demonstrated that supplementation of the culture media with the extract enhanced the myogenic differentiation of chicken muscle progenitor cells. We observed a significant up-regulation of expression of all investigated MRFs (*Myf5*, *MyoD*, and *MyoG*) in cells maintained

in media with CEME. MRFs are critical factors in the maturation of muscle cells [59,60]. Moreover, the expression of *FGF2*, which is considered to be a stimulator of proliferation and a strong inhibitor of differentiation [61], was downregulated in cells cultured with the extract. From a molecular point of view, downregulation of FGF should be coupled with downregulation of Pax 7, however, in the case of heterogeneous culture, which is the primary culture of cells taken from the embryo muscle, expression of mRNA is a resultant expression of the sum of different cells. It should also be taken into account that the chicken embryo muscle undergoes very strong myogenesis just before hatching, but also it contains over 30% of satellite cells [52], whose proteome may promote the proliferation of satellite cells in the culture. Therefore, primary culture, which on the one hand, well reproduces the natural conditions of myogenesis, on the other hand, creates difficulties in interpreting the results. It can certainly be stated that a precise explanation of the above mechanisms requires wider and more precise research.

Differentiation of myoblast cells and their precursors into mature muscle fibers was also confirmed by the change in cellular metabolism from anaerobic processes to the predominance of oxidative phosphorylation. *LDH* gene expression decreased and *ATP5B* gene expression simultaneously increased in cells that were cultured with the extract. The results are in agreement with changes occurring in muscle cells during differentiation, when a high glycolytic state in the myoblasts transforms into intensive oxidative phosphorylation in mature muscle cells [62].

The morphology and molecular status of differentiating cells, as well as their metabolism profile, undoubtedly indicate the formation of a structure containing mature muscle cells under the influence of CEME proteins. However, equally important evidence for the physiological maturity of the structure is its ability to undergo spontaneous contractions. The present results, for the first time, clearly demonstrated that the cultured a tissue-like structure was capable of inducing contractions that were not caused by external factors.

Use of the embryonic muscle extract affected the physiological ability of the muscle cells to contract, regardless of the type of surface (with or without GO) used. The extract contained proteins derived from various muscle-related tissues, including nervous tissue, connective tissue, blood vessels, and blood, as well as various structural proteins, such as of the ECM, cytoplasm, contractile proteins, and neural structures and their regulators, e.g., metabolic enzymes. These proteins acted as agents to directly stimulate muscle contractions or as factors to indirectly create an optimal contraction environment.

ECM proteins, especially collagen alpha 1 and alpha 3, decorin, laminin, and fibromodulin, can affect ECM maturation and cooperation with muscle cells. Laminin controls the structural integrity of muscle tissue and the connection of the intracellular actin structure with ECM [63–65], and fibromodulin is a regulatory factor for myoblast differentiation [66].

The extract was also the source of many proteins responsible for ECM–cell–cytoskeleton interactions. Some proteins form important links with actin-containing filaments of the cytoskeleton [67,68]. However, it seems that the key proteins are those that directly participate in muscle contraction, i.e., motor proteins and their regulators (myosin light chain, myosin-1B, myosin regulatory light chain 2, myosin light chain kinase). Tropomyosin alpha-1 chain–actin-binding protein cooperates with troponin C and is involved in the contractile system of vertebrate striated muscles. Troponin C and tropomyosin form thin fibers, which act to bind Ca^{2+} during the contraction process [69]. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II with mitogen-activated protein kinase can activate myosin light chain kinase [67]. In addition, it can be assumed that the proteins responsible for the management of Ca ions during muscle contractions activate this process in vitro. Calsequestrin (a calcium-binding protein responsible for Ca homeostasis after muscle contraction) supports the storage of a large amount of Ca ions within the sarcoplasmic reticulum. Before birth, the levels of calsequestrin in the muscles increase rapidly [68], indicating that it also stimulates muscle physiological maturation.

Furthermore, CEME components are associated with the nervous system and neural/neuromuscular communication and could be the key to spontaneous muscle cell contraction in the absence of electrical impulses. A recent study revealed that neuromodulin (specific to the nervous system) is present in myoblasts, differentiating muscle cells, and mature muscle fibers [70].

Neural cell adhesion molecule is associated with the fusion of myoblasts, and its level increases during myoblast differentiation. Agrin is a protein critical to neuromuscular junction development and maintenance [71], and utrophin is present in neuromuscular and myotendinous junctions and vasculature [72]. The administration of proteins involved in the cooperation of muscle cells and nerves, especially signal induction, may have been important for the activation and duration of the contractions.

Muscle contractions also require energy; therefore, the proteins involved in ATP metabolism would, undoubtedly, facilitate contraction mechanisms. The presence of ATP synthase subunit gamma, responsible for producing ATP from ADP, is fundamental. In addition, creatine kinase (CK), which catalyzes the transfer of a phosphate group from phosphocreatine to ADP to regenerate ATP, is a key enzyme for cellular ATP homeostasis. Interestingly, the CEME provided a source of both muscle- and brain-specific forms of CK.

Finally, it has to be underlined that the present measurements elucidated the potential effects of a variety of proteins and cells from CEME cultivated on GO surface, thereby including interactions in-between released proteins. However, a further step is necessary to identify groups of key proteins directly affecting tissue development by interacting in a heterogeneous environment of muscle tissue. This quantification might help to develop the solutions for future clinical therapy.

4. Materials and Methods

4.1. Characterization of Graphene Oxide and Preparation of a Graphene Oxide Nanofilm

GO water solution (4 mg/mL) was purchased from NanoPoz (Poznań, Poland), and GO was produced by a modified Hummers' method. The obtained GO flakes had diameters of between 2 and 30 μm , an average size of $\sim 4 \mu\text{m}$, and contained 36% oxygen (manufacturer's data). Chemical characterization of GO was performed with FT-IR. Spectra were registered with the use of a Perkin Elmer System 2000. The roughness of GO was measured by AFM, and imaging was performed on an MFP 3D BioAFM with the commercial triangular cantilever (MPLCT, Bruker, Camarillo, CA, USA), spring constant $k = 0.10 \text{ N/m}$ in AC mode. The measurements were performed on $10 \times 10 \mu\text{m}$ areas, in ten places. The shape and size of GO films were examined using a TEM - JEM-1220 (JEOL, Tokyo, Japan) at 80 kV and a TEM CCD Morada 11 megapixels camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Munster, Germany). The zeta potential and size of GO in solution were measured by light scattering using a ZetaSizer Nano ZS model ZEN3500 (Malvern Instruments, Malvern, UK). All measurements were repeated three times.

Experimental GO nanofilm was prepared by applying a GO solution to the bottom of a well in a culture plate. GO was air dried in a laminar chamber. For nanofilm preparation, a concentration of 1 mg/mL was used. The GO solution was sonicated for 30 min before the experiment. Then, under sterile conditions, the GO solution was embedded onto the bottom of the culture plate (40 μg) and dried at room temperature in a laminar chamber. As a result of the self-assembly and drying process, the plastic bottom of the well was covered with a thin, strongly adhesive nanofilm of GO. The prepared plates were used for further experiments.

4.2. Chicken Embryo Muscle Extract Preparation

Fertilized chicken (Ross 308) eggs were purchased from a certificated hatchery, sterilized in KMnO_4 solution, irradiated with UV for 45 sec, and incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ and $\sim 60\%$ relative humidity. The tissue sample was obtained from an 18-day-old chicken embryo. The egg was removed from the incubator and slightly opened, and the embryo was pulled from the egg and decapitated. Then the explant from the hind limb was dissected, and the skin, bones, and shank were removed from the muscle tissue sample. A sample was then suspended in ultrapure water and homogenized with frozen metal balls in a TissueLyser ball mill (Qiagen, New York, NY, USA). The homogenate was centrifuged at $1400 \times g$ for 45 min at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. The supernatant was transferred into a new tube and stored

at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. In order to reject the proteins contained in CEME, which are not involved in the activation of muscle contraction, an extract of chicken embryo liver was also prepared according to the method described above.

The protein composition of the extract was analyzed by mass spectrometry (MS) using an Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, MA, USA) connected to a Water Acquity HPLC. Protein extract (150 μL) was concentrated on Vivacon 500, 10,000 MWCO Hydrosart filters by centrifuging at $10,000\times g$ for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Filters were washed twice with washing buffer (200 μL , 8 M urea in 100 mM NH_4HCO_3 aqueous solution) and centrifuged at $10,000\times g$ for 20 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Accordingly, the proteins were reduced by the addition of washing buffer (50 μL) with 20 mM TCEP and incubated for 30 min at room temperature, then centrifuged at $10,000\times g$ for 20 min at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Proteins were alkylated with 20 mM IAA (50 μL) in washing buffer. Digestion was performed with a protease mix, LysC/Tryp V507A (Promega, Wisconsin, WI, USA). The protease mix was resuspended in 8M urea in 100 mM NH_4HCO_3 (80 μL). A 40 μL aliquot of the solution was added to a filter and incubated for 3 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; then NH_4HCO_3 (400 μL) was added and the samples were incubated overnight at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Probes were centrifuged at $10,000\times g$ for 30 min at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. NH_4HCO_3 (100 μL) was added and centrifuged at $10,000\times g$ for 30 min at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. The solution was acidified with TFA to a final concentration of 0.4% and dried with a speed-vac. The peptide mixture was fractionated using a high pH protocol on an Oasis HLB 10 mg cartridge (Waters 186000383). Cartridges were activated by washing with methanol and equilibrated with 25 mM ammonium formate at pH 10. The protein pellet was resuspended in 400 μL of 25 mM ammonium formate at pH 10 and loaded onto a cartridge. Samples were washed once with loading buffer. The elution was carried out with an increasing gradient of acetonitrile in loading buffer (5/10/15/20/30/35/40/85). The last elution was carried out with pure methanol. All fractions were dried with a speed-vac. Pellets were resuspended in 60 μL of 0.1% TFA with 2% MeCN. MS analysis was performed by LC-MS in the Laboratory of Mass Spectrometry (IBB PAS, Warsaw) [73]. Data were analyzed on the Max-Quant 1.6.3.4 platform [74,75]. The *Gallus gallus* reference proteome database from UniProt (containing 29474 protein IDs) was used. Data were deposited in the PRIDE repository under PXD015146. To analyze the function of the proteins contained in CEME, the composition of CEME proteins and the composition of liver extract proteins were compared, and then for further interpretation, all proteins common to CEME and liver extract were rejected from the CEME proteome. In this way, proteins that were not involved in the activation of contraction were eliminated, and only those that were potentially responsible for muscle contraction were left. This procedure was authorized by a preliminary study, where the lack of effect of the liver extract on muscle cell contraction was documented.

4.3. Primary Cell Cultures of Muscle Progenitor Cells

Fertilized chicken (Ross 308) eggs were incubated in accordance with the method described in the section “Chicken embryo muscle extract preparation”. Mesenchymal muscle precursor cells were obtained from an 8-day-old chicken embryo limb bud by dissection of the hind limb. The sample was inserted into tubes with trypsin for 24 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The enzyme was then neutralized with culture medium, the sample was disintegrated by gentle pipetting through the tips, and cells were seeded onto a culture plate. Cells were maintained in Dulbecco’s Modified Eagle’s medium (DMEM) (Life Technologies, Texas, TX, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Texas, TX, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies, Texas, TX, USA) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a humidified atmosphere of 5% CO_2 /95% air in a Memmert ICO150med Incubator (Mettler, Schwabach, Germany). Cells were divided into four groups and cultured in standard conditions (CTRL), on the GO nanofilm (GO), with the addition of extract (1% of the medium) (E), and on the GO nanofilm with the addition of extract (1% of the medium) (GO-E). Passages were not performed for the experimental primary cell cultures. The medium was changed every 2 days.

The actual concentration of CEME added to the culture media was evaluated using Trypan Blue assay (NanoEnTek, Massachusetts, MA, USA). Cells were maintained with 5, 2.5, and 1% CEME

supplementation in standard DMEM. After 48 h of exposure to CEME, cells were detached with trypsin. Then a suspension of cells in DMEM (10 μ L) was mixed with trypan blue solution (10 μ L). A mixture of cells and stain (10 μ L) was placed onto a cell counting slide and the total and live cell counts were evaluated using an EVETM automatic cell counter (NanoEnTek, Massachusetts, MA, USA). The results were compared to the control group that was maintained without the addition of CEME.

4.4. Cell Morphology

Cell morphology was observed and recorded using a light optical inverted microscope (TL-LED, Leica Microsystems, Germany) and a Scanning Electron Microscope (SEM) (Quanta 200, FEI, Oregon, OR, USA). Cells were fixed in ice cold methanol for 10 min at 4 °C and stained with eosin/hematoxylin. For SEM imaging, cells were fixed after 5 days of primary cell culture with 2.5% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) (Life Technologies, Texas, TX, USA). The samples were contrasted with osmium tetroxide (Sigma-Aldrich, Missouri, MO, USA) and carbohydrazide (Sigma-Aldrich, Missouri, MO, USA). The cells were then dehydrated in hexylene glycol (Sigma-Aldrich, Missouri, MO, USA); drying was performed using a Polaron CPD 750I critical point dryer (Quorum Technologies, Laughton, UK).

The spontaneous contractions of muscle cells were observed and counted manually from randomly selected visual fields ($n = 10$) in real time ($t = 1$ min each series) using a light optical inverted microscope (TL-LED, Leica Microsystems, Germany). Time-lapse of contractions were performed on a confocal microscope (Olympus FV1000, Tokyo, Japan) with Nomarski contrast. Frames were captured every 6 s for 15 min. Supplementary Video S1 was speeded up 300 times.

4.5. Cell Differentiation

The differentiation of cells was evaluated using a confocal microscope (Olympus FV1000, Tokyo, Japan). For imaging, cells were fixed after 5 days of culture using 4% paraformaldehyde in PBS (Life Technologies, Texas, TX, USA) for 10 min at room temperature and washed with ice-cold PBS. Then cells were incubated in Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Missouri, MO, USA) and washed with PBS (Sigma-Aldrich, Missouri, MO, USA). Subsequently, cells were incubated with blocking solution, i.e., normal goat serum (Chemicon International, California, CA, USA). Cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, MA, USA) and actin filaments with phalloidin-Atto 633 (Sigma-Aldrich, Missouri, MO, USA). After staining, the cells were washed with PBS. The fusion index was calculated for the control group and cells with CEME supplementation from randomly selected visual fields ($n = 7$) and presented as the number of nuclei in the multinucleated myotubes divided by the total number of nuclei. The nuclei were counted manually.

4.6. LDH Assay

Cytotoxicity was evaluated using Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) after 48 and 96 h of primary cell culture. For the GO and GO-E groups, 40 μ L of GO solution was dropped onto the bottom of the wells of 96-well microplates, dried, and incubated for 24 h with DMEM before starting cell culture. Cells were cultured in 96-well plates (approximately 10×10^3 cells per well for a test after 48 h, and 5×10^3 cells per well for a test after 96 h). The assay was performed according to the manufacturer's protocol. The absorbance of samples ($n = 8$) was measured at 450 nm using a Tecan Infinite 200 microplate reader (Tecan, Durham, NC, USA). The results were expressed as a relative value (related to the control) after subtracting the absorbance from blank samples.

4.7. MTT Assay

Viability and proliferation were tested with a Vybrant Cell Proliferation Assay Kit (MTT) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, MA, USA) after 48 and 96 h of primary cell culture. For the GO and GO-E groups, 40 μ L of GO solution was dropped onto the bottom of the wells of 96-well microplates, dried, and incubated for 24 h with DMEM before starting cell culture. Cells were cultured in 96-well

plates (as described above). MTT reagent (10 μ L) was added to each well and incubated for 3 h at 37 °C. Next, lysis buffer (containing Isopropanol, Triton X, and HCl) was added to each well (100 μ L). Culture plates were centrifuged, and the supernatant was transferred to new 96-well plates. The absorbance of samples ($n = 8$) was measured using Tecan Infinite 200 plate reader (Tecan, North Carolina, ND, USA) at 570 nm, according to the manufacturer's protocol.

4.8. Gene Expression

Gene expression at the mRNA level was measured using the quantitative polymerase chain reaction method. The expression of *ATP5B*, *FGF2*, *LDH5*, *PCNA*, *Myf5*, *MyoD1*, *MyoG*, *Pax3*, and *Pax7* was examined, for calculations the *GAPDH* and *ACTB* housekeeping genes were used. All used primers are presented in Table 2. After 5 days of primary cell culture, cells were detached with trypsin and centrifuged at 1 200 rpm for 5 min. The cell pellet was homogenized using a TissueLyser ball mill (Qiagen, Germantown, IL, USA). Total RNA was isolated using a NucleoSpin (Marcherey, Nagel, Duren, Germany). Then, cDNA was synthesized with a Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The Real-Time PCR (RT-PCR) was carried out using a PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Michigan, MI, USA). The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to determine the results.

Table 2. Primers for gene expression analysis using RT-qPCR.

Genes	Sequences (5'-3')
<i>PCNA</i>	forward: TGCACGCATTTGTAGAGACC reverse: AGTCAGCTGGACTGGCTCAT
<i>FGF2</i>	forward: GCACTGAAATGTGCAACAG reverse: TCCAGGTCCAGTTTTTGGTC
<i>LDH-5</i>	forward: ATGCCCAACAAGATCAG reverse: CCTTTCAGCTTGCTCCAC
<i>ATP5B</i>	forward: GTTATTCGGTGTTCGGCTGGT reverse: TAGACCAGAGCGACCTGG
<i>Myf5</i>	forward: CCAGGAGCTCTTGAGGGAAC reverse: AGTCCGCCATCACATCGGAG
<i>MyoD</i>	forward: GCTCTCGCAGGAGAAACAG reverse: CTGGAGGCAGTATGGGACAT
<i>MyoG</i>	forward: GCTGAAGAAGGTGAACGAA reverse: CTGCTGGTTGAGGCTGCT
<i>Pax3</i>	forward: CCGTGCTAGATGGAGGAAGC reverse: AGACACGGCTTGCGGTATG
<i>Pax7</i>	forward: CAGTAGAGACAGGCCAAGC reverse: GGAGTTGGGAAGGAGTAGGG
<i>GAPDH</i>	forward: GAGGACCAGGTTGTCTCCTG reverse: CCACAACACGGTTGCTGTAT
<i>ACTB</i>	forward: GTCCACCTTCCAGCAGATGT reverse: ATAAAGCCATGCCAATCTCG

4.9. Statistics

Data were analyzed using two-factorial and monofactorial analysis of variance, ANOVA, and StatGraphics Centurion version XVI (StatPoint Technologies, Georgia, GA, USA). Differences between groups were tested with Tukey's honest significant difference post hoc test. There were significant differences between groups marked with different letters (a-b-c) and there were no significant differences between groups marked with the same letters (a-a; b-b; c-c). The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

5. Conclusions

The GO nanofilm culture surface did not positively affect the differentiation or functional maturity of differentiated muscle fibers; however, it did promote spontaneous contractions. The chicken embryo

muscle extract, collected on day 18 of embryonic development, contained a cocktail protein that influenced the intense differentiation of the muscle precursor cells collected on day 8 of embryo development. Compared to the cells in the control group, a structure resembling a pseudo-tissue was capable of spontaneous contractions, without the application of an electrical impulse. The addition of chicken embryo muscle extract, to a concentration of about 1% of culture medium, may allow researchers to culture pseudo-tissue muscle capable of spontaneous contraction. The study showed that GO may be used as a niche for differentiating muscle cells, but the decisive influence on the maturation of muscle tissue, especially muscle contractions, depends on the complexity of the applied growth factors.

Supplementary Materials: The following are available online, Supplementary Table S1: The list of identified protein in chicken embryo muscle extract (CEME) by LC-MS. Video S1: Spontaneous contraction activity of cells with chicken embryo muscle extract (CEME) supplementation, 1 to 3 contractions per minute were noted, average 1.7 contraction per minute.

Author Contributions: Conceptualization, J.B., E.S.; Methodology, J.B., E.S., M.W.; Software, M.W.; Validation, J.B., M.W.; Formal analysis, J.B.; Investigation, J.B., M.Z., J.S., M.S., K.D., D.C., P.K.; Resources, E.S., M.W.; Data curation, J.B., M.W., D.C., P.K.; Writing—original draft preparation, J.B., E.S., A.C.; Writing—review & editing, J.B., E.S., A.C.; Visualization, J.B., M.Z.; Supervision, E.S., A.C.; Project administration, E.S.; Funding acquisition, E.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

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

Acknowledgments: This manuscript is a part of Jaśmina Bałaban's PhD thesis. The equipment used for mass spectrometry analysis was sponsored in part by the Center for Preclinical Research and Technology (CePT), a project co-sponsored by the European Regional Development Fund and Innovative Economy, The National Cohesion Strategy of Poland. Foundation of Polish Science TEAM TECH CORE FACILITY/2016-2/2 Mass Spectrometry of Biopharmaceuticals—improved methodologies for qualitative, quantitative and structural characterization of drugs, proteinaceous drug targets and diagnostic molecules.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest related to this study.

References

1. Gates, C.B.; Karthikeyan, T.; Fu, F.; Huard, J. Regenerative Medicine for the Musculoskeletal System Based on Muscle-derived Stem Cells. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **2008**, *16*, 68–76. [[CrossRef](#)]
2. Knight, M.A.F.; Evans, G.R.D. Tissue engineering: Progress and challenges. *Plast. Reconstr. Surg.* **2004**, *114*, 26–37. [[CrossRef](#)]
3. Scaal, M.; Marcelle, C. Chick muscle development. *Int. J. Dev. Biol.* **2018**, *62*, 123–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Horsley, V.; Pavlath, G.K. Forming a Multinucleated Cell: Molecules That Regulate Myoblast Fusion. *Cells Tissues. Organs.* **2004**, *176*, 67–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Asfour, H.; Allouh, M.; Said, R. Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery. *Exp. Biol. Med.* **2018**, *243*, 118–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Valdez, M.R.; Richardson, J.A.; Klein, W.H.; Olson, E.N. Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4. *Dev. Biol.* **2000**, *219*, 287–298. [[CrossRef](#)]
7. Luo, W.; Li, E.; Nie, Q.; Zhang, X. Myomaker, regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3P, promotes chicken myoblast fusion. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 26186–26201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Endo, T. Molecular mechanisms of skeletal muscle development, regeneration, and osteogenic conversion. *Bone* **2015**, *80*, 2–13. [[CrossRef](#)]
9. Bentzinger, C.F.; Wang, Y.X.; Rudnicki, M.A. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a008342. [[CrossRef](#)]
10. Buckingham, M.; Relaix, F. PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *44*, 115–125. [[CrossRef](#)]
11. Chal, J.; Pourqu  , O. Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* **2017**, *144*, 2104–2122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Henderson, C.E.; Huchet, M.; Changeux, J.P. Denervation increases a neurite-promoting activity in extracts of skeletal muscle. *Nature* **1983**, *302*, 609–611. [[CrossRef](#)]

