

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie

Instytut Biologii

Mgr inż. Barbara Urszula Wójcik

**Wpływ nanocząstek metalicznych i  
nanomateriałów węglowych w badaniach na  
modelu wybranych linii raka trzustki, piersi,  
wątroby, glejaka oraz nienowotworowych  
liniach komórkowych**

The influence of metallic and carbon-based nanoparticles in studies on  
selected pancreatic, breast, liver, glioblastoma grade IV  
and non-cancerous cell lines

Rozprawa doktorska  
Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem:

Dr hab. Mateusz Wierzbicki, prof. SGGW

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2024



### **Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej**

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

Data ..... 04.04.2024 .....

Podpis promotora ..... 

### **Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej**

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

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

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 04.04.2024 .....

Podpis autora pracy 



*Serdecznie dziękuję*

*Dr hab. Mateuszowi Wierzbickiemu, prof. SGGW*

*prof. dr hab. Ewie Sawosz Chwalibóg,*

*Pracownikom Katedry Nanobiotechnologii oraz Współautorom*

*Pracę doktorską dedykuję mojemu tacie , który nauczył mnie że warto mieć marzenia i warto je spełniać. Dziękuję za wsparcie oraz możliwość kształcenia się i spełniania marzeń.*



## Spis treści

1.	Streszczenie .....	9
2.	Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską .....	13
3.	Wykaz skrótów .....	14
4.	Wstęp .....	16
5.	Hipoteza badawcza, cel i zakres pracy.....	22
6.	Metodyka badań.....	24
6.1	Nanocząstki i nanomateriały wykorzystywane w badaniach .....	24
6.2	Modele badawcze <i>in vitro</i> .....	26
6.3	Charakterystyka nanocząstek metalicznych i nanomateriałów węglowych .....	27
6.4	Układ doświadczeń .....	29
6.4.1	Doświadczenie I (Publikacja 1: Wójcik <i>et al.</i> , 2021) .....	29
6.4.2	Doświadczenie II (Publikacja 2: Wójcik <i>et al.</i> ; 2023) .....	31
6.4.3	Doświadczenie III (Publikacja 3: Wójcik <i>et al.</i> , 2023).....	33
7.	Omówienie głównych wyników przeprowadzonych doświadczeń .....	35
7.1	Określenie potencjalnych właściwości antynowotworowych nanocząstek metalicznych (Pt, Ag, Au) oraz nanomateriałów węglowych (GO, ND, C <sub>60</sub> (OH) <sub>40</sub> ) względem ustalonych linii nowotworu trzustki: AsPC-1 i BxPC-3 opornych na gemcytabinę oraz wybór nanomateriałów, wykazujących pożądane działanie, do kolejnych analiz. (Publikacja 1: Wójcik <i>et al.</i> , 2021).....	35
7.2	Analiza wpływu bodźców mechanicznych oraz chemicznych, których źródłem były nanofilmy utworzone z nanomateriałów węglowych (GN, GO, C <sub>60</sub> oraz ND) na aktywność proliferacyjną oraz adhezję komórek raka piersi MDA.MB.231 oraz glejaka IV stopnia U-87 MG przy zastosowaniu hodowli <i>in vitro</i> w monowarstwie oraz biodrukowanego modelu 3D. ....	41
7.3	Ocena wpływu parametrów takich jak: rozmiar, metoda produkcji (laserowa, detonacyjna) oraz obecność różnych grup funkcyjnych na powierzchni nanocząstki ND na ich toksyczność względem ustalonych linii nowotworowych: glejaka IV stopnia (U-118 MG, T98G), nowotworu piersi (MCF-7), nowotworu wątroby (Hep G2) oraz nienowotworowej linii ludzkich fibroblastów (HFF-1). (Publikacja 3: Wójcik <i>et al.</i> , 2023) .....	45
8.	Podsumowanie.....	51
9.	Wnioski.....	53
10.	Bibliografia: .....	54
11.	Publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej.....	69



## 1. Streszczenie

### **Wpływ nanocząstek metalicznych i nanomateriałów węglowych w badaniach na modelu wybranych linii raka trzustki, piersi, wątroby, glejaka oraz nienowotworowych liniach komórkowych.**

Choroby nowotworowe stanowią główną przyczynę śmierci w Polsce i na świecie a ich leczenie często okazuje się nieskuteczne doprowadzając tym samym do śmierci pacjenta. Problemy napotykane w trakcie konwencjonalnej terapii spowodowały, iż naukowcy zaczęli poszukiwać alternatywnych metod mogących je rozwiązać. Nanocząstki metaliczne oraz nanomateriały węglowe w ostatnich latach zyskały duże zainteresowanie w tym aspekcie ze względu na ich unikalne właściwości fizykochemiczne. Celem pracy było określenie potencjalnych właściwości antynowotworowych nanocząstek metalicznych oraz nanomateriałów węglowych na komórki nowotworowe charakteryzujące się występowaniem zjawiska lekooporności, w tym komórki nowotworu: piersi (MDA.MB.231, MCF-7), trzustki (BxPC-3, AsPC-1), wątroby (Hep G2) oraz glejaka IV stopnia (U-118 MG, T98G, U-87 MG). Co więcej, niniejsze badania miały na celu analizę wpływu nanomateriałów węglowych jako środka stabilizującego macierz zewnątrzkomórkową (ECM) na aktywność proliferacyjną oraz adhezję komórek glejaka IV stopnia U-87 MG oraz raka piersi MDA.MB.231. Analizowano cytotoxiczność badanych nanomateriałów, indukcję reaktywnych form tlenu (ROS), profil ekspresji cytokin prozapalnych komórek AsPC-1 oraz BxPC-3 w odpowiedzi na traktowanie tlenkiem grafenu (GO) i nanocząstkami diamentu (ND). Analizując wpływ nanofilmów węglowych brano pod uwagę takie parametry jak tempo proliferacji, adhezja do nanofilmów oraz adhezja do wybranych komponentów ECM pokrytych ND. Dodatkowo wykonane zostały analizy cytotoxiczności ND zawieszzonego w macierzy zewnątrzkomórkowej okalającej komórki nowotworowe z zastosowaniem biodrukowanych modeli 3D. Przeprowadzone analizy wykazały, że najwyższy efekt cytotoxiczny względem ustalonych linii nowotworu trzustki można uzyskać stosując ND, który wywołuje dawkozależny spadek żywotności komórek, perforację błony komórkowej oraz indukuje powstawanie ROS. Co więcej zastosowanie ND w formie nanofilmu powoduje powstanie nietoksycznej powierzchni wzmagającej adhezję oraz hamującej proliferację komórek nowotworu piersi MDA.MB.231. Efekt wywoływany przez ND jest komórkowo specyficzny. Cytotoxiczność ND nie zależy od metody produkcji nanomateriału (detonacyjna, laserowa) ani rozmiaru nanocząstek,

jednak obecność grupy aminowej na powierzchni ND nasila jego cytotoxiczność względem komórek glejaka IV stopnia T98G oraz U-118 MG.

**Slowa kluczowe:** nanocząstki metaliczne, nanomateriały węglowe, nanocząstki diamentu, cytotoxiczność, adhezja, proliferacja, biodruk 3D, reaktywne formy tlenu

## Summary

### **The influence of metallic and carbon-based nanoparticles in studies on selected pancreatic, breast, liver, glioblastoma grade IV and non-cancerous cell lines**

Cancer is the main cause of death in Poland and worldwide, and its treatment often turns out to be ineffective, leading to the patient's death. Problems encountered during conventional therapy have caused scientists to look for alternative methods to solve them. Metallic nanoparticles and carbon nanomaterials have gained great interest in recent years due to their unique physicochemical properties. The aim of the work was to determine the potential anticancer properties of metallic nanoparticles and carbon nanomaterials on cancer cells characterized by drug resistance, including cancer cells: breast (MDA.MB.231, MCF-7), pancreas (BxPC-3, AsPC-1), liver (Hep G2) and glioblastoma grade IV (U-118 MG, T98G, U-87 MG). Moreover, this study aimed to analyze the effect of carbon nanomaterials as an extracellular matrix (ECM) stabilizing agent on the proliferative activity and adhesion of U-87 MG grade IV glioma cells and MDA.MB.231 breast cancer cells. The cytotoxicity of the tested nanomaterials, the induction of reactive oxygen species (ROS), and the expression profile of pro-inflammatory cytokines after treatment AsPC-1 and BxPC-3 cells with graphene oxide (GO) and diamond nanoparticles (ND) were analyzed. When analyzing the impact of carbon nanofilms, parameters such as proliferation rate, adhesion to nanofilms and adhesion to selected ND-coated ECM components were taken into account. Additionally, cytotoxicity analyzes of ND suspended in the extracellular matrix surrounding cancer cells were performed using 3D bioprinted models. The analyzes performed showed that the highest cytotoxic effect against established pancreatic cancer lines can be obtained using ND, which causes a dose-dependent decrease in cell viability, perforation of the cell membrane and induces the formation of ROS. Moreover, the use of ND in the form of a nanofilm creates a non-toxic surface that enhances adhesion and inhibits the proliferation of MDA.MB.231 breast cancer cells. The effect caused by ND is cell-specific. The cytotoxicity of ND does not depend on the method of nanomaterial production (detonation, laser) or the size of the nanoparticles, however, the presence of an amino group on the surface of ND increases its cytotoxicity towards T98G and U-118 MG glioblastoma grade IV cells.

**Key words:** metallic nanoparticles, carbon nanomaterials, diamond nanoparticles, cytotoxicity, adhesion, proliferation, 3D bioprinting, reactive oxygen species

## 2. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

„Wpływ nanocząstek metalicznych i nanomateriałów węglowych w badaniach na modelu wybranych linii raka trzustki, piersi, wątroby, glejaka oraz nienowotworowych liniach komórkowych”

1. **Wójcik B**, Sawosz Chwalibóg E, Szczepaniak J, Strojny-Cieślak B, Sosnowska M, Daniluk K, Zielińska-Góriska M, Bałaban J, Chwalibog A, Wierzbicki M. Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22:1–21. doi:10.3390/ijms222212100 (IF<sub>5</sub>=6,2; 140pkt)
2. **Wójcik B**, Zawadzka K, Sawosz Chwalibóg E, Sosnowska-Ławnicka M, Ostrowska A, Wierzbicki M. Cell Line-Dependent Adhesion and Inhibition of Proliferation on Carbon-Based Nanofilms. Nanotechnology, Science and Applications. 2023; 16:41–57. doi:10.2147/nsa.s439185 (IF<sub>5</sub>=5,9; 200pkt)
3. **Wójcik B**, Zawadzka K, Jaworski S, Kutwin M, Sosnowska-Ławnicka M, Ostrowska A, Grodzik M, Małolepszy A, Mazurkiewicz-Pawlicka M, Wierzbicki M. Dependence of diamond nanoparticle cytotoxicity on physicochemical parameters: comparative studies of glioblastoma, breast cancer, and hepatocellular carcinoma cell lines. Nanotoxicology. 2023;17:310–337. doi:10.1080/17435390.2023.2218925 (IF<sub>5</sub>=5,2; 140pkt)

Łączny IF<sub>5</sub> publikacji stanowiących rozprawę doktorską: 17,3, łączna liczba punktów ministerialnych: 480.

Punktacja podana według listy czasopism punktowanych z 2023r, Impact Factor (IF) według Journal Citation Reports.

### 3. Wykaz skrótów

AFM – mikroskopia sił atomowych;  
Ag – nanocząstki srebra;  
ATCC – American Type Culture Collection;  
Au – nanocząstki złota;  
C60 – fulleren;  
 $C_{60}(OH)_{40}$  – fullerenol;  
DLS – dynamiczne rozpraszanie światła;  
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium;  
DNA – kwas deoksyrybonukleinowy;  
ECM – macierz zewnątrzkomórkowa;  
EMEM – Eagles's Minimum Essential Medium;  
EMT – przejście epithelialno-mezechymalne;  
FBS – płodowa surowica bydłęca;  
GN – grafen;  
GO – tlenek grafenu;  
HER – receptor naskórkowego czynnika wzrostu;  
ICAM-1 – wewnętrzkomórkowa molekuła adhezyjna 1;  
IL-1a – interleukina 1a;  
IL-8 – interleukina 8;  
LDE – laserowa elektroforeza Dopplera;  
LDH – dehydrogenaza mleczanowa;  
MN – mikrojądra;  
ND – nanocząstki diamentu;  
ND-B – nanocząstki diamentu o średnicy 10-20nm;  
ND-S – nanocząstki diamentu o średnicy 3-4nm;  
ND-COOH – nanocząstki diamentu funkcjonalizowane grupami karboksylowymi;  
ND-nf – nie funkcjonalizowane nanocząstki diamentu;  
ND-NH<sub>2</sub> – nanocząstki diamentu funkcjonalizowane grupami aminowymi;  
ND-OH – nanocząstki diamentu funkcjonalizowane grupami hydroksylowymi;  
PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanami;  
PFA – paraformaldehyd;  
Pt – nanocząstki platyny;

RayND –nanocząstki diamentu produkowane metodą ablacji laserowej;

RayND-AL – nanocząstki diamentu produkowane metodą ablacji laserowej, poddane procesowi aminowania;

ROS – reaktywne formy tlenu;

RPMI 1640 – Roswell Park Memorial Institute 1640;

RT-DND – nanocząstki diamentu syntetyzowane metodą detonacyjną;

RT-DND-A – nanocząstki diamentu syntetyzowane metodą detonacyjną, poddane procesowi aminowania;

RT-DND-EN – hydrofilowe nanocząstki diamentu syntetyzowane metodą detonacyjną;

RT-DND-L – hydroksylowane nanocząstki diamentu syntetyzowane metodą detonacyjną;

RT-DND-LN – hydrofobowe nanocząstki diamentu syntetyzowane metodą detonacyjną;

SEM – skaningowa mikroskopia elektronowa;

TEM – transmisyjna mikroskopia elektronowa;

TGF- $\beta$  – transformujący czynnik wzrostu  $\beta$ ;

TIMP-2 – tkankowy inhibitor metaloproteinazy 2;

TNF- $\beta$  – czynnik martwicy nowotworu  $\beta$ ;

ZP – potencjał zeta;

#### 4. Wstęp

Choroby nowotworowe stanowią główną przyczynę śmierci w Polsce i na świecie. Zgodnie z raportami Narodowego Rejestru Nowotworów w roku 2020 w Polsce odnotowano 2431 zgonów wśród mężczyzn oraz 2542 zgonów wśród kobiet w następstwie nowotworu trzustki. Szacuje się, iż około 73% pacjentów z nowotworem trzustki umrze w ciągu pierwszego roku od daty diagnozy [1], a jedynie 15% pacjentów będzie miało szansę na skuteczną terapię, która w tym przypadku zakłada chirurgiczne usunięcie patologicznie zmienionej tkanki [2]. Dzieje się tak ponieważ nowotwór ten nie daje żadnych objawów w początkowych fazach rozwoju co generuje problemy ze wczesną diagnozą dającą szansę na całkowite wyleczenie. Kolejnym wyzwaniem w stworzeniu skutecznej terapii jest występowanie zjawiska lekooporności. Nierzadko zdarza się, że komórki nowotworowe nie reagują na zastosowany chemioterapeutyk od samego początku terapii. Okazuje się jednak że lekooporność może również występować z czasem po stopniowej ekspozycji na lek. U podstaw tego zjawiska leży wiele czynników, za które uważa się: mutacje, zaburzenia w ekspresji genów, zaburzenia w przekazywaniu sygnałów w głównych ścieżkach sygnalnych takich jak: NF-k $\beta$ , Notch czy Akt, deregulacje procesu programowanej śmierci komórkowej, aktywację procesu przejścia epithelialno-mezechymalnego (ang. epithelial-mesenchymal transition; EMT), obecność nowotworowych komórek macierzystych, wzmożoną angiogenezę oraz wystąpienie hipoksji w mikrośrodowisku guza nowotworowego [3].

Wysoką śmiertelność również obserwuje się wśród pacjentów zdiagnozowanych z glejakiem IV stopnia. Zgodnie z raportami Narodowego Rejestru Nowotworów w roku 2020 w Polsce odnotowano 1571 zgonów wśród mężczyzn oraz 1365 zgonów wśród kobiet. Glejak IV stopnia jest to nowotwór złośliwy wyróżniający się zwiększym potencjałem proliferacyjnym [4] oraz cechami anaplastycznej komórkowej co przekłada się na jego agresywny rozwój oraz złe rokowanie. Pomimo możliwości zastosowania wielu strategii terapeutycznych od chemiczno- i radioterapii poprzez leczenie chirurgiczne średnia długość życia pacjentów z tym rodzajem nowotworu oszacowana została na poziomie 12,6 miesięcy [5]. Leczenie chorych z glejakiem IV stopnia stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny ze względu na heterogeniczność guza nowotworowego, obecność tkanki martwiczej, wysoką aktywność miotyczną, zaburzenie procesu programowanej śmierci komórkowej, wysoki potencjał proliferacyjny, nasiloną angiogenezę i zdolność do naciekania przylegających tkanek [6]. Co więcej, obserwuje

się również występowanie zjawiska lekooporności [7] oraz EMT [8] co dodatkowo utrudnia skuteczną terapię. Po mimo wysokiej śmiertelności od 2009 roku nie zanotowano żadnych udoskonaleń w najczęściej stosowanym podejściu terapeutycznym jakim jest chemioterapia [9], co wskazuje na potrzebę poszukiwania alternatywnych metod leczenia.

Rak piersi jest jedną z najczęściej występujących chorób nowotworowych powodujących zgon pacjenta. Nie należy zapominać, że ten rodzaj nowotworu diagnozuje się zarówno u kobiet jak i u mężczyzn [10], jednak choroba ta najczęściej dotyczy kobiet. Zgodnie z raportami Narodowego Rejestru Nowotworów w roku 2020 w Polsce odnotowano 77 zgonów wśród mężczyzn oraz 6956 zgonów wśród kobiet. Jest to choroba wyróżniająca się dużą heterogennością pod względem molekularnym co przekłada się na zróżnicowany rozwój oraz rokowania [11]. Za najbardziej agresywny podtyp uważa się potrójnie ujemnego raka piersi [12], który charakteryzuje się brakiem ekspresji receptorów dla progesteronu, estrogenu oraz naskórkowego czynnika wzrostu (ang. human epidermal growth factor receptor; HER). Komórki nowotworowe wykazujące ekspresje receptorów dla estrogenu można zaliczyć do dwóch podtypów luminalnego A i B. Oba podtypy wykazują ekspresję genów charakterystycznych dla komórek gruczołowych, różnią się natomiast ekspresją genu HER2, która obserwowana jest jedynie w podtypie luminalnym B co przekłada się na gorsze rokowania [11]. Zjawisko lekooporności powszechnie występuje we wszystkich podtypach raka piersi, niezależnie od stosowanego leczenia. Co więcej zaobserwowano, że rozwój oporności na różne leki nie wyklucza się wzajemnie co oznacza, że guz może być oporny na wiele strategii terapeutycznych [13]. Dodatkowym wyzwaniem stawianym przed skuteczną terapią jest występowanie zjawiska EMT zwiększającego zdolność do migracji i tworzenia ognisk wtórnych jak i nasilającego oporność na stosowane środki terapeutyczne [14]. Obecnie stosowane w przypadku nowotworu piersi leczenie opiera się o chemo- i radioterapię, interwencję chirurgiczną oraz immunoterapię [15]. Jednak terapie te mają swoje ograniczenia i dla wielu pacjentów okazują się nie być wystarczająco skuteczne co przekłada się na ilość notowanych zgonów w następstwie choroby nowotworowej.

Podobne statystyki obserwuje się w przypadku raka wątrobowokomórkowego. Zgodnie z raportami Narodowego Rejestru Nowotworów w roku 2020 w Polsce odnotowano 1265 zgonów wśród mężczyzn oraz 875 zgonów wśród kobiet. Natomiast

na świecie rejestruje się rocznie około 0,7 miliona zgonów w następstwie nowotworu wątroby [16]. Rak wątrobowokomórkowy jest najczęściej występującym pierwotnym nowotworem złośliwym wątroby. Pomimo znacznych postępów w profilaktyce, technikach diagnostycznych oraz leczeniu zachorowalność oraz śmiertelność stale rosną [17]. Obecnie medycyna dysponuje takimi technikami jak chirurgiczna resekcja guza, transplantacja wątroby, embolizacja oraz chemio- i radioterapia [18]. Metody te jednak często zawodzą co w dużej mierze wynika z późnego rozpoznania [17]. Kolejnym powodem, dla którego terapia może okazać się nieskuteczna jest wystąpienie zjawiska EMT [19] oraz lekooporności [20] związanej z aktywnością białka z rodziny ABC wiążącego trifosforan adeniny o charakterze pompy usuwającej lek z wnętrza komórki nowotworowej [21].

Stosowanym we wszystkich omówionych nowotworach podejściem terapeutycznym jest chirurgiczna resekcja guza nowotworowego. Chociaż w wielu przypadkach jest metodą, która daje największe szanse na przeżycie pacjenta również posiada swoje ograniczenia, które prowadzą do nawrotu choroby. W ciągu 5 lat od daty przeprowadzenia operacji aż u 40% pacjentów obserwuje się nawrót co skutkuje aż 10-krotnie gorszym rokowaniem. Dzieje się tak ponieważ nowo powstały guz nowotworowy przeważnie nie odpowiada na konwencjonalną terapię. Uważa się, że nowo powstałe nowotwory pochodzą z wyselekcjonowanych klonów, które wykazują wyższą oporność na chemio-, immuno- i radioterapię [22]. W tym miejscu należy zaznaczyć, że w patologicznie zmienionej tkance mogą występować różne komórki w tym: krążące komórki nowotworowe, które są zdolne do oddzielenia się od guzów pierwotnych [23] i nowotworowe komórki macierzyste, które promują inicjację, proliferację, migrację i lekooporność [24]. Zgodnie z danymi literackimi, po resekcji guza komórki charakteryzują się kilkoma różnicami fenotypowymi, na podstawie czego wysunięto hipotezę, że owe zmiany fenotypowe mogą być przyczyną nawrotu choroby. Chirurgiczne usunięcie guza sprzyja wydzielaniu czynników, które powodują aktywację komórek immunosupresyjnych, umożliwiając szybkie ponowne zasiedlenie małych kieszonek choroby resztkowej. Ponadto w węzłach chłonnych i nowopowstałym guzie obserwuje się nacieki makrofagów M2 i limfocytów T regulatorowych CD4+Foxp3+. Wszystko to razem tworzy złożoną sieć immunosupresji w otaczającym mikrosrodowisku, która może sprzyjać nawrotom raka [22]. Kolejnym ważnym czynnikiem w rozwoju nowotworu jest macierz zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular

matrix; ECM). Jej rolą jest nie tylko zapewnienie wsparcia strukturalnego zapewniającego integralność tkanki [25], ale jest to także fizjologicznie aktywna struktura, która dostarcza wszystkich niezbędnych cząsteczek regulujących komunikację między komórkami [26]. ECM jest wytwarzana i organizowana przez komórki zasiedlające daną tkankę, ponadto jest to wysoce dynamiczna struktura, która może ulegać przebudowie w zależności od potrzeb tkanki lub w wyniku postępu choroby [25]. Pierwszym krokiem w procesie przerzutowania jest inwazja komórek. Aby zjawisko to było możliwe, musi zostać zakłócona adhezja komórek do macierzy zewnętrzkomórkowej [27], co jest silnie powiązane z dezorganizacją jej unikalnej struktury [28]. Wskazuje to, na kluczową rolę jaką ECM pełni w progresji nowotworu. Aby utrzymać homeostazę, komórki w kontakcie z ECM po przez receptory powierzchniowe i kompleksy adhezyjne oddziałują z ECM regulując ekspresję białek budujących tą strukturę. Tworzy to mechanizm sprzężenia zwrotnego, w którym nie tylko ECM wpływa na rezydujące komórki, co przyczynia się do powstania równowagi między budową i degradacją ECM [29]. Nawet niewielkie zmiany w homeostazie ECM specyficznego dla tkanki mogą mieć znaczący wpływ na proliferację komórek nowotworowych. Liczne zmiany w macierzy zewnętrzkomórkowej, takie jak podwyższony poziom kolagenu I, III, IV i fibronektryny, wskazują, że progresja nowotworu opiera się na złożonych interakcjach komórek nowotworowych z otaczającym je ECM [30]. Ponadto wyższy poziom białek macierzy może przyczyniać się do zmian w polaryzacji komórek oraz w adhezji komórkowej [31].

Problemy napotykane w trakcie konwencjonalnej terapii spowodowały, iż naukowcy zaczęli poszukiwać alternatywnych metod mogących je rozwiązać. Nanocząstki metaliczne oraz nanomateriały węglowe w ostatnich latach zyskały duże zainteresowanie w tym aspekcie ze względu na ich unikalne właściwości fizykochemiczne wynikające m.in.: z efektu ograniczenia kwantowego elektronów, zwiększenia liczby miejsc koordynacyjnych oraz zwiększonego stosunku atomów i jonów powierzchniowych oraz przypowierzchniowych w stosunku do tych znajdujących się wewnętrz danej nanocząstki [32]. Podobieństwo wymiarowe nanocząstek do biomolekuł, wysoki stosunek powierzchni do objętości i możliwość wprowadzania modyfikacji powierzchniowych uczyniły z nich potężne narzędzia w diagnostyce, obrazowaniu i terapii [33]. Ze względu na swój rozmiar, nanocząstki wykazują zdolność do głębszej penetracji tkanek, mogą przenikać między komórkami nabłonkowymi i są

na ogół skutecznie wychwytywane przez komórki docelowe, co skutkuje poprawą biodostępności cząsteczek terapeutycznych [34].

Obecnie wiele badań skierowanych jest na biomedyczne zastosowanie nanocząstek metalicznych. Nanocząstki platyny (Pt), złota (Au) i srebra (Ag) ze względu na swoje specyficzne cechy znalazły zastosowanie w obszarach takich jak bioznakowanie [35], dystrybucja leków [36] i leczenie przeciwnowotworowe [37–39]. Ponadto uważa się, że mechanizm cytotoksyczności charakterystyczny dla nanocząstek Ag i Au czyni z nich obiecujące materiały, które można zastosować w terapii przeciwnowotworowej. Wspomniane nanocząstki pobierane są przez komórki i dopiero w kwaśnym środowisku lisosomów dochodzi do uwalniania toksycznych dla komórki jonów [40]. Mechanizm toksyczności nanocząsteczek Pt nadal nie jest w pełni poznany. Sugeruje się, że nanocząstki te mogą przedostawać się do komórki poprzez aktywny mechanizm internalizacji i podobnie jak nanocząstki Ag i Au, po wniknięciu do komórki uwalniane są toksyczne jony [41]. Choć wielu naukowców podejmuje próby oceny właściwości przeciwnowotworowych nanostruktur metalicznych potrzebne są dalsze badania w celu oceny potencjalnych korzyści i zagrożeń związanych ze stosowaniem nanocząstek metalicznych.

Nanomateriały węglowe również charakteryzują się unikatowymi właściwościami, które czynią z nich materiały, które potencjalnie można zastosować w terapii antynowotworowej. Obecnie analizuje się ich zastosowanie w dziedzinach takich jak nośniki leków [42], inżynieria tkankowa, obrazowanie, diagnostyka i terapia przeciwnowotworowa [43-45]. Nanomateriały węglowe mimo podobnego składu chemicznego różnią się budową oraz właściwościami fizykochemicznymi co przekłada się na różne właściwości biologiczne. Wśród nanomateriałów węglowych znajdują się: grafen (GN), tlenek grafenu (GO), fuleren (C<sub>60</sub>), fulerenol (C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub>) oraz nanocząstki diamentu (ND).

GN jest dwuwymiarową strukturą węglową składającą się z atomów węgla połączonych heksagonalnie [46]. Wskazany nanomateriał wykazuje powinowactwo do struktur biologicznych [47]. Co więcej GN zyskał duże zainteresowanie ze względu na jego zdolność do indukcji apoptozy [48]. Zaproponowano dwa mechanizmy, dzięki którym GN oddziałuje z komórką. Pierwszy dotyczy przylegania płatków GN do zewnętrznej części błony cytoplazmatycznej co powoduje naruszenie jej integralności.

Natomiast drugi mówi o zdolności GN do wnikania do komórek co indukuje powstawanie reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species; ROS) [47].

Najbardziej rozpowszechnioną pochodną grafenu wykorzystywaną w badaniach naukowych z zakresu biologii jest GO. Ten nanomateriał powstaje w wyniku intensywnego utleniania sproszkowanego grafitu. GO najczęściej przyjmuje formę płatków, a jego struktura wzbogacona jest znaczną ilością takich grup funkcyjnych jak OH, C–O–C, C=O oraz COOH [49]. Co więcej, GO ma charakter hydrofilowy z czego wynika lepsza niż w przypadku GN stabilność w zawiesinach wodnych. Chociaż wskazany nanomateriał określany jest mianem cytokompatybilnego [50] doniesienia literaturowe wskazują na jego zdolność do indukcji ROS [51], co wskazuje się jako główny mechanizm cytotoksyczności [52].

C<sub>60</sub> należy do sferycznych struktur węglowych. Przyjmuje formę pustej kuli zwanej ‘buckyball’, która jest najbardziej rozpowszechniona w badaniach z zakresu biologii [53]. Forma kulista C<sub>60</sub> składa się z 20 heksagonów i 12 pentagonów połączonych ze sobą [54]. Mechanizm toksyczności C<sub>60</sub> również opiera się o indukcję ROS. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi omawiany nanomateriał wywołuje możliwą do obserwowania po kilku godzinach produkcję ROS, która przyczynia się do nekrozy w komórkach nowotworowych [55]. Co więcej traktowanie C<sub>60</sub> powoduje perforacje błony komórkowej. W odróżnieniu do fulerenu, fulerenol czyli jego pochodna funkcjonalizowana grupami hydroksylowymi, która charakteryzuje się wyższą hydrofilnością powoduje opóźnioną w czasie produkcję ROS, które przyczyniają się do indukcji śmierci komórkowej o cechach charakterystycznych dla apoptozy. Traktowanie C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub> dodatkowo powoduje utratę symetrycznej budowy plazmalemmy, jednak bez jej permabilizacji oraz fragmentację kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. deoxyribonucleic acid; DNA) [55].

ND również należy do sferycznych struktur węglowych. Swoją popularność zyskał dzięki zdolności do intensywnej penetracji i akumulacji w tkankach neoplastycznych [56]. ND nie jest usuwany z komórki za pośrednictwem białek z rodziny ABC [57], które przyczyniają się do rozwoju lekooporności w komórkach nowotworowych. Dzięki tej właściwości ND może stanowić element skutecznej terapii antynowotworowej. Jako główny mechanizm cytotoksyczności ND wskazuje się indukcję stresu oksydacyjnego. Nadmierna produkcja ROS powoduje uszkodzenie DNA

oraz formowanie mikrojąder (ang. micronuclei; MN). Jednak cytotoksyczność ND może zależeć od wielu czynników takich jak: metoda produkcji, rozmiar oraz obecność grup funkcyjnych. Chociaż ND uważany jest za biokompatybilny nanomateriał [58] jego cytotoksyczność jest również zależna od analizowanego modelu badawczego. Badania pokazują, że ludzkie linie komórkowe wykazują zróżnicowaną wrażliwość na ND. Sugeruje się, że na tę komórkowo specyficzną odpowiedź wpływają mechanizmy internalizacji i zdolność do inicjowania odpowiedzi zapalnej czy apoptozy [59].

Jak wcześniej wspomniano jednym z wielu problemów w terapii przeciwnowotworowej jest nawrót choroby po chirurgicznej resekcji guza. Nanomateriały węglowe takie jak GN, GO, ND i C60 mogą tworzyć nanofilmy [60-63], które stanowią źródło bodźców mechano-chemicznych odpowiedzialnych za zmianę zachowania komórek poprzez zmianę poziom ekspresji białek biorących udział w procesie proliferacji, aktywując syntezę ATP oraz obniżając ekspresję białek budujących cytoszkielet. Dlatego też, nanofilmy węglowe mogą być zdolne do promowania właściwej adhezji i zmniejszania tempa proliferacji komórek nowotworowych, co skutkowałoby zmniejszeniem potencjału onkogennego i zapobieganiem nawrotom choroby.

## 5. Hipoteza badawcza, cel i zakres pracy

### Hipoteza badawcza

Nanocząstki metaliczne oraz nanomateriały węglowe indukują śmierć komórek poprzez perforację błon komórkowych, oraz indukcję stresu oksydacyjnego. Efekt wywoływany przez nanocząstki oraz nanomateriały jest komórkowo specyficzny. Nonofilmy utworzone z nanomaterialów węglowych zwiększa adhezje komórek oraz hamują ich proliferację po przez zaburzenie procesów podziału komórkowego. Cytotoksyczność nanocząstek diamentu jest komórkowo specyficzna i zależy od czynników takich jak rozmiar nanocząstek, obecność grup funkcyjnych na ich powierzchni oraz metoda produkcji.

### Podstawowy cel naukowy

Celem pracy było określenie potencjalnych właściwości antynowotworowych nanocząstek metalicznych oraz nanomaterialów węglowych na komórki nowotworowe charakteryzujące się występowaniem zjawiska lekooporności, w tym komórki

nowotworu: piersi (MDA.MB.231, MCF-7), trzustki (BxPC-3, AsPC-1), wątroby (Hep G2) oraz glejaka IV stopnia (U-118 MG, T98G, U-87 MG). Co więcej niniejsze badania miały na celu analizę wpływu nanomateriałów węglowych jako środka stabilizującego ECM, na aktywność proliferacyjną oraz adhezję komórek glejaka IV stopnia U-87 MG oraz raka piersi MDA.MB.231.

Szczegółowe cele naukowe:

1. Celem doświadczenia I było określenie potencjalnych właściwości antynowotworowych nanocząstek metalicznych (Pt, Ag, Au) oraz nanomateriałów węglowych (GO, ND,  $C_{60}(OH)_{40}$ ) względem ustalonych linii nowotworu trzustki: AsPC-1 i BxPC-3 opornych na gemcytabinę oraz linii nienowotworowych: komórki zrębu szpiku kostnego HS-5 i fibroblasty HFFF-2. Dodatkowym celem był wybór nanomateriałów, wykazujących pożądane działanie, do kolejnych analiz.
2. Celem doświadczenia II była analiza wpływu bodźców mechanicznych oraz chemicznych, których źródłem były nanofilmy utworzone z nanomateriałów węglowych (GN, GO, C<sub>60</sub> oraz ND) na aktywność proliferacyjną oraz adhezję komórek raka piersi MDA.MB.231 oraz glejaka IV stopnia U-87 MG przy zastosowaniu hodowli *in vitro* w monowarstwie oraz biodrukowanego modelu 3D.
3. Ze względu na fakt, iż ND wykazywał najlepsze działanie antynowotworowe w pierwszych dwóch doświadczeniach celem III doświadczenia była ocena wpływu parametrów takich jak: rozmiar, metoda produkcji (laserowa, detonacyjna) oraz obecność różnych grup funkcyjnych na powierzchni ND na ich toksyczność względem ustalonych linii nowotworowych: glejaka IV stopnia (U-118 MG, T98G), nowotworu piersi (MCF-7), nowotworu wątroby (Hep G2) oraz nienowotworowej linii ludzkich fibroblastów (HFF-1).

Zakres pracy:

- Charakterystyka nanocząstek metalicznych (Pt, Ag, Au), nanomateriałów węglowych (GN, GO, C<sub>60</sub>,  $C_{60}(OH)_{40}$ , ND i jego modyfikacji) oraz nanofilmów uzyskanych z GN, GO, C<sub>60</sub> i ND pod względem fizykochemicznym z uwzględnieniem cech powierzchni badanych nanofilmów za pomocą analizy potencjału zeta, średnicy hydrodynamicznej,

pomiaru kąta zwilżalności i widma Ramana oraz przy użyciu technik TEM, SEM i AFM;

- Określenie potencjału toksycznego wskazanych nanocząstek i nanomateriałów z uwzględnieniem nanofilmów na podstawie analizy aktywności metabolicznej oraz integralności błony komórkowej z użyciem testów: MTT, PrestoBlue HS, CyQUANT LDH;
- Określenie zmian morfologicznych z użyciem odwróconej mikroskopii świetlnej;
- Określenie zmian w zakresie ekspresji 40 cytokin prozapalnych wywołanych przez GO i ND (w stężeniu 50 mg/l) po traktowaniu komórek nowotworu trzustki AsPC-1 i BxPC-3 z użyciem membran antygenowych;
- Określenie wpływu badanych nanofilmów na proliferację i adhezję komórek glejaka IV stopnia linii U-87 MG oraz nowotworu piersi MDA.MB.231 za pomocą pomiaru ilości dehydrogenazy mleczanowej (ang. lactate dehydrogenase; LDH) po całkowitej lizie komórek z użyciem testu CyQUANT LDH;
- Określenie wpływu ND na adhezję komórek glejaka IV stopnia U-87 MG oraz komórek raka piersi MDA.MB.231 do 7 komponentów ECM (kolagen I, kolagen II, kolagen IV, fibronektyna, laminina, tenascyna, witronektyna) z użyciem testu ECM Cell Adhesion Array;
- Określenie wpływu ND zawieszonego w macierzy pozakomórkowej na toksyczność i proliferację komórek glejaka IV stopnia U-87 MG oraz nowotworu piersi MDA.MB.231 z zastosowaniem biodrukowanego modelu 3D przy użyciu mikroskopii konfokalnej;
- Analiza poziomu reaktywnych form tlenu po traktowaniu ND komórek nowotworu trzustki BxPC-3 i AsPC-1 oraz po traktowaniu ND i jago modyfikacjami komórek: glejaka IV stopnia: U-118 MG, T98G; nowotworu wątroby Hep G2, nowotworu piersi MCF-7 oraz nienowotworowej linii ludzkich fibroblastów HFF-1.

## 6. Metodyka badań

### 6.1 Nanocząstki i nanomateriały wykorzystywane w badaniach

Niniejsze badania można podzielić na 3 doświadczenia. W doświadczeniu I (Publikacja 1: Wójcik *et al.*, 2021) zastosowano hydrokoloidalne zawiesiny nanocząstek metalicznych pozyskane od firmy Nano-Koloid (Warszawa, Polska) o stężeniach: Pt - 100 mg/l, Au - 50 mg/l, Ag - 50 mg/l. Wskazane hydrokoloidy posłużyły do przygotowania 10 krotnie stężonych roztworów o stężeniach 1, 5, 10, 20 oraz 50 mg/l. Dodatkowo w przedstawionym doświadczeniu zastosowano również nanomateriały węglowe. GO i ND pozyskane były od firmy Skyspring Nanomaterials (Houston, TX, USA). Średnia długość płatków GO wynosiła od 1-2  $\mu\text{m}$ , natomiast ich grubość nie przekraczała 2 nm. Średnica ND mieściła się w zakresie od 3 do 4 nm. Ostatnim nanomateriałem zastosowanym w doświadczeniu I był C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub> pozyskany od firmy US Research Nanomaterials (Houston, TX, USA). Ze wskazanych nanomateriałów wykonane zostały x10 krotnie stężone roztwory o stężeniach: 100, 200, 500 oraz 1000 mg/l. Do przygotowania wszystkich zawiesin wykorzystano ultra czystą wodę. Przed użyciem zawiesiny nanocząstek oraz nanomateriałów sonikowane były przez 1 min (500W, 20 Hz) przy użyciu VC 505 Vibra-Cell™ Ultrasonic Liquid Processor (Sonics & Materials, Newton, CT, USA).

W doświadczeniu II (Publikacja 2: Wójcik *et al.*; 2023) zastosowano następujące nanomateriały: GN, GO, C60 oraz ND. GN został pozyskany od firmy SkySpring Nanomaterials. Zgodnie z danymi dostarczonymi przez producenta powierzchnia płatków GN wynosiła 750 m<sup>2</sup>/g a ich grubość mieściła się w zakresie od 1 do 5 nm. GN wyprodukowane było metodą eksfoliacji. GO i ND pozyskane zostały od firmy US Research Nanomaterials. Średnia długość płatków GO mieściła się w zakresie od 1,5 do 5,5  $\mu\text{m}$  natomiast ich grubość nie przekraczała 1,23  $\mu\text{m}$ . GO zawieszone było w wodzie (2wt%). Średnica ND mieściła się w zakresie od 2 do 10 nm. C60 został pozyskany od firmy SES Research (Houston, TX, USA). Nanomateriał suszony był w piecu próżniowym i zgodnie z danymi przekazanymi przez producenta nie zawierał on rozpuszczalnika. GN, GO, C60 i ND zawieszone zostały w ultraczystej wodzie w celu uzyskania zawiesin o stężeniu 1000 mg/l. Przed użyciem zawiesiny sonikowane były przez 1 min (500W, 32Hz). W celu utworzenia nanofilmów przygotowane zawiesiny zostały wylane i równomiernie rozprowadzone na spodzie dołka 96-dołkowej płytki hodowlanej (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) w objętości 50  $\mu\text{l}$ . Natomiast w celu oceny morfologii na płytach 6-dołkowych (Nunc, Thermo Fisher

Scientific) nałożono 10 kropli w równych odległościach o objętości 10  $\mu$ l. Nanofilmy suszone były w warunkach sterylnych.

W doświadczeniu III (Publikacja 3: Wójcik *et al.*, 2023) zastosowano różne modyfikacje ND, które podzielono na trzy grupy. Pierwsza grupa nanomateriałów różni się obecnością grup funkcyjnych i pozyskana została od firmy US Research Nanomaterials. ND-nf nie było funkcjonalizowane, ND-NH<sub>2</sub> posiadały na swojej powierzchni grupy aminowe, ND-COOH było funkcjonalizowane grupami karboksylowymi, a ND-OH posiadał na swojej powierzchni grupy hydroksylowe. Nanomateriały z drugiej grupy różniły się rozmiarem i pozyskane zostały od firmy Skyspring Nanomaterials. Rozmiar nanocząstek ND-S mieścił się w zakresie 3-4 nm, natomiast ND-B od 10 do 20 nm. Trzecia grupa nanomateriałów różniła się metodą produkcji i pozyskana została od firmy Ray Techniques Ltd. (Jeruzalem, Izrael). RayND oraz RayND-AL produkowane były metodą ablacji laserowej, natomiast RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN produkowane były metodą detonacyjną. Wszystkie nanomateriały zawieszone były w ultraczystej wodzie w celu uzyskania 10 krotnie stężonych roztworów o stężeniach 50, 200, 500 oraz 1000 mg/l. Przed użyciem wszystkie zawiesiny sonikowane były przez 1 min (500W, 32 kHz).

## 6.2 Modele badawcze *in vitro*

W niniejszych analizach zastosowano ustalone linie nowotworowe i nienowotworowe pozyskane z ATCC (ang. American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Wszystkie linie komórkowe scharakteryzowane zostały jako typ adherentny.

W doświadczeniu I zastosowano ustalone linie nowotworu trzustki AsPC-1 oraz BxPC-3 charakteryzujące się opornością na gemcytabinę. Jako kontrolę użyto nienowotworowe linie komórek zrębu szpiku kostnego HS-5 oraz linie fibroblastów ludzkich HFFF-2. Komórki nowotworowe hodowane były w pożywce Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco, Thermo Fisher Scientific) suplementowanej 10% dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (ang. fetal bovine serum; FBS, Gibco) oraz 1% dodatkiem mieszaniny antybiotyku (Antibiotic-Antimycotic, Gibco) składającego się z penicyliny (100 U/mL), streptomycyny (100  $\mu$ g/mL), i Gibco amfoterycyny B (0.25  $\mu$ g/mL). Nowotworowe linie komórkowe hodowano w pożywce

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco) suplementowanej 10% dodatkiem FBS (Gibco) i 1% dodatkiem mieszaniny antybiotyku (Antibiotic-Antimycotic, Gibco). Hodowla prowadzona była w warunkach standardowych w 37°C (95% wilgotności, 5% CO<sub>2</sub>).

W doświadczeniu II użyto dwóch linii nowotworowych: glejaka IV stopnia U-87 MG oraz nowotworu piersi MDA.MB.231. Komórki linii U-87 MG hodowane były w pożywce Eagles's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC) suplementowanej 10% dodatkiem FBS (Gibco) oraz 1% dodatkiem mieszaniny antybiotyku (Antibiotic-Antimycotic, Gibco). Komórki linii MDA.MB.231 hodowane były w pożywce DMEM (ATCC) suplementowanej 10% dodatkiem FBS (Gibco) i 1% dodatkiem mieszaniny antybiotyku (Antibiotic-Antimycotic, Gibco). Hodowla prowadzona była w warunkach standardowych w 37°C (95% wilgotności, 5% CO<sub>2</sub>). Co więcej w celu odtworzenia wielowymiarowych oddziaływań między komórkami zastosowano również technologie biodruku 3D do stworzenia przestrzennych modeli utworzonych zarówno z komórek linii U-87 MG jak i MDA.MB.231.

W doświadczeniu III użyto czterech linii nowotworowych: dwóch linii glejaka IV stopnia T98G i U-118 MG, raka piersi MCF-7 oraz nowotworu wątroby Hep G2. Jako nienowotworową linie kontrolną użyto linii ludzkich fibroblastów HFF-1. Komórki linii T98G, MCF-7 oraz Hep G2 hodowane były w pożywce EMEM (ATCC) suplementowanej 10% dodatkiem FBS (Gibco) oraz 1% dodatkiem mieszaniny antybiotyku (Antibiotic-Antimycotic, Gibco). Komórki linii U-118 MG oraz HFF-1 hodowane były w pożywce DMEM (ATCC). Do hodowli komórek linii U-118 MG zastosowano suplementację FBS (Gibco) w wysokości 10% natomiast w przypadku komórek linii HFF-1 zastosowano 15% dodatek FBS. W obu przypadkach do pożywki dodano 1% mieszaniny antybiotyku (Antibiotic-Antimycotic, Gibco). Hodowla prowadzona była w warunkach standardowych w 37°C (95% wilgotności, 5% CO<sub>2</sub>).

### 6.3 Charakterystyka nanocząstek metalicznych i nanomateriałów węglowych

Ultrastrukturę wybranych do doświadczenia I nanomateriałów i nanocząstek analizowano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM-1220 (ang. transmission electron microscope; TEM, JEOL, Tokio, Japonia) wyposażonego w kamerą Morada o rozdzielczości 11 megapikseli (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Niemcy). Dodatkowo wykonano pomiar potencjału Zeta za pomocą laserowej

elektroforezy Dopplera (ang. laser Doppler electrophoresis; LDE) z zastosowaniem przybliżenia Smoluchowskiego. Wszystkie pomiary wykonane były w temperaturze 25°C przy stężeniu 20 mg/l. Do analiz wykorzystano instrument pomiarowy Zeta Sizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, UK). Kolejno zmierzono średnicę hydrodynamiczną nanocząstek i nanomateriałów zawieszony w ultraczystej wodzie w stężeniu 25 mg/l dla nanocząsteczek metalicznych i 20 mg/l dla nanomateriałów węglowych. Pomiary przeprowadzono metodą dynamicznego rozpraszania światła (ang. dynamic light scattering; DLS).

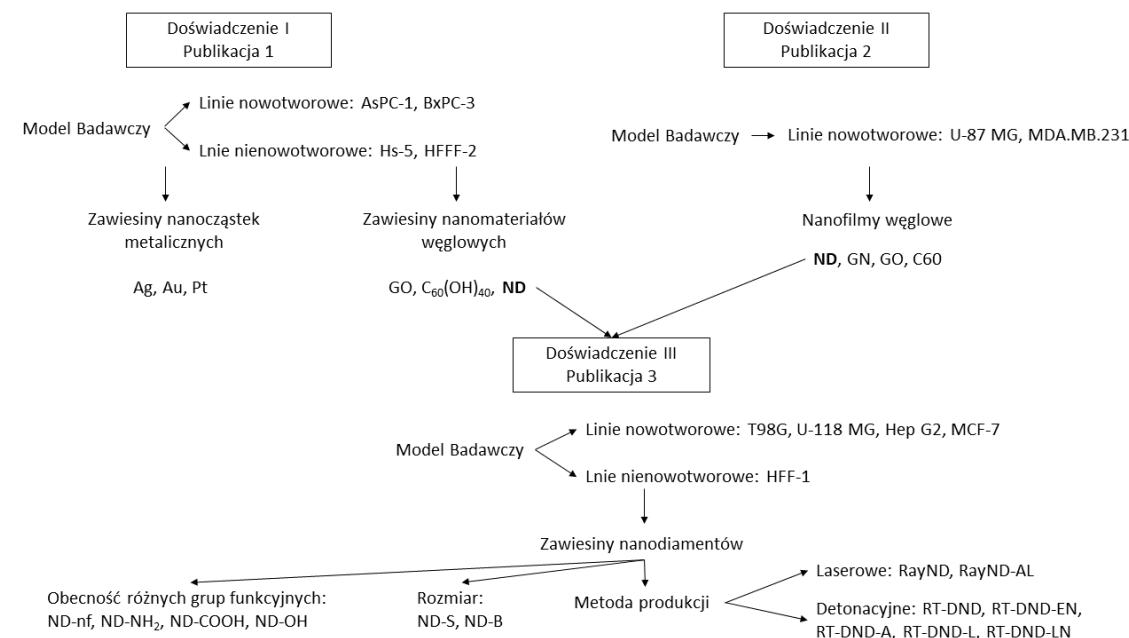
Ultrastrukturę nanomateriałów wykorzystanych w doświadczeniu II GN, GO, C60 i ND analizowano za pomocą mikroskopii TEM JEM-1220 (TEM, JEOL, Tokio, Japonia) przy 80 KV wyposażonego w aparat Morada o rozdzielczości 11 megapikseli (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Niemcy). Powierzchnie wykonane z GN, C60 i ND scharakteryzowane zostały za pomocą mikroskopii sił atomowych (ang. atomic force microscopy; AFM) w tym celu powierzchnię płytki do hodowli komórkowej równomiernie pokryto zawiesinami nanomateriałów i wysuszono (Nanores, Polska). Dodatkowo wysuszone nanomateriały poddano analizie za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (ang. scanning electron microscope; SEM; Quanta 200, FEI, Hillsboro, USA). Dodatkowo zmierzono kąt zwilżania badanych nanofilmów. W tym celu na powierzchni szalki do hodowli komórkowej (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pokrytej odpowiednim nanofilmem umieszczono 50 µl wody. Krople obrazowano za pomocą poziomego mikroskopu stereoskopowego (Delta Optical, Polska). Do pomiarów potencjału Zeta wykorzystano analizator Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Worcestershire, UK). Potencjał Zeta mierzono metodą LDE przy zastosowaniu przybliżenia Smoluchowskiego w temperaturze 25°C. Przed wykonaniem analiz wybrane nanomateriały zdyspergowano w ultraczystej wodzie do stężenia 5 mg/L, poddano sonikacji (500 W i 20 kHz) przez 1 minutę przy użyciu płuczki ultradźwiękowej Vibra-Cell™ (Sonics & Materials) i odwirowano (5 minut, 1000 x g) w celu usunięcia powstałych klastrów.

Nanomateriały z doświadczenia III również zostały poddane analizie z wykorzystaniem techniki TEM. Dodatkowo we współpracy z Politechniką Warszawską wykonano pomiary widma Ramana przy użyciu spektrometru Renishaw inVia ze źródłem lasera 514 nm. Analizę potencjału Zeta i średnicy hydrodynamicznej przeprowadzono przy użyciu analizatora Zeta Sizer Nano-ZS90 (Malvern). Potencjał Zeta mierzono metodą

LDE przy zastosowaniu przybliżenia Smoluchowskiego w temperaturze 25°C. Nanocząstki diamentu zawieszone zostały w ultraczystej wodzie oraz w pożywce hodowlanej EMEM (ATCC) w stężeniu 20 mg/l. Przed wykonaniem analizy próbki zwirowano (5 min; 4000 RPM). Pomiary wykonano w czasie 0h zaraz po dodaniu nanocząstek oraz po 24-godzinnej inkubacji w 37°C. Następnie za pomocą metody DLS zmierzono średnice hydrodynamiczną nanocząstek diamentu w ultraczystej wodzie oraz podłożu hodowlanym EMEM w dwóch punktach czasowych (0h i 24h).

#### 6.4 Układ doświadczeń

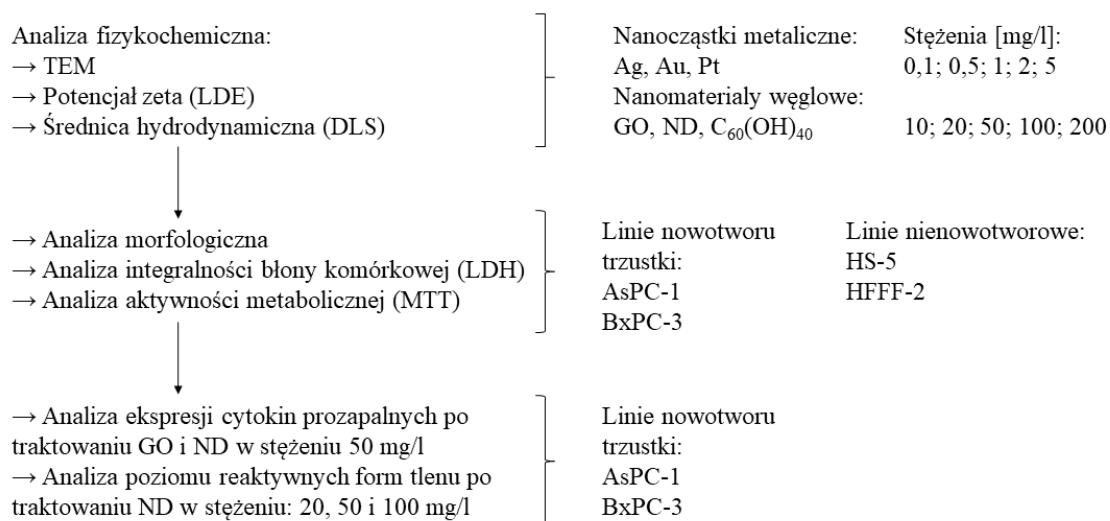
W toku realizacji pracy doktorskiej przeprowadzono trzy doświadczenia (ryc.1) w ramach, których analizowano toksyczność nanocząstek metalicznych: Pt, Ag, Au, nanomateriałów węglowych: GO, ND, C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub> oraz nanofilmów węglowych utworzonych z: GN, GO, C<sub>60</sub> i ND. Co więcej w trakcie realizacji badań przeanalizowano wpływ czynników takich jak obecność grup funkcyjnych (ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH), rozmiar (ND-S, ND-B) czy metoda produkcji (RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN) na toksyczność nanocząstek diamentu. Dodatkowo w toku analiz w celu odzwierciedlenia wielowymiarowych interakcji komórka-komórka oraz komórka-ECM utworzono trójwymiarowy model za pomocą techniki biodruku 3D.



Ryc. 1 Schemat doświadczeń

##### 6.4.1 Doświadczenie I (Publikacja 1: Wójcik *et al.*, 2021)

Celem doświadczenia było określenie potencjalnych właściwości antynowotworowych nanocząstek metalicznych (Pt, Ag, Au) oraz nanomateriałów węglowych (GO, ND, C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub>) względem ustalonych linii nowotworu trzustki: AsPC-1 i BxPC-3 opornych na gemcytabinę oraz wybór nanomateriałów, wykazujących pożądane działanie, do kolejnych analiz. Schemat doświadczenia został przedstawiony na rycinie 2.



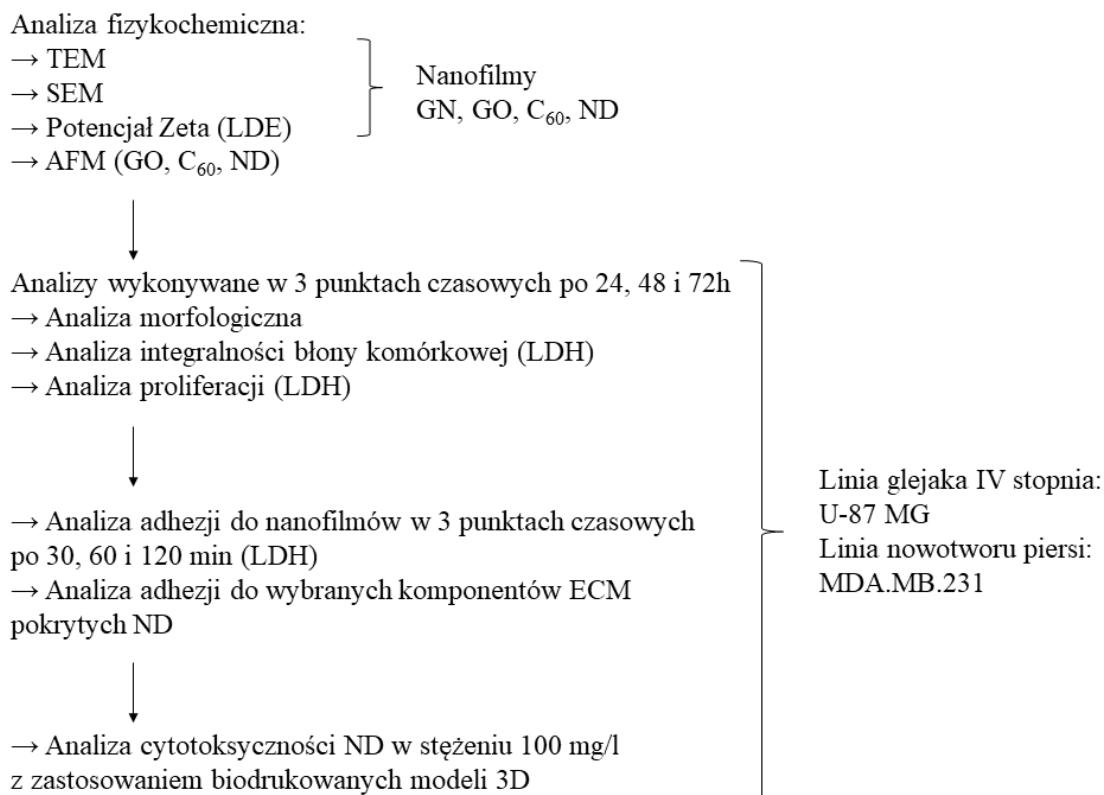
Ryc. 2 Schemat pierwszego doświadczenia

Aby ocenić toksyczność wskazanych nanocząstek i nanomateriałów wykonano testy: aktywności metabolicznej MTT (Thermo Fisher Scientific), integralności błony komórkowej LDH (LDH, Roche, Switzerland) oraz oceniono morfologię komórek. Testy wykonano na dwóch liniach nowotworu trzustki BxPC-3 i AsPC-1 oraz dwóch liniach nienowotworowych: komórkach zrębu szpiku kostnego HS-5 i fibroblastach HFFF-2. Wszystkie analizy wykonane zostały po 24-godzinnej inkubacji z badanym czynnikiem. W celu wykonania testów MTT i LDH stosowano 10% dodatek uprzednio przygotowanych 10 krotnie stężonych zawiesin nanocząstek uzyskując badane stężenia 0,1; 0,5; 1; 2 i 5 mg/l oraz nanomateriałów węglowych uzyskując stężenie 10, 20, 50, 100 i 200 mg/l. Ocena morfologii wykonana została dla stężeń: 1 mg/l dla nanocząstek metalicznych i 10 mg/l dla nanomateriałów węglowych. Po analizie otrzymanych wyników zmierzono poziom ROS po 2-godzinnej inkubacji komórek nowotworowych (BxPC-3 i AsPC-1) z ND w stężeniach 20, 50 i 100 mg/L. Analizę wykonano przy użyciu mikroskopii konfokalnej po wyznakowaniu jąder komórkowych barwnikiem fluorescencyjnym NucRed Live 647 (Thermo Fisher Scientific) oraz ROS przy użyciu

markera stresu oksydacyjnego CM-H2DCFDA (Thermo Fisher Scientific). Zdjęcia wykonano przyżyciowo w komorze utrzymującej stałą temperaturę 37°C oraz atmosferę o 5% zawartości CO<sub>2</sub>. Następnie przeliczono gęstość pikseli odpowiadających ROS na jedną komórkę za pomocą oprogramowania Fiji [64]. Wyniki przedstawiono w postaci % kontroli. Kolejnym etapem była ocena poziomu 40 cytokin prozapalnych. Ta analiza wykonana została dla komórek nowotworowych AsPC-1 i BxPC-3 po 24-godzinnej inkubacji z GO i ND w stężeniu 50 mg/l przy użyciu membran antygenowych (ABCAM, Cambridge, UK). We wszystkich analizach zastosowano również kontrolę nośnika, w tej grupie komórki traktowane były jedynie rozpuszczalnikiem, w którym były zawieszone nanocząstki i nanomateriały - ultraczysta woda. Wszystkie dane liczbowe przeanalizowane zostały statystycznie przy użyciu oprogramowania Statgraphic Plus 4.1 (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, USA) testem jednoczynnikowej analizy wariancji: one-way ANOVA. Różnice między grupami oceniano testem HSD Tukeya, przyjęto poziom istotności  $p \leq 0,05$ . Wszystkie wartości średnie przedstawiono z odchyleniem standardowym.

#### 6.4.2 Doświadczenie II (Publikacja 2: Wójcik *et al.*; 2023)

Celem doświadczenia była analiza wpływu bodźców mechanicznych oraz chemicznych, których źródłem były nanofilmy utworzone z nanomateriałów węglowych (GN, GO, C60 oraz ND) na aktywność proliferacyjną oraz adhezję komórek raka piersi MDA.MB.231 oraz glejaka IV stopnia U-87 MG przy zastosowaniu hodowli *in vitro* w monowarstwie oraz biodrukowanego modelu 3D. Schemat doświadczenia został zaprezentowany na rycinie 3.



Ryc. 3 Schemat drugiego doświadczenia

Wszystkie analizy wykonane zostały na dwóch liniach nowotworowych: glejaka IV stopnia U-87 MG oraz MDA.MD.231. Aby ocenić toksyczność nanofilmów węglowych wykonanych z GN, GO, C<sub>60</sub> oraz ND wykonano test integralności błony komórkowej z wykorzystaniem testu aktywności dehydrogenazy mleczanowej CyQUANT LDH (Thermo Fisher Scientific) oraz analizę morfologiczną z wykorzystaniem mikroskopu Leica DMi8 (Leica Microsystem, Wetzlar, Niemcy) wyposażonego w kamerę Leica MC 190 HD. Analizy te zostały wykonane w trzech punktach czasowych po 24, 48 oraz 72 godz. Pożądanym efektem w terapii z zastosowaniem wzmacnienia naturalnego ECM przez nanofilmy węglowe jest zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych, dlatego też oceniono aktywność proliferacyjną komórek po 24, 48 oraz 72 godz. W tym celu wykonano zmodyfikowany test LDH (Thermo Fisher Scientific), w którym wszystkie grupy (kontrolna i badawcza) zostały poddane lizie. Ilość komórek została oceniona na podstawie całkowitej ilości enzymu LDH w próbie po przyczepieniu do wartości uzyskanych w nietraktowanej grupie kontrolnej. Kolejnym ocenianym parametrem w przedstawionym doświadczeniu była adhezja komórek do podłoża pokrytego określonym nanomateriałem węglowym. Badanie to wykonano w trzech punktach czasowych 20, 60 oraz 120min od wysiania komórek na wcześniej przygotowaną powierzchnię. W celu usunięcia komórek

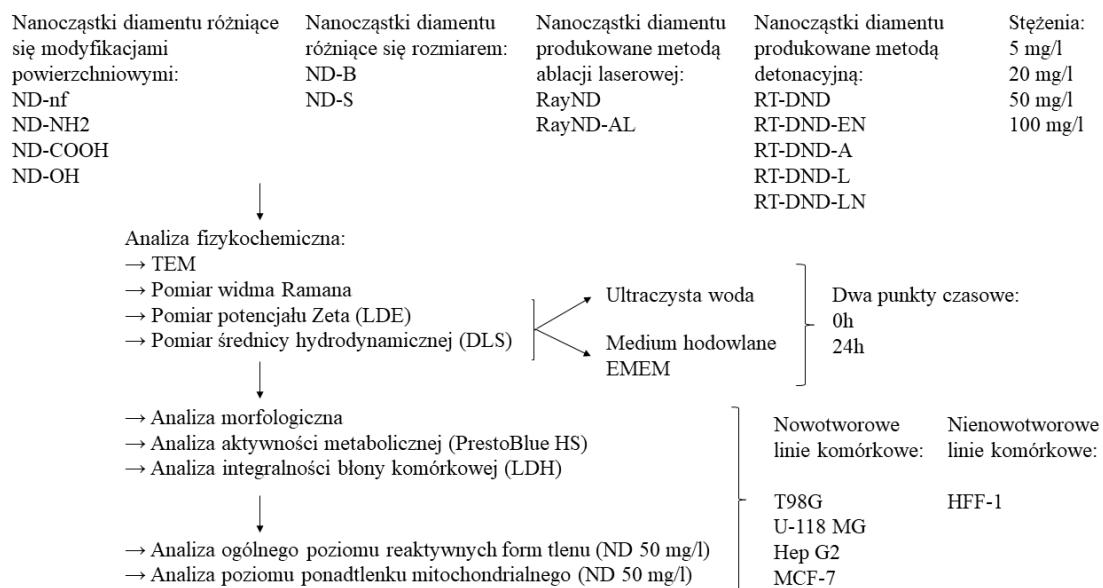
nieprzytwierdzonych do powierzchni dołki w płytce hodowlanej przepłukano solą fizjologiczną buforowaną fosforanami (ang. phosphate buffer saline; PBS, Thermo Fisher Scientific) a następnie wszystkie grupy poddano lizie. Ilość komórek oceniano na podstawie ilości enzymu LDH z zastosowaniem testu CyQUANT LDH (Thermo Fisher Scientific) po przyrównaniu uzyskanych wartości do tych uzyskanych dla nientraktowanej grupy kontrolnej. Analizę adhezji komórkowej uzupełniono wykonując test ECM Cell Adhesion Array (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy), w którym badano adhezję komórek do wybranych składników macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagen I, kolagen II, kolagen IV, fibronektyna, laminina, tenascyna i witronektyna) pokrytych ND. Test opiera się na pomiarze kolorimetrycznym. Kolejnym etapem było stworzenie modeli 3D metodą biodruku z zastosowaniem biodrukarki Bio X (Cellink, Goteborg, Szwajcaria). W tym celu komórki zawieszono w GelMA Bioink (Cellink) w grupie kontrolnej oraz GelMA Bioink (Cellink) z dodatkiem hydrokoloidu ND, uzyskując końcowe stężenie 100 mg/L. Modele 3D inkubowano przez 7 dni w temperaturze 37°C w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Pożywkę do hodowli komórkowej wymieniano na świeżą w drugim, czwartym, piątym i szóstym dniu inkubacji. Po 7 dniach komórki barwiono przy użyciu barwnika Image-IT™ DEAD Green Viability Stain (Thermo Fisher Scientific) po czym utrwalono 4% roztworem paraformaldehydu (PFA), a następnie wybarwiono jądra komórkowe przy użyciu barwnika DAPI (Thermo Fisher Scientific). Analizę przeprowadzono w 4 powtórzeniach dla każdej grupy z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej przy użyciu mikroskopu Leica DMi8 (Leica Microsystem) wyposażonego w kamerę Leica MC 190 HD. Komórki zliczone zostały przy użyciu oprogramowania Fiji [64].

Wszystkie dane liczbowe uzyskane w trakcie doświadczeń zostały przeanalizowane statystycznie z zastosowaniem oprogramowania Statgraphics Plus 4.1 (StatPoint Technologies) za pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji one-way ANOVA. Różnice między grupami przeanalizowano za pomocą testu HSD Tukeya. poziom istotności przyjęto na poziomie  $p < 0,05$ . Wszystkie wartości średnie przedstawiono z odchyleniem standardowym.

#### 6.4.3 Doświadczenie III (Publikacja 3: Wójcik *et al.*, 2023)

Celem doświadczenia III była ocena wpływu parametrów takich jak: rozmiar (ND-S, ND-B), metoda produkcji (laserowa: RayND i RayND-AL, detonacyjna:

RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN ) oraz obecność różnych grup funkcyjnych na powierzchni nanocząstki ND (ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH) na ich toksyczność względem ustalonych linii nowotworowych: glejaka IV stopnia (U-118 MG, T98G), nowotworu piersi (MCF-7), nowotworu wątroby (Hep G2) oraz nienowotworowej linii ludzkich fibroblastów (HFF-1). Schemat doświadczenia został zaprezentowany na rycinie 4.



Ryc. 4 Schemat trzeciego doświadczenia.

Aby ocenić toksyczność badanych ND wykonano testy: aktywności metabolicznej PrestoBlue HS (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), integralności błony komórkowej CyQUANT LDH (Thermo Fisher Scientific) oraz oceniono morfologię komórek. Testy wykonano na czterech liniach nowotworowych: glejaka IV stopnia T98G i U-118 MG, raka piersi MCF-7, nowotworu wątroby Hep G2 oraz jednej linii nienowotworowej fibroblastów HFF-1. Wszystkie analizy wykonane zostały po 24-godzinnej inkubacji z badanym czynnikiem. W celu wykonania testów PrestoBlue HS i LDH stosowano 10% dodatek uprzednio przygotowanych 10x stężonych zawiesin ND uzyskując badane stężenia 5, 20, 50, 100 mg/l. Ocenę morfologii wykonano po traktowaniu nanomateriałami w stężeniu 20 mg/l. W niniejszych analizach zastosowano kontrolę nośnika, w tej grupie komórki traktowane były ultraczystą wodą dodaną do pozywki w objętości 10% (objętość równą objętości dodawanych zawiesin nanomateriałów). Dodatkowo zmierzono poziom ogólnego stresu oksydacyjnego oraz ponadtlenku mitochondrialnego po 3-godzinnym traktowaniu badanymi nanomateriałami

przy użyciu mikroskopii konfokalnej. W tym celu komórki wybarwiono barwnikami fluorescencyjnymi: CM-H2DCFDA (indykator stresu oksydacyjnego, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), MitoSOX Red (indykator mitochondrialnego ponadtlenku, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Jądra komórkowe wybarwiono przy użyciu barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Zdjęcia wykonano sekwencyjnie w komorze utrzymującej stałą temperaturę 37°C, w celu zachowania prawidłowego pH płynu hodowlanego zastosowano dodatek 25 µM HEPES (Thermo Scientific). Następnie przeliczono gęstość pikseli odpowiadających ROS i ponadtlenkowi mitochondrialnemu na jedną komórkę za pomocą oprogramowania Fiji [64]. Wyniki przedstawiono w postaci % kontroli (komórki nietraktowane). Dane uzyskane z analiz aktywności metabolicznej PrestoBlue HS oraz integralności błony komórkowej LDH zostały przeanalizowane statystycznie za pomocą oprogramowania GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, CA, USA) testem wieloczynnikowej analizy wariancji two-way ANOVA. Różnice o poziomie istotności  $p < 0,5$  uznano za istotne (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Dane uzyskane z pomiaru ROS oraz mitochondrialnego ponadtlenku przeanalizowane zostały statystycznie przy użyciu oprogramowania Statgraphic Plus 4.1 (StatPoint Technologies) testem jednoczynnikowej analizy wariancji: one-way ANOVA. Różnice między grupami oceniano testem HSD Tukeya, przyjęto poziom istotności  $p \leq 0,05$ . Wszystkie wartości średnie przedstawiono z odchyleniem standardowym.

## 7. Omówienie głównych wyników przeprowadzonych doświadczeń

7.1 Określenie potencjalnych właściwości antynowotworowych nanocząstek metalicznych (Pt, Ag, Au) oraz nanomateriałów węglowych (GO, ND, C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub>) względem ustalonych linii nowotworu trzustki: AsPC-1 i BxPC-3 opornych na gemcytabinę oraz wybór nanomateriałów, wykazujących pożądane działanie, do kolejnych analiz. (Publikacja 1: Wójcik et al., 2021)

Celem tego badania była ocena toksyczności różnych nanomateriałów metalicznych (Ag, Au i Pt) i węglowych (GO, ND i C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub>) w różnych stężeniach. Jak dotąd nie przeprowadzono wielu badań analizujących potencjalne zastosowanie nanocząsteczek jako środka przeciwnowotworowego w leczeniu raka trzustki. Analiza morfologiczna wykazała, że żadna z badanych linii komórkowych (nowotworowe:

BxPC-3, AsPC-1 i nienowotworowe: HFFF-2, HS-5) nie wykazywała żadnych widocznych zmian po traktowaniu Ag i Au. Nie zaobserwowano żadnych złogów nanocząsteczek na błonie komórkowej ani wewnątrz komórki. Niemniej jednak istnieją pewne dowody na to, że metaliczne nanocząstki, takie jak Ag i Au, mogą przedostawać się do komórek poprzez aktywny mechanizm internalizacji [65]. Mogą także pełnić rolę tzw. konia trojańskiego, przyczyniając się do uwolnienia stosunkowo toksycznych jonów w kwaśnym środowisku lizosomów. Zjawisko to opisano jako efekt konia trojańskiego wzmacnionego przez lizosomy, ponieważ warunki panujące w lizosomach sprzyjają degradacji cząstek i modulują ich toksyczność [66]. Ponadto uważa się, że Au może oddziaływać z grupami fosforu w DNA, powodując śmierć komórki. Co więcej zgodnie z doniesieniami literaturowymi Au może również przyczyniać się do śmierci komórki poprzez oddziaływanie z grupami siarkowymi w białkach [67]. Jednakże przeprowadzone analizy nie wykazały istotnej utraty żywotności komórek BxPC-3 i HFFF-2, nawet przy najwyższym testowanym stężeniu 5 mg/l. Niemniej jednak, po podaniu nanocząstek metalicznych do AsPC-1 i HS-5, żywotność nieznacznie spadła, co sugeruje, że linia komórkowa AsPC-1 może być bardziej podatna na cytotoxisyczne działanie nanocząstek metalicznych. Według Abdolhosseina i wsp. Au ma toksyczny wpływ na komórki raka okrężnicy HT-29. We wspomnianym badaniu stężenie hamujące po 72-godzinnym okresie inkubacji oszacowano na poziomie 419,7 mg/l [68]. Co więcej, inne badanie wykazało, że zarówno Au, jak i Ag wykazują toksyczność wobec linii komórkowej raka okrężnicy HT-116, nawet po 24-godzinnym okresie inkubacji w stężeniach 100 i 200 mg/L [39]. Uwalnianie toksycznych jonów jest silnie zależne od czasu ekspozycji i pH. W ciągu pierwszych 24 godzin inkubacji w środowisku kwaśnym znacznie więcej jonów uwalnia się z nanocząstek Ag niż Au, podczas gdy środowisko obojętne nie sprzyja degradacji nanocząstek [66]. Podobnie jak w przypadku Ag i Au, po traktowaniu Pt nie zaobserwowano zmian morfologicznych we wszystkich badanych liniach komórkowych. Warto zauważyć, że istnieje wiele czynników leżących u podstaw toksyczności Ag i Au, które zależą od stężenia, czasu ekspozycji, środowiska i mechanizmu wnikania do komórek, ponieważ nanocząstki wychwycone na drodze innej niż endocytoza są mniej podatne na degradację co prowadzi do powstania toksycznych jonów [66]. Według Bendale i wsp. cytotoxisyczność Pt wobec komórek ssaczych silnie zależy od typu komórki [69]. Przeprowadzone analizy ujawniły, że podobnie jak inne testowane nanocząstki metaliczne, Pt wpływa jedynie na żywotność komórek AsPC-1 i HS-5, powodując spadek odpowiednio o 20% i 23% przy najwyższym testowanym

stężeniu. Wspomniane wcześniej badanie wykazało, że Pt może wpływać na linię komórkową raka trzustki Mia-Pa-Ca-2. W tym badaniu uzyskano znaczny spadek żywotności, po 48-godzinnym okresie inkubacji z nanocząsteczkami w stężeniu 200 mg/l. Jednak przeprowadzone analizy wskazują na nieznaczną toksyczność koloidalnych zawiesin Ag, Au i Pt wobec komórek BxPC-3 i HFFF-2. Jednakże wyniki testu MTT, które wykazały obniżoną żywotność komórek AsPC-1 po 24-godzinnym traktowaniu metalicznymi nanocząsteczkami w stężeniu 5 mg/l, sugerują, że zwiększenie stężenia nanocząsteczek i wydłużenie czasu inkubacji mogą przyczynić się do uzyskania lepszego działania przeciwnowotworowego w kierunku przerzutowego typu komórek raka trzustki. Co ciekawe, te same nanocząstki w tych samych stężeniach wpłynęły tylko na jedną z dwóch testowanych linii raka trzustki. Zjawisko to może być związane ze specyficzną reakcją na stres oksydacyjny wywołany przez  $H_2O_2$ , ponieważ linia komórkowa AsPC-1 charakteryzuje się obniżoną zdolnością do usuwania  $H_2O_2$  w porównaniu z nienowotworowymi komórkami, takimi jak: H6c7, ludzkimi fibroblastami, ludzkimi astrocytami, HBePC, krwinkami czerwonymi czy nawet HF574int [70], natomiast obecność  $H_2O_2$  w komórkach BxPC-3 sprzyja aktywacji procesu EMT [71]. Niemniej jednak potrzebne są dalsze badania, aby ocenić potencjał przeciwnowotworowy tych nanocząsteczek.