13. Yin, Q.; Johnson, J.; Prevette, D.; Oppenheim, R. Cell death of spinal motoneurons in the chick embryo following deafferentation: Rescue effects of tissue extracts, soluble proteins, and neurotrophic agents. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 7629–7640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Smith, R.; Vaca, K.; McManaman, J.; Appel, S. Selective effects of skeletal muscle extract fractions on motoneuron development in vitro. *J. Neurosci.* **1986**, *6*, 439–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Manthorpe, M.; Skaper, S.D.; Williams, L.R.; Varon, S. Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neuronotrophic factor. *Brain Res.* **1986**, *367*, 282–286. [[CrossRef](#)]
16. Yablonka-Reuveni, Z. Development and postnatal regulation of adult myoblasts. *Microsc. Res. Tech.* **1995**, *30*, 366–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Slater, C.R. Control of myogenesis in vitro by chick embryo extract. *Dev. Biol.* **1976**, *50*, 264–284. [[CrossRef](#)]
18. Ichio, I.; Kimura, I.; Ozawa, E. Promotion of Myoblast Proliferation by Hypoxanthine and RNA in Chick Embryo Extract. *Dev. Growth Differ.* **1985**, *27*, 101–110. [[CrossRef](#)]
19. Huang, J.; Wang, K.; Shiflett, L.A.; Brotto, L.; Bonewald, L.F.; Wacker, M.J.; Dallas, S.L.; Brotto, M. Fibroblast growth factor 9 (FGF9) inhibits myogenic differentiation of C2C12 and human muscle cells. *Cell Cycle* **2019**, *18*, 3562–3580. [[CrossRef](#)]
20. Goel, A.J.; Rieder, M.K.; Arnold, H.H.; Radice, G.L.; Krauss, R.S. Niche Cadherins Control the Quiescence-to-Activation Transition in Muscle Stem Cells. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 2236–2250. [[CrossRef](#)]
21. Lewitus, D.Y.; Landers, J.; Branch, J.R.; Smith, K.L.; Callegari, G.; Kohn, J.; Neimark, A.V. Biohybrid carbon nanotube/agarose fibers for neural tissue engineering. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 2624–2632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ahadian, S.; Ramón-Azcón, J.; Chang, H.; Liang, X.; Kaji, H.; Shiku, H.; Nakajima, K.; Ramalingam, M.; Wu, H.; Matsue, T.; et al. Electrically regulated differentiation of skeletal muscle cells on ultrathin graphene-based films. *Rsc. Adv.* **2014**, *4*, 9534–9541. [[CrossRef](#)]
23. Pinto, A.M.; Gonçalves, I.C.; Magalhães, F.D. Graphene-based materials biocompatibility: A review. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *111*, 188–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kiew, S.F.; Kiew, L.V.; Lee, H.B.; Imae, T.; Chung, L.Y. Assessing biocompatibility of graphene oxide-based nanocarriers: A review. *J. Control. Release* **2016**, *226*, 217–228. [[CrossRef](#)]
25. Kurantowicz, N.; Strojny, B.; Sawosz, E.; Jaworski, S.; Kutwin, M.; Grodzik, M.; Wierzbicki, M.; Lipińska, L.; Mitura, K.; Chwalibog, A. Biodistribution of a High Dose of Diamond, Graphite, and Graphene Oxide Nanoparticles After Multiple Intraperitoneal Injections in Rats. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10*, 398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. 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*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Zhang, X.; Yin, J.; Peng, C.; Hu, W.; Zhu, Z.; Li, W.; Fan, C.; Huang, Q. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. *Carbon N. Y.* **2011**, *49*, 986–995. [[CrossRef](#)]
28. Shi, X.; Chang, H.; Chen, S.; Lai, C.; Khademhosseini, A.; Wu, H. Regulating cellular behavior on few-layer reduced graphene oxide films with well-controlled reduction states. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 751–759. [[CrossRef](#)]
29. Ku, S.H.; Park, C.B. Myoblast differentiation on graphene oxide. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2017–2023. [[CrossRef](#)]
30. Lee, T.J.; Park, S.; Bhang, S.H.; Yoon, J.K.; Jo, I.; Jeong, G.J.; Hong, B.H.; Kim, B.S. Graphene enhances the cardiomyogenic differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *452*, 174–180. [[CrossRef](#)]
31. Weaver, C.L.; Cui, X.T. Directed Neural Stem Cell Differentiation with a Functionalized Graphene Oxide Nanocomposite. *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 1408–1416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Tenorio, D.L.; Valencia, C.H.; Valencia, C.; Zuluaga, F.; Valencia, M.E.; Mina, J.H.; Tovar, C.D.G. Evaluation of the biocompatibility of cs-graphene oxide compounds in vivo. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1572.
33. Belaid, H.; Nagarajan, S.; Teyssier, C.; Barou, C.; Barés, J.; Balme, S.; Garay, H.; Huon, V.; Cornu, D.; Cavailles, V.; et al. Development of new biocompatible 3D printed graphene oxide-based scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *110*, 110595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Marín, J.A.T.; Londoño, S.R.; Delgado, J.; Porras, D.P.N.; Zapata, M.E.V.; Hernandez, J.H.M.; Valencia, C.H.; Tovar, C.D.G. Biocompatible and antimicrobial electrospun membranes based on nanocomposites of chitosan/poly (Vinyl alcohol)/graphene oxide. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Ciriza, J.; Saenz Del Burgo, L.; Virumbrales-Muñoz, M.; Ochoa, I.; Fernandez, L.J.; Orive, G.; Hernandez, M.R.; Pedraz, J.L. Graphene oxide increases the viability of C2C12 myoblasts microencapsulated in alginate. *Int. J. Pharm.* **2015**, *493*, 260–270. [[CrossRef](#)]
36. Kim, M.J.; Lee, J.H.; Shin, Y.C.; Jin, L.; Hong, S.W.; Han, D.-W.; Kim, Y.-J.; Kim, B. Stimulated myogenic differentiation of C2C12 murine myoblasts by using graphene oxide. *J. Korean Phys. Soc.* **2015**, *67*, 1910–1914. [[CrossRef](#)]
37. Ryoo, S.R.; Kim, Y.K.; Kim, M.H.; Min, D.H. Behaviors of NIH-3T3 fibroblasts on graphene/carbon nanotubes: Proliferation, focal adhesion, and gene transfection studies. *ACS Nano* **2010**, *4*, 6587–6598. [[CrossRef](#)]
38. Lee, J.H.; Lee, Y.; Shin, Y.C.; Kim, M.J.; Park, J.H.; Hong, S.W.; Kim, B.; Oh, J.W.; Park, K.D.; Han, D.W. In situ forming gelatin/graphene oxide hydrogels for facilitated C2C12 myoblast differentiation. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2016**, *51*, 527–539. [[CrossRef](#)]
39. Patel, A.; Xue, Y.; Mukundan, S.; Rohan, L.C.; Sant, V.; Stolz, D.B.; Sant, S. Cell-Instructive Graphene-Containing Nanocomposites Induce Multinucleated Myotube Formation. *Ann. Biomed. Eng.* **2016**, *44*, 2036–2048. [[CrossRef](#)]
40. Langelaan, M.L.P.; Boonen, K.J.M.; Kang Yuen, R.-C.; van der Schaft, D.W.J.; Post, M.J.; Baaijens, F.P.T. Advanced maturation by electrical stimulation: Differences in response between C2C12 and primary muscle progenitor cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2011**, *5*, 529–539. [[CrossRef](#)]
41. Burch, N.; Arnold, A.S.; Item, F.; Summermatter, S.; Santos, G.B.S.; Christe, M.; Boutellier, U.; Toigo, M.; Handschin, C. Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Boshkovikj, V.; Webb, H.K.; Pham, V.T.H.; Fluke, C.J.; Crawford, R.J.; Ivanova, E.P. Three-dimensional reconstruction of surface nanoarchitecture from two-dimensional datasets. *Amb. Express* **2014**, *4*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Langer, R.; Sydlik, S.A.; Jhunjhunwala, S.; Webber, M.J.; Anderson, D.G. In Vivo Compatibility of Graphene Oxide with Differing Oxidation States. *ACS Nano* **2015**, *9*, 3866–3874.
44. Shin, Y.C.; Lee, J.H.; Kim, M.J.; Hong, S.W.; Kim, B.; Hyun, J.K.; Choi, Y.S.; Park, J.C.; Han, D.W. Stimulating effect of graphene oxide on myogenesis of C2C12 myoblasts on RGD peptide-decorated PLGA nanofiber matrices. *J. Biol. Eng.* **2015**, *9*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ionita, M.; Vasile, E.; Crica, L.E.; Voicu, S.I.; Pandele, A.M.; Dinescu, S.; Predoiu, L.; Galateanu, B.; Hermenean, A.; Costache, M. Synthesis, characterization and in vitro studies of polysulfone/graphene oxide composite membranes. *Compos. Part. B Eng.* **2015**, *72*, 108–115. [[CrossRef](#)]
46. Patel, A.; Xue, Y.; Hartley, R.; Sant, V.; Eles, J.R.; Cui, X.T.; Stolz, D.B.; Sant, S. Hierarchically aligned fibrous hydrogel films through microfluidic self-assembly of graphene and polysaccharides. *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115*, 2654–2667. [[CrossRef](#)]
47. Chal, J.; Oginuma, M.; Al Tanoury, Z.; Gobert, B.; Sumara, O.; Hick, A.; Bousson, F.; Zidouni, Y.; Mursch, C.; Moncuquet, P.; et al. Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 962–969. [[CrossRef](#)]
48. Zhou, T.; Zhang, B.; Wei, P.; Du, Y.; Zhou, H.; Yu, M.; Yan, L.; Zhang, W.; Nie, G.; Chen, C.; et al. Energy metabolism analysis reveals the mechanism of inhibition of breast cancer cell metastasis by PEG-modified graphene oxide nanosheets. *Biomaterials* **2014**, *35*, 9833–9843. [[CrossRef](#)]
49. Pedersen, B.K.; Åkerström, T.C.A.; Nielsen, A.R.; Fischer, C.P. Role of myokines in exercise and metabolism. *J. Appl. Physiol.* **2007**, *103*, 1093–1098. [[CrossRef](#)]
50. Pedersen, B.K. Muscle as a secretory organ. *Compr. Physiol.* **2013**, *3*, 1337–1362.
51. Tsukamoto, S.; Shibasaki, A.; Naka, A.; Saito, H.; Iida, K. Lactate Promotes Myoblast Differentiation and Myotube Hypertrophy via a Pathway Involving MyoD In Vitro and Enhances Muscle Regeneration In Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Martin, N.R.W.; Passey, S.L.; Player, D.J.; Khodabukus, A.; Ferguson, R.A.; Sharples, A.P.; Mudera, V.; Baar, K.; Lewis, M.P. Factors affecting the structure and maturation of human tissue engineered skeletal muscle. *Biomaterials* **2013**, *34*, 5759–5765. [[CrossRef](#)]
53. Brzóska, E.; Przewoźniak, M.; Grabowska, I.; Jańczyk-Ilach, K.; Moraczewski, J. Pax3 and Pax7 expression during myoblast differentiation in vitro and fast and slow muscle regeneration in vivo. *Cell Biol. Int.* **2009**, *33*, 483–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Jabaily, J.; Singer, M. Neurotrophic and hepatotrophic stimulation of proliferation of embryonic chick muscle cells in vitro: Assay and partial characterization of mitogenic activity in chick embryonic organ and tissue extracts. *Dev. Biol.* **1978**, *64*, 189–202. [[CrossRef](#)]
55. Popiela, H. Trophic effects of adult peripheral nerve extract on muscle cell growth and differentiation in vitro. *Exp. Neurol.* **1978**, *62*, 405–416. [[CrossRef](#)]
56. Shahini, A.; Vydiam, K.; Choudhury, D.; Rajabian, N.; Nguyen, T.; Lei, P.; Andreadis, S.T. Efficient and high yield isolation of myoblasts from skeletal muscle. *Stem Cell Res.* **2018**, *30*, 122–129. [[CrossRef](#)]
57. Relaix, F.; Rocancourt, D.; Mansouri, A.; Buckingham, M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* **2005**, *435*, 948–953. [[CrossRef](#)]
58. Seale, P.; Ishibashi, J.; Scimè, A.; Rudnicki, M.A. Pax7 is necessary and sufficient for the myogenic specification of CD45+*Sca1*+ stem cells from injured muscle. *PLoS Biol.* **2004**, *2*, 0664. [[CrossRef](#)]
59. Berkes, C.A.; Tapscott, S.J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2005**, *16*, 585–595. [[CrossRef](#)]
60. Hernández-Hernández, J.M.; García-González, E.G.; Brun, C.E.; Rudnicki, M.A. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *72*, 10–18. [[CrossRef](#)]
61. Velleman, S.G.; Song, Y. Development and growth of the avian pectoralis major (Breast) muscle: Function of syndecan-4 and glypican-1 in adult myoblast proliferation and differentiation. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Sin, J.; Andres, A.M.; Taylo, D.J.; Weston, T.; Hiraumi, Y.; Stotland, A.; Kim, B.J.; Huang, C.; Doran, K.S.; Gottlieb, R.A. Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. *Autophagy* **2016**, *12*, 369–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Thomas, K.; Engler, A.J.; Meyer, G.A. Extracellular matrix regulation in the muscle satellite cell niche. *Connect. Tissue Res.* **2015**, *56*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Thorsteinsdottir, S.; Deries, M.; Cachaço, A.S.; Bajanca, F. The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. *Dev. Biol.* **2011**, *354*, 191–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Huxley, H.E. Muscle Contraction. *Eur. News* **1986**, *17*, 5–7. [[CrossRef](#)]
66. Lee, E.J.; Nam, J.H.; Choi, I. Fibromodulin modulates myoblast differentiation by controlling calcium channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *503*, 580–585. [[CrossRef](#)]
67. Kim, I.; Je, H.D.; Gallant, C.; Zhan, Q.; Van Riper, D.; Badwey, J.A.; Singer, H.A.; Morgan, K.G. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II-dependent activation of contractility in ferret aorta. *J. Physiol.* **2000**, *526*, 367–374. [[CrossRef](#)]
68. Novák, P.; Soukup, T. Calsequestrin distribution, structure and function, its role in normal and pathological situations and the effect of thyroid hormones. *Physiol. Res.* **2011**, *60*, 439–452. [[CrossRef](#)]
69. Digel, J.; Abugo, O.; Kobayashi, T.; Gryczynski, Z.; Lakowicz, J.R.; Collins, J.H.; Digel, J.; Abugo, O.; Kobayashi, T.; Gryczynski, Z.; et al. Calcium- and magnesium-dependent interactions between the C-terminus of troponin I and the N-terminal, regulatory domain of troponin C. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *387*, 243–249. [[CrossRef](#)]
70. Guamieri, S.; Morabito, C.; Paolini, C.; Boncompagni, S.; Pilla, R.; Fanò-Illic, G.; Mariggìo, M.A. Growth Associated Protein 43 Is Expressed in Skeletal Muscle Fibers and Is Localized in Proximity of Mitochondria and Calcium Release Units. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e53267. [[CrossRef](#)]
71. Kim, J.K.; Caine, C.; Awano, T.; Herbst, R.; Monani, U.R. Motor neuronal repletion of the NMJ organizer, Agrin, modulates the severity of the spinal muscular atrophy disease phenotype in model mice. *Hum. Mol. Genet.* **2017**, *26*, 2377–2385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Sewry, C.A.; Nowak, K.J.; Ehmsen, J.T.; Davies, K.E. A and B utrophin in human muscle and sarcolemmal A-utrophin associated with tumours. *Neuromuscul. Disord.* **2005**, *15*, 779–785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Pietras, Z.; Wojcik, M.A.; Borowski, L.S.; Szewczyk, M.; Kulinski, T.M.; Cysewski, D.; Stepien, P.P.; Dziembowski, A.; Szczesny, R.J. Controlling the mitochondrial antisense–role of the SUV3-PNPase complex and its co-factor GRSF1 in mitochondrial RNA surveillance. *Mol. Cell. Oncol.* **2018**, *5*, 1–3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

74. Cox, J.; Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1367–1372. [CrossRef]
75. Orłowska, K.P.; Kłosowska, K.; Szczesny, R.J.; Cysewski, D.; Krawczyk, P.S.; Dziembowski, A. A new strategy for gene targeting and functional proteomics using the DT40 cell line. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e167. [CrossRef]







Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.



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

Article

Effect of Muscle Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos

Jasmina Bałaban ¹, Marlena Zielińska ¹, Mateusz Wierzbicki ¹, Teresa Ostaszewska ²,
Magdalena Fajkowska ², Małgorzata Rzepakowska ², Karolina Daniluk ¹, Malwina Sosnowska ¹,
André Chwalibog ^{3,*} and Ewa Sawosz ¹

¹ Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, 02-786 Warsaw, Poland; jasmina_balaban@sggw.edu.pl (J.B.); marlena_zielinska@sggw.edu.pl (M.Z.); mateusz_wierzbicki@sggw.edu.pl (M.W.); karolina_daniluk@sggw.edu.pl (K.D.); malwina_sosnowska@sggw.edu.pl (M.S.); ewa_sawosz_chwallibog@sggw.edu.pl (E.S.)

² Department of Ichthyology and Biotechnology in Aquaculture, Institute of Animal Science, Warsaw University of Life Sciences, 02-786 Warsaw, Poland; teresa_ostaszewska@sggw.edu.pl (T.O.); magdalena_fajkowska@sggw.edu.pl (M.F.); malgorzata_rzepakowska@sggw.edu.pl (M.R.)

³ Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Copenhagen, 1870 Frederiksberg, Denmark

* Correspondence: ach@sund.ku.dk



check for updates

Citation: Bałaban, J.; Zielińska, M.; Wierzbicki, M.; Ostaszewska, T.; Fajkowska, M.; Rzepakowska, M.; Daniluk, K.; Sosnowska, M.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Effect of Muscle Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos. *Animals* **2021**, *11*, 3467. <https://doi.org/10.3390/ani11123467>

Academic Editor:

Velmurugu Ravindran

Received: 28 September 2021

Accepted: 2 December 2021

Published: 6 December 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/>).

Simple Summary: Genetic selection of broilers increased muscle growth; however, very fast growth can lead to pathological conditions caused by the deficiency of nutrients. The number of muscle cells is mainly formed during the embryonic period, and consequently, in ovo supplementation of proteins to embryos may impact future muscle structure. We hypothesized that proteins from chicken embryo muscle extract (CEME) caused by the unique, natural composition and biocompatibility can supply additional proteins. However, supplemented proteins are actively metabolized, which may reduce their utilization for improved muscle synthesis. Nevertheless, CEME can be transported and protected by graphene oxide (GO). The objective of the present work was to investigate the effects of in ovo-injected CEME and the complex of GO-CEME on embryonic cell cultures and the growth of chicken embryo hind limb muscle. Toxicity and cell proliferation were measured in vitro with cell cultures and mortality, morphology, histology, and blood biochemistry in vivo with embryos. CEME increased the number of cells and nuclei in muscle, but the complex GO-CEME did not further improve the muscle structure. The results indicate a vital role of CEME as in ovo enhancer of muscle development in broilers.

Abstract: The effects of CEME and its complex with GO injected in ovo on the growth and development of chicken embryo hindlimb muscle were investigated. First, the preliminary in vitro study on primary muscle precursor cell culture obtained from a nine-day-old chicken embryo was performed to assess toxicity (MTT assay) of CEME, GO (100 ppm) and its complex with different concentrations (1, 2, 5, and 10 wt.%). The effect on cell proliferation was investigated by BrdU assay. CEME at concentrations 1–5% increased cell proliferation, but not the complex with GO. In vitro cytotoxicity was highest in 10% and GO groups. Next, the main experiment with chicken embryos was performed with CEME, GO and its complex injected in ovo on day one of embryogenesis. On day 20 of embryogenesis survival, morphological development, histological structure of the muscle, and biochemical parameters of blood serum of the embryos were measured. No negative effect on mortality, body weight, or biochemistry of blood after use of CEME or GO-CEME complexes was observed. Interestingly, the slight toxicity of GO, observed in in vitro studies, was not observed in vivo. The use of CEME at the levels of 2% and 5% improved the structure of the lower limb muscle by increasing the number of cells, and the administration of 2% CEME increased the number of nuclei visible in the stained cross-section of the muscle. The complex GO-CEME did not further improve the muscle structure. The results indicate that CEME can be applied as an in ovo enhancer of muscle development in broilers.

Keywords: chicken embryo; development; in ovo; graphene oxide; histology; muscle; toxicity

1. Introduction

Genetic selection has increased poultry meat production, but it has been followed by substantial deterioration of the muscle structure. Comparing the muscles of broiler chickens to laying hens that were not selected for the increase of the pectoral muscle, a much larger number of muscle fibers and an increase in their diameter are observed [1]. Analysis of the breast muscle genes showed an increase in the expression of genes responsible for the development of free-type muscle fibers, the proliferation of satellite cells, as well as muscle hypertrophy in broiler chickens compared to laying hens [2]. Consequently, a very fast growth rate of broiler chicken can lead to disturbance of the normal structure of the muscle tissue, especially the pectoral muscles, which account for 31% of body weight [3]. The more and more frequent pathological conditions of the muscles, and above all myopathies of the pectoral muscle, regardless of the etiology, to a large extent may result from the deficiency of certain structural and functional proteins. Disruption of the correct ratio of proteins involved in the proliferation, differentiation, maturation of muscle fibers, and the final formation of its structure may predispose to its weakening or even dystrophy. Muscle degeneration is usually associated with an accumulation of interstitial connective tissue or fibrosis [4], resulting from impaired synthesis of amino acids and proteins. Moreover, the pool of exogenous amino acids is limited due to the development of the chicken embryo outside the mother's organism. On the other hand, the proliferation of muscle cells decreases before hatching so that the number of muscle cells is largely formed during the embryonic period. Therefore, only in ovo supplementation can have a decisive impact on the formation of the future correct muscle structure.

The studies showed that the in ovo administration of the amino acid composition to the embryo [5] increased the growth of chickens. Taurine, supplemented in ovo to chicken embryos, improved the structure of breast muscle by increasing the expression of PCNA protein [6]. L-Arginine conjugated with nanoparticles of Ag activates myogenin and MyoD expression, which is pointed to improve muscle growth [7]. Due to the fact that embryonic development takes more than 1/3 of the life of broiler chickens and is a key period for muscle development, the method of in ovo feeding is very promising [8]. However, it entails a number of difficulties, and the key ones include the injection sterility regime and the too rapid degradation of nutritional–functional ingredients delivered. Moreover, the rapid catabolism of supplemented protein may have negative effects resulting from the accumulation of harmful products of protein breakdown. Therefore, the optimization of in ovo supplementation should take into account not only the appropriate composition and the dose of administered compounds but also their metabolism over time.

In previous in vitro studies, we used chicken embryo muscle extract (CEME) extract from an 18-day-old chicken embryo to cultivate muscle tissue from muscle precursor cells taken from a limb bud on day eight of embryogenesis [9]. The results of the research showed that this extract stimulated not only the formation of the correct structure of pseudo-muscle tissue but also its physiological maturation, observed as contractions characteristic of muscle tissue. It should be emphasized that these contractions occurred without any external electrical stimulation but only after administration of the CEME extract—a cocktail of a wide variety of proteins. This interesting observation inspired us to expand our research and determine whether this cocktail could be used not only for tissue culture in vitro but also as a stimulator of muscle development when administered to the chicken embryo in ovo. It has to be underlined that CEME and the complex of CEME with graphene oxide (GO) (GO-CEME) have not been used previously.

Proteins administered to the body from the outside are actively metabolized, which may reduce their utilization and promote the formation of protein degradation products. To counteract such adverse effects, CEME extract was conjugated with GO and administered in the form of a GO-CEME complex. The form of the complex would protect the extract against rapid decomposition and ensure a slow release of extract proteins. Moreover, GO is a carbon structure—a graphite derivative—which, when administered at an appropriate level, is non-toxic and biocompatible [10–13]. Therefore, research on GO is dedicated to using it to

create scaffolds in tissue engineering [14,15] or to transport drugs or functional compounds in medicine [16]. The huge surface area of graphene flakes and the available chemical groups favor the formation of the protein crown as a result of self-organization on the GO surface, especially in the presence of a large number of proteins [17]. The protein crown is an active structure, and its composition changes depending on the physicochemical conditions of the biological environment. This very dynamic process allows the use of GO as a carrier in drug delivery systems. We supposed that CEME could be transported on GO flakes, increasing the activity of the protein cocktail. Taking into account the CEME activity observed in previous *in vitro* studies [9] and the transport properties of GO, we decided to create a “nutrient delivery” system similar to the “drug delivery” systems used in medicine. The present model studies were aimed at checking the possibility of modifying the development and shaping the structure of striated muscle by “feeding” the embryo. The planned feeding system was to meet two conditions: 1. be spread over time and minimize uncontrolled breakdown of nutrients, 2. be the most comprehensive source of nutrients. Consequently, the main objective was to determine whether the extract from embryo muscle conjugated with GO is not toxic and can stimulate the formation of a better muscle structure of embryos, and in the future, muscle development of broilers. The findings can also be utilized in the area of muscle regeneration in animals and humans.

2. Materials and Methods

2.1. Graphene Oxide

Single layer of graphene oxide, as water dispersion 2 wt.%, was purchased from US Research Nanomaterials, Inc. (Houston, TX, USA). GO flakes had thickness of 0.43–1.23 nm and diameter of 1.5–5.5 μm (manufacturer’s data).

The morphology of GO was characterized using a TEM-JEM-1220 (JEOL, Tokyo, Japan) at 80 kV and a TEM CCD Morada 11-megapixel camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Munster, Germany). The zeta potential of GO solution was measured by light scattering using a ZetaSizer Nano ZS model ZEN3500 (Malvern Instruments, Malvern, UK). All measurements were performed in four repetitions. For the experiment, GO was diluted in ultrapure Milli-Q water at the final concentration of 100 ppm and sonicated in an ultrasonic bath (Bandelin Electronic, Berlin, Germany).

2.2. Preparation and Analysis of Chicken Embryo Muscle Extract

Fertilized chicken (Ross 308) eggs were purchased from a commercial hatchery, sterilized in KMnO_4 solution, irradiated with UV, and incubated at 37 °C and ~60% relative humidity. The muscle tissue was obtained from a 20-day-old chicken embryo. After decapitation of the embryo, the explant from the hindlimb was dissected. The skin and bones were removed from the sample. A sample of muscle tissue was suspended in ultrapure water and homogenized with frozen metal balls in a TissueLyser ball mill (Qiagen, New York, NY, USA). The homogenate was centrifuged at $1400\times g$ for 45 min at 4 °C. The supernatant was stored at –80 °C.

The protein composition of the extract was analyzed by mass spectrometry (MS) using an Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, MA, USA) connected to a Water Acquity HPLC, according to the methodology described in the previous article [9]. Obtained data were deposited in the PRIDE repository under PXD015146. The top 100 protein identified in the CEME was grouped on the proteins associated with cell proliferation, metabolism, extracellular matrix organization, nervous system, etc. The protein–protein interaction network analysis was performed in inBio Discover™.

The GO-CEME complex was prepared by mixing GO solution in concentration of 100 ppm with adequate addition of CEME solution and sonicated in an ultrasonic bath (Bandelin Electronic, Berlin, Germany) for self-organization.

2.3. *In Vitro* Study: Cell Culture

Muscle precursor cells were obtained from 9-day-old chicken embryo by dissection of the hindlimb. The sample was treated with trypsin for 24 h at 4 °C and disintegrated by gentle pipetting. After that, cells were seeded onto a culture plate. Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies, Texas, TX, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Texas, TX, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies, Texas, TX, USA) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air in a Memmert ICO150med Incubator (Mettler, Schwabach, Germany). Cells were divided into experimental groups: (1) Control (not treated), (2) CEME0.1%, (3) CEME0.2%, (4) CEME0.5%, (5) CEME1%, (6) CEME2%, (7) CEME5%, (8) CEME10%, (9) GO (100ppm), (10) GO-CEME0.1%, (11) GO-CEME0.2%, (12) GO-CEME0.5%, (13) GO-CEME1%, (14) GO-CEME2%, (15) GO-CEME5%, and (16) GO-CEME10%. In all groups with GO was added 10% of culture media total volume with constant concentration (100 µg/L) and adequate addition of CEME (0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10% of culture media total volume).