Nanomateriały węglowe cieszą się szerokim zainteresowaniem ze względu na swoją unikalną charakterystykę i szeroki zakres możliwych zastosowań.  $C_{60}(OH)_{40}$ , w przeciwieństwie do fulerenu, charakteryzuje się większą biodostępnością ze względu na większą zdolność do tworzenia stabilnych hydrokoloidów [72]. Przeprowadzone badania potwierdziły doniesienia o nietoksycznej charakterystyce  $C_{60}(OH)_{40}$  [73], gdyż nie zaobserwowano spadku aktywności metabolicznej po traktowaniu komórek linii BxPC-3, AsPC-1 i HFFF-2 nawet w najwyższym testowanym stężeniu. Jednakże, analizy przeprowadzone przez inne zespoły badawcze wskazują na zależność toksyczności fulerenolu od stężenia [74] i typu komórki [75]. Niższa żywotność komórek po traktowaniu  $C_{60}(OH)_{40}$  może być spowodowana wzmożonym formowaniem MN, co jest wynikiem nieudanego podziału chromosomalnego DNA w fazie M cyklu komórkowego [76]. Przeprowadzone analizy wykazały, że nanocząstki  $C_{60}(OH)_{40}$  mogą przenikać do cytoplazmy lub tworzyć klastry na powierzchni komórki. Zakładamy, że ze względu na specyficzny okrągły kształt tych nanomateriałów i ich zdolność do hamowania procesu

peroksydacji lipidów [77], mogą one przenikać do cytoplazmy bez uszkadzania błony komórkowej, co potwierdzają wyniki testu LDH.

Dodatkowym celem analizy była ocena właściwości cytotoksycznych GO wobec linii komórkowych raka trzustki. Nie jest do końca jasne, czy GO wykazuje właściwości cytotoksyczne. Niektóre badania sugerują, że zjawisko to silnie zależy od wielkości płatków nanomateriałów, ich stężenia i czasu ekspozycji [73]. Test aktywności metabolicznej wykazał, że w przypadku linii komórkowej HFFF-2 nie zaobserwowano efektu cytotoksycznego. Wyniki te są zgodne z wynikami Bengtsona i wsp., którzy wykazali, że GO nie wpływa na komórki nabłonka płuc myszy FE1 [78] nawet przy najwyższym testowanym stężeniu, 200 mg/l. Inny zespół badawczy potwierdził tę tezę, wykazując brak cytotoksycznego działania oczyszczonego GO na linię komórkową ludzkiego raka płuc A549 w dawkach do 100 mg/L [79]. Jednakże istnieje również wiele badań wykazujących cytotoksyczność GO. Linie komórkowe glejaka U118 i U87 wykazywały znacząco zmniejszoną żywotność po traktowaniu GO w stężeniu 100 mg/L [80]. Co więcej, ludzkie fibroblasty skóry (HDF) również wykazywały niższą żywotność po traktowaniu GO w dawkach większych niż 50 mg/l [81]. Podobnie ludzkie komórki śródblonka żyły pępowinowej (HUEVC) wykazały zależną od dawki odpowiedź na GO [82]. Przeprowadzone badania pokazały, że komórki BxPC-3, AsPC-1 i HS-5 wykazywały zmniejszoną żywotność po traktowaniu GO, nawet przy najniższym testowanym stężeniu 10 mg/l. Według Changa i wsp. GO może indukować stres oksydacyjny w sposób zależny od dawki [51]. Proces ten został uznany za jeden z możliwych mechanizmów leżących u podstaw cytotoksyczności nanomateriałów węglowych [52]. W liniach komórkowych AsPC-1, HFFF-2 i HS-5 nastąpił wzrost aktywności metabolicznej po wprowadzeniu GO w dawce 50 mg/l lub wyższej. Zjawisko to może wynikać z tworzenia się struktury podobnej do nanofilmu z płatków GO, które osadzają się na powierzchni naczynia hodowlanego wraz ze wzrostem stężenia nanomateriału, co może sprzyjać proliferacji komórek [83]. Innym możliwym mechanizmem toksyczności GO jest uszkodzenie błony. Niektóre badania sugerują, że płatki GO z dużym prawdopodobieństwem uszkadzają integralność błony komórkowej [84]. Przeprowadzone analizy nie potwierdziły jednak tezy o uszkodzeniu błony komórkowej, gdyż poziom LDH pozostał na podobnym poziomie jak w grupie kontrolnej. Jedynie linie komórkowe AsPC-1 i HFFF-2 wydawały się bardziej podatne na negatywny wpływ GO i wykazywały podwyższony poziom LDH w pożywce

hodowlanej w porównaniu z kontrolą, co skutkowało odpowiednio 3% i 8% cytotoksycznością. Aby lepiej zrozumieć, w jaki sposób GO wpływa na komórki raka trzustki, przeprowadzono analizę poziomu 40 cytokin prozapalnych. W obu liniach komórek nowotworowych odnotowano niższy poziom TIMP-2 i wewnętrzkomórkowej cząsteczki adhezyjnej ICAM-1. TIMP-2 jest inhibitorem metaloproteinazy macierzy biorącej udział w degradacji macierzy zewnętrzkomórkowej. Obniżenie jego poziomu może prowadzić do nasilenia migracji komórek nowotworowych i powstania wtórnego przerzutów. Ponieważ GO może indukować stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych, zasugerowano, że możliwe jest aktywowanie procesu EMT poprzez aktywację szlaku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ERK/NF-κB. Zjawisko to występuje w różnych liniach ludzkiego raka trzustki, na przykład w komórkach BxPC-3 lub Panc-1. W obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> komórki zyskują fenotyp mezenchymalny, który prowadzi do zwiększonej zdolności do inwazji i migracji [71]. Zmiany zachodzące w komórce nowotworowej sprawiają, że jest ona mniej podatna na anoikis [85] i stosowane chemioterapeutyki [86]. Ponadto traktowanie linii komórkowej BxPC-3 GO spowodowało zmniejszenie poziomu białek: interleukiny 1a (IL-1a; ang. interleukin 1a) i interleukiny 8 (IL-8; ang. interleukin 8). Obie interleukiny biorą udział w pozytywnej regulacji angiogenezy. Wyniki te sugerują, że GO może hamować tworzenie nowych naczyń krwionośnych w mikrosrodowisku guza nowotworowego.

Ponieważ ND wykazuje unikalne właściwości przeciwnowotworowe takie jak zdolność do penetracji i akumulacji w tkance neoplastycznej [56] czy też zdolność do uwrażliwiania komórek nowotworowych na chemioterapeutyki [87], w trakcie realizacji badań oceniono jego właściwości cytotoksyczne wobec wybranych linii raka trzustki. Wpływ ND na różne typy komórek jest nadal przedmiotem intensywnych badań. Nanocząstki te uznaje się nawet za nanomateriał możliwy do zastosowania jako nośniki leków, ponieważ charakteryzują się wysokim wychwytem komórkowym i niską cytotoksycznością [88,89]. Jednakże przeprowadzone analizy wykazały, że ND wywołuje efekt cytotoksyczny wobec wszystkich badanych linii komórek nowotworowych i nienowotworowych. Zaobserwowano, że toksyczność ND zależy nie tylko od stężenia i czasu ekspozycji, ale także od typu komórek [90]. Nasze badania wskazują na to, że komórki BxPC-3 są najbardziej podatne na ND ze wszystkich testowanych linii komórkowych, na co wskazuje zależny od dawki spadek żywotności. Zaobserwowano prawie 30% utratę żywotności, nawet przy najniższym badanym

stężeniu (10 mg/l). ND wywiera także działanie cytotoksyczne na drugą badaną linię komórkową raka trzustki, AsPC-1, również powodując dawkozależny spadek żywotności. Dane uzyskane w niniejszym badaniu są zgodne z wynikami uzyskanymi przez inne grupy badawcze dotyczącymi cytotoksyczności ND [90, 91].

Kolejnym czynnikiem wpływającym na cytotoksyczność nanomaterialów jest ich wielkość. Wielkość nanocząstek stosowanych w przedstawionym badaniu mieściła się w zakresie od 3 do 4 nm. Uznaje się, że mniejsze nanocząstki mogą wywołać lepszy efekt toksyczny. Według Dworak i wsp. najlepszy efekt można uzyskać stosując ND o średnicy poniżej 1 nm [90]. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi ND, nawet w nietoksycznych stężeniach, ma właściwości genotoksyczne i może przyczyniać się do oksydacyjnego uszkodzenia DNA i tworzenia MN. Ponieważ stres oksydacyjny jest jednym z możliwych mechanizmów cytotoksycznych ND, zbadano poziom ROS. Co ciekawe, analiza ta ujawniła, że traktowanie ND linii komórkowej BxPC-3, która była bardziej podatna na ND, powodowało wyższy poziom indukcji ROS w porównaniu z komórkami AsPC-1. Co więcej, dane uzyskane z testu aktywności metabolicznej są zgodne z danymi uzyskanymi z analizy poziomu ROS. Dane te mogą wskazywać na potencjalny udział ROS w mechanizmie cytotoksyczności ND. Ponadto uzyskane wyniki dotyczące stresu oksydacyjnego są zgodne z ustaleniami innych zespołów badawczych, które wykazały, że traktowanie ND powoduje podwyższony poziom ROS w takich liniach komórkowych jak: A549, HaCaT i HeLa [93, 94]. Możliwym jest, że zaobserwowany efekt toksyczny był bardziej widoczny w linii komórkowej BxPC-3 niż w AsPC-1, ponieważ komórki BxPC-3 częściej dzieliły się w warunkach eksperymentalnych. Co więcej, sugeruje się, że występowanie zjawiska wytwarzania ROS stymulowanej przez ND może być specyficzne dla linii komórkowej [93], co również wyjaśniałoby wyższą czułość komórek BxPC-3.

Aby ocenić, czy ND uszkadza błony komórkowe obu linii przeprowadzono pomiar wycieku LDH. W przypadku bardziej wrażliwej linii komórkowej (BxPC-3) zaobserwowano większy wyciek LDH niż w linii komórkowej AsPC-1. Co ciekawe, w przypadku nienowotworowych linii komórkowych (HFFF-2 i HS-5) największy wyciek LDH zaobserwowano przy stężeniu 50 mg/l. Powszechnie wiadomo, że ND może adsorbować białka na swojej powierzchni [92]. Ponadto obie linie komórkowe charakteryzują się ekspresją genów kodujących mucyny, które pełnią rolę ochronną. Zasugerowano, aby różne profile mucyn odpowiadające różnym cechom komórek

(zdolność do przerzutowania lub jej brak) mogły być powiązane ze zwiększoną wrażliwością komórek BxPC-3 na uszkodzenie ND. Jednak, aby potwierdzić to stwierdzenie, potrzebnych jest więcej analiz.

Analizy przeprowadzone z zastosowaniem membran antygenowych wykazały, że w odpowiedzi na traktowanie ND w stężeniu 50 mg/l komórki BxPC-3 oraz AsPC-1 zmieniały profil ekspresji cytokin prozapalnych w stosunku do nientraktowanej kontroli. W linii komórkowej BxPC-3 zaobserwowano wyższy poziom IL-8, która może działać jako pozytywny regulator angiogenezy. IL-8 po raz pierwszy oczyszczono jako czynnik chemiczny dla neutrofili. Jednak późniejsze badania wykazały, że IL-8 w warunkach *in vitro* wykazuje wielokierunkowe działanie na neutrofile, w tym indukcję zmiany kształtu, uwalnianie enzymów lizosomalnych, wytwarzanie ponadtlenku i nadtlenku wodoru oraz zwiększa ekspresję cząsteczek adhezyjnych na neutrofilach [95]. Dodatkowo zaobserwowano niższy poziom tkankowego inhibitora metaloproteinaz 2 (TIMP-2; ang. tissue inhibitor of metalloproteinases), i niższy poziom aktywności wewnętrzkomórkowej cząsteczki adhezyjnej 1 (ICAM-1; ang. intracellular adhesion molecule 1), która może również zwiększać przepuszczalność naczyń krwionośnych. Natomiast w komórkach linii AsPC-1, poza nieco wyższym poziomem IL-8 i spadkiem poziomu TIMP-2, zaobserwowano niższy poziom czynnika martwicy nowotworu- $\beta$  (TNF- $\beta$ ; ang. tumor necrosis factor –  $\beta$ ) nazywanego również limfotoksyną. Oddziaływa on z receptorem LT $\beta$ R. Badania pokazują, że cytokina ta jest zaangażowana w ścieżkę sygnalną prowadzącą do rozwoju nowotworu [96]. Badania prowadzone na modelu mysim wykazały, że chroniczna nadekspresja limfotoksyny prowadziła do rozwoju nowotworu wątroby [97]. Inny zespół wykazał udział tej cytokiny w rozwoju komórek nowotworu prostaty niezależnego od androgenów [98]. Mediatory stanu zapalnego obecne w mikrosrodowisku guza nowotworowego promują przebudowę tkanki, angiogenezę, wzrost tkanki neoplastycznej oraz tłumią odporność adaptacyjną. Przewlekły stan zapalny wywołany podwyższonym poziomem cytokin prozapalnych może sprzyjać progresji nowotworu [96]. Spadek poziomu cytokin prozapalnych zaobserwowany po traktowaniu ND i GO komórek nowotworu trzustki: AsPC-1 oraz BxPC-3 potencjalnie może być związany z korzystnymi dla terapii efektami.

7.2 Analiza wpływu bodźców mechanicznych oraz chemicznych, których źródłem były nanofilmy utworzone z nanomateriałów węglowych (GN, GO, C60 oraz ND) na aktywność proliferacyjną oraz adhezję komórek raka piersi MDA.MB.231 oraz glejaka

IV stopnia U-87 MG przy zastosowaniu hodowli *in vitro* w monowarstwie oraz biodrukowanego modelu 3D.

Celem badania była ocena czy nanomateriały węglowe, takie jak GN, GO, C60 i ND, mogą służyć jako potencjalne składniki ECM, który może wywierać wpływ na potencjał onkogenny komórek nowotworowych zmniejszając go, szczególnie poprzez zmniejszenie tempa proliferacji komórek nowotworowych oraz intensyfikację adhezji do ECM. Nanomateriały możliwe do zastosowania w leczeniu nowotworów powinny charakteryzować się biokompatybilnością. Aby ocenić cytotoxiczność nanofilmów utworzonych z GN, GO, C60 i ND przeprowadzono analizę integralności błony komórkowej. Analiza ta wykazała, że nanomateriały użyte w eksperymencie nie uszkadzają błony komórek MDA.MB.231. Jednakże nanofilm GN i ND wykazywały niską toksyczność wobec komórek U-87 MG. Obrazowanie nanomateriałów za pomocą techniki TEM potwierdziły, że GN ma postać płatków. Wysuszony nanofilm GN charakteryzował się chropowatą powierzchnią, co wykazały analizy SEM i AFM. Zdjęcia morfologii komórek wykazały, że komórki U-87 MG były większe niż komórki MDA.MB.231 i tworzyły skupiska. Połączenie tych czynników mogło przyczynić się do większego wycieku LDH z komórek U-87 MG, co wskazuje na uszkodzenie błony komórkowej. Wyniki te są zgodne z tezą Akhavana i Ghaderiego [99]. Zgodnie z doniesieniami literackimi jeden z proponowanych mechanizmów toksyczności GN zakłada uszkodzenie błony komórkowej w wyniku fizycznych interakcji z nanomateriałem [100]. Hydrofobowy charakter powierzchni GN umożliwia jego interakcje z lipidami błony komórkowej [52], co również może przyczyniać się do umiarkowanej toksyczności nanofilmu GN wobec komórek U-87 MG. Nanofilm utworzony z ND również powodował umiarkowaną toksyczność wobec linii komórkowej glejaka IV stopnia. Jak pokazano na zdjęciach obrazujących morfologię komórek, fragmenty ND częściowo oddzielały się od nanofilmu i były zinternalizowane przez komórki lub tworzyły skupiska na ich powierzchni. Na przyczepność nanofilmu ND mogą wpływać następujące czynniki: tworzenie się fazy innej niż diament, powstawanie pustych przestrzeni podczas procesu suszenia oraz różnice między współczynnikiem rozszerzalności cieplnej nanofilmu ND a otaczającymi go fazami [101]. Analizy wykonane w doświadczeniu I wykazały, że ND w postaci hydrokoloidu narusza integralność błony komórkowej w ustalonych liniach glejaka IV stopnia T98G i U-118 MG [102]. Co ciekawe, zarówno nanofilm GN, jak i ND nie miały wpływu na

integralność plazmalemmy komórek MDA.MB.231. Nanofilmy ND to cienkie warstwy amorficznego węgla połączonych wiązaniem o hybrydyzacji  $sp^2$  związanego z fazami krystalicznymi węgla wiązaniem o hybrydyzacji  $sp^3$ . Charakterystyka nanofilmu ND jest podobna do charakterystyki diamentu w makroskali [103]. Według literatury biokompatybilność nanofilmu ND zależy od struktury wiązań i zawartości wodoru. Biokompatybilność zależy także od linii komórkowej [102]. Nanofilm ND jest jednak uznawany za cytokompatybilny nanomateriał [104], co wykazała analiza przeprowadzona na komórkach MDA.MB.231. Uzyskane wyniki były zgodne z analizą przeprowadzoną na biodrukowanym modelu 3D, gdzie nie zaobserwowano toksyczności po traktowaniu ND komórek MDA.MB.231.

Pożądany efektem związanym z zastosowaniem analizowanych nanofilmów węglowych było zahamowanie tempa proliferacji komórek nowotworowych. Analiza proliferacji wykazała, że nanofilmy GN i ND znaczco hamują proliferację komórek MDA.MB.231 po 48 godzinach. Efekt ten utrzymywał się również po 72 godzinach. Tą samą tendencję zaobserwowano w przypadku komórek U-87 MG. Jednakże po 72 godzinach nie zaobserwowano żadnych znaczących zmian. Badania przeprowadzone na linii komórkowej raka wątrobowokomórkowego C3A wykazały, że cienka warstwa nanofilmu ND zmniejsza ilość białek odpowiedzialnych za proliferację komórek, co prowadzi do zmniejszenia populacji komórek nowotworowych w fazie G0/G1 cyklu komórkowego [60]. Bodźce mechanochemiczne, których źródłem jest nanofilm utworzony z ND, zaburzają ekspresję specyficznych białek związanych z mitozą i proliferacją, co może przyczyniać się do zahamowania proliferacji komórek MDA.MB.231.

Kolejną cechą, którą powinien charakteryzować się nanomateriał odpowiedni do tworzenia niszy stabilizującej ECM po resekcji guza, jest jego proadhezyjny charakter, w związku z tym przeprowadzono analizę adhezji. Analiza wykazała, że nanofilm ND zwiększa adhezję komórek MDA.MD.231 w ciągu pierwszych 30 minut po dodaniu komórek. Otrzymane wyniki są zgodne z tymi uzyskanymi przez Guo i wsp. [105]. Badania przeprowadzone na komórkach Hela wykazały, że ND może zwiększać adhezję komórek, hamując w ten sposób ich migrację poprzez upośledzenie przebudowy cytoszkieletu komórkowego. Innym możliwym mechanizmem leżącym u podstaw tego zjawiska jest zaburzenie szlaku sygnalnego aktywującego proces EMT poprzez zmniejszenie poziomu transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (ang. transforming growth

factor  $\beta$ ; TGF- $\beta$ ) spowodowanego przez ND [105]. Inne badanie dotyczące adhezji osteoblastów do powłok pokrytych nanofilmem utworzonym z ND również wykazało, że nanokrystaliczna warstwa ND może sprzyjać adhezji [106]. Ponieważ adhezja komórek nowotworowych odgrywa istotną rolę w progresji nowotworu [107], zbadano również adhezję komórek do poszczególnych składników ECM pokrytych ND. Analiza wykazała, że pokrycie komponentów ECM ND zwiększa adhezję komórek raka piersi i glejaka IV stopnia do tenascyny i witronektyny. W przypadku komórek U-87 MG zaobserwowano także zwiększoną adhezję do kolagenu I i IV. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi liczne izoformy tenascyny powstają w wyniku alternatywnego splicingu dziewięciu regionów fibronektyny typu III. Różne izoformy splicingowe charakteryzują się specyficznymi funkcjami biologicznymi [108]. Najczęściej występujące tenascyny w mikrośrodowisku nowotworu piersi to te zawierające domeny D i B, które są związane z fenotypem inwazyjnym [109]. Tenascyna ulega również nadekspresji w ECM inwazyjnego fenotypu glejaka IV stopnia [110]. Omawiana składowa ECM może bezpośrednio oddziaływać z różnymi receptorami biorącymi udział w procesie adhezji, wpływając w ten sposób na ich funkcje [111]. Obecność tego białka w ECM może hamować adhezję ogniskową oraz sprzyjać migracji komórek i angiogenezie [112]. Jedna z pierwszych obserwacji dotyczącej tenascyny wykazała, osłabioną adhezję do składnika ECM, co z kolei prowadziło do wyższego tempa proliferacji [113]. Jednak przeprowadzone analizy wykazały, że dodatek ND może osłabiać aktywność tenascyny, zwiększając adhezję, a tym samym hamując proliferację komórek MDA.MB.231. Kolejnym ważnym białkiem obecnym w mikrośrodowisku nowotworu jest witronektyna. Dodatek ND zwiększył adhezję zarówno komórek MDA.MB.231, jak i U-87 MG do tego białka. Interakcja między witronektyną i integrynami może aktywować szlaki sygnalne regulujące reorganizację cytoszkieletu, metabolizm lipidów, wewnętrzkomórkowy transport jonów i ekspresję genów [114]. Co więcej, analiza wykonana na komórkach glejaka IV stopnia U-87 MG wykazała zwiększoną adhezję do kolagenu I i IV pokrytych ND. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi kolagen I ma dwie domeny: domenę interakcji z macierzą i domenę interakcji z komórkami [115]. Pierwsza z nich osłabia właściwości strukturalne włókienek kolagenowych. Domena ta posiada miejsca wiązania proteoglikanów, takich jak siarczan dermatanu czy siarczan keratyny. Natomiast druga odpowiada za przekazywanie sygnału i przebudowę ECM. Domena ta ma miejsca wiązania dla metaloproteinaz macierzy, integryn, receptorów domeny dyskoidyny i białek macierzy [116]. Kolagen typu IV pośredniczy w procesie prowadzącym do

tworzenia fibryli kolagenowych. Domeny te są głównymi składnikami błony podstawowej [116]. Zwiększoną adhezja do tych składników może prawdopodobnie doprowadzić do przebudowy uszkodzonego ECM po resekcji guza.

7.3 Ocena wpływu parametrów takich jak: rozmiar, metoda produkcji (laserowa, detonacyjna) oraz obecność różnych grup funkcyjnych na powierzchni nanocząstki ND na ich toksyczność względem ustalonych linii nowotworowych: glejaka IV stopnia (U-118 MG, T98G), nowotwu piersi (MCF-7), nowotwu wątroby (Hep G2) oraz nienowotworowej linii ludzkich fibroblastów (HFF-1). (Publikacja 3: Wójcik *et al.*, 2023)

Ze względu na słabą farmakokinetykę i występowanie lekooporności, obecnie dostępne strategie terapeutyczne w leczeniu nowotworów wymagają udoskonalenia i optymalizacji. Ze względu na możliwe liczne zastosowania biomedyczne ND, pojawiła się pilna potrzeba oceny ich toksyczności. Analiza morfologiczna ujawniła, że wszystkie ND tworzyły skupiska na powierzchni komórek T98G, U-188 MG, MCF-7, HepG2 i HFF-1 lub zostały zinternalizowane przez komórki. Wyniki te są zgodne z badaniem, w którym wykazano wychwyt komórkowy ND przez komórki HeLa przy użyciu obrazowania TEM i techniki ilościowego znakowania radioaktywnego [117]. Za główny mechanizm pobierania ND przez komórki uważa się endocytozę klatrynozależną [118]. Wychwyt ND ma kluczowe znaczenie dlainicjalizacji interakcji nanomateriału z komórką, czyli procesu determinującego los ND w komórce. Wydaje się, że cechy morfologiczne ND mogą wpływać na etap internalizacji endocytozy, a tym samym na szybkość pobierania nanomateriałów. Absorpcja może być powiązana z powierzchnią styku i lokalną ostrością w punkcie interakcji. Chociaż ND o ostrych krawędziach nie ma trudności z zakotwiczeniem w błonie komórkowej, jego internalizacja trwa dłużej niż w przypadku nanocząstek ND o gładzych krawędziach [119]. Cytotoksyczność i biokompatybilność ND zależą od szeregu czynników takich jak: metoda produkcji, wielkość, obecność grup funkcyjnych na powierzchni nanocząstki oraz od typu traktowanych komórek. Z tego powodu przeprowadzono badania żywotności i integralności błony komórkowej przy użyciu 13 rodzajów ND (ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN), 4 nowotworowych linii komórkowych (T98G, U-118 MG, MCF-7, Hep G2) oraz 1 linii komórek nienowotworowych (HFF-1). Wiele badań pokazuje, że ND bez funkcjonalizacji powierzchni jest cytokompatybilny lub

wywołuje słaby efekt toksyczny [91,120]. To stwierdzenie jest zgodne z wynikami uzyskanymi w testach żywotności. Przeprowadzone analizy wykazały, że prawie wszystkie ND produkowane metodą detonacyjną nie wykazywały cytotoxisyczności wobec linii komórek raka piersi MCF-7, linii komórek raka wątrobowokomórkowego Hep G2 i linii komórek fibroblastów HFF-1. Co więcej po zastosowaniu ND produkowanych metodą detonacyjną w niektórych przypadkach zaobserwowano wzrost aktywności metabolicznej komórek. Niektóre badania sugerują również, że ND charakteryzują się zdolnością do usprawniania proces gojenia się ran [121, 122]. Jednak badanie Mytycha i in. wskazują dwufazową krzywą dawka-odpowiedź ludzkich, nienowotworowych, diploidalnych fibroblastów skóry twarzy [122]. Analiza przeprowadzona przez badaczy wykazała, że ND o średniej wielkości poniżej 10 nm traci właściwości lecznicze i powoduje cytotoxisyczność już w stężeniu 50 mg/l i wyższym. Jednakże nasze badania przeprowadzone na linii komórkowej fibroblastów napletka HFF-1 nie potwierdziły tego stwierdzenia, gdyż niezależnie od metody produkcji, wielkości czy obecności grup funkcyjnych komórki charakteryzowały się wyższą niż 100% aktywnością metaboliczną (na podstawie, której można wnioskować o żywotności) przy stężeniu 100 mg/l. Tylko dwa rodzaje ND spowodowały nieznaczny spadek żywotności: ND-B produkowany metodą detonacyjną o średniej wielkości 10-20 nm w stężeniu 5 mg/l i syntetyzowany laserowo RayND o średniej wielkości 4-5 nm w stężeniu wynoszący 20 mg/l. Efektu cytotoxisycznego obserwowanego w wyższych stężeniach nanomateriałów nie można powiązać z liczbą nanocząstek, które są w stanie przedostać się do wnętrza komórki, co jest bezpośrednio określone przez ich stężenie i czas ekspozycji [123]. Wyższe stężenia nanomateriałów mogą zwiększać ich agregację. Wraz ze wzrostem średniej średnicy aglomeratów może zostać utrudniony proces pobierania nanocząstek przez komórkę, co może prowadzić do zmniejszenia toksyczności [124].

Analiza funkcjonalizowanych nanomateriałów (ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH i ND-OH), w przeciwieństwie do ND-nf (wielkość 2-10 nm), wykazała, że obecność grup funkcyjnych wpłynęła na wywołanie efektu cytotoxisycznego wobec linii komórkowych glejaka IV stopnia T98G i U-118 MG. Takie same wyniki uzyskali Ray i in. w badaniach na komórkach neuronalnych SK-N-MC (rozmiar ND 3-6 nm) [125]. Natomiast Wierzbicki i in. wykazali, że ND (wielkość 2-7 nm) wywołuje efekt cytotoxisyczny wobec komórek U-118 i U87 w stężeniu 100 mg/l i wyższym [126]. Co ciekawe, oba badania

wskazują, że wyższe dawki ND nie nasilają efektu cytotoksycznego. Zjawisko to można powiązać z wrażliwością komórek neuronowych na ROS generowane przez nanomateriały [125]. Nasze badanie ujawniło, że cytotoksyczność zależna od dawki jest wywoływana wyłącznie przez ND-OH, RayND-AL, RT-DND-EN i RT-DND-LN po traktowaniu komórek T98G oraz RT-DND i RT-DND-EN po traktowaniu komórek U-118 MG. Najwyższy efekt cytotoksyczny wobec T98G zaobserwowano po traktowaniu syntetyzowanymi laserowo RayND i RayND-AL (25% spadek żywotności). Wynik ten wskazuje, że metoda produkcji może mieć potencjalny wpływ na cytotoksyczność ND [127]. Jednak największy spadek żywotności w przypadku linii U-118 MG zaobserwowano po podaniu RT-DND w stężeniu 100 mg/l (spadek o 38%). Nanomateriał ten nie był funkcjonalizowany, a średnia wielkość cząstek mieściła się w zakresie od 3,5 do 6 nm. W tym badaniu wykorzystano trzy inne ND produkowane metodą detonacyjną, które nie były funkcjonalizowane: ND-nf (rozmiar 2–10 nm), ND-B (rozmiar 10–20 nm) i ND-S (rozmiar 3–4 nm). Przeprowadzone analizy wykazały, że oprócz RT-DND, jedynie ND-B wywołał cytotoksyczność (28% spadek żywotności przy stężeniu 50 mg/l). Ponieważ ND-B i ND-S zostały zakupione od tej samej firmy i różniły się jedynie wielkością, jest wysoce prawdopodobne, że większe ND mogą być bardziej toksyczne dla komórek U-118 MG.

Analiza TEM uwidoczniała, że zastosowane w badaniach ND miały postać krystaliczną. Uważa się, że takie nanomateriały mogą łatwo uszkodzić błonę komórkową. Nanomateriały napędzane siłami powierzchniowymi i wewnętrzczasteczkowymi przylegają do błony komórkowej, co może skutkować lokalnym odkształceniem, restrukturyzacją lipidów i utworzeniem domen. Ponadto procesy te mogą prowadzić do powstania porów, a także biernej translokacji nanomateriału na skutek inwazji lub ekstrakcji lipidów z membrany [128]. Aby przeanalizować wpływ nanomateriałów na integralność plazmalemmy wykonano test integralności błony komórkowej. Uzyskane wyniki były zgodne z wynikami uzyskanymi w teście żywotności. Traktowanie ND nie zmieniło poziomu wycieku LDH w komórkach Hep G2. Wyniki zarówno testu integralności błony, jak i testu żywotności są zgodne z ustaleniami Pageta i in. Zespół badawczy udowodnił cytokompatybilność ND o różnych średnicach na sześciu ludzkich liniach komórkowych: HepG2, Caki-1, Hek-293, HT29 i A549 [129].

Chociaż nie zaobserwowano spadku żywotności komórek MCF-7, to następujące nanomateriały powodowały zwiększyony wyciek LDH: ND-nf (50 mg/l), ND-OH

(50 mg/l), ND-B (100 mg/l) oraz RT-DND-EN (100 mg/l), co może wskazywać na uszkodzenie błony komórkowej. Wszystkie wymienione nanomateriały wytworzono metodą detonacyjną. ND syntetyzowane laserowo nie wpłynęły na integralność błony komórkowej. ND-S w odróżnieniu od ND-B nie powodował zwiększonego wycieku LDH, chociaż mówi się, że cytotoxiczność ND zależy od wielkości ND, przy czym mniejsze nanomateriały generują silniejszy efekt [90]. Sugerowano jednak również, że mniejsze nanocząstki są w stanie przeniknąć przez najmniejsze pory, takie jak te obecne w błonie jądrowej [130]. Z tego powodu ND-S może nie wpływać na integralność błony komórkowej.

Większość badanych nanomateriałów nie miała wpływu na integralność błony komórkowej komórek HFF-1. Jednakże następujące ND powodowały zwiększyony wyciek LDH: ND-nf (5 i 100 mg/l), ND-B (wszystkie badane stężenia), ND-S (5 mg/l) i RayND-AL (100 mg/l). Co ciekawe, syntetyzowany laserowo RayND, który powodował obniżoną żywotność komórek HFF-1, nie uszkadzał błony komórkowej. Zjawisko to można powiązać ze złożonym mechanizmem cytotoxiczności ND [91]. Nanomateriały mogą być skutecznie zinternalizowane przez komórki bez uszkadzania błony komórkowej, a mimo to powodują uszkodzenia DNA i formowanie MN [92]. Nanomateriały węglowe mogą także wywoływać stres oksydacyjny i powstawanie ponadtlenku mitochondrialnego. Zmiany potencjału zeta i średnicy hydrodynamicznej mogą wskazywać, że ND są zdolne do adsorbowania białek surowicy na swojej powierzchni. Korona białkowa może wpływać na cytotoxiczność badanych nanomateriałów [131]. Chociaż ND charakteryzujące się dodatnim potencjałem zeta (takie jak RayND) może zmniejszać żywotność komórek, ND z ujemnym potencjałem zeta (takie jak RayND-AL) może silniej wpływać na komórki [132] ze względu na większą zdolność do adsorpcji białek na swojej powierzchni [93].

Co ciekawe, wszystkie testowane nanomateriały wpływały na integralność błon komórkowych T98G i U-118 MG, powodując zwiększyony wyciek LDH. Co więcej, traktowanie ND miało również wpływ na aktywność metaboliczną komórek. Może to wskazywać na większą wrażliwość linii komórkowych glejaka VI stopnia na ND. Wyniki uzyskane w trakcie eksperymentu są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Hinzmana i in., gdzie autorzy wykazali niewielki spadek żywotności komórek glejaka U87 po traktowaniu ND syntetyzowanym metodą detonacyjną [133]. Najlepszy efekt cytotoxiczny na komórki T98G zaobserwowano po traktowaniu syntetyzowanymi

laserowo RayND w stężeniu 100 mg/l (35% cytotoxisyczności) oraz ND wytwarzanym techniką detonacyjną RT-DND-LN w stężeniu 50 i 100 mg/l (odpowiednio 35% i 36% cytotoxisyczności). Ponadto największą cytotoxisyczność w komórkach U-118 MG zaobserwowano po wprowadzeniu syntetyzowanego laserowo RayND-AL w stężeniu 100 mg/l (cytotoxisyczność 21%) i produkowanego metodą detonacyjną RT-DND w stężeniu 50 mg/l (24% cytotoxisyczność). Wyniki te mogą wskazywać, na to że metoda produkcji nie miała wpływu na cytotoxisyczność ND. Badania Vaikuviene i in. przeprowadzone na komórkach neuronalnych nie wykazały potencjału cytotoxisznego ND o średniej średnicy 35 nm [134]. Natomiast w przeprowadzonych badaniach wykazano, że zastosowane nanomateriały wpływają na integralność błony komórkowej mimo, że miały średnicę mniejszą niż 35 nm . Zjawisko to może wskazywać, że w przypadku cytotoxisyczności względem komórek glejaka, wielkość ND może odgrywać kluczową rolę. Natomiast po potraktowaniu komórek T98G ND-B i ND-S w najwyższym badanym stężeniu (100 mg/l), ND-B (wielkość 10-20 nm) powodowała 25% cytotoxisyczność, a ND-S (wielkość 3-4 nm) cytotoxisyczność wynosiła jedynie 17%, natomiast w przypadku komórek U-118 MG uzyskano podobne wartości dla obu nanomateriałów. Po zastosowaniu ND-B w stężeniu 100 mg/l cytotoxisyczność oceniono na poziomie 8%. Traktowanie ND-S w stężeniu 20 i 50 mg/l spowodowało 9% cytotoxisyczność dla obu stężeń.

Analiza poziomu reaktywnych form tlenu i ponadtlenku mitochondrialnego wykazała, że wszystkie badane ND mają zdolność obniżania obu parametrów w liniach komórkowych ludzkiego gruczołakoraka piersi MCF-7, ludzkiego raka wątrobowokomórkowego Hep G2 i ludzkich fibroblastu napłetka HFF-1. Co więcej, wszystkie wspomniane linie komórkowe wykazywały wyższą aktywność metaboliczną po traktowaniu ND. Według Chena i in. zjawisko to można powiązać z faktem, że ND wykazują aktywność mimetyczną oksydazy, katalazy i peroksydazy, która silnie zależy od wartości pH [135]. Różne wartości pH w kompartmentach komórek nowotworowych, takich jak płyny pozakomórkowe (pH~6,5), endosomy (pH~5-6) czy lisosomy (pH~4-5) [136], mogą wyzwalać przeciutleniającą aktywność. Ponieważ bezpośrednia interakcja nanocząstek z błoną komórkową może prowadzić do uszkodzeń wywołanych stresem oksydacyjnym [137], działanie przeciutleniające ND może mieć pozytywny wpływ na przeżywalność komórek. Wydaje się, że jedynie obecność grupy -NH<sub>2</sub> na powierzchni ND nie zwiększała poziomu ROS w linii komórkowej Hep G2. Podobnie, nie

zaobserwowano znaczących zmian w poziomie mitochondrialnego ponadtlenku w komórkach Hep G2 po traktowaniu ND-NH<sub>2</sub> i ND-nf. Natomiast RayND-AL syntetyzowany laserowo i syntetyzowane metodą detonacją RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L i RT-DND-LN doprowadziły do większego spadku ROS. Warto zauważyć, że oprócz RayND-AL, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L i RT-DND-LN, również ND-B prowadziły do obniżenia poziomu ponadtlenku mitochondrialnego, który jest jednym z najważniejszych źródeł ROS [138]. Jednakże nie zaobserwowano żadnych znaczących zmian w aktywności metabolicznej komórek po traktowaniu zarówno ND-S, jak i ND-B.