2.4. *In Vitro* Study: Proliferation of Cells

Proliferation status of primary cell culture was tested with a Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). After 24 h of maintaining cells with experimental complexes (as described in section *Cell Culture*), BrdU reagent (10 µL) was added to the culture media, cells were stained for 4 h. All further steps proceeded according to the manufacturer's instructions. The results were analyzed by reading absorbance at 370 nm with a reference wavelength of 492 nm using Tecan Infinite 200 plate reader (Tecan, North Carolina, ND, USA.).

2.5. *In Vitro* Study: Viability of Cells

Viability was tested with a Vybrant Cell Proliferation Assay Kit (MTT) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, MA, USA) after 24 h of treatment with experimental complexes according to the scheme described in section *Cell Culture*. Cells were cultured in 96-well plates. MTT reagent (10 µL) was added to each well and incubated for 3 h at 37 °C. Next, cells were disintegrated with lysis buffer (containing Isopropanol, Triton X, and HCl). Culture plates were centrifuged, and the supernatant was transferred to new 96-well plates. The absorbance of samples (n = 6) was measured using Tecan Infinite 200 plate reader (Tecan, North Carolina, ND, USA.) at 570 nm according to the manufacturer's instructions.

2.6. Hemotoxicity

The hemolysis assay was performed on the chicken blood. The whole blood sample was centrifuged for 5 min at 5000 rpm and plasma and lymphocytes were removed. Fraction of red blood cells were washed with PBS and centrifuged 3 times at 150 × g for 5 min. The final pellet of red blood cells was suspended in PBS. Experimental complexes (0.1 mL) were added to the blood samples (1 mL) and incubated for 1 h at 37 °C. Negative control (0% hemolysis) was treated with PBS and positive control (100% hemolysis) was treated with 20% solution of Triton-X. After the incubation, all samples were centrifuged at 900 × g for 10 min, 200 µL of supernatant were transferred to the new 96-well plate, and absorbance at 405/540 nm (Infinite M200, Tecan, Durham, NC, USA) was measured.

2.7. Animal Model

Eggs were randomly divided into 12 groups: (1) Control (not treated), (2) CEME1%, (3) CEME2%, (4) CEME5%, (5) CEME10%, (8) GO, (9) GO-CEME1%, (10) GO-CEME2%, (11) GO-CEME5%, and (12) GO-CEME10%. The experimental solution complexes were injected in ovo (200 µL) on the first day of incubation. The injection was performed into the albumen with a sterile tuberculin syringe. The injection site was secured with sterile tape, and the eggs were placed in an incubator. The embryos were observed on the 20th day of incubation. Mass of eggs and the embryos were measured and the development

of the embryos was assessed. Embryos were sacrificed by decapitation, and the blood samples, liver, and heart were collected and the organs were weighed. Blood samples were analyzed for albumins, alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), aspartate transaminase (AST), total protein, creatinine, urea, globulins, lactate dehydrogenase (LDH), glucose, and triglyceride by a commercial diagnostic veterinary laboratory (VetLab, Warsaw, Poland) using standard diagnostic kits and protocol.

2.8. Immunohistochemistry

For histological and immunohistochemical analysis, tissues were fixed in 4% buffered formalin. Formalin-fixed muscle samples were paraffin-embedded into blocks by the standard paraffin technique and cut using Rotary Microtome HM 355 S (Microm, Walldorf, Germany) with section transfer system STS. Tissue sections were stained using Periodic Acid–Schiff (PAS) Staining System (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. All the sections were observed and recorded using a Nikon Eclipse Ni light microscope with Nikon DS-Fi3 camera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). The number of cells per microscopic field of view ($n = 5$; area: 0.09 mm^2) was calculated manually using ImageJ-Cell Counter. Fields of view were chosen randomly.

For PCNA detection, monoclonal, mouse, PCNA antibody (No. 13–3900, Life Technologies Rockford, IL, USA.) in a 1:50 dilution was applied on tissue sections. Incubation with anti-PCNA antibody was performed for 60 min at RT. A citrate buffer was used for Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER). A Peroxidase Detection System (Dako North America, CA, USA) was applied for visualization in accordance with manufacturer recommendations. Samples were counterstained with Harris Hematoxylin (Mar-four, Konstantynów Łódzki, Poland). Images of stained sections were analyzed by ImageJ-Cell Counter, PCNA-positive and PCNA-negative nuclei were counted manually on randomly selected microscopic fields of view ($n = 5$; area: 0.09 mm^2), and the percentage of PCNA-positive nuclei of the total nuclei number (PCNA-positive and PCNA-negative) was presented as Proliferation Index.

2.9. Superoxide Dismutase (SOD) Activity

Superoxide dismutase (SOD) Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used to determine SOD activity in homogenized liver samples. The samples (10 mg, $n = 3$ per group) were suspended in ultrapure water/PBS and homogenized with frozen metal balls in a TissueLyser ball mill (Qiagen, New York, NY, USA). The homogenate was centrifuged at $1000 \times g$ for 20 min. The total protein content in supernatant after homogenization was determined using a BCA Protein Assay Kit according to the manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). SOD Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was performed according to the manufacturer's protocol.

2.10. Statistical Analysis

Data were analyzed using monofactorial analysis of variance, ANOVA. Differences between groups were tested with multiple-range Tukey's test using software StatGraphics Centurion version XVI (StatPoint Technologies, Georgia, GA, USA). The significant differences between groups were marked with different letters (a, b, and c). Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. GO and CEME Characterization

The zeta potential of GO solution in a concentration of 100 ppm was 38.8 mV. Transmission Electron Microscopy (TEM) imaging was used to visualization the morphology of the flakes of GO (Figure 1).

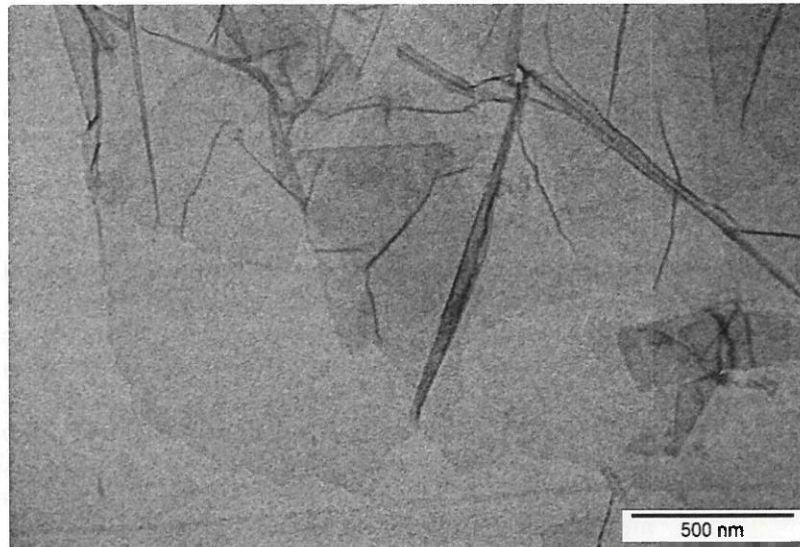


Figure 1. Transmission electron microscopic images of graphene oxide flakes.

The detailed protein profile of the aqueous CEME extract was presented in the previous publication of the authors [9]. This article additionally presents the protein–protein interaction network of the top 100 proteins of the extract visualized by inBio Discover™, taking into account categories, regulation of proliferation (positive vs. negative), and functions (ECM organization, nervous system development, and metabolism) (Figure 2). The largest group (67) are proteins involved and co-involved in proliferation, the second (35) are proteins related to metabolism, 23 proteins are related to the functioning of the nervous system, 3 proteins participated in the organization of ECM, and 5 are structural proteins.

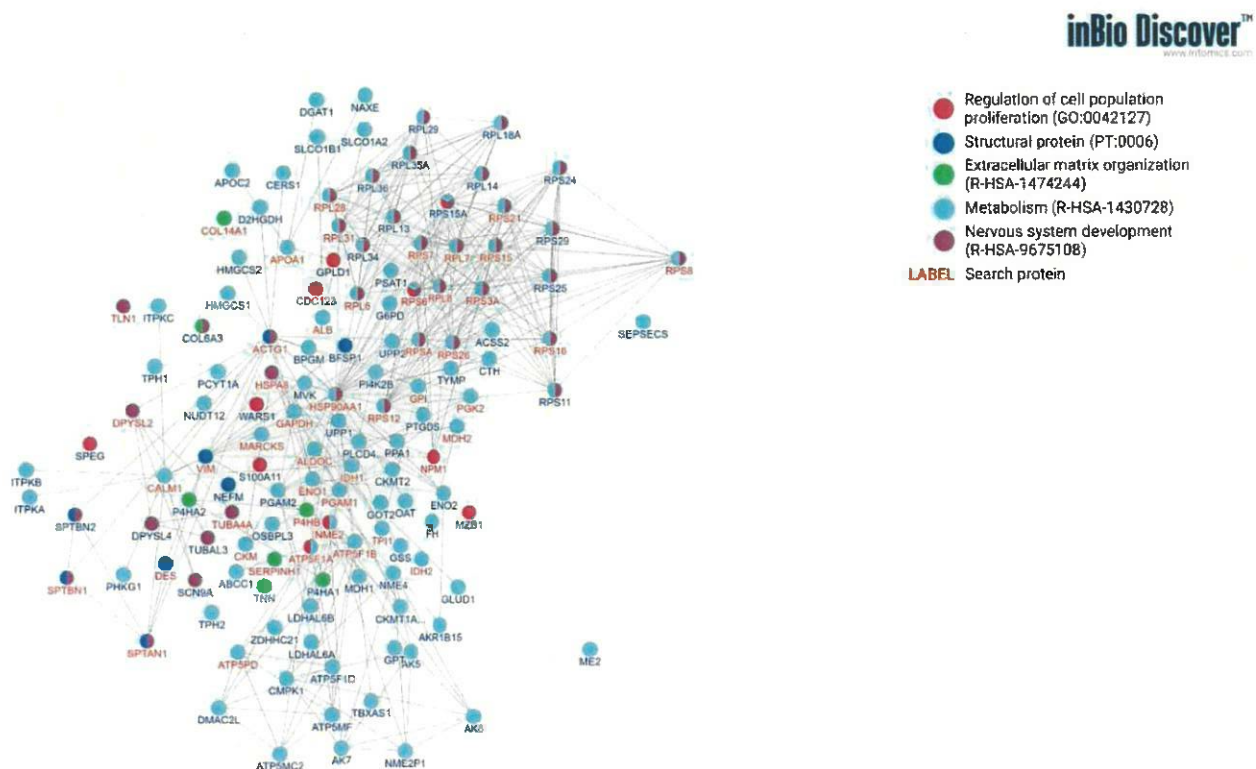


Figure 2. The protein-protein network of top 100 proteins identified in CEME using Mass Spectrometry.

The GO and CEME complexes formed stable, colloidal structures. No visible aggregates or sediment were observed.

3.2. In Vitro Study: Proliferation of Cells

Cell proliferation was analyzed with the BrdU assay based on the quantitative measurement of DNA synthesis by detecting the thymidine nucleoside analog incorporated into the DNA of dividing cells during the S phase. The obtained results showed that the CEME extract, administered at 0.5%, 1%, and 2%, increased the proliferation of muscle cells. GO applied to the medium did not affect the proliferation of cells. However, administration of CEME in a complex with GO (GO-CEME1%; GO-CEME2%; GO-CEME5%) resulted in a significant increase in cell proliferation compared to the administration of the extract alone (Figure 3A).

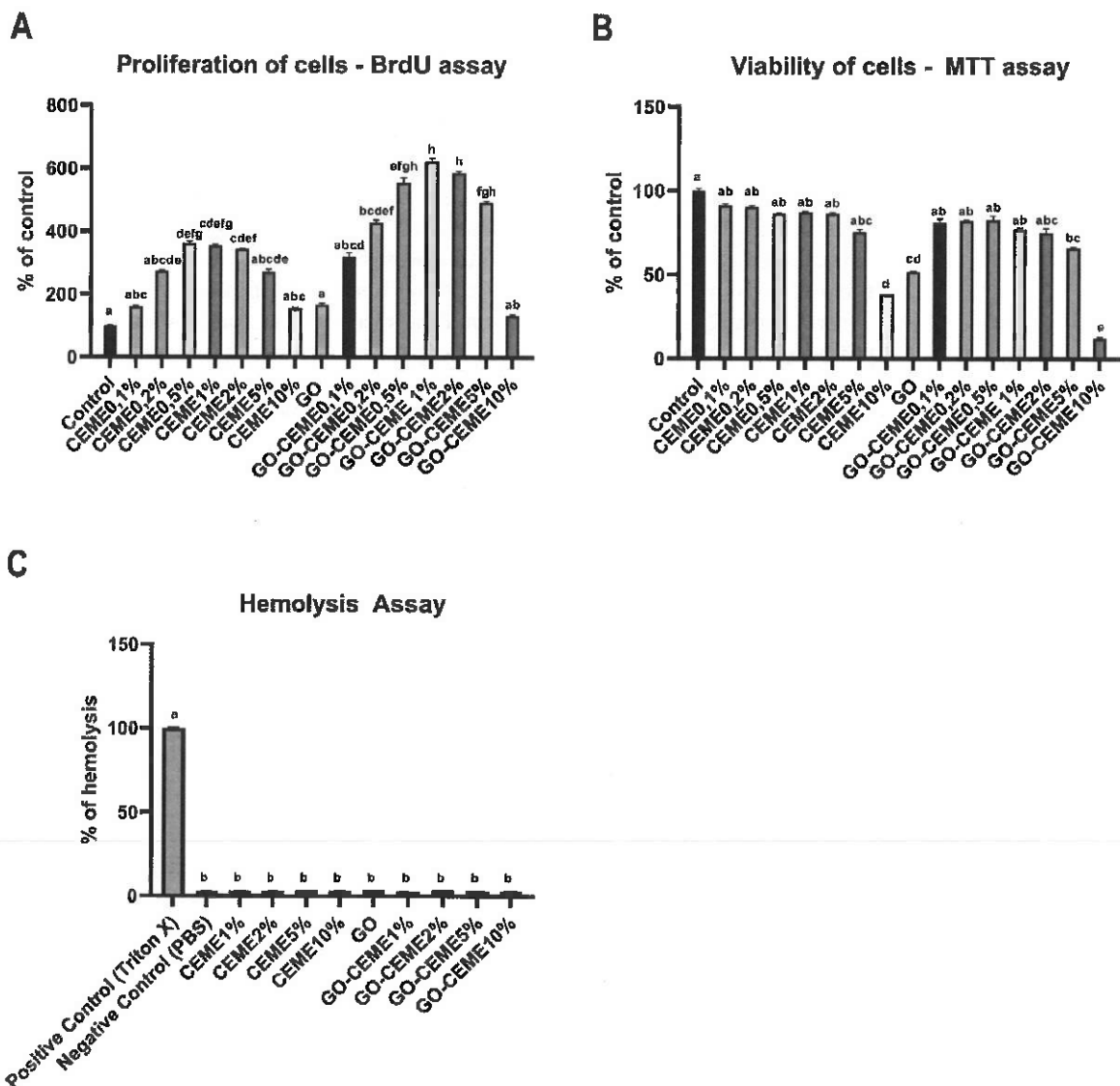


Figure 3. (A) Proliferation of muscle precursor cells from 9-day-old chicken embryo measured by BrdU assay; (B) Viability of muscle precursor cells from 9-day-old chicken embryo measured by MTT assay; (C) Results of hemolysis assay performed on chicken red blood cells; positive control (Triton X)–100% of hemolysis of red blood cells. Presented as mean value with standard deviation, different letters denote significant difference, $p < 0.05$.

3.2.1. In Vitro Study: Viability of Cells

The in vitro cytotoxicity study of GO and CEME was performed by the MTT method by determining the metabolic activity of cells (mitochondrial dehydrogenase activity). The results showed the toxicity of CEME10%, GO and GO-CEME10% and to a small extent, GO-CEME5% (Figure 3B). Moreover, the GO-CEME10% complex had a more negative effect compared to CEME10% as well as GO.

3.2.2. Hemolysis Assay

The basic test of the biocompatibility of nanomaterials is the hemocompatibility test, which determines the potential hemolysis of blood cells after contact with the tested material. No deleterious effects of GO, CEME, and also GO, complexed with CEME up to 10% (Figure 3C), on cell membrane stability and hemolysis after 15, 30, and 60 min were observed.

3.3. In Ovo Study: Chicken Embryo Growth and Development

GO, CEME (in concentrations of 1%, 2%, 5%, and 10%) and GO with CEME complexes (GO-CEME1%, GO-CEME2%, GO-CEME5%, GO-CEME10%) were administered to the chicken embryo at the beginning embryogenesis. The mean egg mass was not significantly different between groups ($p > 0.05$). At the end of embryogenesis (day 20), the growth and development of the embryos were assessed. The administered GO, CEME, and GO-CEME complexes did not reduce the survival rate of the embryos. Moreover, the bodyweight of the embryos and the relative weight of the heart, liver did not change in relation to the control group (Table 1). During the necropsy, no visible malformations, genetic or other pathological changes of the embryos were found.

Table 1. Mean body and organ weight of 20-day-old chicken embryos, presented as mean value \pm standard deviation.

Group	Egg Mass [G]	Embryo Body Weight [G]	Heart Weight [G]	Liver Weight [G]
Control	54.1 \pm 4.42	45.1 \pm 3.52	0.23 \pm 0.014	0.63 \pm 0.063
CEME1%	53.7 \pm 2.95	44.5 \pm 2.46	0.23 \pm 0.043	0.67 \pm 0.094
CEME2%	52.6 \pm 3.05	43.9 \pm 2.32	0.24 \pm 0.071	0.61 \pm 0.103
CEME5%	52.9 \pm 2.70	44.2 \pm 2.72	0.23 \pm 0.032	0.62 \pm 0.092
CEME10%	55.6 \pm 3.25	45.6 \pm 3.28	0.24 \pm 0.024	0.59 \pm 0.091
GO	54.8 \pm 3.55	47.0 \pm 5.49	0.22 \pm 0.023	0.63 \pm 0.142
GO-CEME1%	51.9 \pm 3.49	43.0 \pm 2.98	0.23 \pm 0.028	0.64 \pm 0.085
GO-CEME2%	55.8 \pm 3.35	51.2 \pm 2.71	0.19 \pm 0.072	0.57 \pm 0.067
GO-CEME5%	51.2 \pm 3.41	47.5 \pm 3.57	0.22 \pm 0.027	0.65 \pm 0.100
GO-CEME10%	52.9 \pm 2.74	44.4 \pm 1.78	0.24 \pm 0.035	0.63 \pm 0.081

On day 20 of embryogenesis, blood was collected from the embryos, and the basic blood biochemical parameters were determined (Table 2). The analysis of selected blood biochemical parameters of embryos showed no effect of GO, CEME, and GO-CEME complexes on the activity of the liver enzymes ALT, AP, AST, and LDH as well as on the concentration of albumin, total protein, globulin, TG, and creatinine. There was a slight trend of urea increase in the groups receiving GO and CEME and a decrease in urea after administration of the GO-CEME complex. However, only statistically significant differences were found between GO, CEME5%, and CEME10% vs. GO-CEME5% (Table 2). A reduction in blood glucose concentration was also observed with the administration of GO, CEME10%, and GO-CEME10%. However, the observed differences were not significant, and all results were in the reference ranges.

3.4. *In Ovo Study: Morphological and Immunohistochemical Evaluation of Muscle Structure*

Morphological evaluation of the cross-section of the hindlimb of a 20-day-old chicken embryo showed no pathological changes in the muscle structure in any group. However, in the image of the muscle cross-section, there were significant differences in the muscle structure between the groups (Figure 4). The muscles of the embryos from the control group were characterized by an extensive perimysium with a large amount of connective tissue as well as a clearly marked endomysium, and the cells were loosely packed. In the groups treated with CEME, especially CEME2% and CEME5%, the structure of the muscles were better developed; more densely packed cells, more cell nuclei, and less connective tissue were observed. In the GO and GO-CEME10% groups, the cells were less developed with less marked endomysium, while in the GO-CEME1%, GO-CEME2%, and GO-CEME5% groups to the greatest extent, round, well-developed cells were observed. Summing up, the most favorable structure was characterized by the muscle cells of the embryos from the CEME2% and CEME5% groups, which contained densely packed round cells with a large number of nuclei.

The analysis of immunohistochemical parameters showed a significant increase in the number of cells in the CEME2% and CEME5% groups, calculated on microscopic images per unit area (field of view, 0.09 mm²), compared to the other groups (Figure 5A). In the CEME2% group, a greater number of cell nuclei was also observed (Figure 5B). The cell proliferation index, measured by determining the number of PCNA-positive nuclei versus the total number of nuclei, did not increase in any group, compared to the control group. However, compared to GO-CEME10% the proliferation index increased in CEME10% and GO groups (Figure 5C).

3.5. *SOD Activity*

The experiment also measured the activity of superoxide dismutase (SOD) in the liver, a key antioxidant enzyme. No influence of the applied factors on the activity of SOD was observed. The average activity was near 100% in all groups (Figure 6).

Table 2. Biochemical parameters of blood serum from 20-day-old chicken embryos, presented as mean value \pm standard deviation, different superscript a, b denotes significant difference, $p < 0.05$.

Group	Albumins [G/L]	ALT [U/L]	AP [U/L]	AST [U/L]	Total Protein [G/L]	Creatinine [μ mol/L]	Urea [Mmol/L]	Globulins [G/L]	LDH [U/L]	Triglyceride [Mmol/L]	Glucose [Mmol/L]
Control	3.15 \pm 0.663	3.38 \pm 1.230	2738 \pm 920.2	214.2 \pm 52.80	13.3 \pm 1.72	19.6 \pm 12.19	3.56 \pm 0.861 ^{ab}	10.1 \pm 1.07	1100 \pm 84.2	0.71 \pm 0.203	14.2 \pm 0.30
CEME1%	4.05 \pm 1.011	2.68 \pm 1.681	2858 \pm 1267.2	180.7 \pm 62.41	15.8 \pm 2.18	28.5 \pm 4.47	4.06 \pm 0.333 ^{ab}	11.7 \pm 1.18	1156 \pm 343.1	1.08 \pm 0.372	12.4 \pm 0.64
CEME2%	3.01 \pm 0.285	2.52 \pm 0.143	2218 \pm 176.5	171.5 \pm 21.07	12.1 \pm 0.85	29.9 \pm 1.98	3.94 \pm 0.534 ^{ab}	9.1 \pm 0.57	909 \pm 76.3	0.84 \pm 1.345	12.3 \pm 0.28
CEME5%	3.87 \pm 0.413	3.92 \pm 1.502	2844 \pm 521.9	214.9 \pm 56.96	15.5 \pm 1.10	28.1 \pm 6.18	4.13 \pm 0.645 ^b	11.6 \pm 0.82	1213 \pm 279.9	1.01 \pm 0.231	12.4 \pm 0.53
CEME10%	3.42 \pm 0.142	3.58 \pm 2.343	2249 \pm 309.6	202.6 \pm 118.14	13.3 \pm 1.02	37.3 \pm 18.31	4.17 \pm 0.912 ^b	10.0 \pm 0.95	1029. \pm 542.3	1.22 \pm 1.212	12. \pm 1.65
GO	3.52 \pm 0.522	4.52 \pm 0.786	2199 \pm 439.4	299.4 \pm 29.25	13.6 \pm 1.28	30.6 \pm 6.12	4.19 \pm 0.583 ^b	10.1 \pm 0.88	1448 \pm 389.0	1.02 \pm 0.343	11.55 \pm 1.20
GO-CEME1%	3.15 \pm 0.217	3.05 \pm 1.345	2161 \pm 377.5	200.3 \pm 3.25	12.9 \pm 0.85	23.6 \pm 2.33	3.31 \pm 0.034 ^{ab}	9.8 \pm 0.64	1189 \pm 269.5	1.36 \pm 0.465	14.7 \pm 1.27
GO-CEME2%	3.68 \pm 1.131	3.68 \pm 1.50	2629 \pm 939.1	200.6 \pm 51.81	15.0 \pm 3.67	26.1 \pm 4.29	3.75 \pm 0.593 ^{ab}	11.3 \pm 2.60	1117 \pm 187.7	0.64 \pm 0.161	12.0 \pm 0.68
GO-CEME5%	3.9 \pm 0.911	2.5 \pm 1.55	2496 \pm 403.6	190.0 \pm 46.74	15.0 \pm 2.13	22.8 \pm 3.16	3.04 \pm 0.200 ^a	11.1 \pm 1.27	1177. \pm 289.1	1.04 \pm 0.384	14.5 \pm 0.74
GO-CEME10%	3.13 \pm 0.394	3.71 \pm 1.61	2732 \pm 707.2	170.4 \pm 3.92	12.7 \pm 1.49	22.8 \pm 2.61	3.37 \pm 0.445 ^{ab}	9.6 \pm 1.21	1130 \pm 365.6	1.04 \pm 0.472	11.9 \pm 1.57

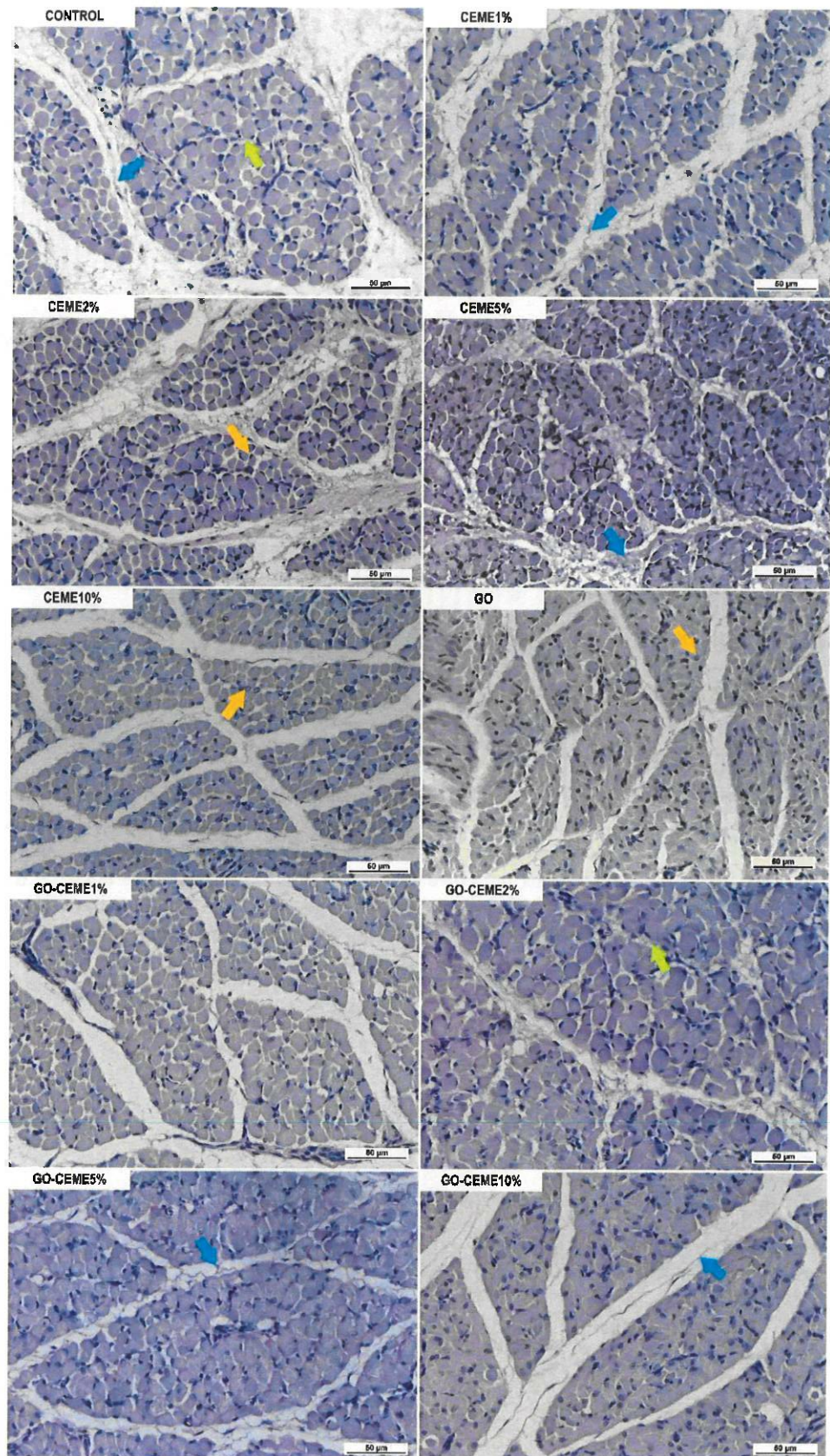


Figure 4. Images of muscle tissue sections after Periodic Acid–Schiff (PAS) staining; yellow arrow–nuclei; green arrow–endomysium; blue arrow–perimysium.