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi ND (średnica 3-4 nm, czystość >95%) nie wpływała na poziom ROS w komórkach MCF-7 [139]. Jednak przeprowadzone analizy uwidocznili, że komórki MCF-7 wykazywały niższy poziom ROS po traktowaniu ND. Choć wszystkie nanomateriały znaczaco obniżały mierzony parametr, warto zaznaczyć, że najwyższy poziom ROS zaobserwowano po traktowaniu ND-NH<sub>2</sub>, podobnie jak w przypadku komórek Hep G2, co może wskazywać, na to że ND funkcjonalizowane grupami -NH<sub>2</sub> mają najsłabsze właściwości przeciutleniające. Chociaż nie było znaczących różnic w zmniejszaniu ogólnego poziomu ROS pomiędzy ND-B i ND-S, ND-B wykazywał większą zdolność do obniżenia poziomu ponadtlenku mitochondrialnego. Badania przeprowadzone na drożdżach również wykazały brak cytotoksyczności i zmniejszenie stresu oksydacyjnego po traktowaniu karboksylowanymi ND [140].

Co ciekawe, nienowotworowe komórki HFF-1 również wykazywały wyższą aktywność metaboliczną i niższy poziom ROS po traktowaniu ND. Podobnie jak we wcześniej omawianych modelach badawczych, ND-NH<sub>2</sub> wykazywał najsłabsze działanie przeciutleniające, ale tylko jeśli chodzi o ogólny poziom ROS. W przypadku ponadtlenku mitochondrialnego najsłabsze właściwości antyoksydacyjne wykazywały ND, RT-DND-EN, RT-DND-A i RT-DND-LN. Ponadto największą aktywność antyoksydacyjną (redukcję ogólnego stresu oksydacyjnego) wykazywały ND-B, ND-S, Ray-ND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-A, RT-DND-EN, RT-DND-L i RT-DND-LN. To działanie w komórkach wydaje się korzystne, gdyż ROS biorą udział w procesach starzenia [138]. ROS odgrywają podwójną rolę w komórkach nienowotworowych; pełnią funkcję wtórnego przekaźników, ale gdy ich poziom jest niezrównoważony, mogą prowadzić do śmierci komórki, powodując uszkodzenie DNA,

białek i lipidów [141]. Wydaje się, że niezależnie od wielkości, metody produkcji i składu chemicznego powierzchni, ND są cytokompatybilne dla komórek HFF-1. Mogą także wykazywać korzystne właściwości poprzez zmniejszenie ogólnego poziomu stresu oksydacyjnego i poziomu ponadtlenku mitochondrialnego, zwiększając w ten sposób aktywność metaboliczną komórek. Według ostatnich doniesień wytwarzanie ROS w glejaku ma związek z lekoopornością. Co więcej, ponieważ ROS wpływają na cykl komórkowy, odgrywają również rolę w progresji nowotworu. Jednakże wzmożona produkcja ROS prowadzi do indukcji apoptozy lub autofagii [7]. Traktowanie glejaka IV stopnia U-118 MG i komórek T98G ND spowodowało wyższy poziom ROS i ponadtlenku mitochondrialnego. Te dwie linie komórkowe były podatne na cytotoksyczne działanie ND, co potwierdziły wszystkie przeprowadzone analizy. RT-DND i RT-DND-EN zwiększyły produkcję mitochondrialnego ponadtlenku. Ponadto po wprowadzeniu ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH i ND-B do płynu hodowanego komórek U-118 MG nie zaobserwowano istotnego wzrostu ogólnego poziomu ROS. Jednakże ND-nf i ND-NH<sub>2</sub> zwiększały poziom ponadtlenku mitochondrialnego. Co ciekawe, w komórkach U-118 MG indukowana przez ND produkcja ROS zależała od wielkości cząstek, ponieważ mniejsze cząstki ND-S powodowały zarówno wyższy poziom ogólnych ROS, jak i wyższy poziom ponadtlenku mitochondrialnego. Traktowanie ND spowodowało także podwyższony poziom ROS w komórkach HeLa [94], komórkach śródblonka [142] oraz limfocytach [90]. Uważa się również, że indukcja wytwarzania ROS przez ND może być komórkowo specyficzna [93], co potwierdzałoby nasze ustalenia. Ponadto w linii komórkowej U-118 MG, w odróżnieniu od linii komórkowej T98G, poziom ogólnego stresu oksydacyjnego zależał także od metody produkcji. Przeprowadzone badania wykazały, że nanomateriały wytworzone techniką detonacyjną RT-DND-EN i RT-DND-LN, wykazywały największą indukcję wytwarzania ROS. Co więcej, traktowanie RT-DND-L spowodowało również najwyższy wzrost poziomu ponadtlenku mitochondrialnego (422% kontroli).

## 8. Podsumowanie

Wyniki uzyskane z doświadczenia I wskazują, że w przypadku ustalonych linii nowotworowych gruczolakoraka trzustki AsPC-1 i BxPC-3 opornych na gemcyabinę lepszy efekt cytotoksyczny można uzyskać stosując nanomateriały węglowe. Po

zastosowaniu nanocząstek metalicznych Ag, Au oraz Pt nie uzyskano pożądanych efektów. Co więcej przeprowadzone analizy uwidoczniliły fakt, że z badanych nanomateriałów węglowych (GO, ND, C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub>), ND indukował najsilniejszy efekt cytotoksyczny powodując dawkozależny spadek żywotności w obu badanych liniach nowotworowych. Przedstawione analizy wykazały również, że cytotoksyczność ND jest komórkowo specyficzna. Linia wrażliwsza na działanie ND - BxPC-3 charakteryzowała się zarówno większym spadkiem aktywności metabolicznej, większym wyciekiem LDH z komórek (świadczącym o uszkodzeniu plazmalemmy) oraz wyższym poziomem wewnętrzkomórkowych ROS po traktowaniu ND. Analizując wyniki z tego doświadczenia do kolejnych analiz zastosowano tylko nanomateriały węglowe.

Analizy przeprowadzone w doświadczeniu II wykazały, że nanofilm utworzony z ND spełnia oczekiwania stawiane przed nanomateriałem mającym na celu stabilizację niszy po resekcji guza nowotworowego. Nanofilm ND charakteryzował się brakiem właściwości cytotoksycznych jednak wzmagał adhezje komórek nowotworu piersi MDA.MB.231 i hamował ich proliferację. Analiza adhezji do wybranych komponentów ECM pokrytych ND dodatkowo wykazała, że nanomateriał ten zwiększa adhezje do tenascyny i witronektyny zarówno w komórkach U-87 MG jak i MDA.MB.231. Nanofilmy utworzone z GO i C60 charakteryzowały się cytokompatybilnością względem badanych linii nowotworowych jednak nie wywierały one wpływu na adhezję oraz proliferację. Analiza danych pozyskanych w doświadczeniach I i II wskazała, że ze wszystkich analizowanych nanocząstek i nanomateriałów najlepsze wyniki uzyskano stosując ND. Analizy przeprowadzone w doświadczeniu III wykazały, że toksyczność i cytokompatybilność ND są komórkowo specyficzne. W toku realizacji badań okazało się, że komórki nowotworu wątroby Hep G2, nowotworu piersi MCF-7 oraz nienowotworowe fibroblasty HFF-1 reagowały w podobny sposób na traktowanie ND w tym przypadku obserwowało zarówno podwyższenie aktywności metabolicznej jak i obniżenie poziomu ROS w komórkach. Wskazany nanomateriał indukował efekt cytotoksyczny w komórkach glejaka IV stopnia T98G oraz U-118 MG w tym przypadku obserwowało obniżenie aktywności metabolicznej, uszkodzenie błony komórkowej oraz wzrost poziomu ROS w komórkach. Uzyskane wyniki wskazują, że stres oksydacyjny wywołyany przez ND może być zaangażowany w mechanizm cytotoksyczności. Przeprowadzone badanie nie potwierdzają jednoznacznie tezy o wpływie metody produkcji na toksyczność ND. Kolejnymi analizowanymi parametrami były rozmiar i obecność grup funkcyjnych na powierzchni ND. Okazuje się, że o ile nie

zaobserwowano istotnych różnic przy zastosowaniu ND o różnej wielkości, obecność grupy hydroksylowej może nasilać cytotoksyczność ND.

## 9. Wnioski

1. Nanocząstki diamentu o średnicy 3-4 nm (SkySpring Nanomaterials) wykazywały toksyczne działanie względem ustalonej linii gruczolakoraka trzustki BxPC-3 w stężeniach od 10 mg/l do 200 mg/l powodując dawkozależny spadek żywotności, uszkodzenie błony komórkowej oraz indukcję reaktywnych form tlenu.
2. Linia gruczolakoraka trzustki AsPC-1 wykazywała mniejszą wrażliwość na traktowanie ND. Spadek żywotności obserwowany jest w stężeniach od 20 mg/l do 200 mg/l a do indukcji reaktywnych form tlenu dochodzi po zastosowaniu dawki 100 mg/l.
3. Funkcjonalizacja nanocząstek diamentu grupami karboksylowymi (ND-COOH) w przeciwieństwie do innych grup funkcyjnych wpływała na cytotoksyczność nanocząstek diamentu powodując wyższy spadek żywotności oraz zwiększyły wypływ LDH z komórki świadczący o uszkodzeniu błony komórkowej w stężeniu 50 mg/l po traktowaniu komórek glejaka T98G.
4. Metoda produkcji (ablacja laserowa, technika detonacyjna) nie wpływała na różnicę w cytotoksyczności nanocząstek diamentu pozyskanych od firmy Ray Techniques Ltd. względem linii komórkowej glejaka T98G.
5. Nanocząstki diamentu o większej średnicy ND-B wykazywały silniejsze działanie toksyczne w stosunku do ND-S w hodowli glejaka T98G powodując wyższy wypływ LDH z komórek w stężeniu 100 mg/l.
6. Nanofilm utworzony z nanocząstek diamentu w postaci hydrokoloidu o stężeniu 1000 mg/l wykazywał działanie toksyczne względem ustalonej linii potrójnie ujemnego raka piersi MDA.MB.231 powodując zwiększyły wypływ LDH po 72h oraz zahamowanie proliferacji po 48h.
7. Nanofilm utworzony z nanocząstek diamentu intensyfikował proces adhezji komórek linii MDA.MB.231 w czasie 30 oraz 60 min. wzmagając interakcje integryny powierzchniowych z tenascyną oraz witronektyną.

## 10. Bibliografia:

1. Mizrahi, J.D. *et al.* (2020) ‘Pancreatic cancer’, *The Lancet*, 395(10242), pp. 2008–2020. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30974-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30974-0).
2. Borowa-Mazgaj, B. (2016) ‘Pancreatic –ncer--mechanisms of chemoresistance’, *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 70, pp. 169–179. Available at: <https://doi.org/10.5604/17322693.1196387>.
3. Long, J. *et al.* (2011) ‘Overcoming drug resistance in pancreatic cancer’, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(7), pp. 817–828. Available at: <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.566216>.
4. Mohiuddin, E. and Wakimoto, H. (2021) ‘Extracellular matrix in glioblastoma: opportunities for emerging therapeutic approaches.’, *American journal of cancer research*, 11(8), pp. 3742–3754. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34522446%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC8414390>.
5. Carlsson, S.K., Brothers, S.P. and Wahlestedt, C. (2014) ‘Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme’, *EMBO Molecular Medicine*, 6(11), pp. 1359–1370. Available at: <https://doi.org/10.15252/emmm.201302627>.
6. Tilak, M. *et al.* (2021) ‘Receptor tyrosine kinase signaling and targeting in glioblastoma multiforme’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), pp. 1–35. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22041831>.
7. Olivier, C. *et al.* (2021) ‘Drug Resistance in Glioblastoma: The Two Faces of Oxidative Stress’, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(January), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.620677>.
8. Iwadate, Y. (2016) ‘Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression’, *Oncology Letters*, pp. 1615–1620. Available at: <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4113>.
9. Brar, H.K. *et al.* (2023) ‘Tyrosine Kinase Inhibitors for Glioblastoma Multiforme : Challenges and Opportunities for Drug Delivery’, *Pharmaceutics*, 15(59), pp. 1–28. Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010059>.
10. Jassem, Al *et al.* (2018) ‘Zaleczenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych 2019r. Rak piersi.’, *Onkologia w Praktyce Klini–znej*

- *Edukacja*, 4(4), pp. 209–256. Available at:  
<https://doi.org/10.5603/OCP.2018.0027>.

11. Nowacka-Zawisza, M. and Krajewska, W.M. (2013) ‘Potrójnie negatywny rak piersi: Molekularna charakterystyka i potencjalne strategie terapeutyczne’, *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczonej*, 67(April), pp. 1090–1097. Available at: <https://doi.org/10.5604/17322693.1077713>.
12. Li, L. *et al.* (2023) ‘Immunotherapy for Triple-Negative Breast Cancer: Combination Strategies to Improve Outcome’, *Cancers*, 15(1). Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers15010321>.
13. Tang, Y. *et al.* (2016) ‘Classification , Treatment Strategy , and Associated Drug Resistance in Breast Cancer’, *Clinical Breast Cancer*, 16(5), pp. 335–343. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.05.012>.
14. Yoon, J.Y. *et al.* (2023) ‘USP41 Enhances Epithelial–Mesenchymal Transition of Breast Cancer Cells through Snail Stabilization’, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24021693>.
15. Jain, M. *et al.* (2023) ‘Long-term yogic intervention decreases serum interleukins IL-10 and IL-1 $\beta$  and improves cancer-related fatigue and functional scale during radiotherapy/chemotherapy in breast cancer patients: a randomized control study’, *Supportive Care in Cancer*, 31(1), pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00520-022-07487-4>.
16. Niu, C. *et al.* (2020) ‘CCAT2 contributes to hepatocellular carcinoma progression via inhibiting miR-145 maturation to induce MDM2 expression’, *Journal of Cellular Physiology*, 235(9), pp. 6307–6320. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.29630>.
17. Savitha, G., Vishnupriya, V. and Krishnamohan, S. (2017) ‘Hepatocellular carcinoma- A review’, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(8), pp. 1276–1280. Available at: <https://doi.org/10.15586/jrenhep.v4i2.84>.
18. Sedighi, M. *et al.* (2023) ‘Nanomedicines for hepatocellular carcinoma therapy: Challenges and clinical applications’, *Materials Today Communications*. Elsevier. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.105242>.
19. Wu, X. *et al.* (2017) ‘GTSE1 promotes cell migration and invasion by regulating EMT in hepatocellular carcinoma and is associated with poor prognosis’,

- Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05311-2>.
20. Marin, J.J.G. *et al.* (2020) ‘Molecular bases of drug resistance in hepatocellular carcinoma’, *Cancers*, 12(6), pp. 1–26. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers12061663>.
21. Chow, E.K. *et al.* (2011) ‘Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment’, *Science Translational Medicine*, 3(73). Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001713>.
22. Predina, J. *et al.* (2013) ‘Changes in the local tumor microenvironment in recurrent cancers may explain the failure of vaccines after surgery’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(5), pp. 415–424. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1211850110>.
23. Pantel, K. and Speicher, M.R. (2016) ‘The biology of circulating tumor cells’, *Oncogene*, 35(10), pp. 1216–1224. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2015.192>.
24. Guo, F. *et al.* (2023) ‘Natural killer cell therapy targeting cancer stem cells: Old wine in a new bottle.’, *Cancer letters*, 570(March), p. 216328. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216328>.
25. Walker, C., Mojares, E. and Del Río Hernández, A. (2018) ‘Role of extracellular matrix in development and cancer progression’, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms19103028>.
26. Frantz, C., Stewart, K.M. and Weaver, V.M. (2010) ‘The extracellular matrix at a glance’, *Journal of Cell Science*, 123(24), pp. 4195–4200. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>.
27. Tufail, M., Cui, J. and Wu, C. (2022) ‘Breast cancer: molecular mechanisms of underlying resistance and therapeutic approaches.’, *American journal of cancer research*, 12(7), pp. 2920–2949. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35968356%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?artid=PMC9360230>.
28. Lah, T.T., Novak, M. and Breznik, B. (2020) ‘Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases’, *Seminars in Cancer Biology*, 60(October 2019), pp. 262–273. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2019.10.010>.

29. Starr, D.A. and Fridolfsson, H.N. (2010) ‘Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges’, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26, pp. 421–44. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104037>.
30. Malik, R., Lelkes, P.I. and Cukierman, E. (2015) ‘Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer’, *Trends in Biotechnology*, 33(4), pp. 230–236. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.01.004>.
31. Paszek, M. Al *et al.* (2005) ‘Tensional homeostasis and the malignant phenotype’, *Cancer Cell*, 8(3), pp. 241–254. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.010>.
32. Orzechowska, A. and Szymańska R. (2016) ‘Nanotechnologia w zastosowaniach biologicznych - wprowadzenie’, *Wszechnictwo*, 117(1-3), pp. 60–69.
33. Sanvicens, N. and Marco, M.P. (2008) ‘Multifunctional nanoparticles - properties and prospects for their use in human medicine’, *Trends in Biotechnology*, 26(8), pp. 425–433. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.005>.
34. Awasthi, R. *et al.* (2018) ‘Nanoparticles in Cancer Treatment: Opportunities and Obstacles’, *Current Drug Targets*, 19(14), pp. 1696–1709.
35. Zhang, Y. *et al.* (2013) ‘Multifunctional gold nanorods with ultrahigh stability and tunability for in vivo fluorescence imaging, SERS detection, and photodynamic therapy’, *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(4), pp. 1148–1151. Available at: <https://doi.org/10.1002/anie.201207909>.
36. Youssef, A.M., Abdel-Aziz, M.S. and El-Sayed, S.M. (2014) ‘Chitosan nanocomposite films based on Ag-NP and Au-NP biosynthesis by *Bacillus Subtilis* as packaging materials’, *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, pp. 185–191. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.047>.
37. Jeyaraj, M. *et al.* (2019) ‘A comprehensive review on the synthesis, characterization, and biomedical application of platinum nanoparticles’, *Nanomaterials*. Available at: <https://doi.org/10.3390/nano9121719>.
38. Poor, M.H.S. *et al.* (2017) ‘Cytotoxic activity of biosynthesized Ag Nanoparticles by *Plantago major* towards a human breast cancer cell line’, *Rendiconti Lincei*, 28(4), pp. 693–699. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12210-017-0641-z>.

39. Kuppusamy, P. *et al.* (2016) ‘In Vitro Anticancer Activity of Au, Ag Nanoparticles Synthesized Using Commelina nudiflora L. Aqueous Extract Against HCT-116 Colon Cancer Cells’, *Biological Trace Element Research*, 173(2), pp. 297–305. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0666-7>.
40. Wang, S.P., Guo, J.G. and Jiang, Y. (2013) ‘The size- and chirality-dependent elastic properties of graphene nanofilms’, *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, 10(1), pp. 250–256. Available at: <https://doi.org/10.1166/jctn.2013.2687>.
41. Asharani, P. *et al.* (2010) ‘DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles’, *Nanomedicine*, 5(1), pp. 51–64. Available at: <https://doi.org/10.2217/nmm.09.85>.
42. Maiti, D. *et al.* (2019) ‘Carbon-Based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Recent Study’, *Frontiers in Pharmacology*. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01401>.
43. Lee, J. *et al.* (2016) ‘Biosensors based on graphene oxide and its biomedical application’, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 105, pp. 275–287. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.001>.
44. Jaya Seema, D.M. *et al.* (2018) ‘Designing of the anticancer nanocomposite with sustained release properties by using graphene oxide nanocarrier with phenethyl isothiocyanate as anticancer agent’, *Pharmaceutics*, 10(3). Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030109>.
45. Xu, J. *et al.* (2019) ‘Inhibition of CaMKII $\alpha$  Activity Enhances Antitumor Effect of Fullerene C60 Nanocrystals by Suppression of Autophagic Degradation’, *Advanced Science*, 6(8). Available at: <https://doi.org/10.1002/advs.201801233>.
46. Campbell, B. and Manning, J. (2007) ‘The rise of graphene’, *Nature Materials*, 6, pp. 183–191. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmat1849>.
47. Zuchowska, A. *et al.* (2017) ‘Graphene as a new material in anticancer therapy-in vitro studies’, *Sensors and Actuators, B: Chemical*. Elsevier, pp. 152–165. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.105>.
48. Zhang, Y. *et al.* (2012) ‘Graphene: A versatile nanoplateform for biomedical applications’, *Nanoscale*, 4(13), pp. 3833–3842. Available at: <https://doi.org/10.1039/c2nr31040f>.

49. Dreyer, D.R. et al. (2010) ‘The chemistry of graphene oxide’, *Chemical Society Reviews*, 39(1), pp. 228–240. Available at: <https://doi.org/10.1039/b917103g>.
50. de Melo-Diogo, D. et al. (2018) ‘Functionalization of graphene family nanomaterials for application in cancer therapy’, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier B.V., pp. 260–275. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.030>.
51. Chang, Y. et al. (2011) ‘In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells’, *Toxicology Letters*, 200(3), pp. 201–210. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.11.016>.
52. Sanchez, V.C. et al. (2012) ‘Biological interactions of graphene-family nanomaterials: An interdisciplinary review’, *Chemical Research in Toxicology*, pp. 15–34. Available at: <https://doi.org/10.1021/tx200339h>.
53. Chen, Z., Mao, R. and Liu, Y. (2012) ‘Fullerenes for Cancer Diagnosis and Therapy: Preparation, Biological and Clinical Perspectives’, *Current Drug Metabolism*, 13(8), pp. 1035–1045. Available at: <https://doi.org/10.2174/138920012802850128>.
54. Fowler, P.W. and Ceulemans, A. (1995) ‘Electron deficiency of the fullerenes’, *Journal of physical chemistry*, 99(2), pp. 508–510. Available at: <https://doi.org/10.1021/j100002a010>.
55. Isakovic, A. et al. (2006) ‘Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene’, *Toxicological Sciences*, 91(1), pp. 173–183. Available at: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj127>.
56. Tjo, K. and Varamini, P. (2021) ‘Nanodiamonds and their potential applications in breast cancer therapy: a narrative review’, *Drug Delivery and Translational Research*. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00996-5>.
57. Chow, E.K. et al. (2011) ‘Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment’, *Science Translational Medicine*, 3(73). Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001713>.
58. Schrand, A.M., Hens, S.A.C. and Shenderova, O.A. (2009) ‘Nanodiamond particles: Properties and perspectives for bioapplications’, *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 34(1–2), pp. 18–74. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408430902831987>.

59. Chipaux, M. *et al.* (2018) ‘Nanodiamonds and Their Applications in Cells’, *Small*, pp. 1–25. Available at: <https://doi.org/10.1002/smll.201704263>.
60. Sosnowska, M. *et al.* (2021) ‘Diamond nanofilm normalizes proliferation and metabolism in liver cancer cells’, *Nanotechnology, Science and Applications*, 14(August), pp. 115–137. Available at: <https://doi.org/10.2147/NSA.S322766>.
61. Wang, S.P., Guo, J.G. and Jiang, Y. (2013) ‘The size- and chirality-dependent elastic properties of graphene nanofilms’, *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, 10(1), pp. 250–256. Available at: <https://doi.org/10.1166/jctn.2013.2687>.
62. Verma, R. *et al.* (2023) ‘Graphene and Graphene Based Nanocomposites for Bio-Medical and Bio-safety Applications’, *ChemistrySelect*, 8(6). Available at: <https://doi.org/10.1002/slct.202204337>.
63. Ansar, S.A. *et al.* (2023) ‘An intuitionistic approach for the predictability of anti-angiogenic inhibitors in cancer diagnosis’, *Scientific Reports*, 13(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32850-8>.
64. Schindelin, J. *et al.* (2012) ‘Fiji: An open-source platform for biological-image analysis’, *Nature Methods*, 9(7), pp. 676–682. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
65. Iversen, T.G., Skotland, T. and Sandvig, K. (2011) ‘Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies’, *Nano Today*. Elsevier, pp. 176–185. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.02.003>.
66. Sabella, S. *et al.* (2014) ‘A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles’, *Nanoscale*, 6(12), pp. 7052–7061. Available at: <https://doi.org/10.1039/c4nr01234h>.
67. Balashanmugam, P. *et al.* (2016) ‘Phytosynthesized gold nanoparticles from C. roxburghii DC. leaf and their toxic effects on normal and cancer cell lines’, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 165, pp. 163–173. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.10.013>.
68. Miri, A. *et al.* (2018) ‘Biosynthesis of gold nanoparticles using Prosopis farcta extract and its in vitro toxicity on colon cancer cells’, *Research on Chemical Intermediates*, 44(5), pp. 3169–3177. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11164-018-3299-y>.

69. Bendale, Y., Bendale, V. and Paul, S. (2017) ‘Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through induction of apoptosis’, *Integrative Medicine Research*, 6(2), pp. 141–148. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.imr.2017.01.006>.
70. Doskey, C.M. et al. (2016) ‘Tumor cells have decreased ability to metabolize H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Implications for pharmacological ascorbate in cancer therapy’, *Redox Biology*, 10, pp. 274–284. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.010>.
71. Li, W. et al. (2015) ‘Superoxide dismutase promotes the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via activation of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ERK/NF-κB axis’, *International Journal of Oncology*, 46(6), pp. 2613–2620. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2938>.
72. Li, J. et al. (2012) ‘Separation and purification of fullerenols for improved biocompatibility’, *Carbon*, 50(2), pp. 460–469. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.08.073>.
73. Seabra, A.B. et al. (2014) ‘Nanotoxicity of graphene and graphene oxide’, *Chemical Research in Toxicology*, 27(2), pp. 159–168. Available at: <https://doi.org/10.1021/tx400385x>.
74. Zha, Y. ying et al. (2012) ‘Concentration-dependent effects of fullerenol on cultured hippocampal neuron viability’, *International Journal of Nanomedicine*, 7, pp. 3099–3109. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S30934>.
75. Su, Y. et al. (2010) ‘Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fullerenol in different cell lines’, *Toxicology*, 269(2–3), pp. 155–159. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.11.015>.
76. Niwa, Y. and Iwai, N. (2006) ‘Genotoxicity in cell lines induced by chronic exposure to water-soluble fullerenes using micronucleus test’, *Environmental Health and Preventive Medicine*, 11(6), pp. 292–297. Available at: <https://doi.org/10.1265/ehpm.11.292>.
77. Djordjevic, A. et al. (2015) ‘Review of synthesis and antioxidant potential of fullerenol nanoparticles’, *Journal of Nanomaterials*, 2015, pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/567073>.
78. Bengston, S. et al. (2016) ‘No Cytotoxicity or Genotoxicity of Graphene Oxide in Murine Lung Epithelial FE1 Cells in Vitro’, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 57, pp. 469–482. Available at: <https://doi.org/10.1002/em.22017>.

79. Ali-Boucetta, H. et al. (2013) ‘Purified Graphene Oxide Dispersions Lack In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Pathogenicity’, *Advanced Healthcare Materials*, 2(3), pp. 433–441. Available at: <https://doi.org/10.1002/adhm.201200248>.
80. Jaworski, S. et al. (2015) ‘In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma’, *International Journal of Nanomedicine*, 10, pp. 1585–1596. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S77591>.
81. Wang, K. et al. (2011) ‘Biocompatibility of Graphene Oxide’, *Nanoscale Research Letters*, 6(1), pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11671-010-9751-6>.
82. Cheng, C. et al. (2013) ‘Biopolymer functionalized reduced graphene oxide with enhanced biocompatibility via mussel inspired coatings/anchors’, *Journal of Materials Chemistry B*, 1(3), pp. 265–275. Available at: <https://doi.org/10.1039/c2tb00025c>.
83. Kenry et al. (2016) ‘Selective Accelerated Proliferation of Malignant Breast Cancer Cells on Planar Graphene Oxide Films’, *ACS Nano*, 10(3), pp. 3424–3434. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07409>.
84. Duan, G. et al. (2017) ‘Graphene-Induced Pore Formation on Cell Membranes’, *Scientific Reports*, 7(42767), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep42767>.
85. Kalluri, R. and Weinberg, R.A. (2009) ‘The basics of epithelial-mesenchymal transition’, *Journal of Clinical Investigation*, 119(9), pp. 1420–1428. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI39104.1420>.
86. Barnett, P. et al. (2011) ‘Snail-mediated regulation of reactive oxygen species in ARCaP human prostate cancer cells’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(1), pp. 34–39. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.044>.
87. Priyadarshni, N., Singh, R. and Mishra, M.K. (2024) ‘Nanodiamonds: Next generation nano-theranostics for cancer therapy’, *Cancer Letters*, 587, p. 216710. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216710>.
88. Li, J. et al. (2010) ‘Nanodiamonds as intracellular transporters of chemotherapeutic drug’, *Biomaterials*, 31(32), pp. 8410–8418. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.058>.

89. Zhu, Y. et al. (2012) ‘The biocompatibility of nanodiamonds and their application in drug delivery systems’, *Theranostics*, pp. 302–312. Available at: <https://doi.org/10.7150/thno.3627>.
90. Dworak, N. et al. (2014) ‘Genotoxic and mutagenic activity of diamond nanoparticles in human peripheral lymphocytes in vitro’, *Carbon*, 68, pp. 763–776. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.11.067>.
91. Schrand, A.M. et al. (2007) ‘Are diamond nanoparticles cytotoxic?’, *Journal of Physical Chemistry B*, 111(1), pp. 2–7. Available at: <https://doi.org/10.1021/jp066387v>.
92. Adach, K. et al. (2016) ‘Studies on the cytotoxicity of diamond nanoparticles against human cancer cells and lymphocytes’, *Chemico-Biological Interactions*, 254, pp. 156–166. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.004>.
93. Mukaida, N., Harada, A. and Matsushima, K. (1998) ‘Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions’, *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 9(1), pp. 9–23. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(97\)00022-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(97)00022-1).
94. Horie, M. et al. (2012) ‘Evaluation of cellular influences induced by stable nanodiamond dispersion; The cellular influences of nanodiamond are small’, *Diamond and Related Materials*, 24, pp. 15–24. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2012.01.037>.
95. Mytych, J. et al. (2014) ‘Nanodiamond-mediated impairment of nucleolar activity is accompanied by oxidative stress and DNMT2 upregulation in human cervical carcinoma cells’, *Chemico-Biological Interactions*, 220, pp. 51–63. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.06.004>.
96. Drutskaya, M.S. et al. (2010) ‘Tumor necrosis factor, lymphotoxin and cancer’, *IUBMB Life*, 62(4), pp. 283–289. Available at: <https://doi.org/10.1002/iub.309>.
97. Haybaeck, J. et al. (2009) ‘A Lymphotoxin-Driven Pathway to Hepatocellular Carcinoma’, *Cancer Cell*, 16(4), pp. 295–308. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.08.021>.
98. Ammirante, M. et al. (2010) ‘B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer’, *Nature*, 464(7286), pp. 302–305. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08782>.

99. Akhavan, O. and Ghaderi, E. (2010) ‘Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria’, ACS Nano, 4(10), pp. 5731–5736. Available at: <https://doi.org/10.1021/nn101390x>.
100. Achawi, S. et al. (2021) ‘Graphene-Based Materials in Vitro Toxicity and Their Structure-Activity Relationships: A Systematic Literature Review’, Chemical Research in Toxicology, 34(9), pp. 2003–2018. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00243>.
101. Handschuh-Wang, S., Wang, T. and Tang, Y. (2021) ‘Ultrathin Diamond Nanofilms—Development, Challenges, and Applications’, Small, 17(30), pp. 1–26. Available at: <https://doi.org/10.1002/smll.202007529>.
102. Wójcik, B. et al. (2023) ‘Dependence of Diamond Nanoparticle Cytotoxicity on Physicochemical Parameters: Comparative Studies of Glioblastoma, Breast Cancer, and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines’. Nanotoxicology, 17(4), 2023, pp. 310–337, Available at: <https://doi.org/10.1080/17435390.2023.2218925>.
103. Luo, D. and Schricker, S.R. (2014) Handbook of Nanomaterials Properties, Handbook of Nanomaterials Properties. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-31107-9>.
104. Roy, R.K. and Lee, K.R. (2007) ‘Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: A review’, Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials, 83(1), pp. 72–84. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30768>.
105. Guo, Q. et al. (2021) ‘Nanodiamonds Inhibit Cancer Cell Migration by Strengthening Cell Adhesion: Implications for Cancer Treatment’, ACS Applied Materials and Interfaces, 13(8), pp. 9620–9629. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsami.0c21332>.
106. Yang, L., Sheldon, B.W. and Webster, T.J. (2008) ‘Orthopedic nano diamond coatings : Control of surface properties and their impact on osteoblast adhesion and proliferation Film Growth Conditions for Diamond Coatings’, Journal of Biomedical Materials Research, 91A(2), pp. 548–556. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32227>.
107. Emery, L.A. et al. (2009) ‘Early Dysregulation of Cell Adhesion and Extracellular Matrix Pathways in Breast Cancer Progression’, The American

- Journal of Pathology, 175(3), pp. 1292–1302. Available at: <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2009.090115>.
108. Meiners, S. and Geller, H.M. (1997) ‘Long and short splice variants of human tenascin differentially regulate neurite outgrowth’, Molecular and Cellular Neurosciences, 10(1–2), pp. 100–116. Available at: <https://doi.org/10.1006/mcne.1997.0643>.
109. Castro, N.P. et al. (2008) ‘Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma’, Breast Cancer Research, 10(5), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1186/bcr2157>.
110. Rolle, K. et al. (2010) ‘Promising human brain tumors therapy with interference RNA intervention (iRNAi)’, Cancer Biology and Therapy, 9(5), pp. 397–407. Available at: <https://doi.org/10.4161/cbt.9.5.10958>.
111. Midwood, K.S. and Orend, G. (2009) ‘The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis’, Journal of Cell Communication and Signaling, 3(3–4), pp. 287–310. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12079-009-0075-1>.
112. Wawrzyniak, D. et al. (2020) ‘Down-regulation of tenascin-C inhibits breast cancer cells development by cell growth, migration, and adhesion impairment’, PLoS ONE, 15(8), pp. 1–25. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237889>.
113. Chiquet-Ehrismann, R. and Tucker, R.P. (2011) ‘Tenascins and the importance of adhesion modulation’, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 3(5), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004960>.
114. Schvartz, I., Seger, D. and Shaltiel, S. (1999) ‘Vitronectin’, International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 31(5), pp. 539–544. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00005-9).
115. Sweeney, S.M. et al. (2008) ‘Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates’, Journal of Biological Chemistry, 283(30), pp. 21187–21197. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M709319200>.
116. Payne, L.S. and Huang, P.H. (2013) ‘The pathobiology of collagens in glioma’, Molecular Cancer Research, 11(10), pp. 1129–1140. Available at: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0236>.
117. Zhang, X. et al. (2012) ‘A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond’, Toxicology Research, 1(1), pp. 62–68. Available at: <https://doi.org/10.1039/c2tx20006f>.

118. Faklaris, O. et al. (2009) ‘Photoluminescent diamond nanoparticles for cell labeling: Study of the uptake mechanism in mammalian cells’, *ACS Nano*, 3(12), pp. 3955–3962. Available at: <https://doi.org/10.1021/nn901014j>.
119. Zhang, B. et al. (2017) ‘Anchored but not internalized: Shape dependent endocytosis of nanodiamond’, *Scientific Reports*, 7(September 2016), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep46462>.
120. Strojny, B. et al. (2018) ‘Nanostructures of diamond, graphene oxide and graphite inhibit CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 enzymes and downregulate their genes in liver cells’, *International Journal of Nanomedicine*, 13, pp. 8561–8575. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S188997>.
121. Pacelli, S. et al. (2017) ‘Nanodiamond-based injectable hydrogel for sustained growth factor release: Preparation, characterization and in vitro analysis’, *Acta Biomaterialia*, 58, pp. 479–491. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2017.05.026>.
122. Mytych, J., Wnuk, M. and Rattan, S.I.S. (2016) ‘Low doses of nanodiamonds and silica nanoparticles have beneficial hormetic effects in normal human skin fibroblasts in culture’, *Chemosphere*, 148, pp. 307–315. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.045>.
123. Barhoum, A. et al. (2022) ‘Review on Natural, Incidental, Bioinspired, and Engineered Nanomaterials: History, Definitions, Classifications, Synthesis, Properties, Market, Toxicities, Risks, and Regulations’, *Nanomaterials*, 12(2), p. 177. Available at: <https://doi.org/10.3390/nano12020177>.
124. Jeevanandam, J. et al. (2018) ‘Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations’, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9(1), pp. 1050–1074. Available at: <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>.
125. Roy, U. et al. (2018) ‘Characterization of Nanodiamond-based anti-HIV drug Delivery to the Brain’, *Scientific Reports*, 8(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16703-9>.
126. Wierzbicki, M. et al. (2017) ‘Diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles decrease migration and invasiveness in glioblastoma cell lines by impairing extracellular adhesion’, *International Journal of Nanomedicine*, 12, pp. 7241–7254. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S146193>.