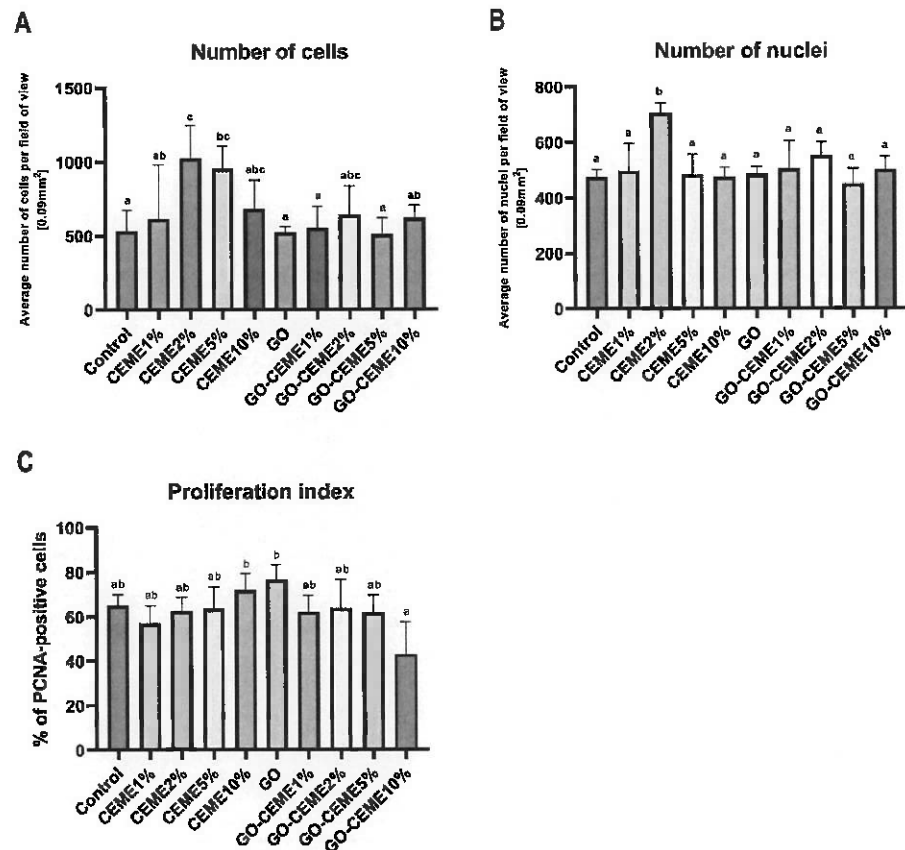


Figure 5. (A) Average number of cells counted on microscopic field of view [area 0.09 mm²] of specimens after Periodic Acid–Schiff (PAS) staining; (B) Average nuclei number counted on the microscopic field of view [area 0.09 mm²] of specimens stained with Hematoxylin; (C) Proliferation Index presented as percentage of PCNA-positive nuclei to the total nuclei number counted on microscopic field of view [area 0.09 mm²] of specimens after immunohistochemical detection of PCNA with Hematoxylin co-staining. Presented as mean value with standard deviation, different letters denote significant difference, *p* < 0.05.

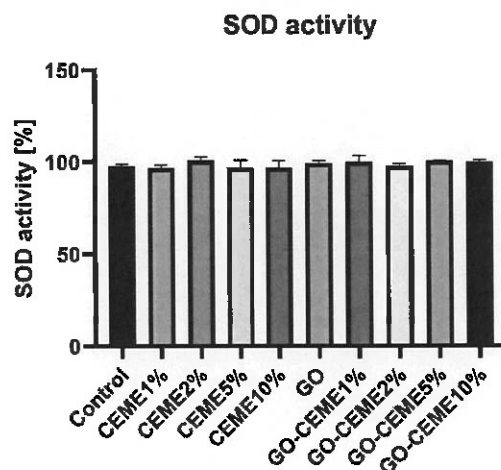


Figure 6. Superoxide dismutase activity in liver samples collected from chicken embryos on 20th day of embryogenesis.

4. Discussion

In previous studies [9], we used CEME extract to stimulate chicken embryo muscle progenitor cells to create pseudo-muscle tissue *in vitro*. We obtained a spectacular result because the addition of CEME to the culture medium stimulated spontaneous muscle contraction. This result inspired further research on the use of CEME to improve the structure of the skeletal muscle of a chicken embryo *in ovo*.

In vitro experiments, cells derived from the pectoral muscle of a 9-day-old chicken embryo were used. The cells constituted a population of muscle precursor cells as documented by [9]. In previous tests, we assessed the toxicity of CEME using the Trypan blue test, which showed a reduction in the number of cells with CEME by 5% [9]. In the current studies, we obtained a more precise response to the potential toxicity of CEME by testing the effect of the extract on the proliferation of muscle progenitor cells with the BrDU test and their metabolism with the MTT test. The results of the MTT test clearly showed the toxicity of CEME, administered at the level of 10%. The proliferation test, while not showing a negative effect of the administration of CEME10%, was also not found to have a positive effect of CEME10%. In the other studies, an extract from the muscles of a chicken embryo has been used to cultivate nerve cells [18–20]. However, a whole chicken embryo (CEE) extract, obtained from an 11-day-old embryo, is usually used to cultivate a variety of cells that require a higher concentration of growth factors than the standard medium [21]. It was found that the use of up to 50 ppm of CEE extract has a positive effect on the culture of fibroblasts derived from chicken embryos [22]. CEE extract is commercially available.

This preliminary *in vitro* toxicity assessment allowed the choice of CEME concentration for *in ovo* studies in chicken embryos. CEME concentrations of 1%, 2%, 5%, and 10% for injection into the embryo were selected for further research, thus eliminating only the lowest concentrations, possibly below the effectiveness level.

In previous studies [9], GO was used as a scaffold layer for differentiating muscle cells, while in these studies, graphene flakes were to be a form of CEME transport and protection. The concentration of GO at the level of 100 ppm used in the research was selected based on our own experience and confirmed the biocompatibility of low concentrations of GO [11,13,23,24]. However, in the presented research, a decrease in the metabolic activity of muscle cells was observed when administered to the GO medium, which can be explained by a certain activity of oxygen groups available on the surface of graphene flakes -OH, =O, -COOH [25] and the generation of a small number of reactive oxygen species. The reversible, non-covalent bonds can be created with other molecules, especially with proteins, forming the so-called protein crown. Caused by this, GO can be a carrier of proteins and release these compounds into the environment over time. When analyzing the results of GO-CEME complex administration, we found that the toxicity of GO disappears when combined with CEME proteins, which results from the protein crown effect [26,27]. Moreover, the GO-CEME complex significantly activates the proliferation of chicken embryo muscle cells, which may be related to the gradual dosing of proteins released from the GO surface. The finding of a beneficial effect of GO-CEME complexes administered at the level of up to 5% CEME on cell proliferation confirmed the advantage of GO and CEME complexation [28,29] as a method to improve GO biocompatibility. Most importantly, the complex of CEME and GO significantly increased the positive effect of CEME on cell proliferation. Cell proliferation (BrdU test) was enhanced by the GO-CEME complex compared to the free CEME used and confirmed the choice of GO-CEME1%, GO-CEME2%, and GO-CEME5% for chicken embryo studies. However, considering cell culture is a more sensitive experimental medium than a chicken embryo, so the controversial concentration of GO-CEME10% was also selected.

The basic test for biocompatibility testing of nanomaterials is hemotoxicity. Interestingly, blood cells' unicellular structures, were not destroyed under the influence of GO and the controversial concentration of CEME10% and the GO-CEME10% complex compared to muscle progenitor cells (MTT test). It seems that cells that adhere to the substrate, such as muscle cells, are much less mobile than rapidly migrating blood cells in the fluid, and

therefore the former may be more sensitive to potentially harmful factors. The level of GO hemotoxicity is defined as above 75 µg/mL; however, it can be easily modified by functionalization of GO surface [30] as confirmed by our results,

The potential toxicity of GO, CEME, and their complex was also investigated in in ovo studies on chicken embryos. The chicken embryo is a unique biological model that allows for a quick and precise response; hence, it is used to test drugs [31–33] as well as graphene materials [34–36]. Analysis of embryo growth and development at the systemic level showed no differences between GO- and CEME-treated embryos and GO-CEME complexes. The analysis of blood biochemical parameters also did not indicate the toxicity of the factors used on the basis of the activity of liver enzymes and albumin concentration. However, it seems that the introduction of an additional amount of protein (CEME) slightly increased the catabolism of the protein, and the unused part of it was deaminated, which is indicated by the increased concentration of urea in the CEME group. Administered L-Arginine supplement in ovo increased the muscle mass of broiler chickens and did not cause an increase in total protein and albumin levels in chickens during the hatching period [37]. This result indicates that the genetic potential of anabolism is inhibited by the limited reserves stored in the egg. However, the excess of supplemented protein is not metabolically beneficial [38]. Therefore, CEME used on the GO platform reduced the tendency to increase the urea concentration in embryos' blood.

Glucose conversion was also slightly disturbed but not significantly different between groups. The transformation of carbohydrates in the embryo can be modified by the supply of a significant amount of protein (CEME). Glucogenic amino acids could be converted into glucose and glycogen which could be stored in the yolk sac and to a lesser extent in the liver. At the end of embryogenesis, yolk sac glycogen is extensively broken down to glucose 6-phosphate and then converted by G6PC2-to free glucose [39].

In the case of an excessive supply of glucose via glucogenic amino acids, the reserves accumulated in the liver and muscles, as a result of in ovo administration of CEME10% on day 1 of embryonic development, could reduce the glucose release from the yolk sac. Interestingly, a decrease in glucose levels was also observed under the influence of GO. Graphene oxide may react with glucose due to its reducing abilities [40], which in turn may reduce the level of free glucose in the blood. Most of the GO-CEME complexes did not affect the glucose level, which can be explained by the involvement of available oxygen groups by binding to CEME. In addition, CEME derived proteins could also be associated with GO and to a lesser extent be a source of glucogenic amino acids and, consequently, glucose. GO has numerous -OH, =O, -COOH groups on its surface [25]; however, they do not seem to be involved in the oxidation processes, leading to redox imbalance, as evidenced by the lack of changes in SOD superoxide dismutase activity. Studies by other authors found that as GO levels increased, the concentration of H₂O₂ decreased, which indicates that GO acts as an electron absorber in the system [41]. Moreover, GO also reacted preferentially with O₂⁻ [42]. Our studies also did not reveal the pro-oxidative activity of GO. It did not affect the activity of SOD, catalyzing the superoxide radical anion dismutation reaction.

Analyzing the influence of GO, CEME, and GO-CEME complexes on the growth and development of the embryo, we found no increase in the embryo weight. However, the maturation of muscles in the embryonic period is largely due to their hyperplasia, the process of hypertrophy intensifies only after hatching [43]; therefore, the increase in muscle mass on the 18th day of embryogenesis does not have to be noticed. However, the microstructure of the muscle, and especially the number of muscle fibers, should indicate its later condition, which will be fully mature after the hyperplasia stage. The number of muscle cells is fully established by the point of hatching, and embryonic myogenesis is the crucial process that determines the muscle mass during the slaughter of chickens [39], so the assessment of the muscle structure on day 20 is fully justified.

Histological analysis of the cross-section of the muscles of the chicken embryo on day 20 showed that in ovo administration of GO did not positively affect the maturation of the hindlimb muscles of the embryo, which was probably associated with the formation

of a protein crown on the surface of the GO flake, which could permanently bind certain proteins and be the cause of their deficiency. Furthermore, GO-CEME10% caused the deterioration of the muscle structure, which may be related to the excessively high level of CEME administered (10%). What is more, the excess peptides related to GO could not be degraded. Therefore, the administration of CEME10% was safer.

The most favorable morphological image of the embryonic muscles (well-developed numerous cells and less connective tissue), supported by morphometry analysis (number of cells), was observed after administration of the CEME extract at the level of 2 and 5%. However, only the addition of CEME2% increased the number of cell nuclei.

It could be noted that supplementation of CEME at day one of injection could be effective later on. However, proteins are also a source of smaller peptides and amino acids, constituting a reserve pool of potentially deficient components for protein building during the following days of embryogenesis. The process of proliferation and differentiation of muscle cells from the pool of premyoblastic targets starts at the beginning of embryogenesis. Expression of *Myf5* is already observed at HH stage 9, so CEME injected into the albumen at HH stage 3 could be used by these cells from the very beginning. Myotomal cells, embryonic myoblasts, and fetal myoblasts, having at their disposal a unique protein cocktail, could fully exploit their genetic potential, normally limited to spare material accumulated in the egg. CEME extract was a source of key enzyme proteins involved in energy production, characteristic of the period of the final stage of development of a chicken embryo. The top 100 identified proteins included proteins involved in glycolysis such as Glucose-6-phosphate isomerase (GPI), Phosphoglycerate kinase 2 (GPI), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Phosphoglycerate kinase 2 (PGK2), Fructose-bisphosphate aldolase (ALDOC), alpha-enolase (ENO1), Phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1), and Triosephosphate isomerase (TPI1). The presence of these enzymes could also reduce the level of glucose in the embryo's blood (CEME10% group) as a result of the intensification of glycolysis. Glucose is present in the yolk in a very small amount (about 1%) and is used as an energy source in the initial phase of embryogenesis and during the hatching [39,44], another source of energy are proteins, and only then are fats used [39]. Thus, the beginning of embryogenesis is an energetically difficult stage, taking into account the low level of glucose and the energetically unfavorable process of obtaining energy from protein. CEME contained the enzymes of ATP synthesis in the mitochondrion ATP synthase subunits A, B, and D (ATP5F1A, ATP5F1B, ATP5F1D) and proteins involved in the synthesis of high-energy compounds such as Isocitrate dehydrogenase NADP (IDH1 I IDH2), Nucleoside dip (IDH2), and Nucleoside synthesis of nucleoside triphosphates other than ATP. Supplementation of such a powerful dose of the enzyme apparatus allowing the production of energy in the muscles, and especially the proteins involved in oxidative phosphorylation, could stimulate muscle development. Moreover, the pool of proteins provided by CEME was also a source of glucogenic amino acids, which could spare the own protein accumulated in the egg. The increase in blood urea level would confirm the deamination of amino acids. The energy that, thanks to supplementation, could be produced in the early stage of embryonic development could be used for the synthesis of the material necessary for the intensive proliferation of myogenic cells in the earlier stages of embryonic development.

Moreover, CEME was the source of proteins involved in the formation of muscle structure, including proteins related to the extracellular matrix. First of all, it contained the key, multifunctional Protein disulfide isomerase (P4HB), among others responsible for the collagen fibril organization [45]. Another one was SerpinH1 (SERPINH1), specifically binding to collagen [46]. CEME also contained the Collagen alpha-1 (XIV) chain structural protein responsible for the collagen organization, including the cell-cell adhesion and ECM organization. It also contained structural proteins such as Desmin (DES) and Vimentins (VIM)-type III intermediate filaments, the first specific for muscles and shaping their normal structure [47,48]. In addition, the presence of other proteins involved in cytoskeleton

formation was observed, such as Spectrin alpha chain (SPTAN1 and SPTBN1) and the most conserved Actin (ACTG1) forming a contractile apparatus.

Proteomic analysis showed a significant contribution to the CEME of nervous system proteins. For specific neuronal development and polarity, Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DPYSL 2) is responsible for axon elongation and also interacts with microtubules, actin, and tubulin [49,50]. Muscle development is strongly stimulated by the nervous system, so it can be assumed that the presence of this protein could also indirectly stimulate muscle maturation.

5. Conclusions

The research concerned the possibility of improving the muscle structure by using CEME extract from physiologically mature muscles and GO flakes as a carrier of the extract, administered in ovo. Basic in vitro studies have documented the biocompatibility of CEME and the GO-CEME complex administered at concentrations 1–5%. No toxicity was observed in in ovo studies. Analysis of the structure of the striated muscle of the 20-old embryo showed a significant improvement, especially the increased number of cells and cell nuclei after administration of 2% CEME. However, GO, although not toxic, did not increase the effectiveness of the CEME extract activity. The research clearly shows the advisability of using the CEME extract as a stimulator of muscle development in the embryonic period. Potential effects on muscle development in broiler chickens require further research.

Author Contributions: Conceptualization, J.B. and E.S.; Formal analysis, T.O., M.F. and M.R.; Funding acquisition, E.S.; Investigation, J.B., M.Z., K.D. and M.S.; Methodology, J.B., M.Z., M.W., T.O., M.F., M.R. and E.S.; Project administration, E.S.; Resources, J.B. and M.W.; Software, M.Z.; Supervision, A.C. and E.S.; Validation, J.B. and M.Z.; Visualization, J.B. and M.W.; Writing—original draft, J.B. and A.C.; Writing—review & editing, J.B. and A.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research work was funded by the National Science Centre, Poland, project number 2020/37/BN27/05532.

Institutional Review Board Statement: The Ethics review board II Local Committee for Ethics in Animal Research of Warsaw University of Life Sciences—SGGW considers that this type of project does not fall under the legislation for the protection of animals used for scientific purposes, national decree-law (Dz. U. 2015 poz. 266 and 2010-63-EU directive). It considers that this type of project, with use chicken embryo at the 9th, 18th and 20th day of incubation has no impact on animal welfare because all procedures are performed after immediate decapitation, which is the standard procedure. The animals used for the Manuscript animals-1419660 were legally in accordance with the Polish and EU law (Dz. U. 2015 poz. 266 and 2010-63-EU directive).

Informed Consent Statement: Not applicable.

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

Acknowledgments: This manuscript is a part of Jaśmina Bałaban's PhD thesis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest related to this study.

References

1. Scheuermann, G.N.; Bilgili, S.F.; Tuzun, S.; Mulvaney, D.R. Comparison of chicken genotypes: Myofiber number in pectoralis muscle and myostatin ontogeny. *Poult. Sci.* **2004**, *83*, 1404–1412. [CrossRef]
2. Zheng, Q.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Yang, N.; Wang, X.J.; Zhu, D. Systematic identification of genes involved in divergent skeletal muscle growth rates of broiler and layer chickens. *BMC Genomics* **2009**, *10*, 87. [CrossRef]
3. Meloche, K.J.; Dozier, W.A.; Brandebourg, T.D.; Starkey, J.D. Skeletal muscle growth characteristics and myogenic stem cell activity in broiler chickens affected by wooden breast. *Poult. Sci.* **2018**, *97*, 4401–4414. [CrossRef]
4. Sihvo, H.K.; Immonen, K.; Puolanne, E. Myodegeneration With Fibrosis and Regeneration in the Pectoralis Major Muscle of Broilers. *Vet. Pathol.* **2014**, *51*, 619–623. [CrossRef]

5. Shafey, T.M.; Mahmoud, A.H.; Alsobayel, A.A.; Abouheif, M.A. Effects of in ovo administration of amino acids on hatchability and performance of meat chickens. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **2014**, *44*, 123–130. [CrossRef]
6. Zielińska, M.K.; Sawosz, E.; Chwalibog, A.; Ostaszewska, T.; Kamaszewski, M.; Grodzik, M.; Skomiał, J. Nano-nutrition of chicken embryos. Effect of gold and taurine nanoparticles on muscle development. *J. Anim. Feed Sci.* **2010**, *19*, 277–285. [CrossRef]
7. Subramaniam, S.; Kang, D.; Siddiqui, S.H.; Park, J.; Tian, W.; Park, B.; Shim, K. Effects of In Ovo Supplementation with Nanonutrition (L-Arginine Conjugated with Ag NPs) on Muscle Growth, Immune Response and Heat Shock Proteins at Different Chicken Embryonic Development Stages. *Animals* **2020**, *10*, 564. [CrossRef]
8. Givisiez, P.E.N.; Moreira Filho, A.L.B.; Santos, M.R.B.; Oliveira, H.B.; Ferket, P.R.; Oliveira, C.J.B.; Malheiros, R.D. Chicken embryo development: Metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 6774–6782. [CrossRef]
9. Bałaban, J.; Wierzbicki, M.; Zielińska, M.; Szczepaniak, J.; Sosnowska, M.; Daniluk, K.; Cysewski, D.; Koczoń, P.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Effects of graphene oxide nanofilm and chicken embryo muscle extract on muscle progenitor cell differentiation and contraction. *Molecules* **2020**, *25*, 1991. [CrossRef]
10. Zhang, X.; Yin, J.; Peng, C.; Hu, W.; Zhu, Z.; Li, W.; Fan, C.; Huang, Q. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. *Carbon* **2011**, *49*, 986–995. [CrossRef]
11. Chang, Y.; Yang, S.T.; Liu, J.H.; Dong, E.; Wang, Y.; Cao, A.; Liu, Y.; Wang, H. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol. Lett.* **2011**, *200*, 201–210. [CrossRef]
12. Ali-Boucetta, H.; Bitounis, D.; Raveendran-Nair, R.; Servant, A.; Van den Bossche, J.; Kostarelos, K. Purified Graphene Oxide Dispersions Lack In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Pathogenicity. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 433–441. [CrossRef]
13. Kurantowicz, N.; Strojny, B.; Sawosz, E.; Jaworski, S.; Kutwin, M.; Grodzik, M.; Wierzbicki, M.; Lipińska, L.; Mitura, K.; Chwalibog, A. Biodistribution of a High Dose of Diamond, Graphite, and Graphene Oxide Nanoparticles After Multiple Intraperitoneal Injections in Rats. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10*, 398. [CrossRef] [PubMed]
14. Ruiz, O.N.; Fernando, K.A.S.; Wang, B.; Brown, N.A.; Luo, P.G.; McNamara, N.D.; Vangsness, M.; Sun, Y.P.; Bunker, C.E. Graphene oxide: A nonspecific enhancer of cellular growth. *Am. Chem. Soc. Nano* **2011**, *5*, 8100–8107. [CrossRef]
15. Górska, Z.; Górska, M.Z.; Hotowy, A.; Wierzbicki, M.; Bałaban, J.; Sosnowska, M.; Jaworski, S.; Strojny, B.; Chwalibog, A.; Sawosz, E. Graphene oxide nanofilm and the addition of l-glutamine can promote development of embryonic muscle cells. *J. Nanobiotechnology* **2020**, *18*, 1–17.
16. Sun, X.; Liu, Z.; Welsher, K.; Robinson, J.T.; Goodwin, A.; Zaric, S.; Dai, H. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano Res.* **2008**, *1*, 203–212. [CrossRef]
17. Jastrzębska, A.M.; Kurtycz, P.; Olszyna, A.R. Recent advances in graphene family materials toxicity investigations. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14*, 1320. [CrossRef]
18. Henderson, C.E.; Huchet, M.; Changeux, J.P. Denervation increases a neurite-promoting activity in extracts of skeletal muscle. *Nature* **1983**, *302*, 609–611. [CrossRef]
19. Yin, Q.; Johnson, J.; Prevette, D.; Oppenheim, R. Cell death of spinal motoneurons in the chick embryo following deafferentation: Rescue effects of tissue extracts, soluble proteins, and neurotrophic agents. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 7629–7640. [CrossRef]
20. Smith, R.; Vaca, K.; McManaman, J.; Appel, S. Selective effects of skeletal muscle extract fractions on motoneuron development in vitro. *J. Neurosci.* **1986**, *6*, 439–447. [CrossRef]
21. Pajtlér, K.; Bohrer, A.; Maurer, J.; Schorle, H.; Schramm, A.; Eggert, A.; Schulte, J.H. Production of chick embryo extract for the cultivation of murine neural crest stem cells. *J. Vis. Exp.* **2010**, *1*, 45–47. [CrossRef]
22. Christman, S.A.; Kong, B.W.; Landry, M.M.; Foster, D.N. Chicken embryo extract mitigates growth and morphological changes in a spontaneously immortalized chicken embryo fibroblast cell line. *Poult. Sci.* **2005**, *84*, 1423–1431. [CrossRef] [PubMed]
23. 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]
24. Dasgupta, A.; Sarkar, J.; Ghosh, M.; Bhattacharya, A.; Mukherjee, A.; Chattopadhyay, D.; Acharya, K. Green conversion of graphene oxide to graphene nanosheets and its biosafety study. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171607. [CrossRef] [PubMed]
25. Hernández Rosas, J.J.; Ramírez Gutiérrez, R.E.; Escobedo-Morales, A.; Chigo Anota, E. First principles calculations of the electronic and chemical properties of graphene, graphane, and graphene oxide. *J. Mol. Model.* **2011**, *17*, 1133–1139. [CrossRef]
26. Hu, W.; Peng, C.; Lv, M.; Li, X.; Zhang, Y.; Chen, N.; Fan, C.; Huang, Q. Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. *Am. Chem. Soc. Nano* **2011**, *5*, 3693–3700. [CrossRef] [PubMed]
27. Li, Y.; Feng, L.; Shi, X.; Wang, X.; Yang, Y.; Yang, K.; Liu, T.; Yang, G.; Liu, Z. Surface coating-dependent cytotoxicity and degradation of graphene derivatives: Towards the design of non-toxic, degradable nano-graphene. *Small* **2014**, *10*, 1544–1554. [CrossRef]
28. Xu, M.; Zhu, J.; Wang, F.; Xiong, Y.; Wu, Y.; Wang, Q.; Weng, J.; Zhang, Z.; Chen, W.; Liu, S. Improved In Vitro and In Vivo Biocompatibility of Graphene Oxide through Surface Modification: Poly(Acrylic Acid)-Functionalization is Superior to PEGylation. *Am. Chem. Soc. Nano* **2016**, *10*, 3267–3281. [CrossRef] [PubMed]
29. Gosika, M.; Velachi, V.; Cordeiro, M.N.D.S.; Maiti, P.K. Covalent Functionalization of Graphene with PAMAM Dendrimer and Its Implications on Graphene's Dispersion and Cytotoxicity. *Am. Chem. Soc. Appl. Polym. Mater.* **2020**, *2*, 3587–3600. [CrossRef]

30. Sasidharan, A.; Panchakarla, L.S.; Sadanandan, A.R.; Ashokan, A.; Chandran, P.; Girish, C.M.; Menon, D.; Nair, S.V.; Rao, C.N.R.; Koyakutty, M. Hemocompatibility and macrophage response of pristine and functionalized graphene. *Small* **2012**, *8*, 1251–1263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Fonseca, B.B.; da Silva, M.V.; de Moraes Ribeiro, L.N. The chicken embryo as an in vivo experimental model for drug testing: Advantages and limitations. *Lab Anim.* **2021**, *50*, 138–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Beedie, S.L.; Mahony, C.; Walker, H.M.; Chau, C.H.; Figg, W.D.; Vargesson, N. Shared mechanism of teratogenicity of anti-angiogenic drugs identified in the chicken embryo model. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Khosravi, A.; Sharifi, I.; Tavakkoli, H.; Derakhshanfar, A.; Keyhani, R.; Salari, Z.; Mosallanejad, S.S.; Bamorovat, M. Embryonic toxico-pathological effects of meglumine antimoniate using a chick embryo model. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0196424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sawosz, E.; Jaworski, S.; Kutwin, M.; Hotowy, A.; Wierzbicki, M.; Grodzik, M.; Kurantowicz, N.; Strojny, B.; Lipińska, L.; Chwalibog, A. Toxicity of pristine graphene in experiments in a chicken embryo model. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 3913–3922.
35. Samak, D.H.; El-Sayed, Y.S.; Shaheen, H.M.; El-Far, A.H.; Abd El-Hack, M.E.; Noreldin, A.E.; El-Naggar, K.; Abdelnour, S.A.; Saied, E.M.; El-Seedi, H.R.; et al. Developmental toxicity of carbon nanoparticles during embryogenesis in chicken. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 19058–19072. [[CrossRef](#)]
36. Szmidi, M.; Sawosz, E.; Urba, K.; Jaworski, S. Toxicity of different forms of graphene in a chicken embryo model. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 19940–19948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Yu, L.L.; Gao, T.; Zhao, M.M.; Lv, P.A.; Zhang, L.; Li, J.L.; Jiang, Y.; Gao, F.; Zhou, G.H. In ovo feeding of L-arginine alters energy metabolism in post-hatch broilers. *Poult. Sci.* **2017**, *97*, 140–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Qaid, M.M.; Al-Garadi, M.A. Protein and amino acid metabolism in poultry during and after heat stress: A review. *Animals* **2021**, *11*, 1167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Uni, Z.; Yadgary, L.; Yair, R. Nutritional limitations during poultry embryonic development. *J. Appl. Poult. Res.* **2012**, *21*, 175–184. [[CrossRef](#)]
40. Akhavan, O.; Ghaderi, E.; Aghayee, S.; Fereydooni, Y.; Talebi, A. The use of a glucose-reduced graphene oxide suspension for photothermal cancer therapy. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 13773–13781. [[CrossRef](#)]
41. Langer, R.; Sydlík, S.A.; Jhunjhunwala, S.; Webber, M.J.; Anderson, D.G. In Vivo Compatibility of Graphene Oxide with Differing Oxidation States. *Am. Chem. Soc. Nano* **2015**, *9*, 3866–3874.
42. Hsieh, H.S.; Zepp, R.G. Reactivity of graphene oxide with reactive oxygen species (hydroxyl radical, singlet oxygen, and superoxide anion). *Environ. Sci. Nano* **2019**, *6*, 3734–3744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ylihäsälä, H.; Kajantie, E.; Osmond, C.; Forsén, T.; Barker, D.J.P.; Eriksson, J.G. Birth size, adult body composition and muscle strength in later life. *Int. J. Obes.* **2007**, *31*, 1392–1399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lu, J.W.; McMurtry, J.P.; Coon, C.N. Developmental changes of plasma insulin, glucagon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryos and hatched chicks. *Poult. Sci.* **2007**, *86*, 673–683. [[CrossRef](#)]
45. McLaughlin, S.H.; Bulleid, N.J. Thiol-independent interaction of protein disulphide isomerase with type X collagen during intra-cellular folding and assembly. *Biochem. J.* **1998**, *331*, 793–800. [[CrossRef](#)]
46. Widmer, C.; Gebauer, J.M.; Brunstein, E.; Rosenbaum, S.; Zaucke, F.; Drögemüller, C. Molecular basis for the action of the collagen-specific chaperone Hsp47 / SERPINH1 and its structure-specific client recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 13243–13247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ferry, A.; Messéant, J.; Parlakian, A.; Lemaitre, M.; Roy, P.; Delacroix, C.; Lilienbaum, A.; Hovhannisyan, Y.; Furling, D.; Klein, A.; et al. Desmin prevents muscle wasting, exaggerated weakness and fragility, and fatigue in dystrophic mdx mouse. *J. Physiol.* **2020**, *598*, 3667–3689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Mado, K.; Chekulayev, V.; Shevchuk, I.; Puurand, M.; Tepp, K.; Kaambre, T. On the role of tubulin, plectin, desmin, and vimentin in the regulation of mitochondrial energy fluxes in muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2019**, *316*, C657–C667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Moutal, A.; White, K.A.; Chefdeville, A.; Laufmann, R.N.; Vitiello, P.F.; Feinstein, D.; Weimer, J.M.; Khanna, R. Dysregulation of CRMP2 Post-Translational Modifications Drive Its Pathological Functions. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 6736–6755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Tan, M.; Cha, C.; Ye, Y.; Zhang, J.; Li, S.; Wu, F.; Gong, S.; Guo, G. CRMP4 and CRMP2 interact to coordinate cytoskeleton dynamics, regulating growth cone development and axon elongation. *Neural Plast.* **2015**, *2015*, 947423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Graphene Oxide Decreases Pro-Inflammatory Proteins Production in Skeletal Muscle Cells Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein

Jaśmina Bałaban¹, Mateusz Wierzbicki¹, Marlena Zielińska-Górska¹, Malwina Sosnowska¹, Karolina Daniluk¹, Sławomir Jaworski¹, Piotr Koczoń², Dominik Cysewski³, André Chwalibog⁴, Ewa Sawosz¹

¹Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Poland; ²Department of Chemistry, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Poland; ³Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, Białystok, Poland; ⁴Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark

Correspondence: André Chwalibog, University of Copenhagen, Groennegårdsvej 3, Frederiksberg, 1870, Denmark, Tel +45 40963573, Email ach@sund.ku.dk

Aim: The experiments aimed to document the presence of the ACE2 receptor on human muscle cells and the effects of the interaction of these cells with the spike protein of the SARS-CoV-2 virus in terms of induction of pro-inflammatory proteins, as well as to assess the possibility of reducing the pool of these proteins with the use of graphene oxide (GO) flakes.

Methods: Human Skeletal Myoblast (HSM), purchased from Gibco were maintained in standard condition according to the manufacturer's instruction. The cells were divided into 4 groups; 1. C-control, 2. S-with addition of spike protein, 3. GO-with the addition of graphene oxide, 4. GO-S-with addition of GO followed by the addition of S protein. Protein S (PX-COV-P049) was purchased from ProteoGenix (France). GO was obtained from Advanced Graphene Products (Zielona Gora, Poland). The influence of all the factors on the morphology of cells was investigated using light and confocal microscopy. ACE2 protein expression on muscle cells was visualized and 40 pro-inflammatory cytokines were investigated using the membrane antibody array method. The protein profile of the lysate of cells from individual groups was also analyzed by mass spectrometry.

Conclusion: The experiments confirmed the presence of the ACE2 receptor in human skeletal muscle cells. It has also been documented that the SARS-CoV-2 virus spike protein influences the activation of selected pro-inflammatory proteins that promote cytokine storm and oxidative stress in muscle cells. The use of low levels of graphene oxide does not adversely affect muscle cells, reducing the levels of most proteins, including pro-inflammatory proteins. It can be assumed that GO may support anti-inflammatory therapy in muscles by scavenging proteins that activate cytokine storm.

Keywords: muscle cells, SARS-CoV-2, virus spike protein S, graphene oxide, cytokine storm, ACE2

Introduction

The research's motivation was to explain the role of muscle tissue as a very large pool of secretory cells in the course and effects of COVID-19, particularly in the induction of cytokine storm, and the search for an effective scavenger of these pro-inflammatory proteins.

The global problem caused by the coronavirus disease (COVID-19) pandemic is the result of not only the severe, unpredictable and difficult-to-treat course of the disease, but also its incalculable consequences.^{1,2} A key symptom of COVID-19 is cytokine storm (CS).³ CS is manifested by excessive secretion of pro-inflammatory cytokines that initiate many pathways involved in the propagation of inflammation leading to fever, impaired capillary permeability, acute respiratory failure, multi-organ failure, and in severe cases to death.⁴ According to these authors, the COVID-19-related cytokine storm and its comprehensive diagnosis are the basis for the diagnosis and treatment of this disease. The key CS chemokines and cytokines are believed to include the C-X-C chemokine motif 10 (CXCL10), interferon gamma (IFN- γ), interleukin 1 beta (IL-1 β), interleukins: IL-2,



IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF); granulocyte – macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1).^{4,5} Currently, COVID-19 is referred to as a multi-organ dysfunction promoting systemic inflammation.⁶

The most dangerous consequence of this disease is the fact that a cytokine storm can induce pro-inflammatory mechanisms in various organs and tissues over the next months and possibly years. 30–50% of patients show symptoms of the disease for many months.⁷ Moreover, 80% of COVID-19 infections are mild, unhospitalized and unmonitored.⁸ Thus, the effects of infection, including CS, may develop in a subclinical and uncontrolled manner, and serious effects may become apparent after months.⁷

Skeletal muscle dysfunction is also observed during and after COVID-19, and may be caused by CS induced in other tissues.⁹ Research is being carried out on the potential possibility of infection of muscle tissue or skeletal muscle cells by the SARS-CoV-2 virus. The expression of the TMPRSS2 and ACE2 genes in human muscle tissue was analyzed and it was confirmed that endothelial cells, smooth muscle cells, pericytes, muscle stem cells (satellite cells), macrophages, immune cells (B, T or NK cells), and muscle fibers express TMPRSS2.^{7,10} However, according to some authors, the ACE2 receptor is only expressed by smooth muscle cells and pericytes.⁸ According to other authors, skeletal muscles has high expression of the ACE2 receptor,^{11,12} but lower than endothelial cells.¹⁰ Yamamoto et al¹³ argue that there is no evidence of direct SARS-CoV-2 invasion into skeletal muscles, moreover, no MERS-CoV-2 virus particles were detected in ultrastructural studies of skeletal muscles of patients.¹⁴

Muscle tissue constitutes a significant mass of human organism, in a 50-year-old male it can constitute 36.8% of body weight,¹⁵ and on average it accounts for about 40% of total body weight, which means that it has a huge pool of various proteins, including also functional. This tissue is thought to contain 50–70% of all body proteins.¹⁶ Although muscle cells are not primarily involved in cytokine induction, however, even their minimal production, given the size of the muscle mass, can provide a powerful supply of pro-inflammatory proteins. So, paradoxically, young, athletic men may be much more sensitive to CS. On the other hand, the pain and weakness of the muscles observed during and after the disease,¹⁷ and the consequent lack of physical activity, as well as the limitation of physical activity related to quarantine also constitute the causal mechanism of CS. Therefore, the search for a method to reduce the intensity of CS is necessary.

Graphene oxide (GO) is an allotropic form of carbon made of flakes 1.1 ± 0.2 nm thick, which have the structure of graphene, but contain numerous oxygen groups such as epoxide (= O), carbonyl (C = O), hydroxyl (-OH) and on the edges carboxyl (-COOH) and carbonyl (-CO) groups.¹⁸ These numerous oxygen groups make GO hydrophilic, and after penetration into the body, it is easily passivated by various chemical compounds, especially proteins, which is called the protein corona effect.¹⁹ These features of GO also make it relatively biocompatible,²⁰ as it is surrounded by proteins that reduce its cell-toxic effect.²¹ Research carried out by our team has shown that GO used as a nano-scaffold for muscle cells is not only non-toxic but is also preferentially chosen by cells that adhere and willingly inhabit the GO surface.²² Moreover, cells develop so well on the GO scaffold that they undergo spontaneous physiological contraction. Also, graphene administered to the breeding medium is non-toxic at a level below $10 \mu\text{g} / \text{L}$.²³ Studies of relatively high biocompatibility of GO have also been confirmed by us in experiments on rats,^{24,25} 3D skin model²⁶ and in studies on other biological models.²⁷ It seems that GO, as a super-thin layer of carbon applied in a small amount, can, without inducing toxicity, deposit on its surface CS-related proteins present in the body. The use of such anti-inflammatory therapy could significantly reduce the dangerous, further consequences of COVID-19 disease.

The aim of the conducted experiments was to explain several important mechanisms of the COVID-19 disease and to initially attempt to use GO as an adjunct treatment.

First of all, we wanted to confirm the controversial presence of the ACE2 receptor on the surface of skeletal muscle cells, as well as determine the effects that may result from the presence of a viral fragment - the spike protein, without infecting the cell with the virus. Moreover, assuming that the S protein induces CS in the immunogenic muscle cells, it seems important which cytokines and other functional proteins would be activated. Most of all, however, for the first

time, we have attempted to minimize CS by using GO. This research is the world's first experiment on the potential possibility of GO scavenging CS proteins.

Materials and Methods

GO Characterization

A GO water solution (4mg/mL) was obtained from Advanced Graphene Products (Zielona Gora, Poland). In the experiment, dilutions were prepared in deionized water and sonicated for 15 minutes before use.

The MIR spectrum of the GO water solution was registered with KRS round plates in transmission mode. Five separate spectra of the working sample were registered, and an averaged spectrum was calculated. The Perkin Elmer System 2000 spectrometer was used for spectra registration, and analysis was performed in the Pegrans software.

The morphology of the GO flakes was examined using a TEM - JEM-1220 (JEOL, Japan) at 80 kV and a TEM CCD Morada 11 megapixels camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Germany). The zeta potential of the GO solution was measured using a ZetaSizer Nano ZS model ZEN3500 (Malvern Instruments, UK).

Cell Culture

Human skeletal myoblast cells were purchased from Gibco (Thermo Fisher Scientific, USA). The cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies, USA) supplemented with 2% horse serum (Life Technologies, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies, USA) according to the manufacturer's instructions. The cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air in a Memmert ICO150med incubator (Mettler, Germany). The Sars-COV-2 spike proteins (PX-COV-P049) were purchased from ProteoGenix (France).

The cells were divided into experimental groups: 1) control group (not treated), 2) with addition of S proteins, 3) with addition of a GO solution, 4) GO-S-with addition of GO followed by the addition of S proteins. The GO was mixed with the culture media yielding final concentrations of 100 ppm GO. In the group with GO and S proteins, a medium containing GO was applied first, and S proteins were added at a final concentration 5 µg/mL after one hour. During the experiment in the laboratory was maintained a high standard of biosafety practice, although protein S is not an infectious or replicating factor, with low/moderate individual risk and no community risk. The experiment was conducted in BSL-2 laboratory with BSL-3 biosafety protocols. No formal approval from the Institute review board was required for this study.

The cells were examined, and their morphologies were recorded using a light optical inverted microscope (TL-LED, Leica Microsystems, Germany). For further visualization, the cells were fixed in ice cold methanol for ten minutes at 4°C and stained with eosin/hematoxylin (E+H).

Confocal Microscopy

The morphology of the cells and the presence of ACE2 receptors in muscle cells was evaluated using a confocal microscope (Olympus FV1000, Japan). For imaging, the cells cultured on slides were fixed using 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) (Life Technologies, USA) for ten minutes at room temperature and washed with ice-cold PBS. The cells were then incubated in Tween (0.3%) and washed with PBS (Sigma-Aldrich, USA). Subsequently, the cells were incubated with a blocking solution – normal goat serum (5%; Chemicon International, USA) – for one hour at room temperature. The cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific, USA), actin filaments were stained with phalloidin-Atto 633 (Sigma-Aldrich, USA), and the ACE2 receptors were stained with a polyclonal rabbit antibody anti-ACE2 (SAB3500978, Sigma-Aldrich, USA) overnight at 4°C (dilution 1.5:100). After three series of washing, a goat anti-rabbit antibody (dilution 1:100) was used as a secondary antibody with Alexa Fluor™ 488 (Thermo Fisher Scientific, USA), and the cells were incubated for one hour at room temperature. After staining, the cells were washed with PBS, and the slides were sealed and stored in the dark.

The number of nuclei was analyzed using ImageJ-Cell Counter; the nuclei stained with DAPI were counted manually in a randomly selected field of view ($n = 5/\text{group}$).

The areas of actins and ACE2 receptors were analyzed using ImageJ by calculating the actin or ACE2 positive (non-black) pixels on binarized one-channel images obtained by confocal microscopy ($n = 5/\text{group}$). The mean area of actins and ACE2 were obtained by dividing the total area by the number of nuclei in the field of view ($n = 5/\text{group}$), which represented the relative area of actins and ACE2 receptors in a single cell.

The data were analyzed using monofactorial analysis of variance, ANOVA, with Tukey's post-hoc test for determining the differences between the groups. Differences with a $p\text{-value} \leq 0.05$ were defined as statistically significant. Differences between groups were marked with different letters above the bars (a, b).

Analyses were performed in StatGraphics Centurion version XVI (StatPoint Technologies, USA).

Human Inflammation Antibody Array

The cells were cultured according to the scheme described in section "Cell culture" and treated for 24 hours after confluency reached about 80%. After treatment, the cells were manually detached, collected, and centrifuged at 1200 rpm for ten minutes. The protein extract was prepared with a PierceTM RIPA buffer (Thermo Scientific, USA) with protease inhibitors (Sigma-Aldrich, USA) and sonicated for three minutes with a pulse of 30 seconds on/off and an amplitude of 20%. The samples were centrifuged at 12,000 rpm for 25 minutes at 4°C. The supernatant was collected, and the total protein concentration was determined using a bicinchoninic acid kit (Sigma-Aldrich, USA). All samples from each experimental group were pooled before further procedure. Human inflammation factors were analyzed using an antibody array (ab134003; Abcam, UK). The assay was performed in accordance with the manufacturer's instructions. The membranes were visualized using Azure Biosystem C400 (Azure, USA), and analyzed using the ImageJ software. Obtained results were normalized to the control dots.

Mass Spectrometry

Cells were cultured under standard conditions, and after confluency reached around 80%, treated for 24 hours according to the scheme described in the "Cell culture" section. After treatment, the cells were manually scrapped off, collected, washed with PBS, and centrifuged at 1200 rpm for ten minutes. The protein extract was prepared with a PierceTM RIPA buffer (Thermo Scientific, USA) and sonicated for three minutes with a pulse of 30 seconds on/off and an amplitude of 20%. Protease inhibitors (Sigma-Aldrich, USA) were added to the PierceTM RIPA buffer. The samples were centrifuged at 12,000 rpm for 25 minutes at 4°C. The supernatant was collected and subsequently precipitated using chloroform/methanol protocol. Each group was analyzed in three independent replicates. The protein pellets of each sample were solubilized in 100 μL of 100 mM TEAB, 8 M urea, 5 μL of TCEP mM, sonicated, and alkylated with 5 μL of MMTS for 30 minutes. The protein mixture was digested with a mixture of proteases LysC/Trypsin (Promega V5073, USA) in 8 M urea and 100 mM TEAB, in a 1:50 ratio. After four hours of digestion with shaking at 37°C, the samples were diluted to achieve a urea concentration of 1 M and digested overnight. The peptide mixture was purified with HL 10 mg cartridges and evaporated to dryness in a rotary evaporator. The pellets were dissolved with 2% acetonitrile in the presence of 0.1% TFA. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analyses were performed in the Laboratory of Mass Spectrometry (IBB PAS, Warsaw) using a NanoAcquity UPLC System (Waters) coupled to a QExactive Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA). The mass spectrometer was operated in the data-dependent MS2 mode, and data were acquired in the m/z range of 200–2000. Peptides were separated by a 180-minute linear gradient of 95% solution A (0.1% formic acid in water) to 45% solution B (acetonitrile and 0.1% formic acid). Each sample measurement was preceded by three washing runs to avoid cross-contamination.

Data were analyzed with the PEAKS Q software and searched against the UniProt human reference proteome. The results were also analyzed in the Panther Classification System version 16.0.

Heat maps were prepared using the GraphPad Prism software version 8.1.2 (GraphPad Software Inc., USA).

The data were analyzed by monofactorial analysis of variance, ANOVA, and *t*-test, with the level of significance set at $p \leq 0.05$. Analyses were performed in the StatGraphics Centurion version XVI (StatPoint Technologies, USA).

Results

Characterization of GO

Transmission electron microscopy (TEM) was used to confirm the morphology of the GO flakes. After drying, thin sheets of GO formed a wrinkled surface of 1–3 layers of flakes with irregular edges (Figure 1A). The size of the flakes was 2 to 3 μm . The zeta potential of the GO water solution (1mg/mL) was -28.3 ± 2.1 mV.

A wide characteristic band generated by the stretching of the O-H group at 3450 cm^{-1} was identified in middle infrared (MIR) analysis. The bands generated by the stretching of the C-H bond were located at 2816 cm^{-1} . Bands assigned to triple bonds between carbon atoms (sp hybridization) were registered at 2363 cm^{-1} . A very intense characteristic band at 1615 cm^{-1} was assigned to double bonds between carbon atoms (sp^2 hybridization of carbon). Two bands located at 1371 and 1350 cm^{-1} were assigned to C-O or C-C stretching and/or C-H deformations, respectively. C-C stretching indicates the sp^3 hybridization of carbon. Hence carbon was present in the sample in all known types of hybridization. The presence of hydrogen and oxygen was also confirmed (Figure 1B).