127. Lewinski, N., Colvin, V. and Drezek, R. (2008) ‘Cytotoxicity of nanopartides’, Small, pp. 26–49. Available at: <https://doi.org/10.1002/smll.200700595>.
128. Chen, K.L. and Bothun, G.D. (2014) ‘Nanoparticles meet cell membranes: Probing nonspecific interactions using model membranes’, Environmental Science and Technology, 48(2), pp. 873–880. Available at: <https://doi.org/10.1021/es403864v>.
129. Paget, V. et al. (2014) ‘Carboxylated nanodiamonds are neither cytotoxic nor genotoxic on liver, kidney, intestine and lung human cell lines’, Nanotoxicology, 8(SUPPL. 1), pp. 46–56. Available at: <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.855828>.
130. Turcheniuk, K. and Mochalin, V.N. (2017) ‘Biomedical applications of nanodiamond (Review)’, Nanotechnology, 28(25). Available at: <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa6ae4>.
131. Khanal, D. et al. (2020) ‘The protein corona determines the cytotoxicity of nanodiamonds: implications of corona formation and its remodelling on nanodiamond applications in biomedical imaging and drug delivery’, Nanoscale Advances, 2(10), pp. 4798–4812. Available at: <https://doi.org/10.1039/d0na00231c>.
132. Namdar, R. and Nafisi, S. (2018) ‘Nanodiamond applications in skin preparations’, Drug Discovery Today, 23(5), pp. 1152–1158. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.04.006>.
133. Hinzmann, M. et al. (2014) ‘Nanoparticles containing allotropes of carbon have genotoxic effects on glioblastoma multiforme cells’, International Journal of Nanomedicine, 9(1), pp. 2409–2417. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S62497>.
134. Vaitkuviene, A. et al. (2015) ‘Impact of diamond nanoparticles on neural cells’, Molecular and Cellular Probes, 29(1), pp. 25–30. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.10.005>.
135. Chen, T.M. et al. (2017) ‘Nanodiamonds as pH-switchable oxidation and reduction catalysts with enzyme-like activities for immunoassay and antioxidant applications’, Nanoscale, 9(40), pp. 15673–15684. Available at: <https://doi.org/10.1039/c7nr05629j>.
136. Li, Y. et al. (2014) ‘In vivo enhancement of anticancer therapy using bare or chemotherapeutic drug-bearing nanodiamond particles’, International Journal of

- Nanomedicine, 9(1), pp. 1065–1082. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S54864>.
137. Jiang, W. et al. (2008) ‘Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent’, *Nature Nanotechnology*, 3(3), pp. 145–150. Available at: <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30>.
138. Indo, H.P. et al. (2015) ‘A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging’, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.3164/jcbn.14-42>.
139. Daniluk, K. et al. (2020) ‘Use of Selected Carbon Nanoparticles as Melittin’, *Materials*, 13(1), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma13010090>.
140. Kaluç, N. and Thomas, P.B. (2022) ‘A carboxylated nanodiamond reduces oxidative stress and shows no sign of toxicity in yeast’, *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 30(4), pp. 487–494. Available at: <https://doi.org/10.1080/1536383X.2021.1960509>.
141. Liu, Y. et al. (2020) ‘Amplification of oxidative stress: Via intracellular ROS production and antioxidant consumption by two natural drug-encapsulated nanoagents for efficient anticancer therapy’, *Nanoscale Advances*, 2(9), pp. 3872–3881. Available at: <https://doi.org/10.1039/d0na00301h>.
142. Solarska, K. et al. (2012) ‘Effect of nanodiamond powders on the viability and production of reactive oxygen and nitrogen species by human endothelial cells’, *Diamond and Related Materials*, 21, pp. 107–113. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2011.10.020>.

**11. Publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej**



Article

# Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3

Barbara Wójcik <sup>1</sup>, Ewa Sawosz <sup>1</sup>, Jarosław Szczepaniak <sup>1</sup>, Barbara Strojny <sup>1</sup>, Małwina Sosnowska <sup>1</sup>, Karolina Daniluk <sup>1</sup>, Marlena Zielińska-Górska <sup>1</sup>, Jaśmina Bałaban <sup>1</sup>, André Chwalibog <sup>2</sup> and Mateusz Wierzbicki <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland; barbara\_wojcik@sggw.edu.pl (B.W.); ewa\_sawosz\_chwalibog@sggw.edu.pl (E.S.); jaroslaw\_szczepaniak1@sggw.edu.pl (J.S.); barbara\_strojny@sggw.edu.pl (B.S.); malwina\_sosnowska@sggw.edu.pl (M.S.); karolina\_daniluk@sggw.edu.pl (K.D.); marlena\_zielinska\_gorska@sggw.edu.pl (M.Z.-G.); jasmina\_balaban@sggw.edu.pl (J.B.)

<sup>2</sup> Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Copenhagen, Groennegaardsvej 3, 1870 Frederiksberg, Denmark; ach@sund.ku.dk

\* Correspondence: mateusz\_wierzbicki@sggw.edu.pl



**Citation:** Wójcik, B.; Sawosz, E.; Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sosnowska, M.; Daniluk, K.; Zielińska-Górska, M.; Bałaban, J.; Chwalibog, A.; Wierzbicki, M. Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12100. <https://doi.org/10.3390/ijms222212100>

Academic Editor: Valentina Villari

Received: 20 September 2021

Accepted: 4 November 2021

Published: 9 November 2021

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



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

**Abstract:** Pancreatic cancer, due to its asymptomatic development and drug-resistance, is difficult to cure. As many metallic and carbon-based nanomaterials have shown anticancer properties, we decided to investigate their potential use as anticancer agents against human pancreatic adenocarcinoma. The objective of the study was to evaluate the toxic properties of the following nanomaterials: silver (Ag), gold (Au), platinum (Pt), graphene oxide (GO), diamond (ND), and fullerene (C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub>) against the cell lines BxPC-3, AsPC-1, HFFF-2, and HS-5. The potential cytotoxic properties were evaluated by the assessment of the cell morphology, cell viability, and cell membrane damage. The cancer cell responses to GO and ND were analysed by determination of changes in the levels of 40 different pro-inflammatory proteins. Our studies revealed that the highest cytotoxicity was obtained after the ND treatment. Moreover, BxPC-3 cells were more sensitive to ND than AsPC-1 cells due to the ND-induced ROS production. Furthermore, in both of the cancer cell lines, ND caused an increased level of IL-8 and a decreased level of TIMP-2, whereas GO caused only decreased levels of TIMP-2 and ICAM-1 proteins. This work provides important data on the toxicity of various nanoparticles against pancreatic adenocarcinoma cell lines.

**Keywords:** metallic nanoparticles; carbon-based nanomaterials; pancreatic cancer; in vitro; cytotoxicity

## 1. Introduction

Very often, pancreatic cancer is a silent killer that displays no symptoms until it is too late for effective therapy. It is estimated that around 73% of patients will die within the first year after diagnosis [1], and that only 15% of patients will have a chance to qualify to undergo surgery, which is the most promising anticancer therapy to date [2]. For these reasons, pancreatic cancer, which is the 11th most common type of cancer and the 7th leading cancer-related cause of death worldwide, remains a worldwide public health issue [3]. Despite considerable progress in cancer therapy, the occurrence of pancreatic cancer is still increasing.

One of many reasons that drives the ongoing search for novel and unconventional therapeutic strategies is the drug-resistant nature of pancreatic cancer cells. It is believed that drug-resistance can occur de novo or can be acquired during exposure to chemotherapeutics. In the second case, although cells that are exposed to anticancer drugs initially show drug sensitivity, continued treatment ends in failure. There are many factors underlying the occurrence of drug-resistance. Mutations; abnormal gene expression; dysregulation of the main signalling pathways such as NF-κB, Notch, and Akt; dysregulation of the apoptosis

pathway; the appearance of epithelial-mesenchymal transition; the presence of cancer stem cells; increased angiogenesis; and the hypoxic microenvironment inside the tumour are thought to be the main reasons for drug-resistance [4]. Few of the commercially available pancreatic adenocarcinoma cell lines are characterized by resistance to the pyrimidine nucleoside analogue gemcitabine, which is still one of the most important agents that is used in treatment, including BxPC-3 [5] and AsPC-1 [6].

Thanks to the significant development of nanotechnology, nanoparticles (NPs) are a possible solution to overcoming the difficulties that are connected with therapy. Due to their unique physical and chemical properties, NPs have proven to be applicable in pharmacy and medicine [7]. Moreover, they can be used to reduce the undesirable side-effects of conventional therapeutic strategies [8]. In this study, the influence of metallic and carbon-based nanomaterials was investigated.

Metallic NPs have been tested in different fields of science. In recent years, many researchers have investigated the medical applications of platinum (Pt), gold (Au), and silver (Ag) NPs. Due to their specific features, they are explored in areas of biolabeling [9], drug delivery [10], and anticancer treatment [11–13]. Furthermore, Ag and Au NPs are thought to be promising anticancer agents because of the release of relatively toxic ions in the acidic environment of lysosomes [14]. The toxic mechanism of Pt NPs is still not completely understood. It has been suggested that those NPs can enter the cell by an active mechanism of internalization, and, similarly to Ag and Au NPs, toxic ions are released once they are inside the cell [15]. Even though many scientists are attempting to assess the anti-cancer properties of metallic nanostructures, their activity strongly depends on their shape and size [16]. For this reason, more research is needed to evaluate the potential benefits and risks of metallic NPs usage.

Carbon-based nanomaterials also possess diverse and inimitable properties that make them suitable agents for use in various potential applications such as drug delivery systems [17], tissue engineering, imaging, biosensing, diagnosis, and cancer therapy [18–20].

Although their composition remains similar, carbon-based nanomaterials are characterized by distinct physical and biological features, depending on their structure. The most intensively investigated members of that group to date are thought to be graphene oxide (GO), diamond (ND), and fullerol ( $C_{60}(OH)_n$ ). GO displays properties such as a high drug-loading efficiency, a tunable surface, and good colloidal stability. Although GO has been reported as a biocompatible nanomaterial [21], it is also capable of inducing oxidative stress in a dose-dependent manner [22]. This process was suggested as one of the possible mechanisms underlying carbon-based nanomaterial cytotoxicity [23]. GO was proven to be cytotoxic in doses that exceeded 200 mg/L for the lung cancer cell line A549 [22,24] or the human liver cell line HepG2 [25]. ND are characterized by high rigidity, chemical stability, a large surface area, and a high absorption capacity [26]. As they can penetrate intensively and accumulate in the neoplastic tissue, they can potentially break down the barriers of conventional treatment [27]. It has been noted that ND may also reduce chemoresistance and enhance anti-tumour efficiency [28,29].

Fullerene  $C_{60}$  has also shown some promising prospects for biomedical applications, as it possesses certain biological activities, such as antioxidant [30], anticancer [20], and immunomodulatory effects [31]. Moreover, it is characterized by the ability to accumulate in the tumour as it easily penetrates the permeable blood vessels that surround the neoplastic tissue [32]. To achieve increased water solubility and expand the possible biomedical applications, polar hydroxyl groups have been added to the  $C_{60}$  skeleton [33]. Due to their specific structure that is characterized by the unique  $\pi$ -system, hydroxylated fullerenes are thought to have a dual nature. They can act as both antioxidative and prooxidative agents [34]. As antioxidants, they may display hepatoprotective [35] and cardioprotective effects [36]. As prooxidative agents in the acidic environment that is present in the tumour microenvironment, they may be capable of reactive oxygen species production (ROS) with greater rates of oxygen consumption [37]. However, it has been suggested that as the number of hydroxyl groups increases, reversible radical trapping ability decreases [38].

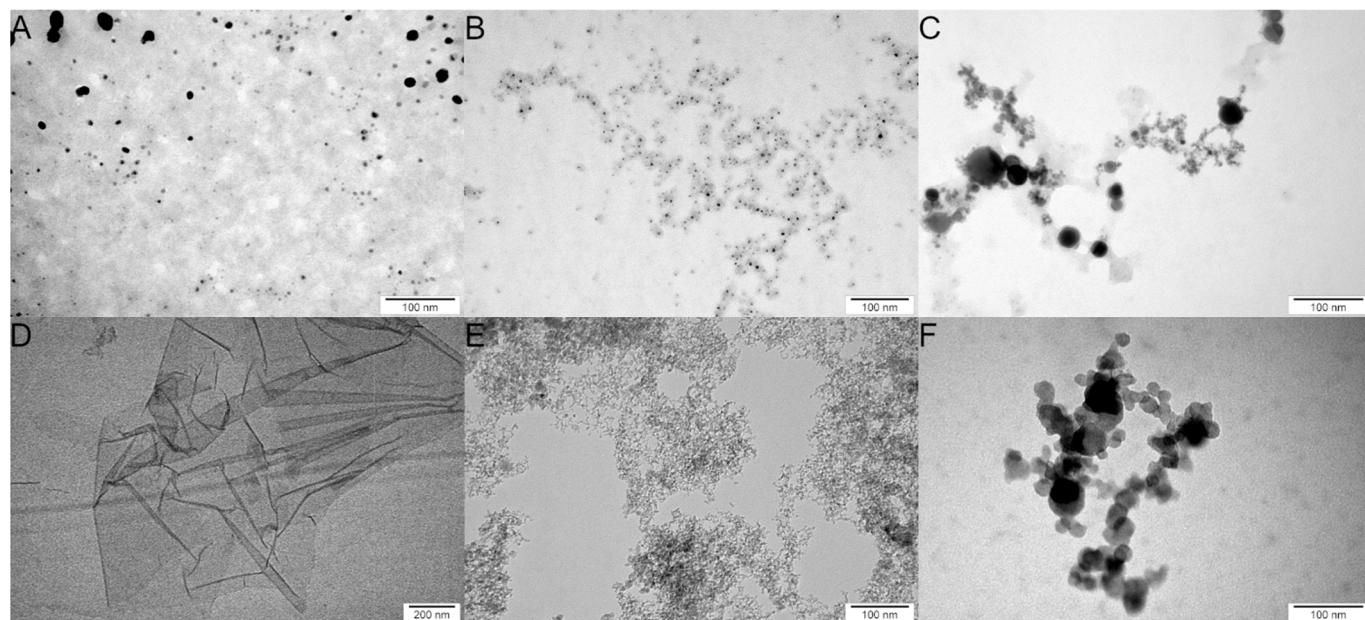
Hence, fullerenols with a greater number of hydroxylated groups may display lower antioxidant activity and higher toxicity against cancer cells.

This study aimed to investigate the potential toxic properties of different metallic and carbon-based nanomaterials against pancreatic cancer. Based on its anti-cancer features, the decision was made to evaluate the influence of Ag, Au, Pt, GO, ND, and  $C_{60}(OH)_{40}$ . Tests were carried out on two human pancreatic cancer cell lines: AsPC-1 and BxPC-3; both are gemcitabine resistant and differ in their ability to metastasise. Furthermore, to determine whether the chosen NPs influence normal cells, the same analyses were performed on the fibroblast cell line HFFF-2 and the bone-marrow-derived cell line HS-5. The expected effect that was induced by the chosen nanomaterials was a decrease in the viability of neoplastic cells in the absence of, or with little impact on, the life processes of the normal cells.

## 2. Results

### 2.1. Physicochemical Analysis of Metallic and Carbon-Based Nanostructures

Transmission electron microscopy (TEM) analysis was performed to assess the morphology of the metallic and carbon-based nanomaterials. The analysis revealed that the tested nanomaterials, apart from GO, were spherical (Figure 1); GO took the form of flakes with visible folds (Figure 1D). This analysis also revealed heterogeneity in the size of Pt and Ag (Figure 1A,C).



**Figure 1.** TEM images of the nanomaterials that were used in experiments. (A) silver (Ag); (B) gold (Au); (C) platinum (Pt); (D) graphene oxide (GO); (E) diamond (ND); and (F) fullerol ( $C_{60}(OH)_{40}$ ).

The data in Table 1 show the zeta potentials and hydrodynamic diameters of the studied nanomaterials. The analysis that was performed revealed that the Au suspension was the least stable of both of the metallic and carbon-based nanomaterials, with a zeta potential of  $-13.30\text{ mV}$ . The zeta potentials of both Ag and Pt were negative, maintaining the following values:  $-23.20\text{ mV}$  and  $-21.73\text{ mV}$ , respectively, which indicated moderate stability. The ND hydrocolloidal suspension also exhibited moderate stability with a positive zeta potential of  $23.20\text{ mV}$ . The highest stability was observed in the case of GO and  $C_{60}(OH)_4$ , obtaining  $-38.88\text{ mV}$  and  $-48.08\text{ mV}$ , respectively.

**Table 1.** Zeta potential (ZP) and the average NPs/agglomerate size in suspension that were measured by laser Doppler electrophoresis (LDE) and dynamic light scattering (DLS), respectively. All of the ZP measurements were performed at an NP concentration of 20 mg/L. The average size of metallic NPs was measured at the concentration of 25 mg/L and that of carbon-based nanomaterials at 20 mg/L. The results are presented as mean with standard division (SD).

Sample	ZP by LDE [mV] ± SD	Diameter by DLS [nm] ± SD
Ag	−23.2 ± 1.29	244.2 ± 53.16
Au	−13.3 ± 3.91	190.2 ± 54.69
Pt	−21.7 ± 2.0	80.0 ± 7.36
GO	−38.9 ± 0.38	419.6 ± 13.31
ND	23.2 ± 0.68	157.6 ± 1.12
C <sub>60</sub> (OH) <sub>40</sub>	−48.1 ± 6.58	185.3 ± 4.45

## 2.2. Membrane Integrity

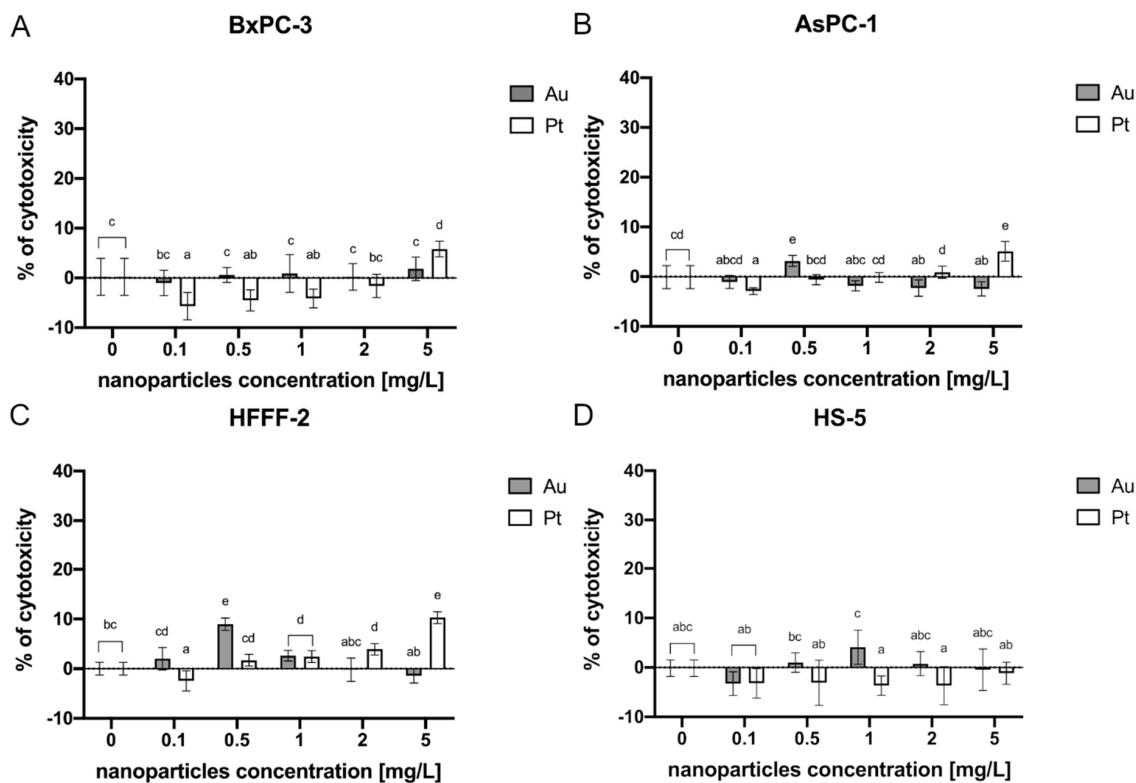
### 2.2.1. Metallic Nanoparticles

The lactate dehydrogenase (LDH) assay was performed following cell treatment with the metallic NPs. Before the study was conducted, the interference analysis was made to investigate the potential influence of the nanomaterials on the colorimetric reaction. As shown in the Supplementary Materials, only in the case of Ag at the concentration of 2 mg/L and 5 mg/L did interference occur. Therefore, Ag NPs were excluded from the membrane integrity assay.

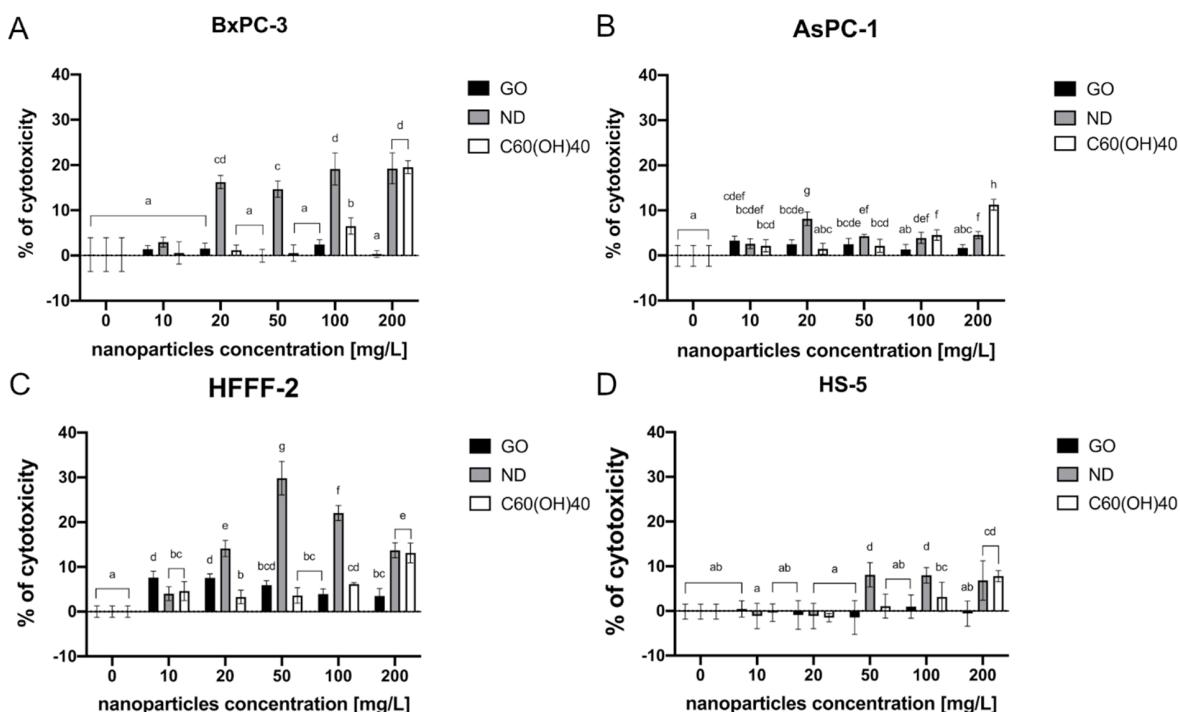
In the BxPC-3 cell line, only Pt at the concentration of 5 mg/L exhibited a potential toxic effect, contributing to 6% of cytotoxicity (Figure 2A). In the AsPC-1 cell line, the highest toxic effect was observed after Pt administration at a concentration of 5 mg/L, which caused a 5% cytotoxicity. A cytotoxic effect was also observed after Au treatment at a concentration of 0.5 mg/L (3%) (Figure 2B). Following the treatment of HFFF-2 with metallic NPs, Pt at a concentration of 1 mg/L, 2 mg/L, and 5 mg/L as well as Au at 0.5 mg/L and 1 mg/L caused a cytotoxic effect maintaining 3%, 4%, 10%, 9%, and 3% respectively (Figure 2C). In the HS-5 cells, there was no observed cytotoxic effect (Figure 2D).

### 2.2.2. Carbon-Based Nanoparticles

The LDH assay that was performed revealed that the highest cytotoxicity was observed following the treatment of the BxPC-3 cells with ND at almost all of the tested concentrations—20, 50, 100, and 200 mg/L. The percentage of cytotoxicity ranged from 16% to 19%, compared to the control group and rose in a dose-dependent manner. The cytotoxic effect was also obtained by introducing C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub> at a concentration of 100 mg/L and 200 mg/L into the cell culture (7% and 20%, respectively) (Figure 3A). Furthermore, the exposure of the AsPC-1 cell line to carbon-based nanomaterials revealed that the highest cytotoxicity was caused by C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub> at a concentration of 200 mg/L, which is 11%. ND 20 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, and 200 mg/L treatment also caused an elevated cytotoxicity that ranged from 2 to 8%. Furthermore, GO at the concentrations of 10 mg/L, 20 mg/L, and 50 mg/L caused 3% cytotoxicity in the AsPC-1 cells (Figure 3B). A significant effect on membrane integrity that was caused by ND was also observed in the fibroblast HFFF-2 cell line. Herein, the highest cytotoxic effect occurred at a concentration of 50 mg/L and 100 mg/L and led to a 30% and 22% of cytotoxicity, respectively. GO at the concentration of 10 and 20 mg/L resulted in approximately 8% of cytotoxicity (Figure 3C). The highest toxicity on the HS-5 cells was also observed after ND 50 mg/L, 100 mg/L, and C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub> 200 mg/L treatment, where 8% of cytotoxicity was achieved (Figure 3D).



**Figure 2.** Membrane integrity of the cells after a 24-h incubation period with metallic NPs as determined by an LDH assay. The results are presented as the percentage of cytotoxicity (mean with standard deviation). Different letters above the columns indicate statistically significant differences between the groups ( $p \leq 0.05$ ). Capital letters refers to the different cell lines: (A) BxPC-3; (B) AsPC-1; (C) HFFF-2; and (D) HS-5.

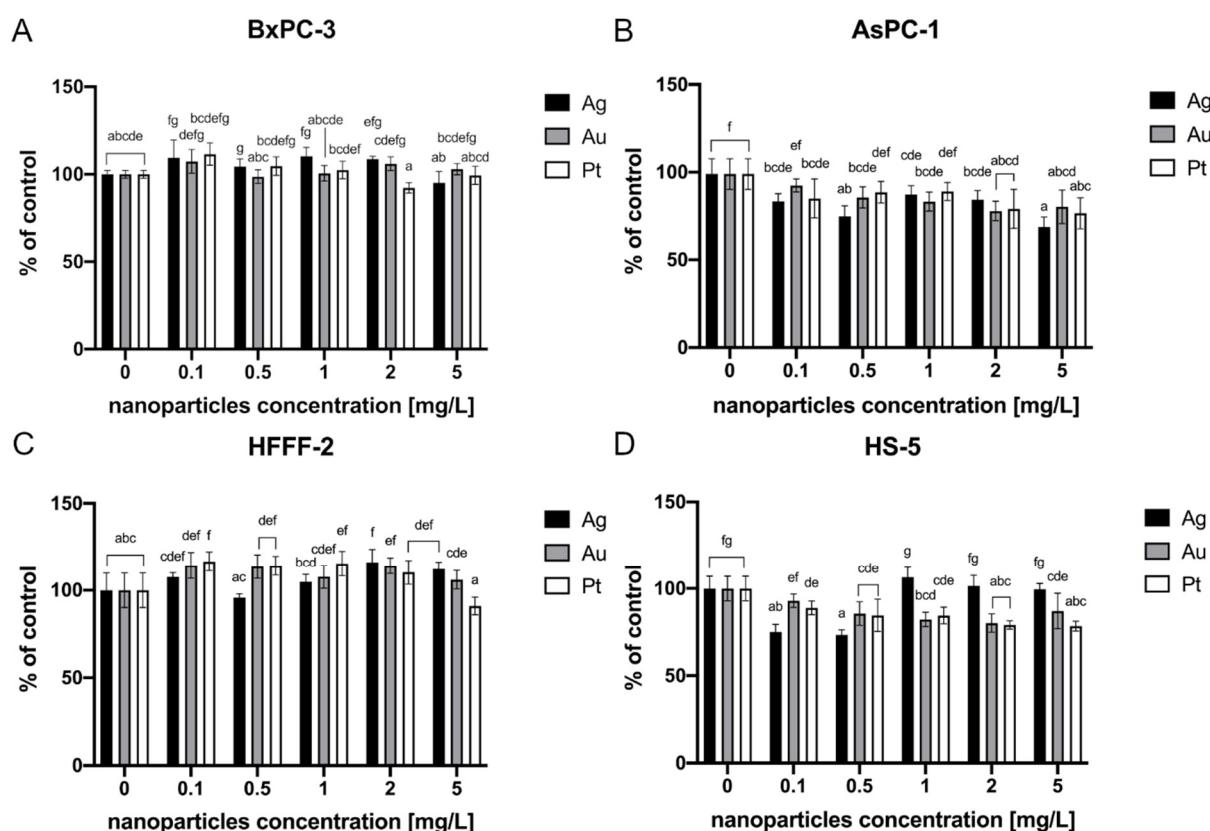


**Figure 3.** Membrane integrity of the cells after a 24-h incubation period with carbon-based nanomaterials as determined by an LDH assay. The results are presented as the percentage of cytotoxicity (mean with standard deviation). Different letters above the columns indicate statistically significant differences between the groups ( $p \leq 0.05$ ). Capital letters refer to different cell lines: (A) BxPC-3; (B) AsPC-1; (C) HFFF-2; and (D) HS-5.

### 2.3. Viability Evaluation

#### 2.3.1. Metallic Nanoparticles

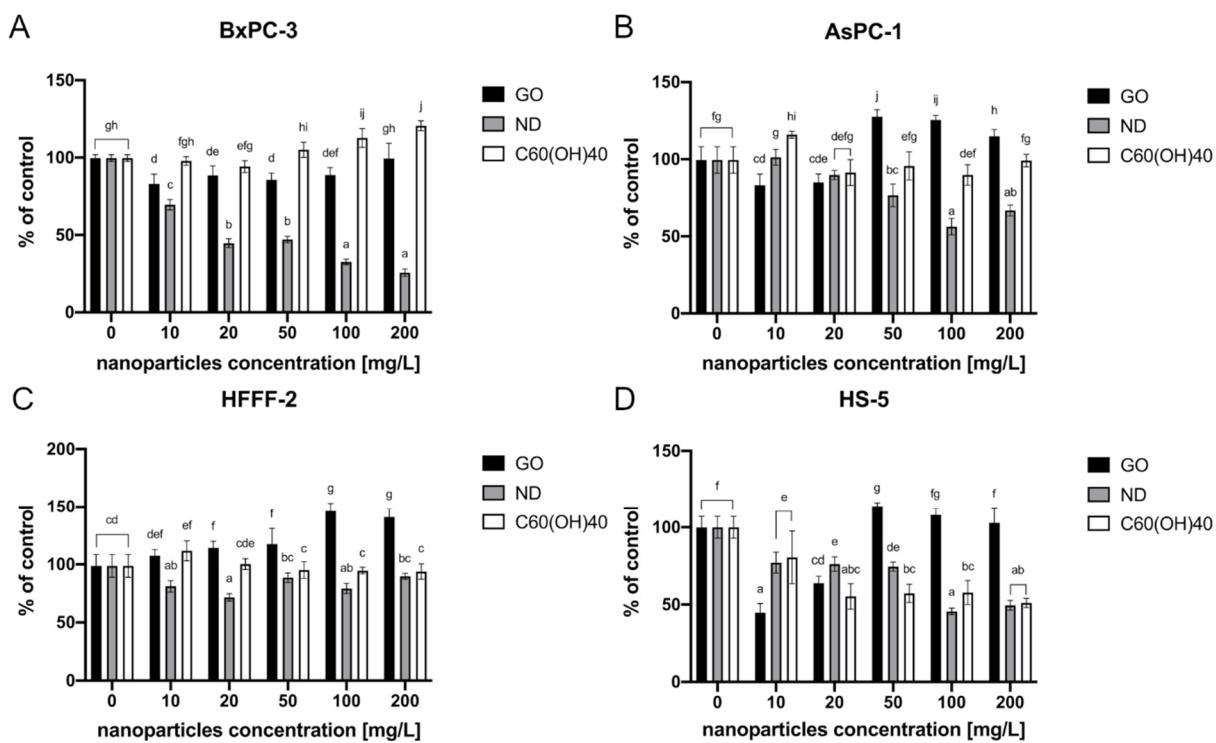
The MTT test did not reveal any cytotoxic effects of the evaluated metallic NPs on the BxPC-3 and HFFF-2 cell lines (Figure 4A,C). However, after NP treatment of the AsPC-1 and HS-5 cell lines, a loss of viability was observed. All of the tested metallic NPs led to decreased cell viability of AsPC-1 cells. Ag resulted in an approximately 33% decrease at the highest concentration (5 mg/L) (Figure 4B). The highest decrease in HS-5 cell viability was observed after incubation with Ag at concentrations of 0.1 and 0.5 mg/L (25% and 27%, respectively). The HS-5 cells were also vulnerable to Pt at all of the tested concentrations. The highest loss of viability (23%) in this group was observed after the treatment of Pt at the concentration of 5 mg/L. Au at a concentration of 2 mg/L resulted in an approximately 20% decrease (Figure 4D).



**Figure 4.** Viability of the cells after a 24-h incubation period with metallic NPs as determined by an MTT assay. The results are presented as a percentage of the control (mean with standard deviation). Different letters above the columns indicate statistically significant differences between the groups ( $p \leq 0.05$ ). Capital letters refers to different cell lines: (A) BxPC-3; (B) AsPC-1; (C) HFFF-2; and (D) HS-5.

#### 2.3.2. Carbon-Based Nanomaterials

MTT analysis revealed that the highest decrease in BxPC-3 cell viability was observed after incubation with ND. The viability decreased from 67% after exposure to the lowest tested concentration—10 mg/L, to 26% in the highest used concentration, which was 200 mg/L. Moreover, a dose-dependent reaction was observed. Furthermore, GO at concentrations from 10 to 100 mg/L also displayed a toxic effect. The cell viability in that group varied from 83% (10 mg/L) to 89% (100 mg/L). There was, however, no dose-dependent reaction (Figure 5A).



**Figure 5.** The cell viability after a 24-h incubation period with carbon-based nanomaterials as determined by an MTT assay. The results are presented as a percentage of the control (mean with standard deviation). Different letters above the columns indicate statistically significant differences between the groups ( $p \leq 0.05$ ). Capital letters refers to different cell lines: (A) BxPC-3; (B) AsPC-1; (C) HFFF-2; and (D) HS-5.

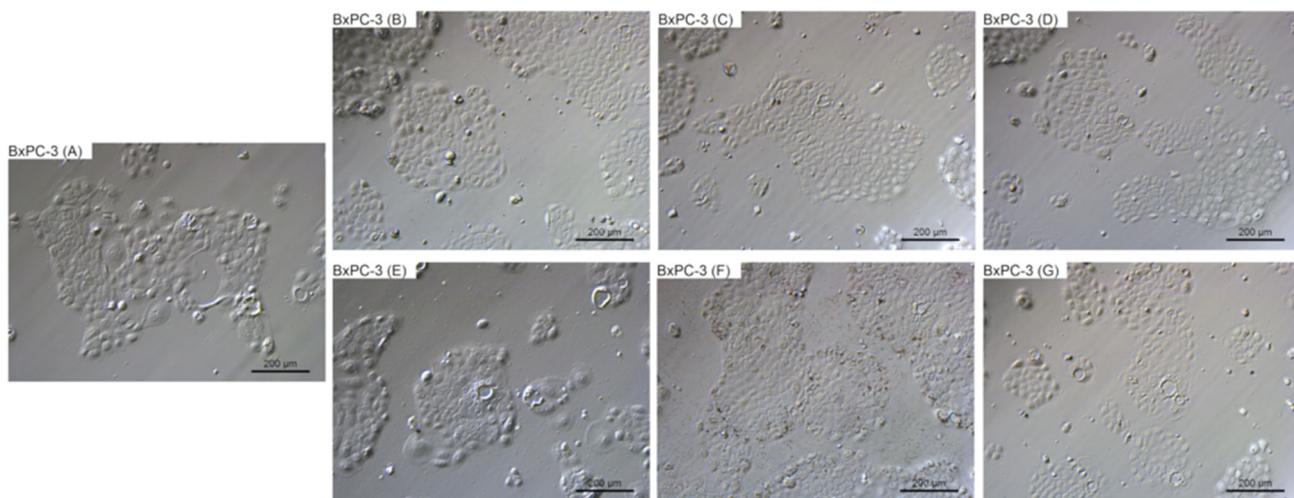
In the case of another pancreatic cancer cell line, AsPC-1, only ND caused a loss of viability. Herein, the highest decrease in the cell activity was observed at a concentration of 100 mg/L, leading to decrease to 56% of the control (Figure 5B).

The fibroblasts cell line HFFF-2 also displayed lower cell viability than the control after incubation with ND. The highest decrease was observed in the 20 mg/L concentration and was at the level of 72% of the control. After GO administration, there was a significant increase in cell viability which varied from 107% to 149% of the control. Moreover, the cell viability increased in a dose-dependent manner (Figure 5C).

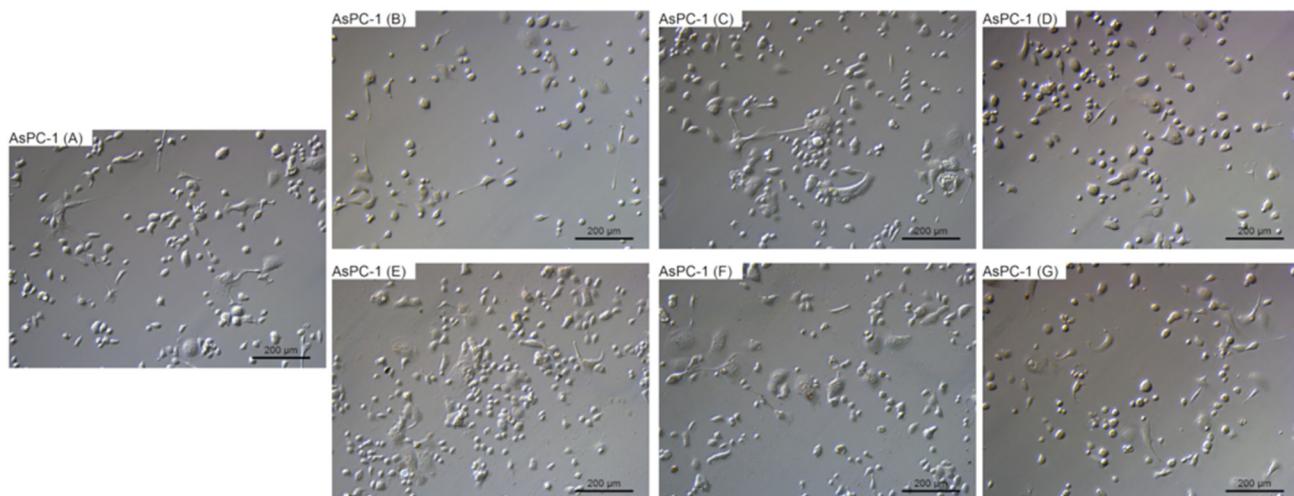
The most detrimental effect on the HS-5 cells was observed in the group that was treated with GO at the lowest tested concentration, 10 mg/L, and after ND 100 mg/L, causing 55% and 54% decreases in cell vitality, respectively. After  $C_60(OH)_{40}$  administration, the cells viability decreased from 81% after exposure to the lowest tested concentration—10 mg/L to 51% in the highest tested concentration—200 mg/L. Furthermore, a dose-dependent reaction was observed (Figure 5D).