Cell Morphology - Light and Confocal Microscopy

The morphology of the human skeletal myoblast (HSkM) cells exposed to GO, S proteins, and S proteins together with GO were added to the culture medium in concentrations of 100 ppm GO and $5\mu\text{g/mL}$ S protein (Figure 2A and B) was analyzed using light microscopy. There were no significant differences between groups after 24 hours of treatment. An elongated shape characteristic of skeletal muscle cells was observed in all groups. The muscle fibers with multiple nuclei also were present (Figure 2B). There were no signs of apoptosis or necrosis in any of the groups. Clearly visible GO flakes were suspended in the culture medium and adhered to the cells in the GO group. Interestingly, the GO flakes adhering closely to the cells did not affect the deformation of the cells in these adhesion areas. In summary, the

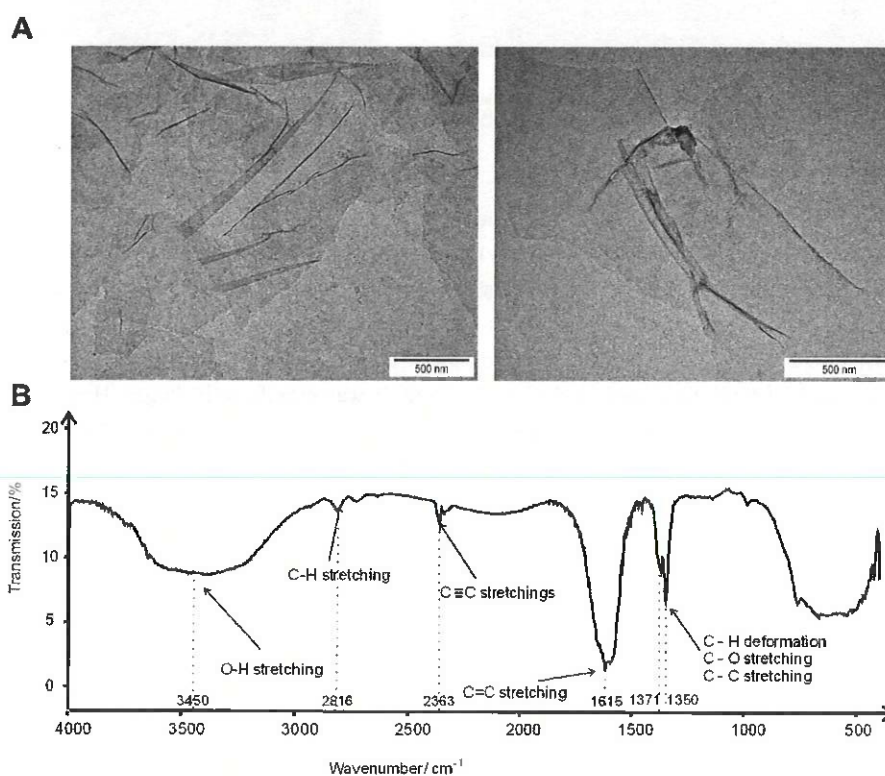


Figure 1 Transmission electron microscopy images of GO flakes (A); middle infrared (MIR) spectrum of graphene oxide (GO) registered in transmission mode in the spectral range of $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ (B).

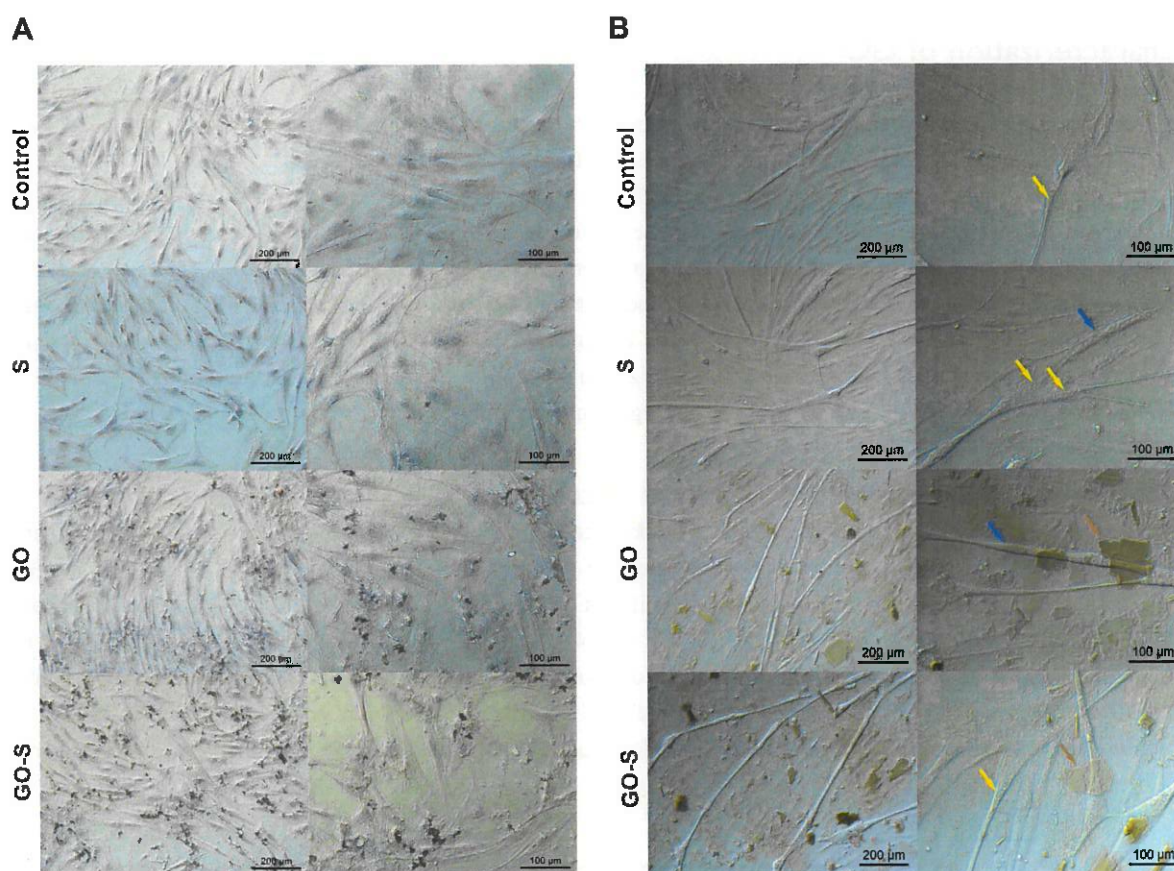


Figure 2 Microscopy images of the morphology of fixed HSKM cells after staining with eosin (cytoplasm) and hematoxylin (nuclei) (A) and without fixation (B) in the control group and after 24 hours of treatment with S protein (S), graphene oxide (GO), and GO with S protein (GO-S); yellow arrows – nuclei, brown arrows – GO flakes, blue arrows – muscle fibers.

introduction of the S proteins and the use of GO in groups of cells incubated with S proteins, as well as the introduction of GO alone into the medium did not adversely affect the morphology of the muscle cells.

Sections with stained nuclei (DAPI), actins (phalloidin), and ACE2 receptors were observed with a confocal microscope (Figure 3), and the surface of the actins and ACE receptors were measured. No adverse changes were found in the morphological image of the actin. However, their surfaces were slightly larger in the groups where GO was applied, and in the case of total actin area in the GO-S group, it was significantly larger. However, no morphological changes indicative of cytotoxicity and no disruptions of cytoskeleton integrity or actin polymerization were observed (Figure 4A and B). The muscle cell samples were also stained for the ACE2 receptors. A strongly expressed presence of ACE2 receptors was found on muscle cells from the control group and the S, GO, and S-GO groups (Figure 3). The total ACE2 area and mean ACE2 area measurements did not differ between the groups (Figure 4C and D). When analyzing the morphology and the number of cell nuclei, no differences were observed between the groups and no pathological changes in the images of cell nuclei were found (Figure 4E).

Protein Analysis

The experiment analyzed the expression of 40 proteins involved in inflammation (Figure 5). Cells incubated with the S proteins showed an increase in ICAM-1 (A-B/9), MCP-1 (E-F/6), and IL-8 (C-D/8) proteins. The application of GO to the cells incubated with S proteins decreased the expression of these proteins to the level of the control group. Moreover, GO, when used alone, did not increase the expression of pro-inflammatory proteins.

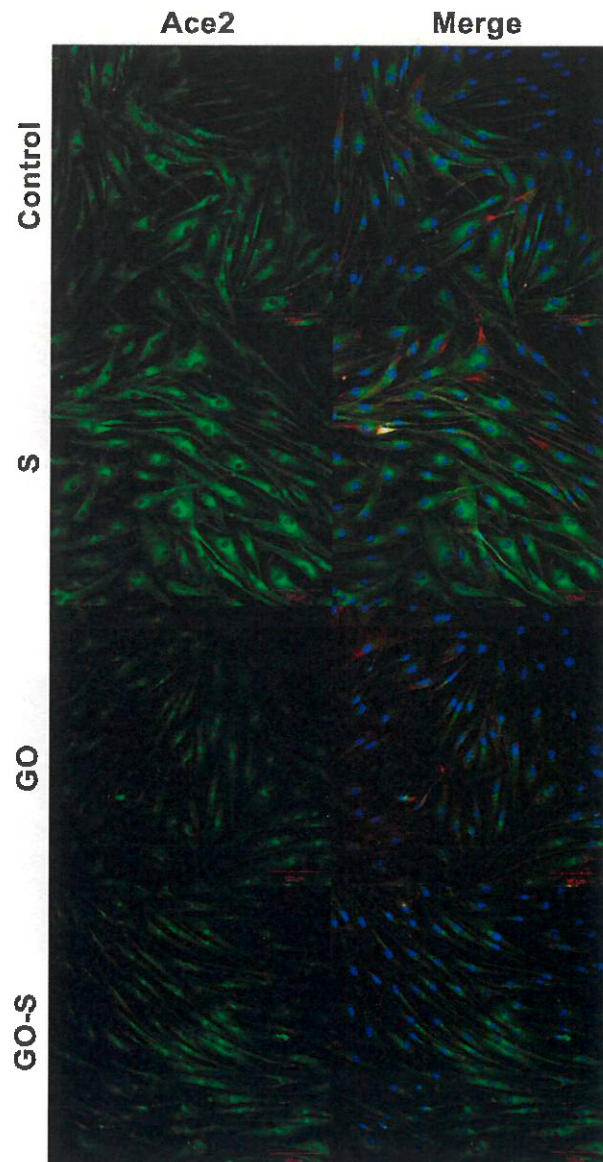


Figure 3 Morphology of HSKM cells, in the control group, and after 24 hours of treatment with S protein, graphene oxide (GO), S protein with GO, visualized using confocal microscopy: ACE2 receptor – immunofluorescent staining (green), nuclei – DAPI (blue), actin – phalloidin (red).

Proteomic analysis was also carried out using mass spectrometry (full data available in the [Supplement Material, Table S2](#)). We analyzed the changes in the profile of a broad spectrum of proteins induced by the presence of S proteins, GO, and both factors using the Peaks Q and Panther softwares. A total of 667 proteins with significantly altered expression levels were found in the experimental groups compared to the control group. The analysis of the heatmap images ([Figure 6](#)) shows that the S proteins increased the expression of proteins relative to the control group, while the use of GO in the group of cells incubated with S proteins decreased their level; however, the greatest decrease of numerous proteins level was observed in group treated with GO.

A volcano plot analysis confirmed these trends, showing a significant up-regulation of 13 selected proteins and a downregulation of 13 induced by the presence of S proteins in the culture media. The addition of GO to the medium of cells incubated with S proteins significantly increased the levels of five proteins and decreased the levels of 638 proteins ([Figure 7](#)). For comparison, the addition of GO alone increased the expression of five proteins and decreased the

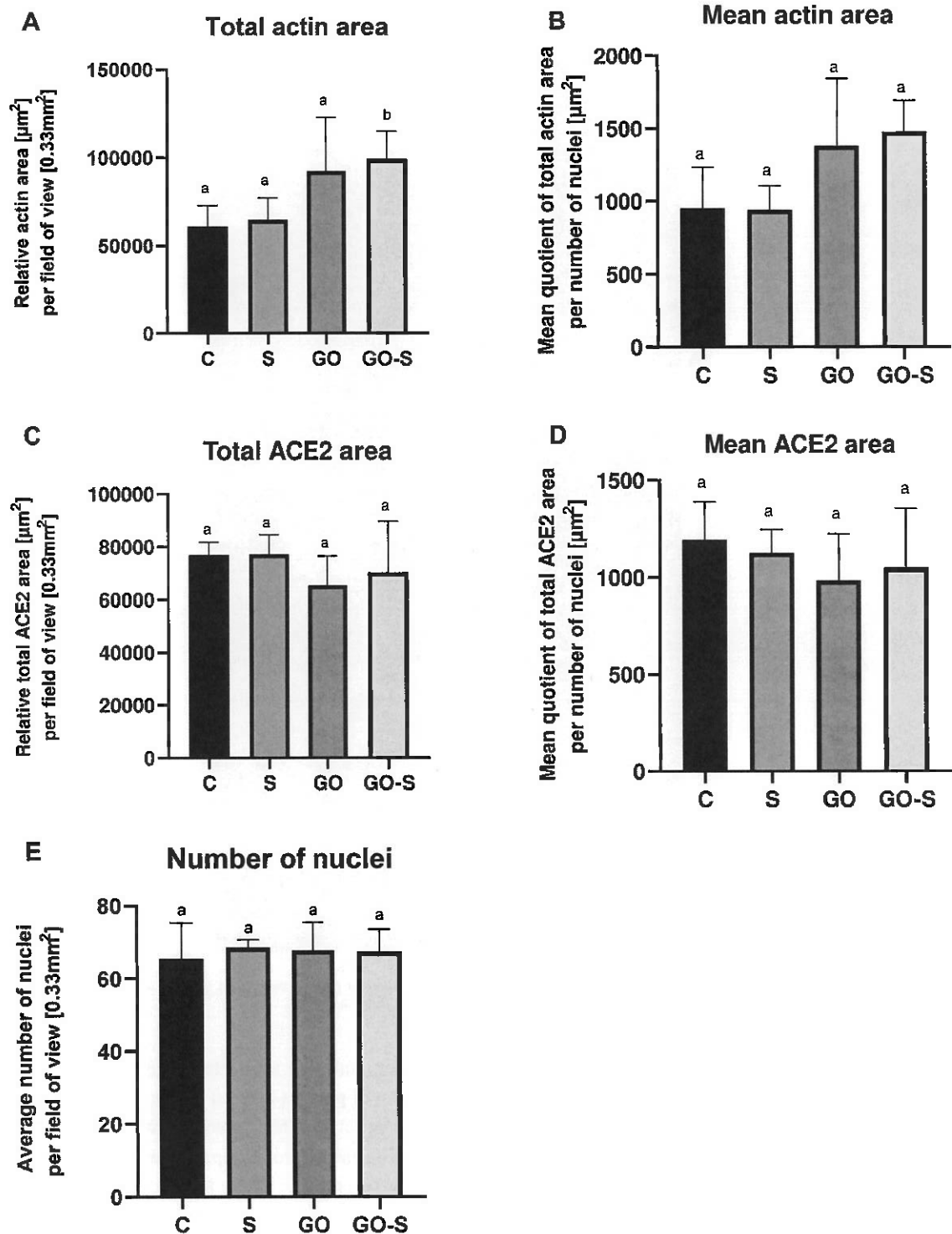


Figure 4 Cytoskeletal integrity assessment: total and mean actin area in HSKM in the control group (C) and after 24 hours of treatment with S protein (S), graphene oxide (GO), and S protein combined with GO (GO-S) ($n = 5/\text{group}$) (A and B); presence of ACE2 receptors in HSKM cells – total and mean ACE2 receptor area ($n = 5/\text{group}$) (C and D); cytotoxicity – number of nuclei in HSKM cells ($n = 5/\text{group}$) (E); different letters above the bars indicate significant differences between groups from Tukey post-hoc test analysis.

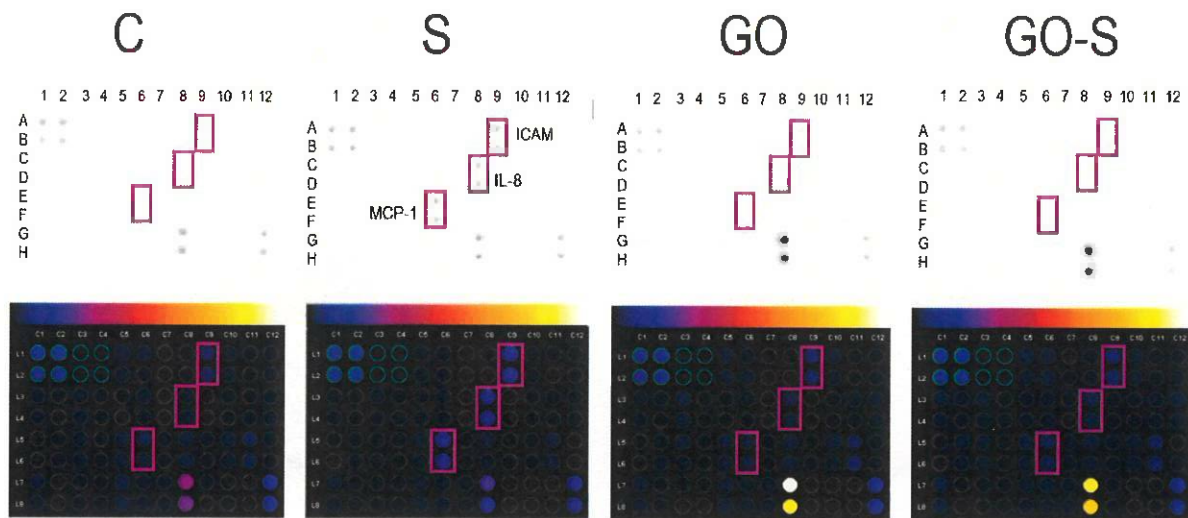


Figure 5 Array analysis of inflammation factors in HSkM cells in the control group (C) and after 24 hours of treatment with S protein (S), graphene oxide (GO), and a combination of S proteins and GO (GO-S) (A); results normalized to the control dots; full array map available in the [Supplementary Material \(Table S1\)](#). **Abbreviations:** ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; IL-8, interleukin 8.

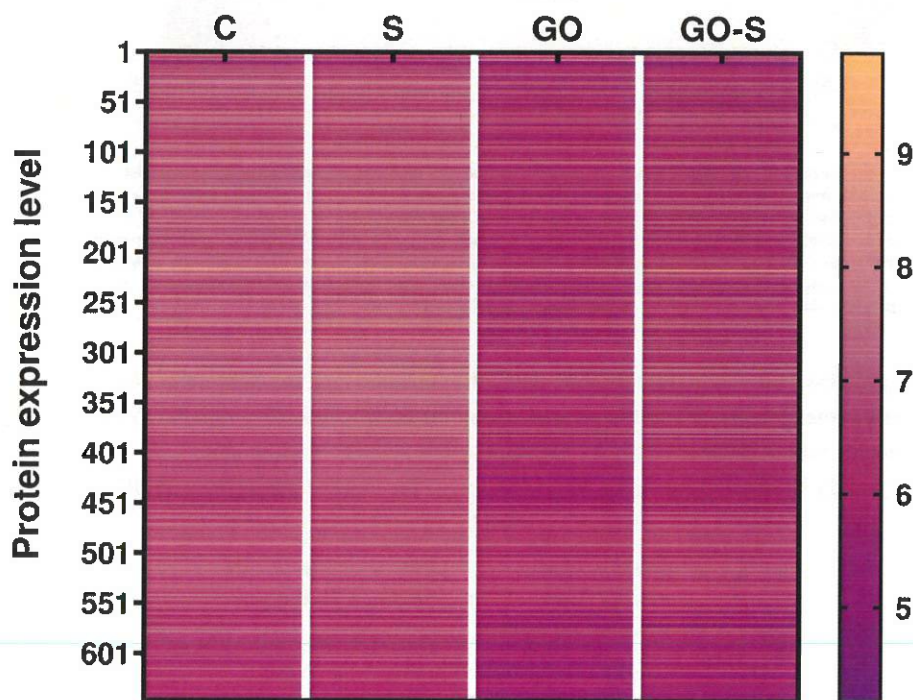


Figure 6 Heatmap representation of protein expression changes identified through the mass spectrometry analysis of HSkM cells in the control group (C) and after 24 hours of treatment with S protein (S), graphene oxide (GO), and S protein with GO (GO-S); the heatmap only included 667 proteins with significantly altered expression levels identified in the mass spectrometry results analysis using the Peaks Q software; the results are presented as \log_{10} values.

expression of 431 proteins (Table 1). The Venn diagram (Figure 8) showed number of proteins with decreased expression level, which were common in S, GO and GO-S groups, in comparison to the control group. There were no similarities in proteins with increased expression level between S group and GO, GO-S. Only one record was common between GO and GO-S group.

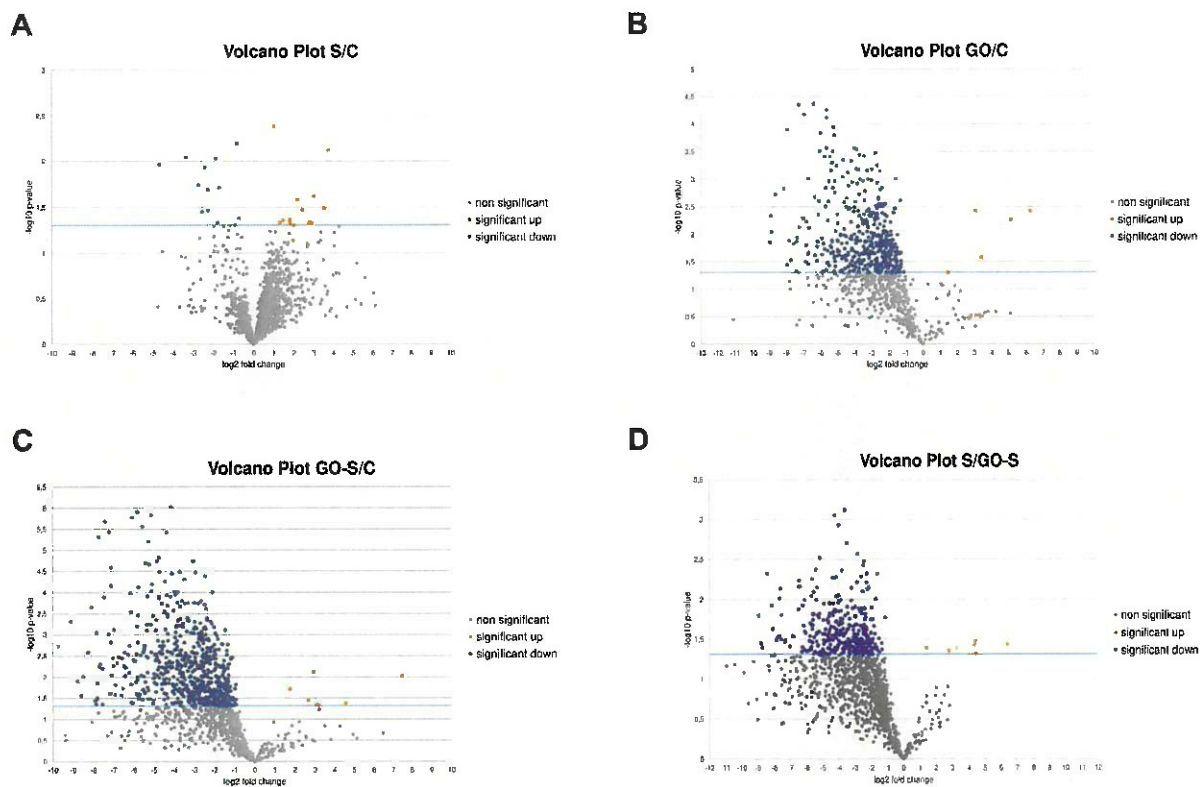


Figure 7 Volcano plot representation of the expression level of proteins identified by mass spectrometry analysis; volcano plot of up- and downregulated proteins in HSkM cells after 24 hours of treatment with S protein (S) compared to the control group (C) (A); volcano plot of up- and downregulated proteins in HSkM cells after 24 hours of treatment with graphene oxide (GO) compared to the control group (C) (B); volcano plot of up- and downregulated proteins in HSkM cells after 24 hours of treatment with S protein and graphene oxide (GO-S) compared to the control group (C) (C); volcano plot of up- and downregulated proteins in HSkM cells after 24 hours of treatment with S protein (S) compared to the group treated with S protein and graphene oxide (GO-S) (D); the violet dots (left side) mark the proteins with significantly decreased expressions, the Orange dots (right side) mark the proteins with significantly increase expressions; the x-axis shows log₂ fold changes in expression level, and the y-axis -log₁₀ p-values; blue line - significance threshold.

The top ten proteins that were most significantly differentiated by the S proteins were selected (Table 2). The expression of these proteins increased to the greatest extent (at least two-fold) compared to the control group. Then, the level of these proteins was monitored following the application of GO and S proteins (GO-S group) and after using GO alone. We found that the S proteins increased the expression of the histone deacetylase 2 (HDAC2) protein the most, and

Table 1 Number of Proteins with Significantly Altered Expression Level Identified Through the Volcano Plot Analysis

Number of Up- and Downregulated Proteins (Compared to the Control Group)		
	Upregulated	Downregulated
S	13	13
GO	5	431
GO-S	5	638

Abbreviations: S, experimental group of HSkM cells treated with S protein; GO, experimental group with graphene oxide; GO-S, experimental group with cell treated with S protein and graphene oxide.