#### 2.4. Morphological Evaluation

To evaluate the changes in cell morphology that was caused by particular NPs, live imaging was performed. Figures 6–9 show the general external morphology of the control (A), metallic NPs–treated cells (B, C, D), and the carbon-based nanomaterials (E, F, G). No significant changes in the morphology were observed after metallic NPs and  $C_60(OH)_{40}$  administration in every tested cell line; the cells were similar to the control in every group. However, microscopy studies revealed that, after exposure to ND and GO, cell morphology began to change.



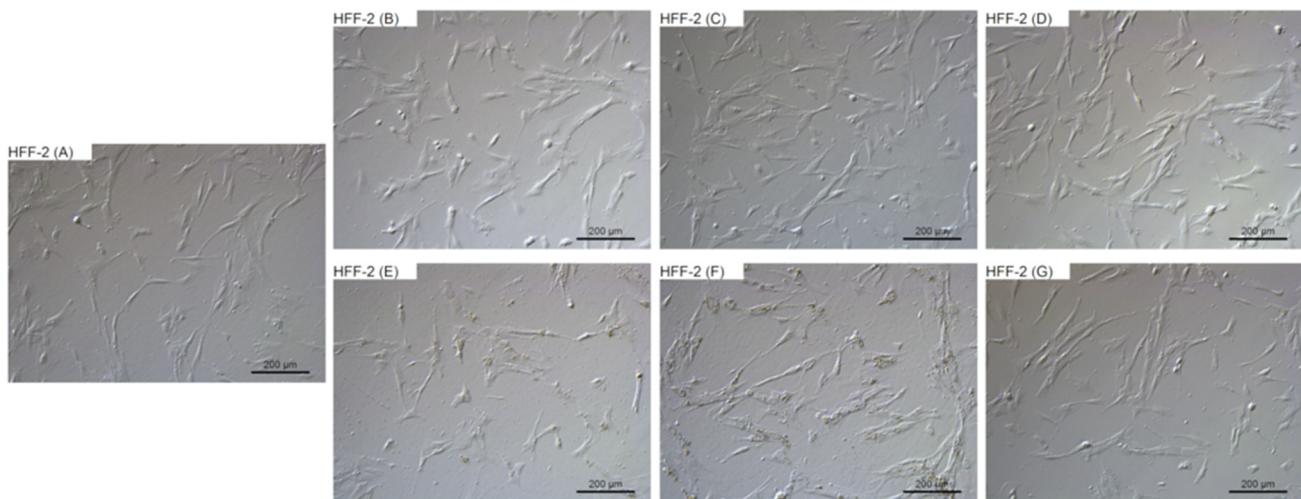
**Figure 6.** Morphological characterization of the BxPC-3 human pancreatic adenocarcinoma cell line. The cells were treated with metallic NPs at a concentration of 1 mg/L and carbon-based nanomaterials at a concentration of 10 mg/L. The incubation period lasted for 24 h. (A) control were treated with ultrapure water, (B) cells were treated with Ag, (C) cells were treated with Au, (D) cells were treated with Pt, (E) cells were treated with GO, (F) cells were treated with ND, and (G) cells were treated with  $C_60(OH)_{40}$ .



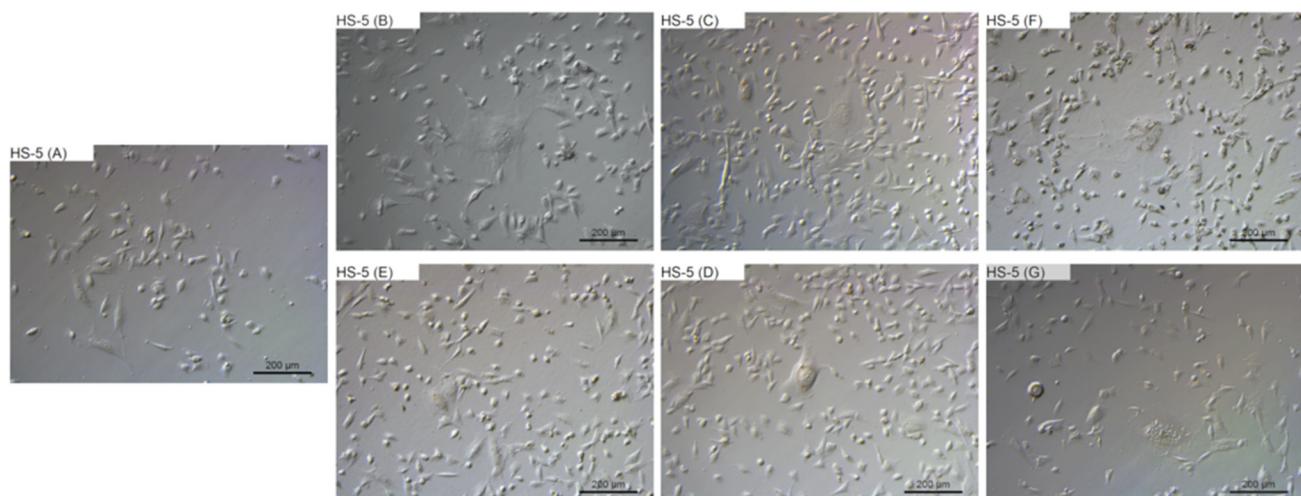
**Figure 7.** Morphological characterization of the AsPC-1 human pancreatic adenocarcinoma cell line. The cells were treated with metallic NPs at a concentration of 1 mg/L and carbon-based nanomaterials at a concentration of 10 mg/L. The incubation period lasted for 24 h. (A) control were treated with ultrapure water, (B) cells were treated with Ag, (C) cells were treated with Au, (D) cells were treated with Pt, (E) cells were treated with GO, (F) cells were treated with ND, and (G) cells were treated with  $C_60(OH)_{40}$ .

ND was taken up by the cells, or was adsorbed onto its surface, even at the lowest tested concentration of 10 mg/L. ND agglomerates were visible as black spots (Figures 6F, 7F, 8F and 9F). As the concentration of diamond nanoparticles increased, the BxPC-3 and AsPC-1 cells appeared to become overloaded with nanoparticles and began to shrink. Some of them even became rounded and detached from the growth substrate (Figures 6F and 7F). In the non-cancer cell lines, such a strong cell body contraction was not observed (Figures 8F and 9F).

The GO were also localized in the cytoplasm or formed clusters on the cell surfaces (Figures 6E, 7E, 8E and 9E). In lower concentrations, the cells tended to shrink more than in the higher concentrations. The analysis showed that, at a concentration of 50 mg/L and higher, the treated cells remained similar to those from the control group.



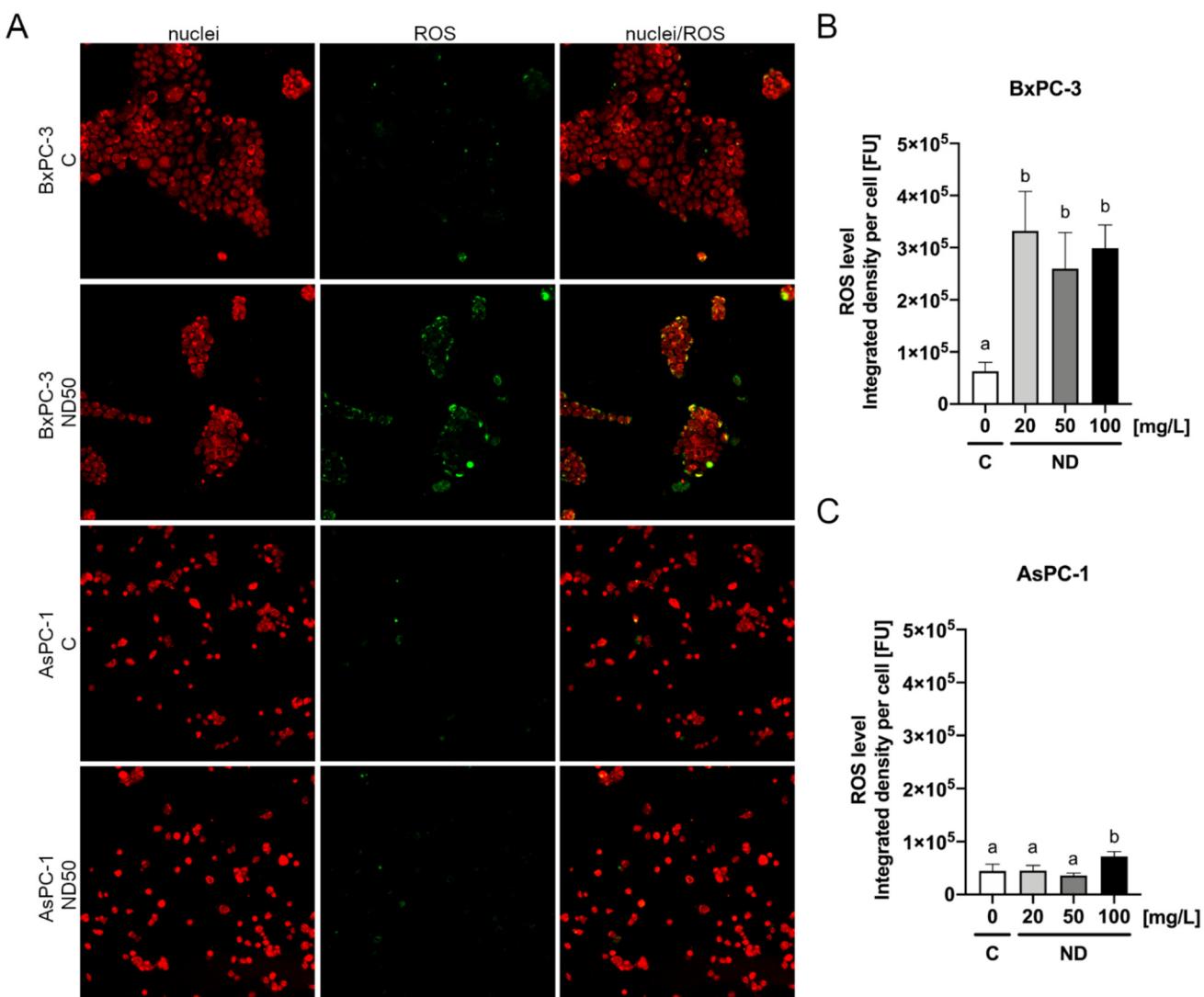
**Figure 8.** Morphological characterization of the HFFF-2 human fibroblast cell line. The cells were treated with metallic NPs at a concentration of 1 mg/L and carbon-based nanomaterials at a concentration of 10 mg/L. The incubation period lasted for 24 h. (A) control were treated with ultrapure water, (B) cells were treated with Ag, (C) cells were treated with Au, (D) cells were treated with Pt, (E) cells were treated with GO, (F) cells were treated with ND, and (G) cells were treated with  $C_{60}(OH)_{40}$ .



**Figure 9.** Morphological characterization of the HS-5 human-bone-marrow-derived cell line. The cells were treated with metallic NPs at a concentration of 1 mg/L and carbon-based nanomaterials at a concentration of 10 mg/L. The incubation period lasted for 24 h. (A) control were treated with ultrapure water, (B) cells were treated with Ag, (C) cells were treated with Au, (D) cells were treated with Pt, (E) cells were treated with GO, (F) cells were treated with ND, and (G) cells were treated with  $C_{60}(OH)_{40}$ .

## 2.5. Reactive Oxygen Species Detection

Detection of reactive oxygen species was performed following the pancreatic cancer cells treatment with ND. The analysis revealed that ND even at the lowest tested concentration, 20 mg/L, contributed to an increased level of ROS in the BxPC-3 cells (Figure 10), whereas a significant increase of ROS in the AsPC-1 cells was only observed after ND treatment at the concentration of 100 mg/L (Figure 10).



**Figure 10.** ROS detection after 2 h of incubation of the AsPC-1 and BxPC-3 cell lines with ND at the concentrations of 20 mg/L, 50 mg/L, and 100 mg/L determined using the general oxidative stress indicator CM-H2CFDA (A). The results are presented as the integrated density per cell (mean from seven replications with standard deviation) (B,C). Different letters above columns indicate statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

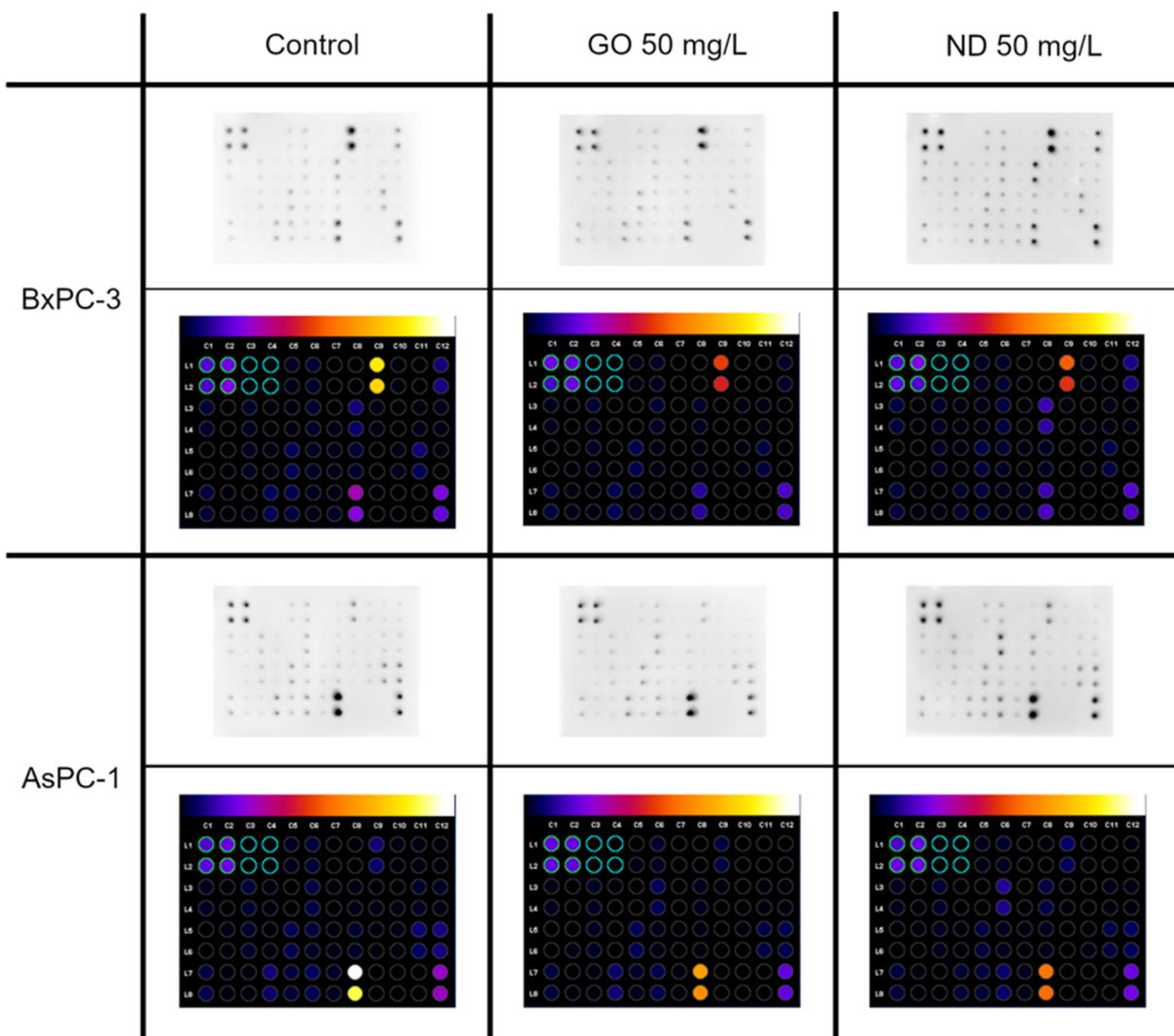
### 2.6. Cytokine Array

The next analysis to be performed was the cytokine assay. The levels of 40 different pro-inflammatory proteins were determined. In this analysis, only the BxPC-3 and AsPC-1 cell lines were investigated. The locations of particular proteins on the membrane are presented in Table 2.

There were several changes in the pro-inflammatory protein levels that were observed; one of them was similar in both of the cell lines. They displayed a lower level of TIMP-2 after exposure to ND 50 mg/L and GO 50 mg/L compared with the control (Figure 11). However, there were also unique changes in the protein levels for each cell line that was observed. AsPC-1 showed an increased level of IL-6sR and a decreased level of TNF- $\beta$  after ND 50 mg/L treatment. Furthermore, the ICAM-1 level was decreased in the group that was incubated with GO 50 mg/L, while in the BxPC-3 cell line, a lower level of IL-1a and a higher level of IL-8 was observed after GO 50 mg/L treatment. Moreover, a decreased level of ICAM-1 was observed after treatment with both GO and ND (Figure 11).

**Table 2.** Location of specific proteins on the membrane.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Pos	Pos	Neg	Neg	EOTAXIN	EOTAXIN-2	GCSF	GM-CSF	ICAM-1	INF-γ	I-309	IL-1α
2	Pos	Pos	Neg	Neg	EOTAXIN	EOTAXIN-2	GCSF	GM-CSF	ICAM-1	INF-γ	I-309	IL-1α
3	IL-1b	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
4	IL-1b	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
5	IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MIP-1α	MIP-1β	MIP-1δ
6	IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MIP-1α	MIP-1β	MIP-1δ
7	RANTES	TGF-β1	TNF-α	TNF-β	s TNF RI	s TNF RII	PDGF-BB	TIMP-2	BLANK	BLANK	Neg	Pos
8	RANTES	TGF-β1	TNF-α	TNF-β	s TNF RI	s TNF RII	PDGF-BB	TIMP-2	BLANK	BLANK	Neg	Pos



**Figure 11.** Pro-inflammatory protein expression after 24 h of incubation of the AsPC-1 and BxPC-3 cell lines with ND and GO, at a concentration of 50 mg/L, as determined by the human inflammation antibody array-membranes. The control group was treated with the same volume of ultrapure water. The results are normalized to the control groups. Images were created with ImageJ software.

### 3. Discussion

As many proven therapeutic approaches in cancer treatment, such as surgery, radiation therapy, chemotherapy, or immunotherapy, have their limitations, an urgent need for a novel strategy has emerged. The purpose of this investigation was to evaluate the toxicity of different metallic (Ag, Au, and Pt) and carbon-based (GO, ND, and  $C_{60}(OH)_{40}$ )

nanomaterials at different concentrations. To date, there are not many studies exploring the potential usage of NPs as an anticancer agent against pancreatic cancer. Morphological analysis revealed that every tested cell line (cancer: BxPC-3, AsPC-1, and non-cancer: HFFF-2, HS-5) did not exhibit any visible changes after Ag and Au treatment. There were no clusters of NPs that were observed on the cell membrane or inside the cell body. Nevertheless, there is some evidence that metallic NPs such as Ag and Au can enter the cells via an active internalization mechanism [39]. They may also act as a so-called Trojan horse, contributing to the release of relatively toxic ions in the acidic environment of lysosomes. This phenomenon has been reported as the lysosome-enhanced Trojan horse effect as the conditions prevailing in the lysosomes promote particle degradation and modulate their toxicity [40]. Furthermore, Au is thought to be able to interact with phosphorus groups in DNA, which can lead to a loss of viability or trigger the same effect by reacting with the sulphur agents in proteins [41]. However, our study did not reveal any significant loss of viability in the BxPC-3 and HFFF-2 cells, even at the highest tested concentration 5 mg/L. Nevertheless, after NP administration to AsPC-1 and HS-5, the viability decreased slightly, suggesting that the AsPC-1 cell line might be more vulnerable to the cytotoxic effects of metallic NPs. According to Abdolhosseini et al., Au has a toxic effect on HT-29 colon cancer cells. In the abovementioned study, the inhibitory concentration after a 72-h incubation period was estimated at the level of 419.7 mg/L [42]. Furthermore, another study showed that both Au and Ag display toxicity against the colon cancer cell line HT-116, even after a 24-h incubation period at concentrations of 100 and 200 mg/L [13]. The release of toxic ions is strongly dependent on the exposure time and the pH. Moreover, in the first 24 h of incubation in an acidic environment, significantly more ions are released from Ag rather than Au NPs, whereas a neutral environment does not promote NP degradation [40].

As with Ag and Au, after Pt treatment, there were no obvious morphological changes in any of the cell lines that were analysed. Notably, there are many factors underlying Ag and Au toxicity that depend on the concentration, exposure time, environment, and the mechanism of entry into the cells, as the NPs taken up by means other than endocytosis are less prone to ion release [40]. According to Bendale et al., the cytotoxicity of Pt towards mammalian cells strongly depends on the cell type [43]. Our study revealed that, like other tested metallic NPs, Pt only affected the viability of AsPC-1 and HS-5 cells, causing a 20% and 23% decrease, respectively, at the highest tested concentration. The previously mentioned study showed that Pt can affect the pancreatic cancer cell line Mia-Pa-Ca-2. The cell response was measured by a significant decrease in cell viability that was obtained after a 48-h incubation period with NPs at a concentration of 200 mg/L. Furthermore, it seems that the pancreatic cancer cells are less prone to the negative effects that are caused by Pt NPs than lung cancer (A549) or ovarian adenocarcinoma (PA-1) [43]. Our study indicates a near absence of toxicity of colloidal Ag, Au, and Pt towards BXPC-3 and HFFF-2 cells. However, the results of the MTT assay (Figure 4), which showed decreased viability of AsPC-1 cells after treatment with metallic NPs at the highest tested concentrations, suggests that increasing the NP concentration and extending the incubation time may contribute to greater anticancer effects towards the metastatic type of pancreatic cancer cells. Interestingly, the same NPs at the same concentrations influenced only one of the two tested pancreatic cancer lines. This phenomenon might be related to the specific response to oxidative stress when  $H_2O_2$  is present as the AsPC-1 cell line is characterized by a downregulated ability to remove  $H_2O_2$  compared with that of the normal cells such as H6c7, normal human fibroblasts, normal human astrocytes, HBePC, red blood cells, or even HF74int [44], whereas the presence of  $H_2O_2$  in BxPC-3 cells promotes epithelial-mesenchymal transition [45]. Nevertheless, more research is needed to evaluate the anticancer potential of those NPs.

Carbon-based NPs have attracted widespread interest due to their unique characteristics and wide range of possible applications.  $C_{60}(OH)_{40}$ , unlike fullerene, is available to biological systems because of its high-water solubility [46]. Our studies confirmed the reports of the non-toxic characteristic of  $C_{60}(OH)_{40}$  [47], as there was no decrease in

metabolic activity that was observed in the BxPC-3, AsPC-1, and HFFF-2 cell lines at any of the concentrations that were tested. On the other hand, other results regarding fullerenol toxicity demonstrated dependency on concentration [48] and cell type [49]. Lower cell viability after  $C_{60}(OH)_{40}$  treatment may be caused by the increased micronuclei formation (MN), which is a result of unsuccessful chromosomal DNA division in the M-phase of the cell cycle [50]. The performed analysis revealed that  $C_{60}(OH)_{40}$  NPs can penetrate the cytoplasm or form deposits on the cell surface. We assume that, because of the specific round shape of those NPs and their ability to suppress the lipid peroxidation process [34], they can penetrate into the cytoplasm without damaging cell membrane, as evidenced by the results of LDH assay (Figure 3).

An additional aim of the analysis was to assess the cytotoxic properties of GO against pancreatic cancer cell lines. It is not entirely clear whether GO displays cytotoxic properties. Some studies suggest that this phenomenon strongly depends on the size of nanomaterial flakes, their concentration, and exposure time [47]. The viability assay revealed that, in the case of the HFFF-2 cell line, there was no cytotoxic effect. This finding is in line with those of Bengtson et al., who showed no effect of GO on murine lung epithelial FE1 cells [51] even at the highest tested concentration, 200 mg/L. Another research team confirmed that thesis, demonstrating no cytotoxic effect of purified GO on the human lung carcinoma cell line A549 at doses up to 100 mg/L [52]. By contrast, there are also many studies showing GO cytotoxicity. Glioblastoma cell lines, U118 and U87, displayed significantly decreased vitality after GO treatment at a concentration of 100 mg/L [53]. Moreover, human dermal fibroblasts (HDF) also displayed lower cell viability when exposed to GO at doses that were greater than 50 mg/L [54]. Similarly, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) showed a dose-dependent response toward GO [55]. Our studies showed that BxPC-3, AsPC-1, and HS-5 cells displayed decreased viability after GO treatment, even at the lowest tested concentration, 10 mg/L. According to Chang et al., GO can induce oxidative stress in a dose-dependent manner [22]. This process was suggested as one of the possible mechanisms underlying carbon-based nanomaterial cytotoxicity [23]. In AsPC-1, HFFF-2, and HS-5 cell lines, there was an increase in cell viability following introduction of GO at a dose of 50 mg/L or higher. This phenomenon might be a result of the formation of a nanofilm-like structure from GO flakes that sediment as the concentration of the nanomaterial rises, which can promote cell proliferation [56]. Another possible mechanism of GO toxicity evolves membrane damage. Some research suggests that flakes are highly likely to perforate the cell membrane when entering the cell body [57]. However, our studies did not confirm that thesis as LDH leakage remained similar to that in the control group. Only the AsPC-1 and HFFF-2 cell lines seemed to be more vulnerable to the negative effect of GO and displayed an increased level of LDH in the culture medium compared with the control resulting in 3% and 8% of cytotoxicity, respectively (Figure 3). For a better understanding of how GO influences pancreatic cancer cells, a cytokine array was performed. In both of the cancer cell lines, lower levels of TIMP-2 and the intracellular adhesion molecule, ICAM-1, were noted. TIMP-2 is a matrix metalloproteinase inhibitor that is involved in extracellular matrix degradation. Lowering of its levels may lead to the intensification of cancer cell migration and formation of secondary metastasis. As GO may induce oxidative stress in cancer cells, we suggest that epithelial-mesenchymal transition might be induced through the activation of the  $H_2O_2/ERK/NF-\kappa B$  axis. This phenomenon occurs in different human pancreatic cancer lines, for example, BxPC-3 cells or Panc-1. In the presence of  $H_2O_2$ , the cells gain a mesenchymal phenotype that leads to increased invasion and migration ability [45]. Several changes taking place in a cancer cell make it less susceptible to anoikis [58] and drugs [59]. Moreover, treatment of the BxPC-3 cell line with GO resulted in a decrease in IL-1 $\alpha$  and IL-8 protein levels. Both interleukins take part in the positive regulation of angiogenesis. These results suggest that GO can inhibit the formation of new blood vessels in the tumour microenvironment.

Since ND expresses some unique anticancer properties, its cytotoxic properties towards certain pancreatic cancer lines were evaluated. The effect of ND on different cell

types is still a subject of intensive study. These NPs have even been considered to be a drug carrier agent as they are characterized by high cell uptake and low cytotoxicity [60,61]. However, our studies revealed that ND displays cytotoxicity towards all of the tested cancer and non-cancer cell lines. It has been observed that ND toxicity depends not only on the concentration and exposure time but also on the cell type [62]. Our studies show that BxPC-3 cells are the most vulnerable to ND of all of the cell lines that were tested, showing a dose-dependent decrease in viability. An almost 30% loss in viability was observed, even at the lowest tested concentration (10 mg/L) (Figure 5). However, it has been demonstrated that ND also promotes a cytotoxic effect on another pancreatic cancer cell line, AsPC-1, also showing a dose-dependent reaction. Data that were obtained in the present research agrees with the findings of other studies concerning ND-induced cytotoxicity [63,64].

The other factor underlying the cytotoxicity issue is NP size. Nanoparticles used in our studies reached a size from 3 to 4 nm. In general, the smallest NPs can induce the most pronounced toxic effect. According to Dworak et al., ND below 1 nm in diameter may contribute to the most visible impact [62]. It was previously reported that ND, even in non-toxic concentrations, have genotoxic properties and may contribute to oxidative DNA damage and MN formation. As oxidative stress is one of the possible cytotoxic mechanisms of ND, the level of ROS was investigated. Interestingly this analysis revealed that treatment with ND of the BxPC-3 cell line, that was more vulnerable to ND, caused a higher level of ROS induction compared to the AsPC-1 cells (Figure 10). Moreover, the data that were obtained from the viability assay are in agreement with those obtained from ROS detection assay. This finding may suggest that ROS production is one of the factors underlying the cytotoxicity mechanism of ND. Furthermore, the obtained results regarding oxidative stress are in line with findings of other research teams, where they proved that ND treatment causes an increased level of ROS in A549, HaCaT, and HeLa [65,66]. We assumed that the revealed toxic effect was more pronounced in the BxPC-3 cell line than in AsPC-1 because BxPC-3 cells were more likely to divide under the experimental conditions. What is more, it is suggested that the occurrence of the phenomenon of ND-stimulated ROS production may be cell line-specific [66] which would also explain the higher sensitivity of the BxPC-3 cells.

The two cell lines displayed different morphologies (Figures 6A and 7A). To assess whether ND damaged cell membranes and whether both of the cell lines reacted similarly, LDH leakage measurements were performed. In the case of the more sensitive cell line (BxPC-3), higher LDH leakage was observed than in the AsPC-1 cell line (Figure 3). Interestingly, in the case of non-cancer cell lines (HFFF-2 and HS-5), the highest LDH leakage was observed at a concentration of 50 mg/L. It is well known that ND can adsorb proteins on its surface and has a good loading capacity [64]. Furthermore, both of the cell lines are characterized by the expression of genes encoding mucins, which play a protective role. We propose that the different mucin profiles corresponding to the different cell characteristics (metastatic and non-metastatic) may be associated with increased BxPC-3 cell sensitivity to ND injury; however, to confirm this statement, more data are needed.

Furthermore, exposure to ND provoked the expression of different pro-inflammatory proteins (Figure 11). In the BxPC-3 cell line, we have observed a higher level of IL-8, which may act as a positive regulator of angiogenesis but a lower level of TIMP-2, which is an inhibitor of matrix metalloproteinases and a lower level of intracellular adhesion molecule ICAM-1, which may also increase the permeability of blood vessels. Whereas, in AsPC-1, apart from the slightly higher level of IL-8 and a decrease in TIMP-2 chemiluminescence, a lower level of TNF- $\beta$  was observed. Tumour necrosis factor may be responsible for the increased mortality rate of tumour cells as it can induce apoptosis in certain tumour cell lines.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Carbon-Based and Metallic Family Nanoparticles

GO and ND were obtained from SkySpring Nanomaterials (Houston, TX, USA). The average diameter of GO varied from 1 to 2  $\mu\text{m}$ , with an obtained thickness of less than 2 nm. According to the manufacturer, greater than 99% purity was obtained. The average ND size was in the range of 3–4 nm, with greater than 95% purity.

$\text{C}_{60}(\text{OH})_{40}$  were obtained from US Research Nanomaterials (Houston, TX, USA). The material is more than 99% pure fullerene ( $\text{C}_{60}$ ) coated with over 40 hydroxyl groups.

GO, ND, and  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{40}$  nanoparticles were diluted in ultrapure water to a concentration of 2000 mg/L and then sonicated at 500 W and 20 kHz for 1 min using a Vibra-Cell<sup>TM</sup> Ultrasonic Liquid Processor (Sonics & Materials, Newton, CT, USA). Subsequently, from the 2000 mg/L stock solutions, the following 10 $\times$  concentrated solutions were made in ultrapure water: 100, 200, 500, and 1000 mg/L.

Colloidal water suspensions of the metallic NPs were obtained from Nano-Koloid (Warsaw, Poland) with the following concentrations: Pt—100 mg/L, Au—50 mg/L, and Ag—50 mg/L. They were sonicated at 500 W and 20 kHz for 1 min. From the stock solutions (100 mg/L and 50 mg/L), the following 10 $\times$  concentrated solutions were prepared: 1, 5, 10, 20, and 50 mg/L.

### 4.2. Physicochemical Analysis of Metallic and Carbon-Based Nanostructures

The ultrastructure of the chosen nanomaterials was analysed using a JEM-1220 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) at 80 KeV with a Morada 11 megapixel camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany).

A Zeta Sizer Nano-ZS90 analyser (Malvern, Worcestershire, UK) was used to perform zeta potential measurements using a Smoluchowski approximation at 25 °C at a concentration of 20 mg/L for all of the nanomaterials, followed by an investigation of the hydrodynamic diameter of the nanomaterials that were suspended in ultrapure water at a concentration of 25 mg/L for metallic NPs, and 20 mg/L for the carbon-based nanomaterials. The measurements were performed by dynamic light scattering (DLS). Before analysis was performed, the water suspensions of NPs were first sonicated at 500 W and 20 kHz for 2 min and then centrifuged (5 min, 5000 $\times g$  rpm).

### 4.3. Cell Lines

A total of four cell lines were used in the study: two pancreatic adenocarcinoma cell lines, AsPC-1 and BxPC-3, and two non-cancer cell lines, HFFF-2 fibroblasts and HS-5 bone-marrow-derived cells. All of the cell lines were obtained from the ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). AsPC-1 and BxPC-3 cell lines were cultured in RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) that was supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, Gibco) and a 1% antibiotic mix (Antibiotic-Antimycotic, Gibco) of penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and Gibco amphotericin B (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). HS-5 and HFFF-2 were cultured in DMEM (Gibco) that was supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic. All of the cell lines were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere that contained 5% of CO<sub>2</sub>. Moreover, all of the cell lines are characterized by the type of adherent cells.

The cells were seeded at a density of  $1 \times 10^5$  cells/mL for the membrane integrity assay,  $1.5 \times 10^5$  cells/mL for the viability assay, and  $5 \times 10^5$  cells/mL for morphological analysis. For both the membrane integrity and viability assays, the cells were seeded on a 96-well microplate (Corning, NY, USA) in 100  $\mu\text{L}$  of medium per well. For morphological analyses, the cells were seeded on a 12-well plate (Corning) in 2 mL of medium per well. Subsequently, 24 h after seeding, when the cells were fully attached, 10% of the medium was exchanged with the exact volume (10  $\mu\text{L}/\text{well}$  on a 96-well microplate; 200  $\mu\text{L}/\text{well}$  on a 12-well microplate; 300  $\mu\text{L}/\text{well}$  on a 6-well microplate) of 10 $\times$  concentrated solutions of GO, ND,  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{40}$ , Pt, Au, and Ag, to obtain the final concentrations of 10, 20, 50, 100, and 200 mg/L carbon-based nanomaterials and 0.1, 0.5, 1, 2, and 5 mg/L metallic NPs.

directly in the cell culture media. The cells were incubated for a further 24 h before tests were performed.

#### 4.4. Membrane Integrity

A LDH activity assay (LDH, Roche, Switzerland) was used to evaluate the cell membrane integrity. The test is based on an enzymatic reaction in which LDH catalyses the conversion of lactate to pyruvate by the reduction of NAD<sup>+</sup> to NADH, which then interacts with a specific probe to produce a colour. The change in the media colour, relative to that of a control group, indicates leakage of LDH from damaged cells. This analysis was performed in three independent experiments with six replications for each group.

The lysis buffer was added to wells in triplicate to evaluate the maximum level of LDH in the probe and incubated for 45 min. To evaluate spontaneous LDH leakage, 10 µL of ultrapure water was added to another triplet of wells. The microplates were then centrifuged (10 min, 200× g) to remove arisen clusters of NPs. Afterward, 50 µL of the supernatant was transferred to a new plate. A total of 100 µL of LDH reaction mixture was added to the probes and incubated for 30 min at room temperature protected from light. Spectrophotometer readings were performed at a wavelength of 490 nm (reference wavelength: 690 nm) in a microplate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).

The results are presented as a % of the maximum LDH release and were calculated from the following formula:

$$\% \text{ of cytotoxicity} = \frac{A - \text{spontaneous LDH leakage}}{\text{MAX LDH} - \text{spontaneous LDH leakage}} \times 100\%$$

where  $A$  is the mean absorbance of the treated group, MAX LDH is the mean absorbance of the triplet of wells where the cells were lysed, and spontaneous LDH leakage is the mean absorbance from the triplet that was treated with 10 µL of ultra-pure water.

#### 4.5. Viability Assay

For the evaluation of cell viability after treatment with GO, ND, C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub>, Pt, Au, and Ag, the MTT test was performed. The MTT test is based on the conversion of a yellow, soluble tetrazolium salt into strongly pigmented, purple formazan crystals by mitochondrial succinate dehydrogenase of metabolically active cells. This analysis was performed in three independent experiments with six replications.

The culture medium containing the nanoparticles was removed, and 100 µL per well of fresh medium was added. The MTT (Thermo Fisher Scientific) reagent was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a concentration of 5 mg/mL and 10 µL was introduced into each well. After 4 h of incubation in 37 °C, the culture medium was removed, and formazan crystals were dissolved in 200 µL of solubilization detergent (Isopropanol, Triton X-100, 0.01N HCl). Afterwards, the microplates were centrifuged (10 min, 200× g) to remove the arisen NP clusters, and 100 µL of supernatant was transferred to a new plate. The spectrometer readings were performed at a wavelength of 570 nm in a microplate reader.

The results are presented as % of control and were calculated from the following formula:

$$\% \text{ of control} = \frac{A}{C} \times 100\%$$

where  $A$  is the mean absorbance of the treated group, and  $C$  is the mean absorbance of the control.

#### 4.6. Morphological Evaluation

For cell morphological evaluation, the viable cells were visualized without any staining. For live imaging, a Leica DMi8 microscope (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany) equipped with a Leica MC 190 HD camera was used.

#### 4.7. Reactive Oxygen Species Detection

The evaluation of reactive oxygen species (ROS) induction after ND treatment was assessed using the general oxidative stress indicator, CM-H2DCFDA (Thermo Fisher Scientific). BxPC-3 and AsPC-1 cells were seeded at the density of  $1.4 \times 10^5$  cells/mL in ibiTreat 15 μ-Slide (ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) in 60 μL of medium per well. After 24 h, the medium was replaced with fresh medium that was supplemented with 10% of ND suspension to obtain a final concentration of 20 mg/L, 50 mg/L, and 100 mg/L or 10% dH<sub>2</sub>O for the control. After 2 h of incubation CM-H2DCFDA in PBS with Ca<sup>2+</sup> (Thermo Fisher Scientific) at the final concentration of 5 μM was added to each well. After 20 min cells were washed and the nuclei were stained with NucRed Live 647 (Thermo Fisher Scientific) for 20 min in full medium. The cells were washed with fresh medium and the ROS level was analyzed with a confocal microscope, FV-1000 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), that was equipped with an incubation chamber that maintained a temperature of 37 °C (Solent Scientific Ltd., Portsmouth, UK) and an on-stage chamber that maintained 5% CO<sub>2</sub> in air (PeCon GmbH, Erbach, Germany). The cells were imaged sequentially using 20× objective at excitation and emission of 495/525 nm (CM-H2DCFDA) and 642/661 nm (NucRed Live 647). All images were taken using the same laser parameters. The experiment was carried out in seven replications and each well was imaged four times. The ROS levels were expressed as a sum of the pixel values per cell. Analysis and cell counting was performed using Fiji software [67]. The cell number on each image was assessed by the thresholding of channel with the stained cell nuclei, followed by watershed segmentation, and analyzed particles function.

#### 4.8. Cytokine Array

For the assessment of the induced inflammatory response, the human inflammation antibody array-membranes (40 targets, Abcam, Cambridge, UK) were used. This method is an antibody-paired-based assay. The antibodies that are placed on the membrane in spots bind to the specific proteins that are present in the sample followed by pairing with biotinylated detector antibody and streptavidin HRP. The membrane detects 40 different cytokines, and the results are visualized by chemiluminescent detection.

AsPC-1 and BxPC-3 lines were treated with GO and ND at a concentration of 50 mg/L for 24 h. Afterward, the cells were washed three times with cold PBS and centrifuged (4 °C, 10 min, 200× g). The pellet was immediately frozen for later use. The protein was extracted using TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) at a speed of 50 osc/s for 3 min, after suspending the cells in the lysis buffer that was dedicated to the performed analysis. the samples were then centrifuged (12,000× g rpm, 10 min), and the supernatant was transferred to a new microtube. The protein concentration was determined using the BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

First, the membranes were washed in 2 mL of blocking buffer for 30 min. Then, those membranes were incubated overnight with 200 μg of proteins per membrane. Each membrane was washed in 20 mL of wash buffer I followed by three washes in buffer I (2 mL, 5 min) and two washes in buffer II (2 mL, 5 min). Next, the membranes were incubated overnight with 1 mL of biotin-conjugated anti-cytokine antibodies. Subsequently, all of the washes were repeated, and the membranes were incubated overnight with 2 mL of HRP-conjugated streptavidin. Before detection, all of the washes were repeated. The results were visualized by chemiluminescence detection at multiple exposure times (from 10 s to 1 min) with the ChemiDoc1 Imaging System using Quantity One Basic Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

#### 4.9. Statistical Analysis

The data were analysed using mono-factorial analysis of variance: one-way ANOVA with Statgraphics® Plus 4.1 (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, USA). The differences between the groups were tested using Tukey's HSD multiple-range tests. The differences

with  $p < 0.05$  were considered significant. All of the mean values are presented with the standard deviation.

## 5. Conclusions

The results indicate that more pronounced cytotoxic effects against certain human pancreatic cancer cell lines were achieved after carbon-based NP treatment rather than metallic NPs. Interestingly Pt, Ag, and Au caused a decrease in cell viability but only in HS-5 and AsPC-1 cell lines.

The highest cytotoxicity was observed with the use of ND. Both of the cancer cell lines showed a dose-dependent viability decrease in the concentration range from 10 to 200 mg/L in the BxPC-3 cell line and from 50 to 200 mg/L in AsPC-1. Furthermore, BxPC-3 cell line was more sensitive to ND compared to AsPC-1 due to greater reduction in cell viability and induction of ROS. Moreover, GO and ND treatment changed the level of certain pro-inflammatory proteins. In both the BxPC-3 and AsPC-1 cell lines, GO at 50 mg/L reduced the signal intensity of TIMP-2 and ICAM-1 compared with the control groups, whereas ND at a concentration of 50 mg/L reduced the signal intensity of TIMP-2 and increased the IL-8 level in the AsPC-1 and BxPC-3 cell lines. This work provides critical data showing the different cytotoxicity levels of various nanoparticles against pancreatic adenocarcinoma cell lines.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms222212100/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.W., E.S. and M.W.; methodology, B.W. and M.W.; software, B.W. and K.D.; validation, B.S., M.S. and M.Z.-G.; formal analysis, J.S., B.W. and J.B.; investigation, B.W.; resources, M.W.; data curation, E.S.; writing—original draft preparation, B.W.; writing—review and editing, A.C. and M.W.; visualization, B.W.; supervision, M.W.; project administration, M.W.; funding acquisition, M.W. 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 2020/37/B/NZ7/03532.

**Data Availability Statement:** The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

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

## Abbreviations

Ag	silver
Au	gold
C <sub>60</sub> (OH) <sub>40</sub>	fullerenol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxide
FBS	foetal bovine serum
GO	graphene oxide
HDF	human dermal fibroblasts
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	intracellular adhesion molecule 1
IL-1a	interleukin 1
IL-8	interleukin 8
LDH	lactate dehydrogenase
MIP-1 $\beta$	macrophage inflammatory protein 1 $\beta$
MN	micronuclei
ND	nano diamond
NPs	nanoparticles
Pt	platinum

ROS	reactive oxygen species
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
TEM	transmission electron microscope
TIMP-2	tissue inhibitor of metalloproteinases 2
TNF- $\beta$	tumour necrosis factor $\beta$

## References

- Mizrahi, J.D.; Surana, R.; Valle, J.W.; Shroff, R.T. Pancreatic cancer. *Lancet* **2020**, *395*, 2008–2020. [[CrossRef](#)]
- Borowa-Mazgaj, B. Pancreatic cancer—mechanisms of chemoresistance. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2016**, *70*, 169–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Long, J.; Zhang, Y.; Yu, X.; Yang, J.; LeBrun, D.G.; Chen, C.; Yao, Q.; Li, M. Overcoming drug resistance in pancreatic cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **2011**, *15*, 817–828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Arlt, A.; Gehrz, A.; Müerköster, S.; Vorndamm, J.; Kruse, M.L.; Fölsch, U.R.; Schäfer, H. Role of NF- $\kappa$ B and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* **2003**, *22*, 3243–3251. [[CrossRef](#)]
- Takezaki, Y.; Namikawa, T.; Koyama, T.; Munekage, E.; Munekage, M.; Maeda, H.; Kitagawa, H.; Hanazaki, K. Antitumor effects of eribulin mesylate in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cell lines. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 6077–6082. [[CrossRef](#)]
- Aghebati-Maleki, A.; Dolati, S.; Ahmadi, M.; Baghbanzadeh, A.; Asadi, M.; Fotouhi, A.; Yousefi, M.; Aghebati-Maleki, L. Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. *J. Cell Physiol.* **2020**, *235*, 1962–1972. [[CrossRef](#)]
- Senapati, S.; Mahanta, A.K.; Kumar, S.; Maiti, P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2018**, *3*, 7. [[CrossRef](#)]
- Zhang, Y.; Qian, J.; Wang, D.; Wang, Y.; He, S. Multifunctional gold nanorods with ultrahigh stability and tunability for in vivo fluorescence imaging, SERS detection, and photodynamic therapy. *Angew. Chem. Int.* **2013**, *52*, 1148–1151. [[CrossRef](#)]
- Youssef, A.M.; Abdel-Aziz, M.S.; El-Sayed, S.M. Chitosan nanocomposite films based on Ag-NP and Au-NP biosynthesis by Bacillus Subtilis as packaging materials. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *69*, 185–191. [[CrossRef](#)]
- Jeyaraj, M.; Gurunathan, S.; Qasim, M.; Kang, M.H.; Kim, J.H. A comprehensive review on the synthesis, characterization, and biomedical application of platinum nanoparticles. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1719. [[CrossRef](#)]
- Sobhani Poor, M.H.; Khatami, M.; Azizi, H.; Abazari, Y. Cytotoxic activity of biosynthesized Ag Nanoparticles by *Plantago major* towards a human breast cancer cell line. *Rend. Fis. Acc. Lincei* **2017**, *28*, 693–699. [[CrossRef](#)]
- Kuppusamy, P.; Ichwan, S.J.; Al-Zikri, P.N.H.; Suriyah, W.H.; Soundharajan, I.; Govindan, N.; Maniam, G.P.; Yusoff, M.M. In vitro anticancer activity of Au, Ag nanoparticles synthesized using *Commelina nudiflora* L. aqueous extract against HCT-116 colon cancer cells. *Biol. Trace Elem. Res.* **2016**, *173*, 297–305. [[CrossRef](#)]
- Wang, F.; Yu, L.; Monopoli, M.P.; Sandin, P.; Mahon, E.; Salvati, A.; Dawson, K.A. The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, *9*, 1159–1168. [[CrossRef](#)]
- Asharani, P.; Xinyi, N.; Hande, M.P.; Valiyaveettill, S. DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles Research Article. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 51–64. [[CrossRef](#)]
- Patil, M.P.; Kim, G.D. Marine microorganisms for synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *172*, 487–495. [[CrossRef](#)]
- Maiti, D.; Tong, X.; Mou, X.; Yang, K. Carbon-Based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Recent Study. *Front. Pharmacol.* **2019**, *9*, 1401. [[CrossRef](#)]
- Lee, J.; Kim, J.; Kim, S.; Min, D.H. Biosensors based on graphene oxide and its biomedical application. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *105*, 275–287. [[CrossRef](#)]
- Jaya Seema, D.M.; Saifullah, B.; Selvanayagam, M.; Gothai, S.; Hussein, M.Z.; Subbiah, S.K.; Mohd Esa, N.; Arulselvan, P. Designing of the anticancer nanocomposite with sustained release properties by using graphene oxide nanocarrier with phenethyl isothiocyanate as anticancer agent. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 109. [[CrossRef](#)]
- Xu, J.; Wang, H.; Hu, Y.; Zhang, Y.S.; Wen, L.; Yin, F.; Wang, Z.; Zhang, Y.; Li, S.; Miao, Y.; et al. Inhibition of CaMKII $\alpha$  Activity Enhances Antitumor Effect of Fullerene C60 Nanocrystals by Suppression of Autophagic Degradation. *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1233. [[CrossRef](#)]
- De Melo-Diogo, D.; Lima-Sousa, R.; Alves, C.G.; Costa, E.C.; Louro, R.O.; Correia, I.J. Functionalization of graphene family nanomaterials for application in cancer therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *171*, 260–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 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](#)] [[PubMed](#)]
- Sanchez, V.C.; Jachak, A.; Hurt, R.H.; Kane, A.B. Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials-An Interdisciplinary Review. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 15–34. [[CrossRef](#)]
- Jin, C.; Wang, F.; Tang, Y.; Zhang, X.; Wang, J.; Yang, Y. Distribution of graphene oxide and TiO<sub>2</sub>-graphene oxide composite in A549 cells. *Biol. Trace Elem. Res.* **2014**, *159*, 393–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Ahamed, M.; Akhtar, M.J.; Khan, M.A.M. Investigation of cytotoxicity, apoptosis, and oxidative stress response of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -RGO nanocomposites in human liver HepG2 cells. *Materials* **2020**, *13*, 660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hekmat, A.; Salavati, F.; Hesami Tackallou, S. The Effects of Paclitaxel in the Combination of Diamond Nanoparticles on the Structure of Human Serum Albumin (HSA) and Their Antiproliferative Role on MDA-MB-231cells. *Protein J.* **2020**, *39*, 268–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Tjo, K.; Varamini, P. Nanodiamonds and their potential applications in breast cancer therapy: A narrative review. *Drug Deliv. Transl. Res* **2021**, in press. [[CrossRef](#)]
28. Xiao, J.; Duan, X.; Yin, Q.; Zhang, Z.; Yu, H.; Li, Y. Nanodiamonds-mediated doxorubicin nuclear delivery to inhibit lung metastasis of breast cancer. *Biomaterials* **2013**, *34*, 9648–9656. [[CrossRef](#)]
29. Toh, T.B.; Lee, D.K.; Hou, W.; Abdullah, L.N.; Nguyen, J.; Ho, D.; Chow, E.K.H. Nanodiamond-mitoxantrone complexes enhance drug retention in chemoresistant breast cancer cells. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 2683–2691. [[CrossRef](#)]
30. Hao, T.; Li, J.; Yao, F.; Dong, D.; Wang, Y.; Yang, B.; Wang, C. Injectable fullerol/alginate hydrogel for suppression of oxidative stress damage in brown adipose-derived stem cells and cardiac repair. *ACS Nano* **2017**, *11*, 5474–5488. [[CrossRef](#)]
31. Xu, Y.; Zhu, J.; Xiang, K.; Li, Y.; Sun, R.; Ma, J.; Sun, H.; Liu, Y. Synthesis and immunomodulatory activity of [60]fullerene-tuftsin conjugates. *Biomaterials* **2011**, *32*, 9940–9949. [[CrossRef](#)]
32. Xu, B.; Yuan, L.; Hu, Y.; Xu, Z.; Qin, J.J.; Cheng, X.D. Synthesis, Characterization, Cellular Uptake, and In Vitro Anticancer Activity of Fullerol-Doxorubicin Conjugates. *Front. Pharmacol.* **2021**, *11*, 1685. [[CrossRef](#)]
33. Kovel, E.S.; Kicheeva, A.G.; Vnukova, N.G.; Churilov, G.N.; Stepin, E.A.; Kudryasheva, N.S. Toxicity and antioxidant activity of fullerol c60,70 with low number of oxygen substituents. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6382. [[CrossRef](#)]
34. Djordjevic, A.; Srdjenovic, B.; Seke, M.; Petrovic, D.; Injac, R.; Mrdjanovic, J. Review of synthesis and antioxidant potential of fullerol nanoparticles. *J. Nanomater.* **2015**, *2015*, 280. [[CrossRef](#)]
35. Elshater, A.E.A.; Haridy, M.A.M.; Salman, M.M.A.; Fayyad, A.S.; Hammad, S. Fullerene C60 nanoparticles ameliorated cyclophosphamide-induced acute hepatotoxicity in rats. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *97*, 53–59. [[CrossRef](#)]
36. Borović, M.L.; Ičević, I.; Kanački, Z.; Žikić, D.; Seke, M.; Injac, R.; Djordjević, A. Effects of fullerol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> nanoparticles on a single-dose doxorubicin-induced cardiotoxicity in pigs: An ultrastructural study. *Ultrastruct. Pathol.* **2014**, *38*, 150–163. [[CrossRef](#)]
37. Pickering, K.D.; Wiesner, M.R. Fullerol-sensitized production of reactive oxygen species in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1359–1365. [[CrossRef](#)]
38. Kovel, E.S.; Sachkova, A.S.; Vnukova, N.G.; Churilov, G.N.; Knyazeva, E.M.; Kudryasheva, N.S. Antioxidant activity and toxicity of fullerenols via bioluminescence signaling: Role of oxygen substituents. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2324. [[CrossRef](#)]
39. Iversen, T.G.; Skotland, T.; Sandvig, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today* **2011**, *6*, 176–185. [[CrossRef](#)]
40. Sabella, S.; Carney, R.P.; Brunetti, V.; Malvindi, M.A.; Al-Juffali, N.; Vecchio, G.; Janes, S.M.; Bakr, O.M.; Cingolani, R.; Stellacci, F.; et al. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale* **2014**, *6*, 7052–7061. [[CrossRef](#)]
41. Balashanmugam, P.; Durai, P.; Balakumaran, M.D.; Kalaichelvan, P.T. Phytosynthesized gold nanoparticles from *C. roxburghii* DC. leaf and their toxic effects on normal and cancer cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2016**, *165*, 163–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Miri, A.; Darroudi, M.; Entezari, R.; Sarani, M. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Prosopis farcta* extract and its in vitro toxicity on colon cancer cells. *Res. Chem. Intermed.* **2018**, *44*, 3169–3177. [[CrossRef](#)]
43. Bendale, Y.; Bendale, V.; Paul, S. Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through induction of apoptosis. *Integr. Med. Res.* **2017**, *6*, 141–148. [[CrossRef](#)]
44. Doskey, C.M.; Buranasudja, V.; Wagner, B.A.; Wilkes, J.G.; Du, J.; Cullen, J.J.; Buettner, G.R. Tumor cells have decreased ability to metabolize H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Implications for pharmacological ascorbate in cancer therapy. *Redox Biol.* **2016**, *10*, 274–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Li, W.; Cao, L.; Han, L.; Xu, Q.; Ma, Q. Superoxide dismutase promotes the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via activation of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ERK/NF-κB axis. *Int. J. Oncol.* **2015**, *46*, 2613–2620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Li, J.; Zhang, M.; Sun, B.; Xing, G.; Song, Y.; Guo, H.; Chang, Y.; Ge, Y.; Zhao, Y. Separation and purification of fullerenols for improved biocompatibility. *Carbon* **2012**, *50*, 460–469. [[CrossRef](#)]
47. Seabra, A.B.; Paula, A.J.; De Lima, R.; Alves, O.L.; Durán, N. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 159–168. [[CrossRef](#)]
48. Zha, Y.Y.; Yang, B.; Tang, M.L.; Chen, J.T.; Wen, L.P.; Wang, M. Concentration-dependent effects of fullerol on cultured hippocampal neuron viability. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 3099–3109. [[CrossRef](#)]
49. Su, Y.; Xu, J.Y.; Shen, P.; Li, J.; Wang, L.; Li, Q.; Li, W.; Xu, G.T.; Fan, C.; Huang, Q. Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fullerol in different cell lines. *Toxicology* **2010**, *269*, 155–159. [[CrossRef](#)]
50. Niwa, Y.; Iwai, N. Genotoxicity in cell lines induced by chronic exposure to water-soluble fullerenes using micronucleus test. *Environ. Health Prev. Med.* **2006**, *11*, 292–297. [[CrossRef](#)]
51. Bengtson, S.; Kling, K.; Madsen, A.M.; Noergaard, A.W.; Jacobsen, N.R.; Clausen, P.A.; Alonso, B.; Pesquera, A.; Zurutuza, A.; Ramos, R.; et al. No cytotoxicity or genotoxicity of graphene oxide in murine lung epithelial FE1 cells in vitro. *Environ. Mol. Mutagen.* **2016**, *57*, 469–482. [[CrossRef](#)]
52. 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](#)]

53. Jaworski, S.; Sawosz, E.; Kutwin, M.; Wierzbicki, M.; Hinzmann, M.; Grodzik, M.; Winnicka, A.; Lipińska, L.; Włodyga, K.; Chwalibog, A. In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 1585–1596. [[CrossRef](#)]
54. Wang, K.; Ruan, J.; Song, H.; Zhang, J.; Wo, Y.; Guo, S.; Cui, D. Biocompatibility of graphene oxide. *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, *6*, 8. [[CrossRef](#)]
55. Cheng, C.; Nie, S.; Li, S.; Peng, H.; Yang, H.; Ma, L.; Sun, S.; Zhao, C. Biopolymer functionalized reduced graphene oxide with enhanced biocompatibility via mussel inspired coatings/anchors. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 265–275. [[CrossRef](#)]
56. Chaudhuri, P.K.; Loh, K.P.; Lim, C.T. Selective accelerated proliferation of malignant breast cancer cells on planar graphene oxide films. *ACS Nano* **2016**, *10*, 3424–3434. [[CrossRef](#)]
57. Duan, G.; Zhang, Y.; Luan, B.; Weber, J.K.; Zhou, R.W.; Yang, Z.; Zhao, L.; Xu, J.; Luo, J.; Zhou, R. Graphene-induced pore formation on cell membranes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42767. [[CrossRef](#)]
58. Kalluri, R.; Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Investig.* **2009**, *119*, 1420–1428. [[CrossRef](#)]
59. Barnett, P.; Arnold, R.S.; Mezencev, R.; Chung, L.W.K.; Zayzafoon, M.; Odero-Marah, V. Snail-mediated regulation of reactive oxygen species in ARCaP human prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *404*, 34–39. [[CrossRef](#)]
60. Li, J.; Zhu, Y.; Li, W.; Zhang, X.; Peng, Y.; Huang, Q. Nanodiamonds as intracellular transporters of chemotherapeutic drug. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8410–8418. [[CrossRef](#)]
61. Zhu, Y.; Li, J.; Li, W.; Zhang, Y.; Yang, X.; Chen, N.; Sun, Y.; Zhao, Y.; Fan, C.; Huang, Q. The biocompatibility of nanodiamonds and their application in drug delivery systems. *Theranostics* **2012**, *2012*, 302–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Dworak, N.; Wnuk, M.; Zebrowski, J.; Bartosz, G.; Lewinska, A. Genotoxic and mutagenic activity of diamond nanoparticles in human peripheral lymphocytes in vitro. *Carbon* **2014**, *68*, 763–776. [[CrossRef](#)]
63. Schrand, A.M.; Huang, H.; Carlson, C.; Schlager, J.J.; Ōsawa, E.; Hussain, S.M.; Dai, L. Are diamond nanoparticles cytotoxic? *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 2–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Adach, K.; Fijalkowski, M.; Gajek, G.; Skolimowski, J.; Kontek, R.; Blaszczyk, A. Studies on the cytotoxicity of diamond nanoparticles against human cancer cells and lymphocytes. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *254*, 156–166. [[CrossRef](#)]
65. Horie, M.; Komaba, L.K.; Kato, H.; Nakamura, A.; Yamamoto, K.; Endoh, S.; Fujita, K.; Kinugasa, S.; Mizuno, K.; Haghjara, Y.; et al. Evaluation of Cellular Influences Induced by Stable Nanodiamond Dispersion; The Cellular Influences of Nanodiamond Are Small. *Diam. Relat. Mater.* **2012**, *24*, 15–24. [[CrossRef](#)]
66. Mytych, J.; Lewinska, A.; Bielak-Zmijewska, A.; Grabowska, W.; Zebrowski, J.; Wnuk, M. Nanodiamond-Mediated Impairment of Nucleolar Activity Is Accompanied by Oxidative Stress and DNMT2 Upregulation in Human Cervical Carcinoma Cells. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *220*, 51–63. [[CrossRef](#)]
67. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)]

## Supplementary materials

### Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3

Barbara Wójcik <sup>1</sup>, Ewa Sawosz <sup>1</sup>, Jarosław Szczepaniak <sup>1</sup>, Barbara Strojny <sup>1</sup>, Małwina Sosnowska <sup>1</sup>, Karolina Daniluk <sup>1</sup>, Marlena Zielińska-Górská <sup>1</sup>, Jaśmina Bałaban <sup>1</sup>, André Chwalibog <sup>2</sup> and Mateusz Wierzbicki <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland; barbara\_wojcik@sggw.edu.pl (B.W.); ewa\_sawosz\_chwalibog@sggw.edu.pl (E.S.); jaroslaw\_szczepaniak1@sggw.edu.pl (J.S.); barbara\_strojny@sggw.edu.pl (B.S.); malwina\_sosnowska@sggw.edu.pl (M.S.); karolina\_daniluk@sggw.edu.pl (K.D); marlena\_zielinska\_gorska@sggw.edu.pl (M.Z.); jasmina\_balaban@sggw.edu.pl (J.B.);

<sup>2</sup> Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Copenhagen, Groennegaardsvej 3, 1870 Frederiksberg, Denmark; ach@sund.ku.dk

\* Correspondence: mateusz\_wierzbicki@sggw.edu.pl

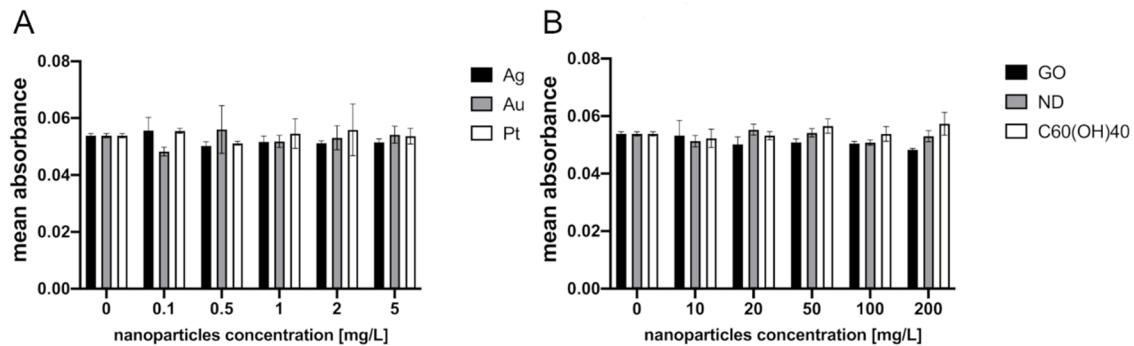
### Interference Analysis

In order to exclude the influence of nanomaterials on the result of MTT and LDH cytotoxicity assays interference analysis was performed. The performed analysis revealed a statistically significant influence of Ag nanoparticles at the concentrations of 2 mg/L and 5 mg/L on the results of colorimetric LDH reaction.

Firstly 90 µL of complete growth medium RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1% of antibiotic – antimycotic mix (Gibco) was added to the 96-well microplate. Subsequently 10 µL of 10x concentrated nanomaterials suspensions was added in order to obtain final concentration as follows: 0.1 mg/L; 0.5 mg/L; 1 mg/L; 2 mg/L; 5 mg/L for metallic (Ag, Au, Pt) nanoparticles and 10 mg/L; 20 mg/L; 50 mg/L; 100 mg/L; 200 mg/L for carbon-based nanomaterials (GO, ND, C<sub>60</sub>(OH)<sub>40</sub>) and incubated together in humidified atmosphere containing 5% of CO<sub>2</sub> at for 37°C for 24h.

The MTT and LDH interference analyses (Thermo Fisher Scientific) were carried out similarly to the cytotoxicity tests but without the presence of cells. For MTT interference (Figure S1) analysis MTT reagent (Thermo Fisher Scientific) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a concentration of 5 mg/mL and 10 µL was introduced into each well. After 4 h of incubation in 37°C, the culture medium was removed, and formazan crystals were dissolved in 200 µl of solubilization detergent (Isopropanol, Triton X-100, 0.01N HCl). Afterwards, microplates were centrifuged (10 min, 200 x g) and 100 µl of supernatant was transferred to a new plate. Spectrometer readings were performed at a wavelength of 570 nm in a microplate reader.

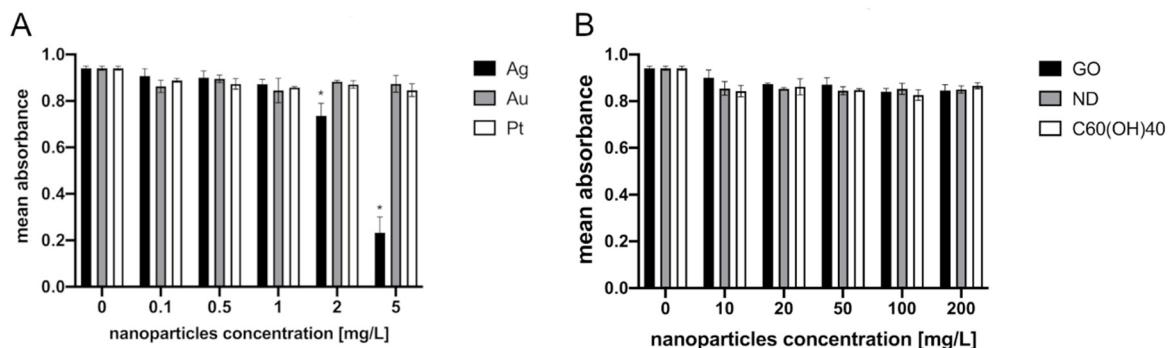
### MTT - interference analysis



**Figure S1.** MTT interference analysis. Interactions of MTT reagent and nanomaterials presented as the mean absorbance from 3 replications with standard deviation. A statistically significant difference between a group and the control was marked as \* p<0.05. Capital letters refer to different groups of nanomaterials: (A) metallic NPs, (B) carbon-based nanomaterials.

For LDH (Thermo Fisher Scientific) interference analysis (Figure S2) nanomaterials were incubated for 24 h in the prepared microplates. Subsequently, microplates were centrifuged (10 min, 200 x g) and 50 µL of supernatant was transferred into a new plate. One hundred microlitres of LDH reaction mixture was added to the probes and incubated for 30 minutes at room temperature, protected from light. Spectrophotometer readings were performed at a wavelength of 490 nm (reference wavelength: 690 nm) in a microplate reader (Tecan Group ltd., Männedorf, Switzerland).

### LDH - interference analysis



**Figure S2.** LDH interference analysis. Interactions of LDH reagent and nanomaterials presented as the mean absorbance from 3 replications with standard deviation. A statistically significant difference between a group and the control was marked as \* p≤0.05. Capital letters refer to different groups of nanomaterials: (A) metallic NPs, (B) carbon-based nanomaterials.

Warszawa, 26.09.2023r.

**mgr inż. Barbara Wójcik**  
barbara\_wojcik1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Ewa Sawosz Chwalibóg, Jarosław Szczepaniak, Barbara Strojny-Cieślak, Małwina Sosnowska, Karolina Daniluk, Marlena Zielińska-Górska, Jaśmina Bałaban, André Chwalibog, i Mateusz Wierzbicki. 2021. „Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3”. International Journal of Molecular Sciences 22: 1–21” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: wykonaniu wszystkich analiz, których wyniki przedstawione są zarówno w artykule jak i w suplementie dołączonym do artykułu; opracowaniu oraz wizualizacji uzyskanych danych; oraz na napisaniu i redakcji manuskryptu.

Podpis



Warszawa, 26.09.2023r.

**prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg**  
ewa\_sawosz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Ewa Sawosz Chwalibóg, Jarosław Szczepaniak, Barbara Strojny-Cieślak, Małwina Sosnowska, Karolina Daniluk, Marlena Zielińska-Górska, Jaśmina Bałaban, André Chwalibog, i Mateusz Wierzbicki. 2021. „Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3”. International Journal of Molecular Sciences 22: 1–21” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w stworzeniu koncepcji badań oraz weryfikacji danych uzyskiwanych w trakcie analiz.

Podpis



Warszawa, 26.09.2023r.

**mgr Jarosław Szczepaniak**  
jaroslaw\_szczepaniak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Ewa Sawosz Chwalibóg, Jarosław Szczepaniak, Barbara Strojny-Cieślak, Małwina Sosnowska, Karolina Daniluk, Marlena Zielińska-Górská, Jaśmina Bałaban, André Chwalibog, i Mateusz Wierzbicki. 2021. „Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3”. International Journal of Molecular Sciences 22: 1–21” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie formalnej manuskryptu.

Podpis

*Jarosław Szczepaniak*

Warszawa, 26.09.2023r.

**dr Barbara Strojny-Cieślak**  
barbara\_strojny-cieslak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Ewa Sawosz Chwalibóg, Jarosław Szczepaniak, Barbara Strojny-Cieślak, Małwina Sosnowska, Karolina Daniluk, Marlena Zielińska-Górcka, Jaśmina Bałaban, André Chwalibog, i Mateusz Wierzbicki. 2021. „Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3”. International Journal of Molecular Sciences 22: 1–21” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na walidacji stosowanych metod.

Podpis



Warszawa, 26.09.2023r.

**dr Malwina Sosnowska-Ławnicka**  
malwina\_sosnowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Ewa Sawosz Chwalibóg, Jarosław Szczepaniak, Barbara Strojny-Cieślak, Małwina Sosnowska, Karolina Daniluk, Marlena Zielińska-Górska, Jaśmina Bałaban, André Chwalibog, i Mateusz Wierzbicki. 2021. „Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3”. International Journal of Molecular Sciences 22: 1–21” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na walidacji stosowanych metod.

Podpis

*Małwina Sosnowska-Ławnicka*

Warszawa, 26.09.2023r.

**mgr inż. Karolina Daniluk**  
karolina\_daniluk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Ewa Sawosz Chwalibóg, Jarosław Szczepaniak, Barbara Strojny-Cieślak, Małwina Sosnowska, Karolina Daniluk, Marlena Zielińska-Górcka, Jaśmina Bałaban, André Chwalibog, i Mateusz Wierzbicki. 2021. „Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3”. International Journal of Molecular Sciences 22: 1–21” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na doborze oprogramowania służącego do wizualizacji danych uzyskanych w toku realizacji badań.

Podpis

*Karolina Daniluk*

Warszawa, 26.09.2023r.

dr inż. Marlena Zielińska-Górska  
marlena\_zielinska\_gorska@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii

Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Wójcik, Barbara, Ewa Sawosz Chwalibóg, Jarosław Szczepaniak, Barbara Strojny-Cieślak, Małwina Sosnowska, Karolina Daneluk, Marlena Zielińska-Górska, Jaśmina Bałaban, André Chwalibóg, i Mateusz Wierzbicki. 2021. „Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3”. International Journal of Molecular Sciences 22: 1–21” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na walidacji metod analitycznych stosowanych w toku realizacji badań.

Zielinska-Górska M.

Podpis

Warszawa, 26.09.2023r.

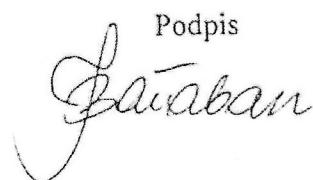
mgr Jaśmina Bałaban  
jasmina\_balaban@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii

Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Wójcik Barbara, Ewa Sawosz Chwalibóg, Jarosław Szczepaniak, Barbara Strojny-Cieślak, Małwina Sosnowska, Karolina Daniluk, Marlena Zielińska-Górcka, Jaśmina Bałaban, André Chwalibóg, i Mateusz Wierzbicki. 2021. „Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3”. International Journal of Molecular Sciences 22: 1–21” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie formalnej przygotowanego manuskryptu.

Podpis  


Warszawa, 26.09.2023r.

**prof. André Chwalibog**  
ach@sund.ku.dk

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Ewa Sawosz Chwalibóg, Jarosław Szczepaniak, Barbara Strojny-Cieślak, Małwina Sosnowska, Karolina Daniluk, Marlena Zielińska-Górcka, Jaśmina Bałaban, André Chwalibóg, i Mateusz Wierzbicki. 2021. „Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3”. International Journal of Molecular Sciences 22: 1–21” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na recenzji oraz redakcji manuskryptu.

Podpis



Warszawa, 26.09.2023r.

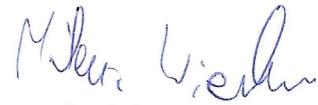
**dr hab. Mateusz Wierzbicki, prof. SGGW**  
mateusz\_wierzbicki@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**

**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Ewa Sawosz Chwalibóg, Jarosław Szczepaniak, Barbara Strojny-Cieślak, Małwina Sosnowska, Karolina Daniluk, Marlena Zielińska-Górcka, Jaśmina Bałaban, André Chwalibóg, i Mateusz Wierzbicki. 2021. „Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3”. International Journal of Molecular Sciences 22: 1–21” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w przygotowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodologii oraz recenzji i redakcji manuskryptu.



Podpis

 Open Access Full Text Article

## ORIGINAL RESEARCH

# Cell Line-Dependent Adhesion and Inhibition of Proliferation on Carbon-Based Nanofilms

Barbara Wójcik, Katarzyna Zawadzka, Ewa Sawosz, Małwina Sosnowska , Agnieszka Ostrowska , Mateusz Wierzbicki 

Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, 02-786, Poland

Correspondence: Mateusz Wierzbicki, Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, Warsaw, 02-786, Poland, Tel +48 22 5936676, Email mateusz\_wierzbicki@sggw.edu.pl

**Introduction:** Disorganisation of the extracellular matrix (ECM) is strongly connected to tumor progression. Even small-scale changes can significantly influence the adhesion and proliferation of cancer cells. Therefore, the use of biocompatible nanomaterials capable of supporting and partially replenishing degraded ECM might be essential to recover the niche after tumor resection. The objective of this study was to evaluate the influence of graphene, graphene oxide, fullerene, and diamond nanofilms on breast cancer and glioblastoma grade IV cell lines.

**Methods:** Nanomaterials were characterized using SEM and TEM techniques; zeta potential analysis was also performed. Nanofilms of graphene, fullerene, and diamond nanoparticles were also characterized using AFM. The toxicity was tested on breast cancer MDA-MB.231 and glioblastoma grade IV U-87 MG cell lines, using LDH assay and by counting stained dead cells in bioprinted 3D models. The following parameters were analyzed: proliferation, adhesion to the nanofilm, and adhesion to particular ECM components covered with diamond nanoparticles.

**Results and Discussion:** Our studies demonstrated that nanofilms of graphene and diamond nanoparticles are characterized by cell-specific toxicity. Those nanomaterials were non-toxic to MDA.MB.231 cells. After applying bioprinted 3D models, diamond nanoparticles were not toxic for both cell lines. Nanofilms made of diamond nanoparticles and graphene inhibit the proliferation of MDA.MB.231 cells after 48 and 72 hours. Increased adhesion on nanofilm made of diamond nanoparticles was only observed for MDA.MB.231 cells after 30 and 60 minutes from seeding the cells. However, analysis of adhesion to certain ECM components coated with diamond nanoparticles revealed enhanced adhesion to tenascin and vitronectin for both tested cell lines.

**Conclusion:** Our studies show that nanofilm made of diamond nanoparticles is a non-toxic and pro-adhesive nanomaterial that might stabilize and partially replenish the niche after breast tumor resection as it enhances the adhesion of breast cancer cells and inhibits their proliferation.