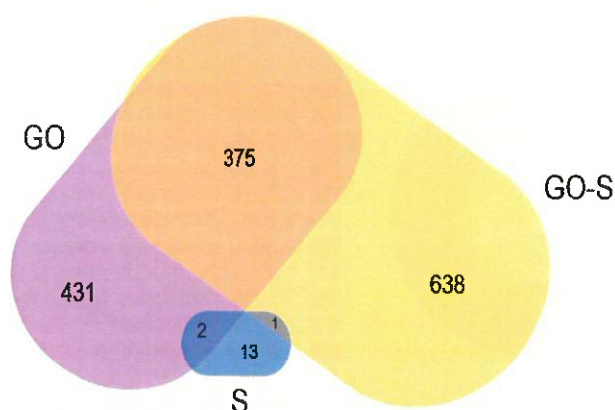


Figure 8 Venn diagram with numbers of proteins with significantly decreased expression level among the S, GO and GO-S groups, in comparison to the control group.

interestingly, the addition of GO further increased the expression of this protein. The application of GO alone also increased its expression, but to a lesser extent. The expression of the stomatin-like protein 2 mitochondrial (STOML2) increased significantly under the influence of the S proteins, but the presence of GO was the reason for its reduction to the control group level. The S proteins also significantly increased the expression of the following proteins by more than two-fold: mitochondrial superoxide dismutase (SOD2), peroxisomal multifunctional enzyme type 2 (HSD17B4), cyclooxygenase-1 (COX-1/PTGS1), CD59 glycoprotein (CD59), calponin-3 (CNN3), caveolae-associated protein 4 (CAVIN4), titin (TTN), and 40S ribosomal protein S3 (RPS3). Interestingly, in all cases, application of GO decreased the level of these proteins. The incubation of cells with S proteins also resulted in a significant, more than two-fold reduction in the expression of two proteins - keratin type I cytoskeletal 9 (KRT9) and hornerin (HRNR).

The application of GO significantly increased the expression of these proteins, and indeed, the level of these proteins was the highest in the groups with GO alone.

Table 2 List of the Selected Top Ten Proteins with Significantly Altered Expression Levels Induced by the Presence of S Proteins Relative to the Control Group Based on at Least 2-Fold Change of Expression Level

Top Ten Proteins Up- and Downregulated Relative to the Control Group		
Gene Symbol	Protein Description	Fold Change
Upregulated		
HDAC2	Histone deacetylase 2	8.15
STOML2	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	4.65
SOD2	Superoxide dismutase, mitochondrial	2.65
HSD17B4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	2.53
COX1/PTGS1	Prostaglandin G/H synthase 1/Cyclooxygenase 1	2.38
CD59	CD59 glycoprotein	2.38
CNN3	Calponin-3	2.30
CAVIN4	Caveolae-associated protein 4	2.22
TTN	Titin	2.15
RPS3	40S ribosomal protein S3	2.04
Downregulated		
HRNR	Hornerin	0.37
KRT9	Keratin, type I cytoskeletal 9	0.5

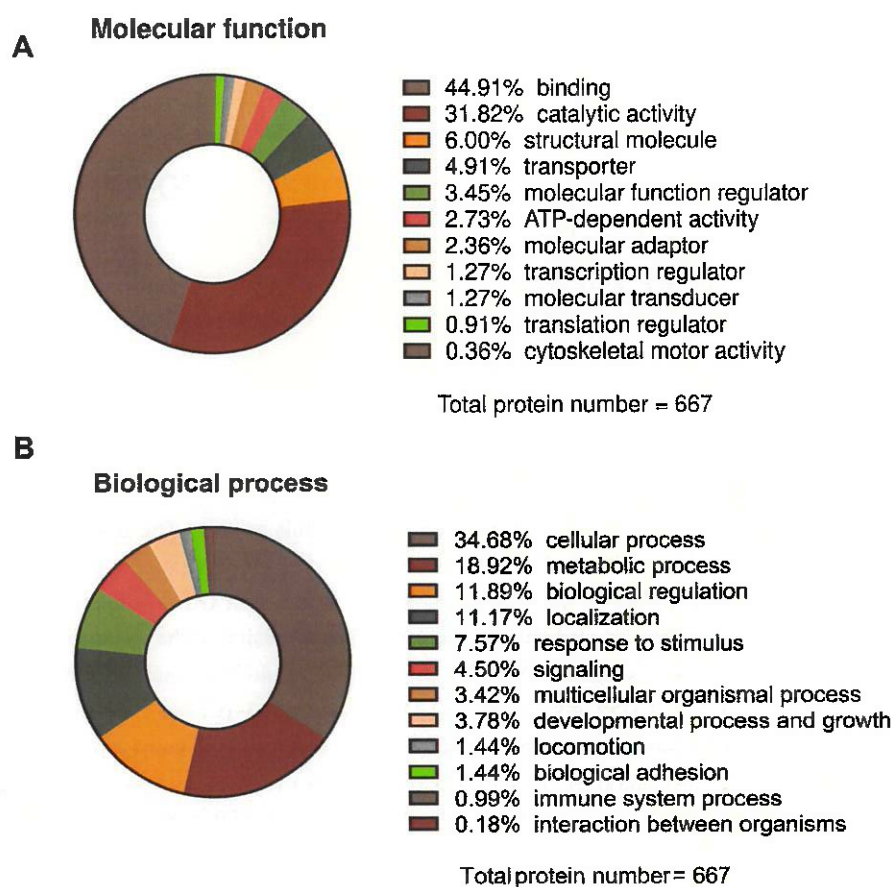


Figure 9 Summary classification of general molecular function (A) and biological processes (B) of proteins with significantly altered expression levels in experimental groups (GO, S, GO-S) relative to the control group, identified by mass spectrometry analysis.

Regarding the influence of GO, the levels of several proteins increased relative to the control group, especially keratin type II cytoskeletal 2, hornerin, and keratin type II cytoskeletal. The level of the remaining proteins was lower than in the control group.

Around one third of proteins were responsible for cellular processes and about 1/5 for metabolic changes (Figure 9A). With regard to molecular functions, approximately 45% of the different proteins were related to binding and as much as 30% were associated with catalytic activity (Figure 9B).

Discussion

A Human Skeletal Myoblast (HSkM) was derived from a healthy human being and constituted the physiologically relevant cellular model of myoblasts. Cells taken directly from muscle tissue that have undergone few population doublings and have not been immortalized represent a more reliable experimental model of skeletal muscle response to experimental factors compared to traditionally used immortalized cells.²⁸

In studies carried out on HSkM cells, we found a well-expressed presence of the ACE2 receptor protein localized around the cells, which is confirmed by the studies of other authors.^{11,29} The expression of the ACE2 receptor in muscle cells indicates the potential effect of SARS-CoV-2 on skeletal muscle^{17,30} and may explain the cause of muscle weakness, pain and dysfunction during COVID-19 disease.³¹ There is a significant loss of muscle mass in COVID-19 patients.³² Among the studies documenting skeletal muscle damage related to COVID-19, the authors point to sarcopenia,³³ cachexia, myalgia, myositis, rhabdomyolysis, atrophy, peripheral neuropathy and Guillain-Barré syndrome.³²⁻³⁵ In our research, we did not observe any pathological changes in the morphological image, especially the cell microstructure, the number of nuclei and the actin image. However, in our experiments we did not use the SARS-

CoV-2 virus, but only its S spike protein. Protein S is a key determinant of the invasiveness of the virus by binding to ACE2, hence the inhibition of the SARS-CoV-2 S - ACE2 interaction is the basis for research on the treatment and prevention of COVID-19.^{36,37} In our research, we observed a change in the spectrum of proteins produced by muscle cells under short contact with the spike protein. This should be related to the situation where there is no infection of muscle cells but only contact with the residues of the virus. Moreover, *in vitro* studies on one cell line never reflect the real state, where the condition of muscles is also influenced by proteins and secretions synthesized in other tissues. *In vitro* studies on primary cells are carried out in a short period of time due to the mortality of HSKM cells. However, these studies are crucial in understanding the first signs of a cytokine storm that may occur under the influence of the S protein in muscle tissue. According to Seixas et al³⁸ the mechanisms responsible for the pathological changes in skeletal muscles during COVID-19 are still unknown, but undoubtedly the key cause, according to these authors, seems to be a cytokine storm.

Thus, another study of the implications that might be associated with the presence of the viral spike protein was to determine the expression of proteins involved in the induction of inflammation. After incubation of HSKM cells with the S protein, an increase in the levels of ICAM-1, MCP-1 and IL-8, which are among the key pro-inflammatory cytokines and chemokines, was observed.³⁹ Increased levels of these proteins have also been observed in COVID-19 patients.⁴ Interleukin 8 is a chemokine considered to be the most potent chemotactic agent in humans, and moreover has a clear target specificity for neutrophils, which it attracts and activates in inflammatory areas.⁴⁰ Muscle tissue shows the presence of many cytokines and chemokines, including IL-8,⁴¹ which is a manifestation of its immunological and endocrine function.⁴² However, some authors argue that a modest release of IL-8 by muscle cells causes not so much an increase in plasma IL-8 concentration as local activity, especially promoting angiogenesis.^{42,43} IL-8 may bind the CXCR1 receptor responsible for its pro-inflammatory action or the CXCR2 receptor present on microvascular endothelial cells responsible for angiogenesis.⁴⁴ This local proangiogenic neovascularization promoting effect of IL-8⁴² may, paradoxically in the case of COVID-19, increase the ACE2 receptor pool present on the endothelial cells of newborn vessels and thus increase the cell availability for SARS-CoV-2 virus.

Another protein whose elevated level was observed due to the presence of the S protein was the chemokine MCP-1. MCP-1 is responsible for the production of adhesion molecules as well as the proliferation and migration of VSMC vascular smooth muscle cells^{45,46} and may also promote the formation of atherosclerotic lesions, it is one of the most important cytokines responsible for venous thrombosis.⁴⁷ In COVID-19 patients, a postmortem examination revealed thrombus in the small vessels of the lungs. The presence of a fibrin clot in small arteries indicates an increased risk of vascular and venous thromboembolic complications.^{48,49} Moreover, serum MCP-1 levels are a biomarker indicating a very severe course and a high risk of death in COVID-19 patients.⁵ Studies on mice have found that increased production of MCP-1 in skeletal muscle promotes inflammation in skeletal muscle.⁵⁰ Moreover, MCP-1 is also called myokine - the exercise factor, because intense muscle effort increases its level, and it promotes the infiltration of macrophages after severe muscle damage. It appears that muscle, as a tissue that exhibits secretory functions and accounts for approximately 40% of body weight, may play a very important role in inducing and promoting inflammation, especially in COVID-19.

In the conducted studies, an increased level of ICAM-1 was also observed under the influence of the spike S protein. Increased blood ICAM-1 levels have been reported in patients with COVID-19, especially in severe cases, and ICAM-1 may also be a predictor of complications related to COVID-19.⁵¹ ICAM-1 is a cell surface adhesion receptor and is responsible for the accumulation of white blood cells at sites of inflammation. Moreover, it stimulates the synthesis of cytokines that induce rhinovirus replication.⁵² Increased ICAM-1 expression in muscle cells and muscle satellite cells occurs after muscle overload, contributing to muscle hypertrophy.⁵³ Exercise may also increase the expression of IL-8, increased levels of which were observed under the influence of the S protein.⁵⁴ Thus, the spike protein is likely to induce mechanisms similar to severe muscle overload. Muscle overload reduces the antioxidant capacity, which can lead to oxidative stress.⁵⁵ Activation of oxidative stress can be a step in the development of a cytokine storm. Analysis of the level of cytokines and the found increased synthesis of IL-8, MCP-1 and ICAM-1 - characteristic of COVID-19 infection,⁵⁶ induced in human skeletal muscle cells by the presence of the spike protein, clearly indicated the activation of the cytokine storm.

The application of GO in the group of cells incubated in the medium with the S protein decreased the level of cytokines IL-8, MCP-1 and ICAM-1 to the level of the control group. Graphene oxide alone, added to the culture medium, did not affect the induction of any of the inflammatory proteins. These results confirm ours and other authors' observations, which prove the significant biocompatibility of graphene oxide administered in a small amount.²³ In *in vitro* studies on smooth muscle, found no negative effect of GO, but it was observed an increase of cell proliferation under the influence of GO.⁵⁷ Moreover, *in vitro* studies on macrophages showed that GO at 1 $\mu\text{m} / \text{mL}$ did not increase the level of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α .⁵⁸ There are also studies showing negative, including pro-inflammatory effects of GO,⁵⁹ although the toxicity depends on the dose used and we used a safe level in our studies, also verified in preliminary studies.

In order to clarify the molecular causes of changes induced by the incubation of cells with the S protein and the effect of GO to reduce this adverse effect, we conducted a proteomic analysis of the lysate of cells from the control group and the S, GO-S and GO groups. We found that the S protein had the greatest effect on increasing the level of histone deacetylase (HDAC2), what's more, GO increased the level of this protein even more. Takahashi et al⁶⁰ indicate that HDAC2 increases ACE2 expression, being an important risk factor in the course of COVID-19. This is very clearly confirmed by our results, which moreover documented that the S protein, regardless of the presence of a virus, causes this mechanism in skeletal muscle cells. It can be assumed that the spike protein promotes infection by increasing the ACE2 pool and thus increasing the availability of cells to the virus. ACE2, in addition to its function of cleaving angiotensin II, also affects the functioning of mitochondria,⁶¹ what is more, it regulates the activity of the mitochondrial oxidase NADPH 4, responsible for the production of Reactive Oxygen Forms (ROS).⁶² The overproduction of ROS may, in turn, be a factor that promotes a cytokine storm.

Another protein whose level has significantly increased is Stomatin-like protein 2 mitochondrial (STOML2). This protein regulates the biogenesis and activity of mitochondria by regulating mitochondrial translation, although its key role is to increase the activity of this translation in a state of increased cell activity.⁶³ It can be presumed that the increase in HDAC2 and STOML2 levels is associated with the activation of the ROS production process by the S protein. This may be confirmed by a significant increase in the level of Superoxide dismutase (SOD2), Cyclooxygenase-1 (COX-1) and Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 (HSD17B4) and the 40S S3 ribosomal protein (RPS3). SOD2 is an enzyme that catalyzes superoxide dismutation in the first line of ROS formation in mitochondria.⁶⁴ SOD2 levels may be elevated due to overproduction of ROS.⁶⁵ What's more, increasing the level of the 40S S3 ribosomal protein, which, apart from involvement in translation, also performs a repair function towards DNA, and in particular has an affinity for the DNA adduct (7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG), resulting from the action of ROS⁶⁶ would confirm the thesis about the promotion of oxidative stress in skeletal muscle cells by the spike protein.

Overexpression of SOD2 also affects the aconitase activity and may inhibit the activity of pyruvate carboxylase - the Krebs cycle enzyme, which reduces the efficiency of energy production from glucose,⁶⁷ which in turn may affect the activation of beta-oxidation of fatty acids, manifested by increased PMFP2 expression. Muscle weakness is a characteristic symptom of COVID-19 infection.¹⁷ COX-1 and COX-2 are highly expressed in inflamed tissues, including COVID-19.⁶⁸ COX-1 is present in muscles⁶⁹ and is a physiologic variant of COX enzyme which catalyzes the conversion of arachidonic acid to Prostaglandin H₂ (PGH₂), leading to the synthesis of prostaglandins and thromboxan, and above all to PGG₂.⁷⁰ Moreover, COX-1 regulates angiogenesis,⁷¹ which would seem consistent with the increase in IL-8 levels observed in our research and support the hypothesis of promoting infection by the spike protein by activating angiogenesis and thereby increasing the ACE2 receptor pool. However, confirmation of this thesis requires further in-depth research. Nevertheless, both an increase in SOD2 and COX-1 levels may indicate activation of oxidative stress, which is a cytokine storm promoter by activating the redox-sensitive transcription factor NF- κ B, which will regulate IL-1 β , IL-6, TNF- α and observed in our study, IL-8.⁷²

The S protein also increased the expression of the CD59 membrane glycoprotein, which may also be involved in the regulation of inflammatory factors.⁷³ There was also an increase in the level of CAVIN4 - a protein significantly involved in inflammatory signaling mechanisms related to pathogenic changes in muscles, including muscular dystrophy.⁷⁴ Interestingly, the S protein also increased CNN3 protein expression. This protein regulates the organization and contractility of stress fibers,⁷⁵ which may suggest some influence of the spike protein on muscle function. This would

confirm an increase in the level of titin, a protein strongly associated with muscle activation and strength,⁷⁶ which may also confirm the observation regarding the increase in ICAM-1 expression and support the thesis that the effect of the S protein is similar to the effect of muscle overload.

Analyzing the influence of GO on the expression of the discussed proteins increased by the spike protein, it should be stated that all these proteins, except HDAC2, were down-regulated. The decreased expression of these proteins was non-specific and showed no physiological relationship. The protein corona effect characteristic of GO⁷⁷ may explain this phenomenon. GO, as a super-thin material, has a large specific surface, which exposes numerous hydroxyl, epoxy and carboxyl groups, enabling the formation of weak bonds, electrostatic and hydrophobic interactions.^{78,79} GO flakes introduced into the biological fluid are surrounded by proteins present in the biological environment, although this process is not strictly specific, there is a certain personalization characteristic of the biological fluid donor's disease.^{80,81} This regularity explains why the proteome of muscle cells treated with spike protein and GO is different compared to cells treated with GO alone. By analyzing the proteomic results, as well as the identification of selected inflammatory cytokines, it can be assumed that GO flakes bound proteins involved in promoting cytokine storm on the surface. These preliminary results represent the first attempt to use GO as a quencher for a spike protein-induced cytokine storm. The use of GO as a factor reducing the effect of CS could be of key importance for post-COVID-19 therapy.

Conclusion

It can be concluded that human muscle cells have a strongly expressed ACE2 receptor, which confirms the results of studies by other authors. This observation confirms the possibility of the SARS-CoV-2 virus entering muscle cells and stimulating them to produce pro-inflammatory proteins. In addition, the S protein of the SARS-CoV-2 virus, introduced into the muscle cell culture, activates some molecular mechanisms leading to the induction of a cytokine storm. Molecular changes under the influence of protein S may resemble the effect of muscle overload, especially the activation of oxidative stress and pro-angiogenic effects. This confirms the secretory function of skeletal muscle tissue and, for the first time, indicates the pro-inflammatory potential of this tissue in the face of COVID-19 infection. Moreover, this effect is independent of the presence of the virus in the cell, but only induced by the spike protein. Most importantly, however, we documented for the first time the possibility of reducing pro-inflammatory proteins, induced in the cell by protein S, with GO. As highly capable of adsorbing proteins on their surface and forming a protein corona, GO flakes can act as a CS protein scavenger. The conducted research may indicate the potential use of GO in supporting the treatment of muscle inflammation in COVID-19. Since muscles are a large part of the human body mass, their cytokine storm-promoting activity is likely to determine the course of the disease.

Acknowledgments

This manuscript is a part of Jaśmina Bałaban's PhD thesis.

Funding

This research was funded by the National Center for Research and Development in Poland, project dedicated to COVID-19 Hospitals number 23/2020.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Gonzalez A, Orozco-Aguilar J, Achiardi O, Simon F, Cabello-Verrugio C. SARS-CoV-2/renin-angiotensin system: deciphering the clues for a couple with potentially harmful effects on skeletal muscle. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):7904. doi:10.3390/ijms21217904
2. Rabbani G, Ahn SN. Review: roles of human serum albumin in prediction, diagnoses and treatment of COVID-19. *Int J Biol Macromol*. 2021;193 (Pt A):948–955. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.10.095
3. Pum A, Ennemoser M, Adage T, Kungl AJ. Cytokines and chemokines in SARS-CoV-2 infections-therapeutic strategies targeting cytokine storm. *Biomolecules*. 2021;11(1):91. doi:10.3390/biom11010091

4. Yang L, Xie X, Tu Z, Fu J, Xu D, Zhou Y. The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):255. doi:10.1038/s41392-021-00679-0
5. Chen Y, Wang J, Liu C, et al. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. *Mol Med.* 2020;26(1):97. doi:10.1186/s10020-020-00230-x
6. Long B, Carius BM, Chavez S, et al. Clinical update on COVID-19 for the emergency clinician: presentation and evaluation. *Am J Emerg Med.* 2022;54:46–57.
7. Meacci E, Pierucci F, Garcia-Gil M. Skeletal muscle and COVID-19: the potential involvement of bioactive sphingolipids. *Biomedicines.* 2022;10(5):117.
8. Disser NP, De Micheli AJ, Schonk MM, et al. Musculoskeletal consequences of COVID-19. *J Bone Joint Surg Am.* 2020;102(14):1197–1204.
9. Suh J, Amato AA. Neuromuscular complications of coronavirus disease-19. *Curr Opin Neurol.* 2021;34(5):669–674.
10. Hikmet F, Méar L, Edvinsson Å, Micke P, Uhlén M, Lindskog C. The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Mol Syst Biol.* 2020;16(7):e9610. doi:10.15252/msb.20209610
11. Riquelme C, Acuña MJ, Torrejón J, et al. ACE2 is augmented in dystrophic skeletal muscle and plays a role in decreasing associated fibrosis. *PLoS One.* 2014;9(4):e93449. doi:10.1371/journal.pone.0093449
12. Perez-Valera M, Martinez-Canton M, Gallego-Selles A, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (SARS-CoV-2 receptor) expression in human skeletal muscle. *Scand J Med Sci Sports.* 2021;31(12):2249–2258. doi:10.1111/sms.14061
13. Yamamoto K, Takeshita H, Rakugi H. ACE2, angiotensin 1-7 and skeletal muscle: review in the era of COVID-19. *Clin Sci.* 2020;134(22):3047–3062. doi:10.1042/CS20200486
14. Alsaad KO, Hajeer AH, Al Balwi M, et al. Histopathology of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection - clinicopathological and ultrastructural study. *Histopathology.* 2018;72(3):516–524. doi:10.1111/his.13379
15. Gallagher D, Visser M, De Meersman RE, et al. Appendicular skeletal muscle mass: effects of age, gender, and ethnicity. *J Appl Physiol.* 1997;83(1):229–239. doi:10.1152/jappl.1997.83.1.229
16. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int.* 2015;96(3):183–195. doi:10.1007/s00223-014-9915-y
17. Paliwal VK, Garg RK, Gupta A, Tejan N. Neuromuscular presentations in patients with COVID-19. *Neurol Sci.* 2020;41(11):3039–3056. doi:10.1007/s10072-020-04708-8
18. Schniepp HC, Li JL, McAllister MJ, et al. Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide. *J Phys Chem B.* 2006;110(17):8535–8539. doi:10.1021/jp060936f
19. Maiolo D, Del Pino P, Metrangolo P, Parak WJ, Baldelli Bombelli F. Nanomedicine delivery: does protein Corona route to the target or off road? *Nanomedicine.* 2015;10(21):3231–3247. doi:10.2217/nmm.15.163
20. Kurantowicz N, Sawosz E, Halik G, et al. Toxicity studies of six types of carbon nanoparticles in a chicken-embryo model. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:2887–2898. doi:10.2147/IJN.S131960
21. Hu W, Peng C, Lv M, et al. Protein Corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. *ACS Nano.* 2011;5(5):3693–3700. doi:10.1021/nm200021j
22. Bałaban J, Wierzbicki M, Zielińska M, et al. Effects of graphene oxide nanofilm and chicken embryo muscle extract on muscle progenitor cell differentiation and contraction. *Molecules.* 2020;25(8). doi:10.3390/molecules25081991
23. Bałaban J, Zielińska M, Wierzbicki M, et al. Effect of muscle extract and graphene oxide on muscle structure of chicken embryos. *Animals.* 2021;11(12):1–18. doi:10.3390/ani11123467
24. Kurantowicz N, Strojny B, Sawosz E, et al. Biodistribution of a high dose of diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles after multiple intraperitoneal injections in rats. *Nanoscale Res Lett.* 2015;10(1):398. doi:10.1186/s11671-015-1107-9
25. Strojny B, Kurantowicz N, Sawosz E, et al. Long term influence of carbon nanoparticles on health and liver status in rats. *PLoS One.* 2015;10(12):1–19. doi:10.1371/journal.pone.0144821
26. Zielińska-Górska M, Sawosz E, Sosnowska M, et al. Molecular biocompatibility of a silver nanoparticle complex with graphene oxide to human skin in a 3D epidermis in vitro model. *Pharm.* 2022;14(7):116.
27. Jaworski S, Strojny-Cieślak B, Wierzbicki M, et al. Comparison of the toxicity of pristine graphene and graphene oxide, using four biological models. *Mater.* 2021;14(15):4250. doi:10.3390/ma14154250
28. Tan GW, Kondo T, Imamura K, et al. Simple derivation of skeletal muscle from human pluripotent stem cells using temperature-sensitive Sendai virus vector. *J Cell Mol Med.* 2021;25(20):9586–9596. doi:10.1111/jcmm.16899
29. Motta-Santos D, Dos Santos RAS, Oliveira M, et al. Effects of ACE2 deficiency on physical performance and physiological adaptations of cardiac and skeletal muscle to exercise. *Hypertens Res.* 2016;39(7):506–512. doi:10.1038/hr.2016.28
30. He Q, Sudibya HG, Yin Z, et al. Centimeter-long and large-scale micropatterns of reduced graphene oxide films: fabrication and sensing applications. *ACS Nano.* 2010;4:3201. doi:10.1021/nn100780v
31. Ferrandi PJ, Alway SE, Mohamed JS. The interaction between SARS-CoV-2 and ACE2 may have consequences for skeletal muscle viral susceptibility and myopathies. *J Appl Physiol.* 2020;129(4):864–867. doi:10.1152/jappphysiol.00321.2020
32. Ali AM, Kunugi H. Skeletal muscle damage in COVID-19: a call for action. *Medicina.* 2021;57(4):372. doi:10.3390/medicina57040372
33. Piotrowicz K, Gaśowski J, Michel JP, Veronese N. Post-COVID-19 acute sarcopenia: physiopathology and management. *Aging Clin Exp Res.* 2021;33(10):2887–2898. doi:10.1007/s40520-021-01942-8
34. Ramani SL, Samet J, Franz CK, et al. Musculoskeletal involvement of COVID-19: review of imaging. *Skeletal Radiol.* 2021;50(9):1763–1773. doi:10.1007/s00256-021-03734-7
35. Caress JB, Castoro RJ, Simmons Z, et al. COVID-19-associated Guillain-Barré syndrome: the early pandemic experience. *Muscle Nerve.* 2020;62(4):485–491. doi:10.1002/mus.27024
36. Rabbani G, Ahn SN, Kwon H, Ahmad K, Choi I. Penta-peptide ATN-161 based neutralization mechanism of SARS-CoV-2 spike protein. *Biochem Biophys Reports.* 2021;28:101170. doi:10.1016/j.bbrep.2021.101170
37. Angeli F, Reboldi G, Trapasso M, Zappa M, Spanevello A, Verdecchia P. COVID-19, vaccines and deficiency of ACE(2) and other angiotensinases. Closing the loop on the “Spike effect”. *Eur J Intern Med.* 2022;103:23–28. doi:10.1016/j.ejim.2022.06.015

38. Seixas ML, Mitre LP, Shams S, et al. Unraveling muscle impairment associated with COVID-19 and the role of 3D culture in its investigation. *Front Nutr*. 2022;9:825629. doi:10.3389/fnut.2022.825629
39. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497–506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5
40. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*. 1993;64(5 Suppl):456–460.
41. De Rossi M, Bernasconi P, Baggi F, de Waal Malefyt R, Mantegazza R. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *Int Immunol*. 2000;12(9):1329–1335. doi:10.1093/intimm/12.9.1329
42. Akerstrom T, Steensberg A, Keller P, Keller C, Penkowa M, Pedersen BK. Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2005;563(2):507–516. doi:10.1113/jphysiol.2004.077610
43. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem*. 2003;278(10):8508–8515. doi:10.1074/jbc.M208231200
44. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR + CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol*. 2000;165(9):5269–5277. doi:10.4049/jimmunol.165.9.5269
45. van der Meer IM, de Maat MPM, Bots ML, et al. Inflammatory mediators and cell adhesion molecules as indicators of severity of atherosclerosis: the Rotterdam study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(5):838–842. doi:10.1161/01.ATV.0000016249.96529.B8
46. Xiang S, Dong N, Liu J, et al. Inhibitory effects of suppressor of cytokine signaling 3 on inflammatory cytokine expression and migration and proliferation of IL-6/IFN- γ -induced vascular smooth muscle cells. *J Huazhong Univ Sci Technol*. 2013;33(5):615–622. doi:10.1007/s11596-013-1168-x
47. Li YS, Shyy YJ, Wright JG, Valente AJ, Cornhill JF, Kolattukudy PE. The expression of monocyte chemoattractant protein (MCP-1) in human vascular endothelium in vitro and in vivo. *Mol Cell Biochem*. 1993;126(1):61–68. doi:10.1007/BF01772208
48. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(4):844–847. doi:10.1111/jth.14768
49. Perico L, Benigni A, Casiraghi F, Ng LFP, Renia L, Remuzzi G. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat Rev Nephrol*. 2021;17(1):46–64. doi:10.1038/s41581-020-00357-4
50. Evers-van Gogh LJA, Oteng AB, Alex S, et al. Muscle-specific inflammation induced by MCP-1 overexpression does not affect whole-body insulin sensitivity in mice. *Diabetologia*. 2016;59(3):624–633. doi:10.1007/s00125-015-3822-2
51. Smith-Norowitz TA, Loeffler J, Norowitz YM, Kohlhoff S. Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) levels in convalescent COVID-19 serum: a case report. *Ann Clin Lab Sci*. 2021;51(5):730–734.
52. Liu H, Tan J, Liu J, Feng H, Pan D. Altered mast cell activity in response to rhinovirus infection provides novel insight into asthma. *J Asthma*. 2020;57(5):459–467.
53. Dearth CL, Goh Q, Marino JS, et al. Skeletal muscle cells express ICAM-1 after muscle overload and ICAM-1 contributes to the ensuing hypertrophic response. *PLoS One*. 2013;8(3):e58486. doi:10.1371/journal.pone.0058486
54. Della Gatta PA, Garnham AP, Peake JM, Cameron-Smith D. Effect of exercise training on skeletal muscle cytokine expression in the elderly. *Brain Behav Immun*. 2014;39:80–86.
55. Palazzetti S, Richard MJ, Favier A, Margaritis I. Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol*. 2003;28(4):588–604.
56. Ebihara T, Matsumoto H, Matsubara T, et al. Resistin associated with cytokines and endothelial cell adhesion molecules is related to worse outcome in COVID-19. *Front Immunol*. 2022;13:830061.
57. Ren J, Braileanu G, Gorgojo P, et al. On the biocompatibility of graphene oxide towards vascular smooth muscle cells. *Nanotechnology*. 2020;32(5):55101.
58. Cicuéndez M, Casarrubios L, Barroca N, et al. Benefits in the macrophage response due to graphene oxide reduction by thermal treatment. *Int J Mol Sci*. 2021;22:13.
59. Wen KP, Chen YC, Chuang CH, Chang HY, Lee CY, Tai NH. Accumulation and toxicity of intravenously-injected functionalized graphene oxide in mice. *J Appl Toxicol*. 2015;35(10):1211–1218.
60. Takahashi Y, Hayakawa A, Sano R, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress ACE2 and ABO simultaneously, suggesting a preventive potential against COVID-19. *Sci Rep*. 2021;11(1):3379.
61. Shi TT, Yang FY, Liu C, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 regulates mitochondrial function in pancreatic β -cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(1):860–866.
62. Graham KA, Kulawiec M, Owens KM, et al. NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(3):223–231.
63. Mitsopoulos P, Lapohos O, Weraarpachai W, Antonicka H, Chang YH, Madrenas J. Stomatin-like protein 2 deficiency results in impaired mitochondrial translation. *PLoS One*. 2017;12:e0179967.
64. Kitada M, Xu J, Ogura Y, Monno I, Koya D. Manganese superoxide dismutase dysfunction and the pathogenesis of kidney disease. *Front Physiol*. 2020;11:755.
65. Warner BB, Stuart L, Gebb S, Wispé JR. Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am J Physiol*. 1996;271(1 Pt 1):L150–8.
66. Kim SH, Lee JY, Kim J. Characterization of a wide range base-damage-endonuclease activity of mammalian rps3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328(4):962–967.
67. Kim KH, Rodriguez AM, Carrico PM, Melendez JA. Potential mechanisms for the inhibition of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Antioxid Redox Signal*. 2001;3(3):361–373.
68. Fokunang C. Overview of non-steroidal anti-inflammatory drugs (nsaids) in resource limited countries. *MOJ Toxicol*. 2018;4(1):5–13.
69. Weinheimer EM, Jemiolo B, Carroll CC, et al. Resistance exercise and cyclooxygenase (COX) expression in human skeletal muscle: implications for COX-inhibiting drugs and protein synthesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292(6):R2241–8.
70. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*. 1999;18(55):7908–7916.
71. Gupta RA, Tejada LV, Tong BJ, et al. Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2003;63(5):906–911.

72. Attiq A, Yao LJ, Afzal S, Khan MA. The triumvirate of NF- κ B, inflammation and cytokine storm in COVID-19. *Int Immunopharmacol*. 2021;101 (Pt B):108255.
73. Huang Y, Qiao F, Abagyan R, Hazard S, Tomlinson S. Defining the CD59-C9 binding interaction. *J Biol Chem*. 2006;281(37):27398–27404.
74. Chidlow JHJ, Sessa WC. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2010;86 (2):219–225.
75. Ciuba K, Hawkes W, Tojkander S, et al. Calponin-3 is critical for coordinated contractility of actin stress fibers. *Sci Rep*. 2018;8(1):17670.
76. Monroy JA, Powers KL, Gilmore LA, Uyeno TA, Lindstedt SL, Nishikawa KC. What is the role of titin in active muscle? *Exerc Sport Sci Rev*. 2012;40(2):73–78.
77. Duan G, Kang S, Tian X, et al. Protein Corona mitigates the cytotoxicity of graphene oxide by reducing its physical interaction with cell membrane. *Nanoscale*. 2015;7(37):15214–15224.
78. Chung C, Kim YK, Shin D, Ryoo SR, Hong BH, Min DH. Biomedical applications of graphene and graphene oxide. *Acc Chem Res*. 2013;46 (10):2211–2224.
79. Wang M, Gustafsson OJR, Siddiqui G, et al. Human plasma proteome association and cytotoxicity of nano-graphene oxide grafted with stealth polyethylene glycol and poly(2-ethyl-2-oxazoline). *Nanoscale*. 2018;10(23):10863–10875.
80. Hajipour MJ, Raheb J, Akhavan O, et al. Personalized disease-specific protein Corona influences the therapeutic impact of graphene oxide. *Nanoscale*. 2015;7(19):8978–8994.
81. Di Santo R, Digiacoimo L, Quagliariini E, et al. Personalized graphene oxide-protein corona in the human plasma of pancreatic cancer patients. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:491.

Nanotechnology, Science and Applications

Dovepress

Publish your work in this journal

Nanotechnology, Science and Applications is an international, peer-reviewed, open access journal that focuses on the science of nanotechnology in a wide range of industrial and academic applications. It is characterized by the rapid reporting across all sectors, including engineering, optics, bio-medicine, cosmetics, textiles, resource sustainability and science. Applied research into nano-materials, particles, nano-structures and fabrication, diagnostics and analytics, drug delivery and toxicology constitute the primary direction of the journal. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/nanotechnology-science-and-applications-journal>

Warszawa, dn. 18.09.2023

mgr inż. Jaśmina Bałaban
jasmin.balaban@gmail.com

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

**Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska M., Szczepaniak J., Sosnowska M., Daniluk K., Cysewski D., Koczoń P., Chwalibog A., Sawosz E. 2020. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. *Molecules*, 25(8) 1991 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji i planu badań, opracowaniu metodyki, wykonaniu doświadczeń, interpretacji wyników, analizie statystycznej, przygotowaniu manuskryptu i wizualizacji danych (65% udziału).

Podpis



Warszawa, dn. 25.01.2023

dr hab. Mateusz Wierzbicki
mateusz_wierzbicki@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska M., Szczepaniak J., Sosnowska M., Daniluk K., Cysewski D., Koczoń P., Chwalibog A., Sawosz E. 2020. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. *Molecules*, 25(8) 1991 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu przy opracowaniu metodyki badań, wyborze oprogramowania oraz opracowaniu walidacji (3% udziału).

Podpis

Mateusz Wierzbicki

Warszawa, dn. 19.09.2023r.

dr inż. Marlena Zielińska-Górska
marlena_zielińska_gorska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska M., Szczepaniak J., Sosnowska M., Daniluk K., Cysewski D., Koczoń P., Chwalibog A., Sawosz E. 2020. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. *Molecules*, 25(8) 1991 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu przy części doświadczeń związanych z mikroskopią konfokalną oraz wsparciu przy wizualizacji wyników (3%).



Podpis

Warszawa, dn. 25.09.2023

mgr Jarosław Szczepaniak
jaroslaw_szczepaniak@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska M., Szczepaniak J., Sosnowska M., Daniluk K., Cysewski D., Koczoń P., Chwalibog A., Sawosz E. 2020. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. *Molecules*, 25(8) 1991 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w części doświadczalnej związanej z analizą ekspresji genów metodą Real Time - PCR (2% udziału).

Podpis



Warszawa, dn. 18.09.23

dr Malwina Sosnowska
malwina_sosnowska@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska M., Szczepaniak J., Sosnowska M., Daniluk K., Cysewski D., Koczoń P., Chwalibog A., Sawosz E. 2020. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. *Molecules*, 25(8) 1991 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w części doświadczalnej związanej z analizą cytotoksyczności tlenku grafenu (2% udziału).

Podpis

Sosnowska Malwina

Warszawa, dn. 19.09.2022

mgr inż. Karolina Daniluk
karolina_daniluk@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska M., Szczepaniak J., Sosnowska M., Daniluk K., Cysewski D., Koczoń P., Chwalibog A., Sawosz E. 2020. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. *Molecules*, 25(8) 1991 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w części doświadczalnej związanej z analizą żywotności komórek w warunkach in vitro (2% udziału).

Podpis

Karolina Daniluk

Warszawa, dn. 28.09.2023

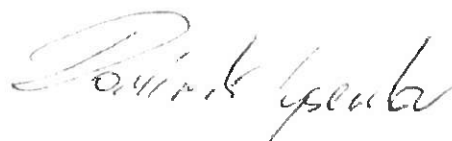
dr Dominik Cysewski
dominikcysewski@gmail.com

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska M., Szczepaniak J., Sosnowska M., Daniluk K., Cysewski D., Koczoń P., Chwalibog A., Sawosz E. 2020. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. *Molecules*, 25(8) 1991 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przygotowaniu analizy ekstraktu z mięśni zarodków kury domowej metodą spektrometrii mas i depozycji wyników w bazie danych (3% udziału).

Podpis



Załącznik nr 9 – Wzór oświadczenia o współautorstwie

Warszawa, dn. 26 IX 2023

prof. dr hab. Piotr Koczoń
piotr_koczon@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska M., Szczepaniak J., Sosnowska M., Daniluk K., Cysewski D., Koczoń P., Chwalibog A., Sawosz E. 2020. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. *Molecules*, 25(8) 1991 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przygotowaniu analizy tlenu grafenu metodą spektroskopii w podczerwieni FTIR (3% udziału).

Podpis

P. Koczoń

Warszawa, dn. 29.11.2023

prof. dr hab. Andre Chwalibog
ach@sund.ku.dk

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska M., Szczepaniak J., Sosnowska M., Daniluk K., Cysewski D., Koczoń P., Chwalibog A., Sawosz E. 2020. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. *Molecules*, 25(8) 1991 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w procesie przygotowywania i redakcji manuskryptu oraz pełnienia funkcji autora korespondencyjnego (7% udziału).

Podpis



Warszawa, dn.

prof. dr hab. Ewa Sawosz – Chwalibóg
ewa_sawosz-chwalibog@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska M., Szczepaniak J., Sosnowska M., Daniluk K., Cysewski D., Koczoń P., Chwalibog A., Sawosz E. 2020. Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction. *Molecules*, 25(8) 1991 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w opracowaniu koncepcji i planu doświadczenia, opracowaniu metodyki, przygotowywaniu manuskryptu artykułu i jego korekcie, nadzorowaniu przebiegu badań, a także pozyskaniu finansowania i udostępnieniu niezbędnej aparatury badawczej (10% udziału).



Podpis

Warszawa, dn. 18.09.2023

mgr inż. Jaśmina Bałaban
jasmin.balaban@gmail.com

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Zielińska M., Wierzbicki M., Ostaszewska T., Fajkowska M., Rzepkowska M., Daniluk K., Sosnowska M., Chwalibog A., Sawosz E., Effect of Muscle Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos. *Animals*, 2021, 11(12), 3467 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu planu badań, opracowaniu metodyki, wykonaniu doświadczeń, interpretacji i prezentacji wyników, przygotowaniu manuskryptu (65% udziału).

Podpis



Warszawa, dn. 19.09.23r.

dr inż. Marlena Zielińska-Górska
marlena.zielińska_gorska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Zielińska M., Wierzbicki M., Ostaszewska T., Fajkowska M., Rzepkowska M., Daniluk K., Sosnowska M., Chwalibog A., Sawosz E., Effect of Muscle Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos. *Animals*, 2021, 11(12), 3467 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu przy części doświadczeń, pobieraniu materiału biologicznego do analiz, a także wsparciu podczas opracowaniu metodyki i walidacji (4% udziału).

Marlena Zielińska-Górska

Podpis

Warszawa, dn. 25.09.2025

dr hab. Mateusz Wierzbicki
mateusz_wierzbicki@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Zielińska M., Wierzbicki M., Ostaszewska T., Fajkowska M., Rzepkowska M., Daniluk K., Sosnowska M., Chwalibog A., Sawosz E., Effect of Muscle Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos. *Animals*, 2021, 11(12), 3467 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu przy opracowaniu metodyki oraz wizualizacji danych (3% udziału).

Podpis



Warszawa, dn. 18.09.23

Prof. dr hab. Teresa Ostaszewska
tresza_ostaszewska@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Zielińska M., Wierzbicki M., Ostaszewska T., Fajkowska M., Rzepkowska M., Daniluk K., Sosnowska M., Chwalibog A., Sawosz E., Effect of Muscle Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos. *Animals*, 2021, 11(12), 3467 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu przy opracowaniu metodyki oraz ocenie materiału histologicznego (3% udziału).

Podpis

T. Ostaszewska

Warszawa, dn.

dr Magdalena Fajkowska
magdalena_fajkowska@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Balaban J., Zielińska M., Wierzbicki M., Ostaszewska T., Fajkowska M., Rzepkowska M., Daniluk K., Sosnowska M., Chwalibog A., Sawosz E., Effect of Musele Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos. *Animals*, 2021, 11(12), 3467 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu przy opracowaniu metodyki oraz analizie materiału histologicznego (3% udziału).


Podpis

Warszawa, dn. 18.08.2023

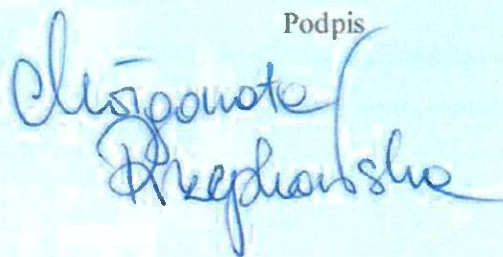
dr Małgorzata Rzepkowska
malgorzata_rzepkowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Zielińska M., Wierzbicki M., Ostaszewska T., Fajkowska M., Rzepkowska M., Daniluk K., Sosnowska M., Chwałibog A., Sawosz E., Effect of Muscle Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos. *Animals*, 2021, 11(12), 3467 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu przy opracowaniu metodyki oraz analizie materiału histologicznego (3% udziału).

Podpis



Załącznik nr 9 – Wzór oświadczenia o współautorstwie

Warszawa, dn. 19.09.2023

mgr Karolina Daniluk
karolina_daniluk@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Zielińska M., Wierzbicki M., Ostaszewska T., Fajkowska M., Rzepkowska M., Daniluk K., Sosnowska M., Chwalibog A., Sawosz E., Effect of Muscle Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos. *Animals*, 2021, 11(12), 3467 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu przy pobieraniu materiału biologicznego do analiz (2% udziału).

Podpis

Karolina Daniluk

Warszawa, dn. 18.09.23

dr Malwina Sosnowska
malwina_sosnowska@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Zielińska M., Wierzbicki M., Ostaszewska T., Fajkowska M., Rzepkowska M., Daniluk K., Sosnowska M., Chwalibog A., Sawosz E., Effect of Muscle Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos. *Animals*, 2021, 11(12), 3467 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu przy pobieraniu materiału biologicznego do analiz (2% udziału).

Podpis

Sosnowska Malwina

Warszawa, dn. 29. 11. 2023

prof. dr hab. Andre Chwalibog
ach@sund.ku.dk

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Zielińska M., Wierzbicki M., Ostaszewska T., Fajkowska M., Rzepkowska M., Daniluk K., Sosnowska M., Chwalibog A., Sawosz E., Effect of Muscle Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos. *Animals*, 2021, 11(12), 3467 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w przygotowaniu manuskryptu i jego korekcie, a także pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego (5% udziału).

Podpis



Warszawa, dn.

prof. dr hab. Ewa Sawosz - Chwalibóg
ewa_sawosz-chwalibog@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Zielińska M., Wierzbicki M., Ostaszewska T., Fajkowska M., Rzepkowska M., Daniluk K., Sosnowska M., Chwalibog A., Sawosz E., Effect of Muscle Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos. *Animals*, 2021, 11(12), 3467 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji i planu badań, nadzorowaniu przebiegu doświadczeń, a także pozyskaniu finansowania (10% udziału).


Podpis

Warszawa, dn. 18.09.2023

mgr inż. Jaśmina Bałaban
jasmin.balaban@gmail.com

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska-Górska M., Sosnowska M., Daniluk K., Jaworski S., Koczoń P., Cysewski D., Chwalibog A., Sawosz E., Graphene Oxide Decreases Pro-Inflammatory Proteins Production in Skeletal Muscle Cells Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2023, 16:1-18 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu planu badań, opracowaniu metodyki, wykonaniu doświadczeń, analizie wyników oraz przygotowaniu manuskryptu (65% udziału).

Podpis



Warszawa, dn. 25.09.2023

dr hab. Mateusz Wierzbicki
mateusz_wierzbicki@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska-Górska M., Sosnowska M., Daniluk K., Jaworski S., Koczoń P., Cysewski D., Chwalibog A., Sawosz E., Graphene Oxide Decreases Pro-Inflammatory Proteins Production in Skeletal Muscle Cells Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2023, 16:1-18 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu przy opracowaniu wyników (2% udziału).

Podpis



Warszawa, dn. 19.09.23r.

dr inż. Marlena Zielińska-Górska
marlena.zielińska.gorska@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska-Górska M., Sosnowska M., Daniluk K., Jaworski S., Koczoń P., Cysewski D., Chwalibog A., Sawosz E., Graphene Oxide Decreases Pro-Inflammatory Proteins Production in Skeletal Muscle Cells Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein. *Nanotechnology: Science and Applications*, 2023, 16:1-18 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w części doświadczalnej związanej z mikroskopią konfokalną (2% udziału).

Marlena Zielińska-Górska

Podpis

Warszawa, dn. 18.08.23

dr Malwina Sosnowska
malwina_sosnowska@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska-Górska M., Sosnowska M., Daniluk K., Jaworski S., Koczoń P., Cysewski D., Chwalibog A., Sawosz E., Graphene Oxide Decreases Pro-Inflammatory Proteins Production in Skeletal Muscle Cells Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2023, 16:1-18 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w opracowaniu wyników dotyczących analizy proteomicznej (2% udziału).

Podpis

Sosnowska Malwina

Warszawa, dn. 13.10.2023

mgr inż. Karolina Daniluk
karolina_daniluk@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska-Górska M., Sosnowska M., Daniluk K., Jaworski S., Koczoń P., Cysewski D., Chwalibog A., Sawosz E., Graphene Oxide Decreases Pro-Inflammatory Proteins Production in Skeletal Muscle Cells Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2023, 16:1-18 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w części doświadczalnej związanej z analizą białek prozapalnych (2% udziału).

Podpis

Karolina Daniluk

Warszawa, dn. 18.09.2023

dr hab. Sławomir Jaworski
slawomir_jaworski@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

**Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska-Górska M., Sosnowska M., Daniluk K., Jaworski S., Koczoń P., Cysewski D., Chwalibog A., Sawosz E., Graphene Oxide Decreases Pro-Inflammatory Proteins Production in Skeletal Muscle Cells Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2023, 16:1-18 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na udostępnieniu aparatury niezbędnej do wykonania badań (2% udziału).

Podpis

Sławomir Jaworski

Załącznik nr 9 – Wzór oświadczenia o współautorstwie

Warszawa, dn. 26.11.2023

prof. dr hab. Piotr Koczoń
piotr_koczon@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska-Górska M., Sosnowska M., Daniluk K., Jaworski S., Koczoń P., Cysewski D., Chwalibog A., Sawosz E., Graphene Oxide Decreases Pro-Inflammatory Proteins Production in Skeletal Muscle Cells Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2023, 16:1-18 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu analizy tlenu grafenu metodą spektroskopii w podczerwieni FTIR (3% udziału).

Podpis



Załącznik nr 9 – Wzór oświadczenia o współautorstwie

Warszawa, dn. 29.09.2023

dr Dominik Cysewski
dominikcysewski@gmail.com

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska-Górska M., Sosnowska M., Daniluk K., Jaworski S., Koczoń P., Cysewski D., Chwalibog A., Sawosz E., Graphene Oxide Decreases Pro-Inflammatory Proteins Production in Skeletal Muscle Cells Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2023, 16:1-18 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu analizy proteomicznej metodą spektrometrii mas (3% udziału).

Podpis



Warszawa, dn. 29.11.2023

prof. dr hab. Andre Chwalibog
ach@sund.ku.dk

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska-Górska M., Sosnowska M., Daniluk K., Jaworski S., Koczoń P., Cysewski D., Chwalibog A., Sawosz E., Graphene Oxide Decreases Pro-Inflammatory Proteins Production in Skeletal Muscle Cells Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2023, 16:1-18 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestnictwie w przygotowaniu manuskryptu i jego korekcie, a także pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego (9% udziału).

Podpis



Warszawa, dn.

prof. dr hab. Ewa Sawosz - Chwalibóg
ewa_sawosz-chwalibog@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Bałaban J., Wierzbicki M., Zielińska-Górska M., Sosnowska M., Daniluk K., Jaworski S., Koczoń P., Cysewski D., Chwalibóg A., Sawosz E., Graphene Oxide Decreases Pro-Inflammatory Proteins Production in Skeletal Muscle Cells Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2023, 16:1-18 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przygotowaniu koncepcji i planu badań, zdobyciu finansowania, a także udziale w przygotowaniu manuskryptu i jego korekcie (10% udziału).



Podpis

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW


.....
(czytelny podpis autora)