**Keywords:** 3D models, breast cancer, carbon-based nanomaterials, cytotoxicity, glioblastoma

## Introduction

Triple-negative breast cancer is the most aggressive malignant subtype of breast cancer.<sup>1</sup> It accounts for around 15–20% of all cases diagnosed.<sup>2</sup> It is characterized by a strong tendency to early metastasis (approximately 2–3 years after diagnosis).<sup>3</sup> Although cancer treatment is still developing and new therapeutic strategies are being optimized, the prognosis for patients with triple-negative breast cancer is still poor.<sup>4</sup> Over half a million deaths annually are caused by breast cancer.<sup>5</sup> Although cancer diagnosis is also developing and new tools are being developed that enable early diagnosis, metastases are still difficult to inhibit and manage clinically.<sup>6</sup> Another tumor considered one of the most difficult to treat is a primary brain tumor – glioblastoma. It is difficult to manage clinically due to its proliferative and highly invasive nature.<sup>7</sup> The median survival time of patients who suffer from this kind of tumor, regardless of treatment, is 12.6 months.<sup>8</sup> Thus, there is an urgent need to inhibit tumor growth.

Many patients, after tumor resection, develop recurrences of the disease. It is believed that newly arisen tumors are derived from selected tumor clones that are resistant to the applied therapy.<sup>9</sup> At this point, it should be noted that

circulatory tumor cells that can shed from primary tumors<sup>10</sup> and cancer stem cells that promote initiation, proliferation, migration, and drug resistance of solid cancers may be present in pathologically changed tissue.<sup>11</sup> However, according to the literature, after tumor resection, the remaining cells are characterized by a few phenotypical differences, which have been hypothesized to be a possible cause of cancer recurrence. Surgical removal of the tumor mass promotes the secretion of inhibitory factors, which cause the activation of immunosuppressive cells to allow rapid repopulation of small pockets of residual disease. Moreover, the infiltration of residual lymph nodes and recurrent tumors with M2 macrophages and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells is observed. These factors create a complex network of immunosuppression in the surrounding microenvironment, which may underline cancer recurrence.<sup>9</sup> Another important factor in cancer development is the extracellular matrix (ECM), which is the non-cellular component of tissue. Its role is not only to provide structural support ensuring tissue integrity,<sup>12</sup> but it is also a physiologically active structure that provides all the essential molecules that regulate cell-to-cell communications.<sup>13</sup> ECM is produced and arranged by resident cells; it is a highly dynamic structure that can be remodeled in accordance with tissue needs or as a result of disease progression.<sup>12</sup> The first step in the metastasis process is the invasion of malignant cells. For this phenomenon to be possible, the adhesion of cells to the ECM must be disturbed,<sup>14</sup> which is strongly connected with the disorganization of the unique ECM.<sup>15</sup> This indicates that ECM plays a crucial role in cancer progression. Even small-scale changes in the tissue-specific microenvironment homeostasis can significantly influence the proliferation of cancer cells. Numerous changes in the ECM, such as increased levels of collagens I, III, IV, and fibronectin, indicate that tumor progression is based on the complex interactions of cancer cells and tumor microenvironment.<sup>16</sup> Higher levels of matrix proteins may contribute to changes in cell polarity and cell-to-cell adhesion.<sup>17</sup> For that reason, the use of nanomaterials capable of supporting and partially replenishing degraded ECM might be essential to restore the niche after tumor resection.

Nanomaterials such as graphene (GN), graphene oxide (GO), fullerene (C60), and diamond nanoparticles (ND) can form nanofilms.<sup>18–21</sup> However, the biosafety of the chosen carbon-based nanomaterials is the most pressing issue while designing potential biological applications. According to the literature, GN in colloidal suspension may induce cell death through caspase-mediated and caspase-independent pathways. The induction of oxidative stress is pointed out as a main process underlying the cytotoxicity of this nanomaterial. However, Fahmi et al demonstrated that GN may be capable of inducing irreparable DNA fragmentation produced by endogenous cellular endonucleases.<sup>22</sup> GO in colloidal suspension may also induce time- and dose-dependent toxicity at the concentrations higher than 100 mg/L. Wu et al displayed the role of oxidative stress mediated by ROS in the cytotoxicity of GO. Moreover, the scientists also indicated that the arrest in GO/G1 phase after exposure to GO may be engaged in the cell death induction.<sup>23</sup> Another nanomaterial that was chosen for analyses also exhibit anticancer properties. Exposure to C60 may cause oxidative stress/ERK-independent cell cycle block in G2/M phase, thus inhibiting cancer cells proliferation. Moreover, C60 is also capable of inducing ROS-mediated necrotic cell damage.<sup>24</sup> According to our previous studies, ND cytotoxicity is cell specific.<sup>25</sup> The cytotoxicity of this nanomaterial is strongly connected with the increase of ROS level and cytochrome c release.<sup>26</sup> Although, the nanomaterials may exhibit some cytotoxicity, carbon-based nanofilms are a source of mechanochemical stimuli that may change cells' behavior by changing the expression level of proteins involved in the proliferation process, activating ATP synthesis, or lowering the expression of cytoskeleton proteins. Therefore, we hypothesize that nanofilms made of GN, GO, C60, and ND may be capable of promoting proper adhesion and reducing the proliferation rate of breast cancer cells MDA.MB.231 and glioblastoma cells U-87 MG, which would result in a reduction in oncogenic potential and prevention of disease recurrence.

## Materials and Methods

### Carbon-Based Nanomaterials

Graphene (GN) was obtained from SkySpring Nanomaterials (Houston, TX, USA). Nano-sized platelets were produced by the exfoliation method. According to the manufacturer, the GN flakes' surface area was 750 m<sup>2</sup>/g, and their thickness ranged from 1 to 5 nm. Single-layer graphene oxide (GO) was obtained from US Research Nanomaterials (Houston, TX, USA). The material was dispersed in water (2wt%). The diameter of flakes ranged from 1.5 to 5.5 μm and their thickness from 0.43 to 1.23 nm.

Fullerene ( $C_{60}$ ) was obtained from SES Research (Houston, TX, USA). The material was vacuum oven-dried and, according to the manufacturer, solvent-free. Diamond nanoparticles (ND) were obtained from US Research Nanomaterials (Houston, TX, USA). The nanomaterial was produced using the detonation technique. According to the manufacturer, the average diameter of ND grains was 2–10 nm. GN, GO,  $C_{60}$ , and ND were dispersed in ultrapure water to a final concentration of 1000 mg/L. Prior to use, water suspensions of nanomaterials were sonicated for 1 minute (500 W, 32 kHz) using a VC 505 Ultrasonic Liquid Processor with a cup horn (Sonics & Materials, Newtown, CT, USA).

## Physicochemical Analysis of Carbon-Based Nanomaterials

The ultrastructure of GN, GO,  $C_{60}$ , and ND was analyzed using a JEM-1220 transmission electron microscope (TEM, JEOL, Tokyo, Japan) at 80 KV with a Morada 11-megapixel camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany). All nanomaterials were analyzed using atomic force microscopy (AFM) to characterize the surface of the cell culture plate covered with nanomaterials (Nanores, Poland). Additionally, dried nanomaterials were analyzed using a scanning electron microscope (SEM; Quanta 200, FEI, Hillsboro, USA). Additionally, the water contact angle was measured for the tested nanofilms. For that reason 200  $\mu$ L of water suspensions of GN, GO,  $C_{60}$  and ND were placed on the surface of the cell culture dish (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) followed by drying under sterile conditions. Subsequently, 50  $\mu$ L of water was placed at the top of dried nanofilm. The drops were imaged using a horizontal stereoscopic microscope (Delta Optical, Poland). Then the water contact angle was determined using Fiji software.<sup>27</sup>

A Zetasizer Nano ZS90 analyzer (Malvern, Worcestershire, UK) was used for zeta potential measurements. Zeta potential was measured by laser Doppler electrophoresis (LDE). In addition, the Smoluchowski approximation at 25°C was applied. First of all, chosen nanomaterials were dispersed in ultrapure water to a concentration of 5 mg/L, sonicated at 500 W and 20 kHz for 1 minute using a Vibra-Cell™ Ultrasonic Liquid Processor (Sonics & Materials, Newton, CT, USA), and centrifuged (5 minutes, 1000 $\times g$ ) in order to remove arisen clusters.

## Nanofilm Preparation

To assess cell morphology, carbon nanofilm was created on the bottom of 6-well culture plates (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). In each well, there were 10 dots of GN, GO,  $C_{60}$ , and ND, respectively, which were made by applying 10  $\mu$ L of an aqueous suspension of the chosen nanomaterial at 1000 mg/L, followed by drying under sterile conditions.

For membrane integrity, proliferation assessment, and the analysis of cell adhesion, nanofilms were made in a 96-well microplate (Nunc, Thermo Fisher Scientific) by covering the whole surface of the bottom of the well with 50  $\mu$ L of 1000 mg/L suspensions. Afterward, nanofilms were fully dried under sterile conditions, obtaining the final density of 151.5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>.

## Cell Lines

Two cancer cell lines were used in the study: glioblastoma U-87 MG and breast cancer MDA.MB.231. They were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Both of them were characterized as adherent. The MDA.MB.231 cell line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, ATCC) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and a 1% antibiotic mix (Antibiotic-Antimycotic, Gibco) of penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL), and Gibco amphotericin B (0.25  $\mu$ g/mL). The U-87 MG cell line was cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC) supplemented with 10% FBS (Gibco) and a 1% antibiotic mix (Gibco). Both cell lines were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

Cells were seeded at a density of  $1\times 10^5$  cells/mL for membrane integrity and LDH-proliferation assays and  $3\times 10^5$  cells/mL for morphological and adhesion analyses. For the cell membrane integrity, proliferation, and adhesion analyses, cells were seeded on a 96-well microplate (Nunc, Thermo Fisher Scientific) in 100 mL of medium per well. For morphological analysis, cells were seeded on a 6-well plate (Nunc, Thermo Fisher Scientific) in 3 mL of medium per well.

## Membrane Integrity Assay

A lactate dehydrogenase activity assay (Thermo Fisher Scientific) was performed to evaluate cell membrane integrity. A change in media color, compared to the control group, indicates the leakage of LDH from damaged cells.

For maximum LDH release, lysis buffer was added into the triplet of control wells. After 45 minutes, 50 µL of cell culture media was transferred into a new plate and then mixed with 100 µL of LDH reaction mixture. Spectrophotometer reading was performed after 30 minutes at 490 nm (reference wavelength: 690 nm), using a microplate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). The membrane integrity assay was performed after 24 hours, 48 hours, and 72 hours in 3 independent experiments with 6 replicates for each group.

The results are presented as % of maximum LDH release and were calculated with the formula:

$$\% \text{ of Maximum LDH} = \frac{A}{\text{MAX LDH}} \times 100\%$$

where A is the mean absorbance of the targeted group, and MAX LDH is the mean absorbance of the lysed control group.

## Proliferation Assay

After all cells were lysed, the total LDH level was determined in the same way as in the membrane integrity assay. Changes in the level of enzymes relative to a control group indicate changes in the number of cells.

In order to perform proliferation analysis, lysis buffer was added to every well. After 45 minutes, plates were centrifuged (10 minutes, 200 g) to remove clusters of nanomaterials, followed by the transfer of 50 µL of cell culture media into a new plate. The analysis was performed after 24 hours, 48 hours, and 72 hours of cell culture on nanofilms in 3 independent experiments with 6 replicates for each group.

Results are presented as % of control and were calculated with the formula:

$$\% \text{ of control} = \frac{A}{C} \times 100\%$$

where A is the mean absorbance of the targeted group, and C is the mean absorbance of the control group.

## Morphological Analysis

For imaging of cell morphology, a Leica DMi8 microscope (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany) equipped with a Leica MC 190 HD camera was used.

## Analysis of Cell Adhesion

In order to perform adhesion analysis after 30, 60, and 120 minutes from seeding, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS, Thermo Fisher Scientific), followed by the addition of the lysis buffer into every well. After 45 minutes, plates were centrifuged (10 minutes, 200 g) to remove clusters of nanomaterials, followed by the transfer of 50 µL of cell culture media into a new plate. The analysis was performed in 3 independent experiments with 6 replicates for each group.

Results are presented as % of control and were calculated with the formula:

$$\% \text{ of control} = \frac{A}{C} \times 100\%$$

where A is the mean absorbance of the targeted group, and C is the mean absorbance of the control group.

## Analysis of Cell Adhesion to Selected Components of the Extracellular Matrix Covered with Diamond Nanoparticles

The ECM Cell Adhesion Array (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was performed in order to evaluate cell adhesion to selected components of the extracellular matrix covered with ND. The test is based on colorimetric measurement and was performed on a 96-well plate. Each well was pre-coated with different ECM proteins (collagen I, collagen II,

collagen IV, fibronectin, laminin, tenascin, and vitronectin). After rehydration of wells, 100 µL of ND solution in PBS at the concentration of 100 mg/L (tested group) and PBS (control group) was added into appropriate wells and incubated for 5 hours in order to cover the bottom of the well with ND. After removal of the liquid, 100 µL of the cell suspension at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL in assay buffer was added into each well and incubated for 2 hours at 37°C. The cells were washed 3 times with assay buffer, and 100 µL of cell stain solution was added, followed by 5 minutes incubation. Subsequently, cells were washed 5 times with ultrapure water, and after the plate was fully dried, 100 µL of extraction buffer was added into each well, followed by 10 minutes incubation. Samples were transferred to a new plate, and absorbance measurement was performed at a wavelength of 540 nm in a microplate reader (Tecan Group Ltd.).

The results were presented as the mean absorbance of the triplet of wells.

### 3D Analysis

In order to create a 3D model using the bioprinting technique, MDA.MB.231 and U-87 MG cells were washed in an appropriate complete cell culture medium and centrifuged for 6 minutes, 200g. Then, 50 µL of cell suspension at the concentration of  $1 \times 10^8$  cells/mL was mixed with 425 µL GelMA Bioink (Cellink, Goteborg, Switzerland). Additionally, for the tested group, 25 µL of ND hydrocolloid at the concentration of 2000 mg/L was added to a mixture, obtaining a final concentration of 100 mg/L. For the control group, the same volume of ultrapure water (25 µL) was added. 3D models were printed using Bio X extrusion bioprinter (Cellink) on the 8-well 90 µL-slides (ibiTreat, ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany). Afterward, 300 µL of appropriate complete cell medium was added into each well. 3D models were incubated for 7 days at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The cell culture medium was exchanged with a fresh one on the second, fourth, fifth, and sixth day of incubation. After 7 days, cells were stained using Image-IT™ DEAD Green™ Viability Stain (Thermo Fisher Scientific) at a concentration of 100 nM in fresh complete cell culture medium for 45 minutes at 37°C. Subsequently, cells were washed 4 times with PBS (Thermo Fisher Scientific) for 7, 5, 2, and 2 minutes respectively. After that, cells were fixed with a 4% solution of paraformaldehyde (PFA) for 15 minutes at 4°C and again washed twice with PBS (Thermo Fisher Scientific) for 2 minutes, followed by staining cell nuclei using DAPI (Thermo Fisher Scientific) at the concentration of 300 nM in PBS for 45 minutes at 37°C. Afterward, cells were washed 4 times with PBS for 5 minutes. Then, an 88% solution of glycerol was added to each well. Preparations prepared in this way were incubated at 4°C overnight. The number of live and dead cells was analyzed with an FV-1000 confocal microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Cells were imaged sequentially using a 20X objective at excitation and emission wavelengths of 461/358 nm (DAPI) and 490/525 (Image-IT™ DEAD Green™ Viability Stain, Thermo Fisher Scientific). The analysis was performed in 4 replicates for each group. Analysis and cell counting were performed using Fiji software.<sup>27</sup> The cell number on each image was assessed by thresholding the channel with stained cell nuclei, followed by watershed segmentation and particle function analysis. Additionally, the images of 3D structures were performed using a Leica DMi8 microscope (Leica Microsystem) equipped with a Leica MC 190 HD camera.

### Statistical Analysis

Data were analyzed using mono-factorial analysis of variance: one-way ANOVA with Statgraphics® Plus 4.1 (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, USA). The differences between groups were tested using Tukey's HSD multiple range tests. Differences with p-value <0.05 were considered significant. All mean values are presented with the standard deviation.

## Results

### Physicochemical Analysis

The data in Table 1 presents the zeta potential of the tested nanomaterials. All measurements were performed at a concentration of 5 mg/L. The analysis revealed that GN, GO, and C60 were characterized by negative values of zeta

potential. Furthermore, the highest values,  $-27.55$  and  $-26.83$  mV, and the highest stability were displayed by GO and GN, respectively. C60 and ND were the least stable, maintaining only  $-16.75$  mV and  $16.55$  mV, respectively.

In order to characterize the surface of dried nanofilms, SEM analysis was performed. The results are presented in [Figure 1](#). Nanomaterials were also analyzed using a TEM ([Figure 1](#)). GN and GO took the form of flakes, whereas C60 and ND were spherical. The shape of the nanomaterials influenced the surface of nanofilms. Nanomaterials like GN and GO formed more uniform surfaces compared to C60 and ND after drying.

For better characterization of tested nanomaterials, GN, C60, and ND nanofilms were characterized using the AFM technique. The results are presented in [Table 2](#) and [Figure 2](#). The analysis revealed that GN nanofilm had the highest roughness, while C60 nanofilm had the lowest roughness.

Atoms located in the interfacial region or at the interface are subject to the action of a different system of forces than the atoms located deep in the phase. On the one hand, they are attracted by atoms of its own phase and, on the other hand, by atoms from the neighboring phase. Therefore, they are located in an asymmetric force field. The water contact angle was measured to provide information about the character of prepared nanofilms. The images of water drops on prepared nanofilms are presented in [Figure 3](#). The analysis performed using Fiji software revealed that the water contact angle for the cell culture plate was maintained at the level of  $60.32^\circ$ . Similar value was obtained for the surface covered with GO which was  $64.26^\circ$ . Water contact angle of C60 was smaller than the one obtained for the cell culture plate and was maintained at the level of  $43.57^\circ$ . The smallest values were observed on the surfaces covered with ND and GN nanofilms with the water contact angle of  $17.99^\circ$  and  $22.12^\circ$ , respectively.

## Morphological Analysis

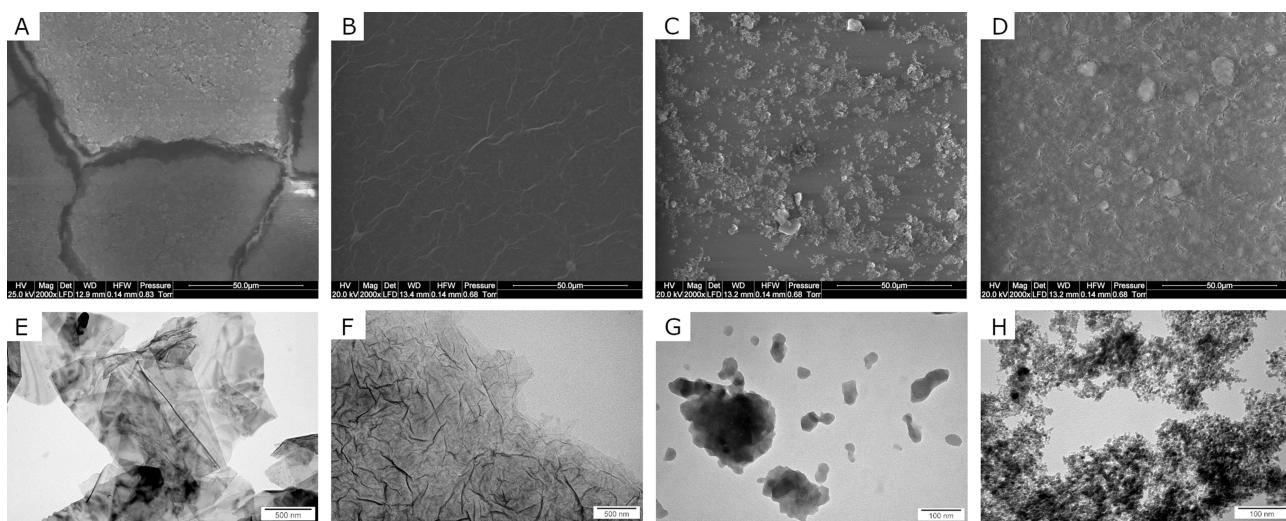
In order to evaluate the changes in cell morphology caused by the nanomaterials, imaging 24 hours, 48 hours, and 72 hours after cell seeding on certain nanofilms was performed. Applying nanofilms, placed as dots, allowed analysis of the cell morphology inside, outside, and on the border of the dots ([Figures 4 and 5](#)). U-87 MG and MDA.MB.231 cells showed changes in polarization and shape, depending on location, in relation to the nanofilm dot. U-87 MG cells that were located near the ND nanofilm dot began to shrink after 48 hours of incubation compared to the control and GN nanofilm. Another finding was that MDA.MD.231 cells tended to accumulate on the border of GN, ND, and GO nanofilm with the side edge adjacent to it ([Figures 4 and S1](#)). U-87 MG cells formed spheroids to a lesser extent. The cells that were exposed to GO and C60 nanofilms looked similar to the untreated ones. However, some changes in the cells size could be observed after 24 hours ([Figures S1 and S2](#)).

## Membrane Integrity Assay

In order to evaluate the cytotoxicity of certain carbon-based nanofilms at the level of membrane integrity, an LDH assay was performed. Interference analysis was performed to eliminate the risk of false results according to the protocol described in the [Supplementary Materials](#) ([Figure S3](#)). The analysis revealed that all nanomaterials tested did not influence the cell membrane integrity of MDA.MB.231 cells ([Figure 6A–C](#)). However, GN and ND nanofilms induced enhanced leakage of LDH from U-87 MG cells after 24, 48, and 72 hours of incubation ([Figure 6D–F](#)).

**Table 1** Zeta Potential (ZP) in Suspension Measured by Laser Doppler Electrophoresis (LDE); the Results are Presented as Mean (n=4) with Standard Division (SD)

Sample	ZP by LDE [mV] $\pm$ SD
<b>GN</b>	$-26.83 \pm 3.32$
<b>GO</b>	$-27.55 \pm 0.75$
<b>C<sub>60</sub></b>	$-16.75 \pm 4.56$
<b>ND</b>	$16.55 \pm 0.81$



**Figure 1** SEM (**A–D**) and TEM (**E–H**) images of GN (**A** and **E**); GO (**B** and **F**); C60 (**C** and **G**); and ND (**D** and **H**).

## Proliferation Assay

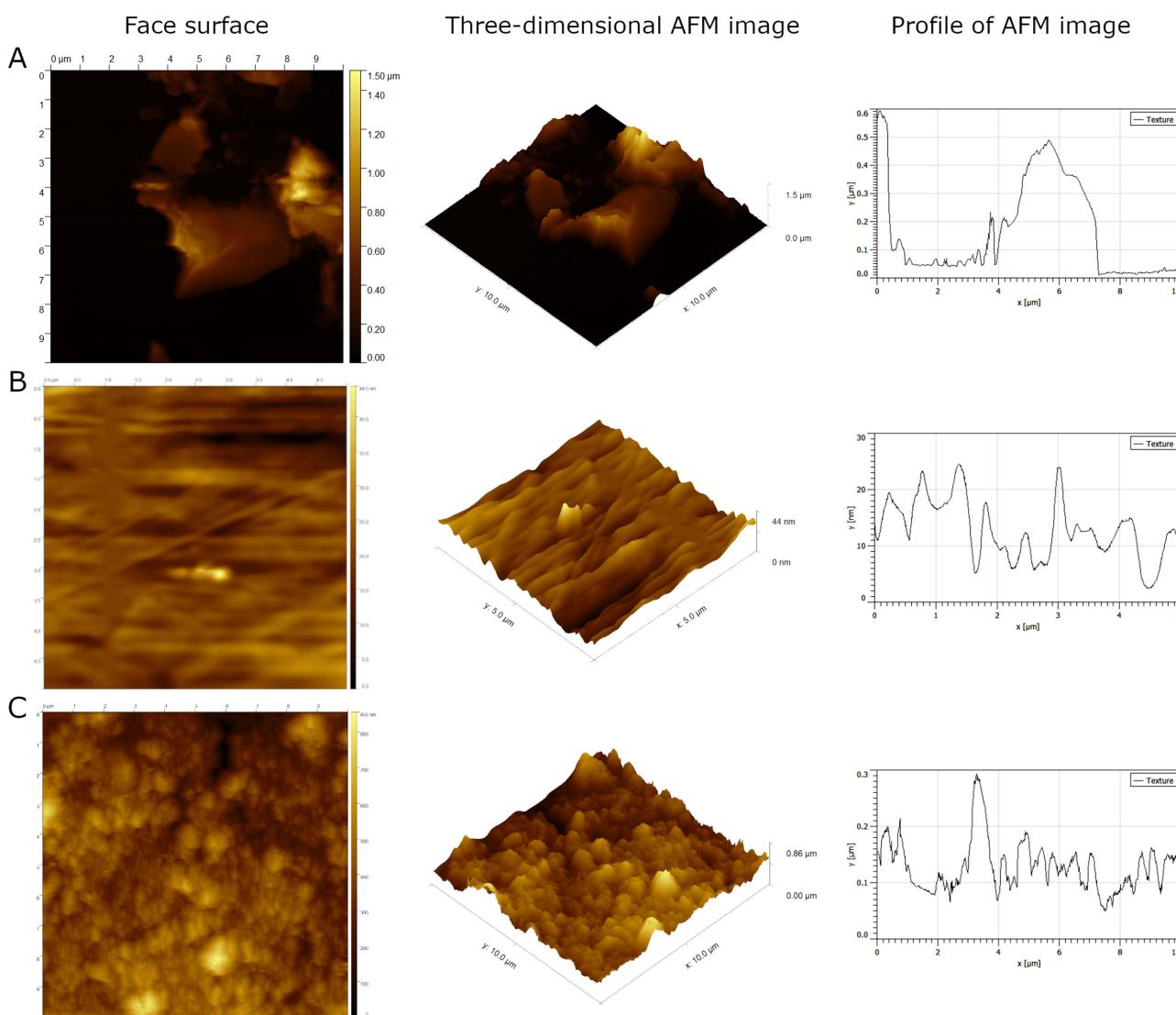
In order to assess the influence of certain carbon-based nanofilms on the proliferation rate, a total LDH measurement was performed. Interference analysis was performed to eliminate the risk of false results (Figure S3). The results from the proliferation assay are presented in Figure 7. The analysis revealed that GN and ND nanofilms decreased the proliferation rate in MDA.MB.231 48 and 72 hours after incubation (Figure 7B and C). The greatest inhibitory effect was obtained after 72 hours. Incubation on GN nanofilm resulted in a 20.97% decrease in the number of cells, whereas incubation on ND nanofilm resulted in a 30.09% decrease. In the case of the U-87 MG cell line, a similar tendency was observed after 48 hours incubation on GN and ND nanofilms, which caused a 15.95% and 16.17% loss in the number of cells (Figure 7D). However, the proliferation-inhibitory effect was not maintained with increasing incubation time and after 72 hours, the proliferation of U-87 MG cells remained at the level of the untreated control group (Figure 7E).

## Analysis of Cell Adhesion

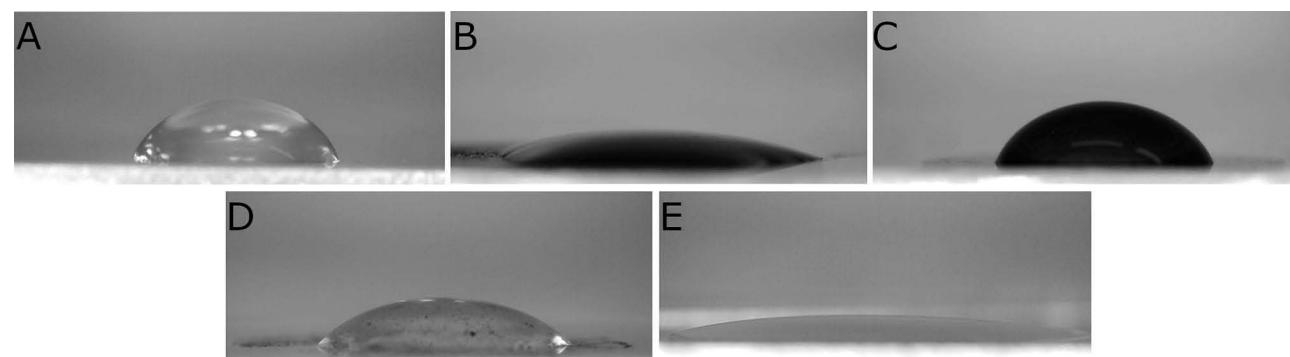
In order to assess the influence of certain carbon-based nanofilms on cell adhesion, a total LDH measurement was performed. Interference analysis was performed to eliminate the risk of false results (Figure S3). The results from the analysis of cell adhesion are presented in Figure 8. The analysis revealed that MDA.MB.231 cell adhesion was enhanced on ND nanofilm compared to the control during the first 60 minutes after seeding cells (Figure 8A and B). GN and GO

**Table 2** AFM Parameters of Nanofilms Made of GN, C60, and ND

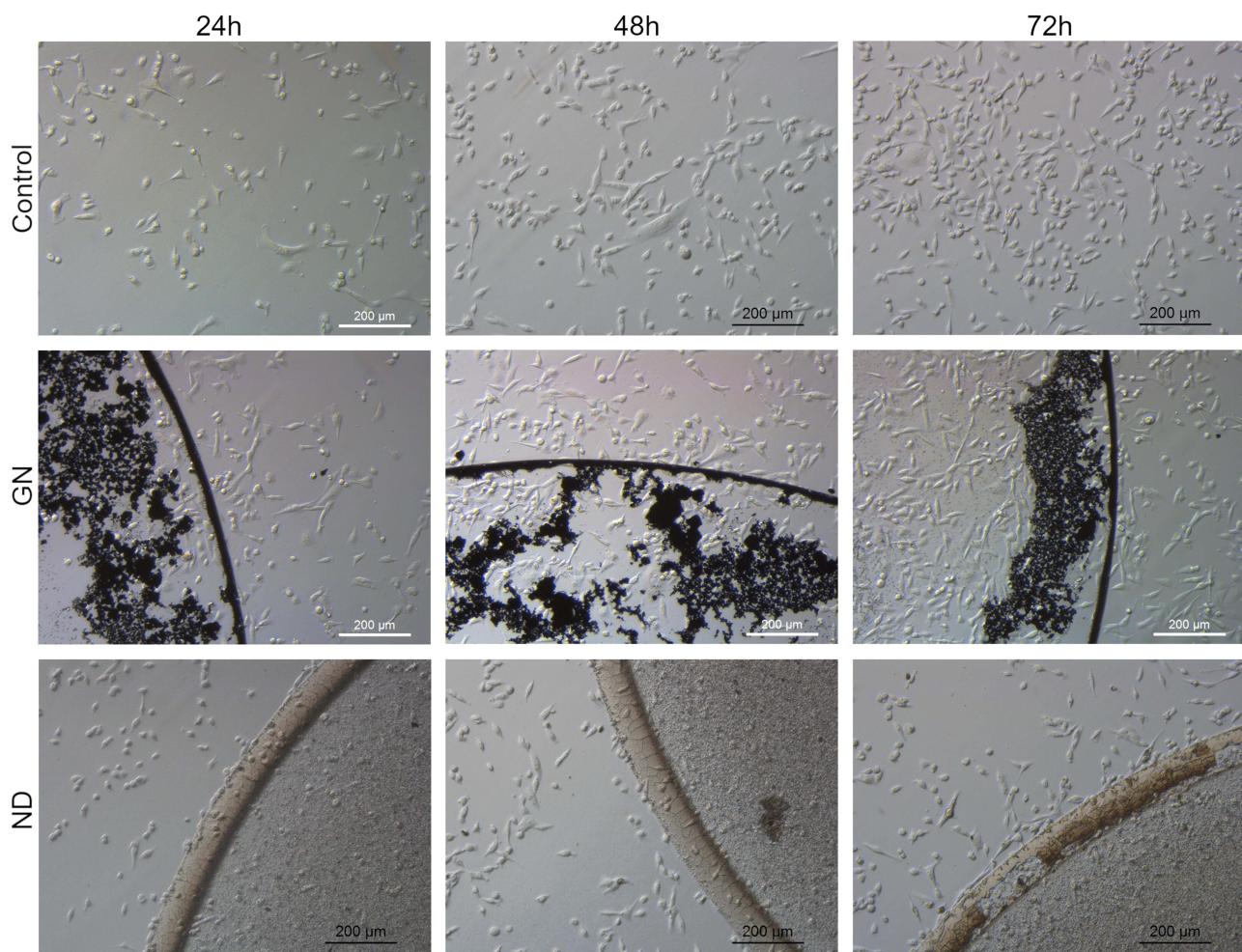
AFM parameter [nm]	GN	C60	ND
Roughness average	16.5	0.3	7.0
Root mean square roughness	29.3	0.4	10.5
Maximum height of the roughness	296.3	3.5	148.9
Maximum roughness valley depth	125.4	1.6	38.2
Maximum roughness peak height	170.9	1.8	110.7
Average maximum height of the profile	173.1	2.5	140.8
Average maximum height of the roughness	142.1	1.9	70.6
Average maximum roughness valley depth	68.0	0.9	26.6
Average maximum roughness peak height	74.1	0.9	44.1
Average third-highest peak to third-lowest valley height	142.1	2.2	100.4



**Figure 2** Topographical images of nanofilms made of GN (**A**), C60 (**B**), and ND (**C**) performed using the AFM technique.



**Figure 3** Water contact angle of cell culture plate, 60.32° (**A**); GN, 22.12° (**B**); GO, 64.26° (**C**); C60, 43.57° (**D**); ND, 17.99° (**E**).



**Figure 4** Morphological characterization of MDA.MB.231 human breast adenocarcinoma, seeded on GN and ND nanofilms after 24 hours, 48 hours, and 72 hours.

nanofilms did not influence cell adhesion (Figure 8A–C). In the case of U-87 MG cells, only GN nanofilm weakened the cell adhesion during the first 30 minutes after cell seeding (Figure 8D).

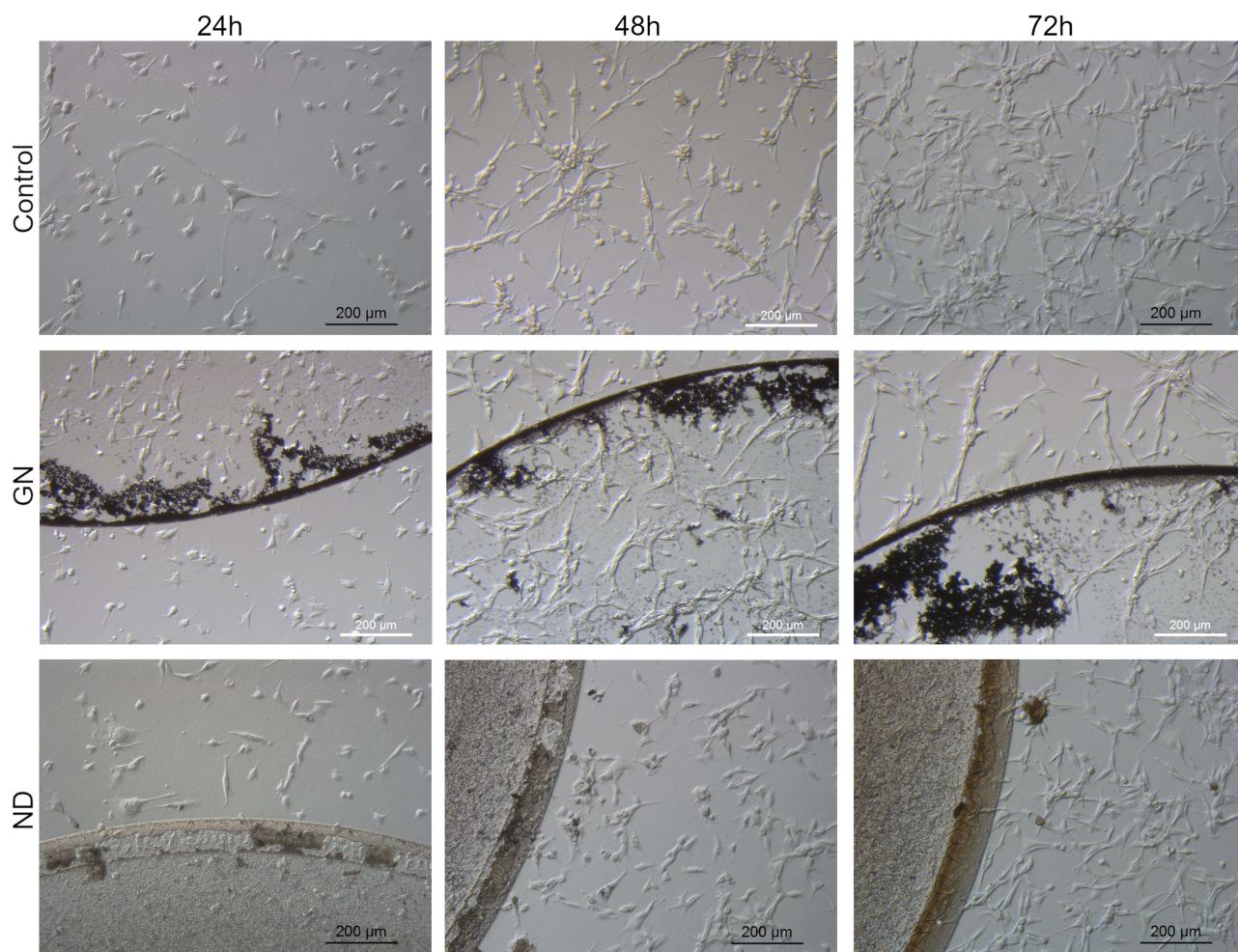
### Analysis of Cell Adhesion to Selected Components of the Extracellular Matrix Covered with Diamond Nanoparticles

ECM Cell Adhesion Array was performed to evaluate cell adhesion to selected components of the ECM covered with ND. The analysis revealed that ND enhances MDA.MB.231 cell adhesion to tenascin and vitronectin (Figure 9A). ND also enhances U-87 MG cell adhesion to the following ECM components: collagen I, collagen IV, tenascin, and vitronectin (Figure 9B).

### 3D Analysis

In order to reproduce multidimensional interactions between cells and between cells and ECM, bioprinted 3D models containing cancer cells were created. The analysis of MDA.MB.231 cells showed that although there was no difference in the number of dead cells between the control group and the treated group, the addition of ND caused the live and dead cell layers to separate. Dead cells were located at the bottom of the bioprinted 3D model, and live cells were observed at the upper part (Figure 10).

The same phenomenon was not observed in the case of U-87 MG cells. Live and dead cells were located throughout the whole volume of the bioprinted 3D model. However, it was observed that in the group treated with ND, the

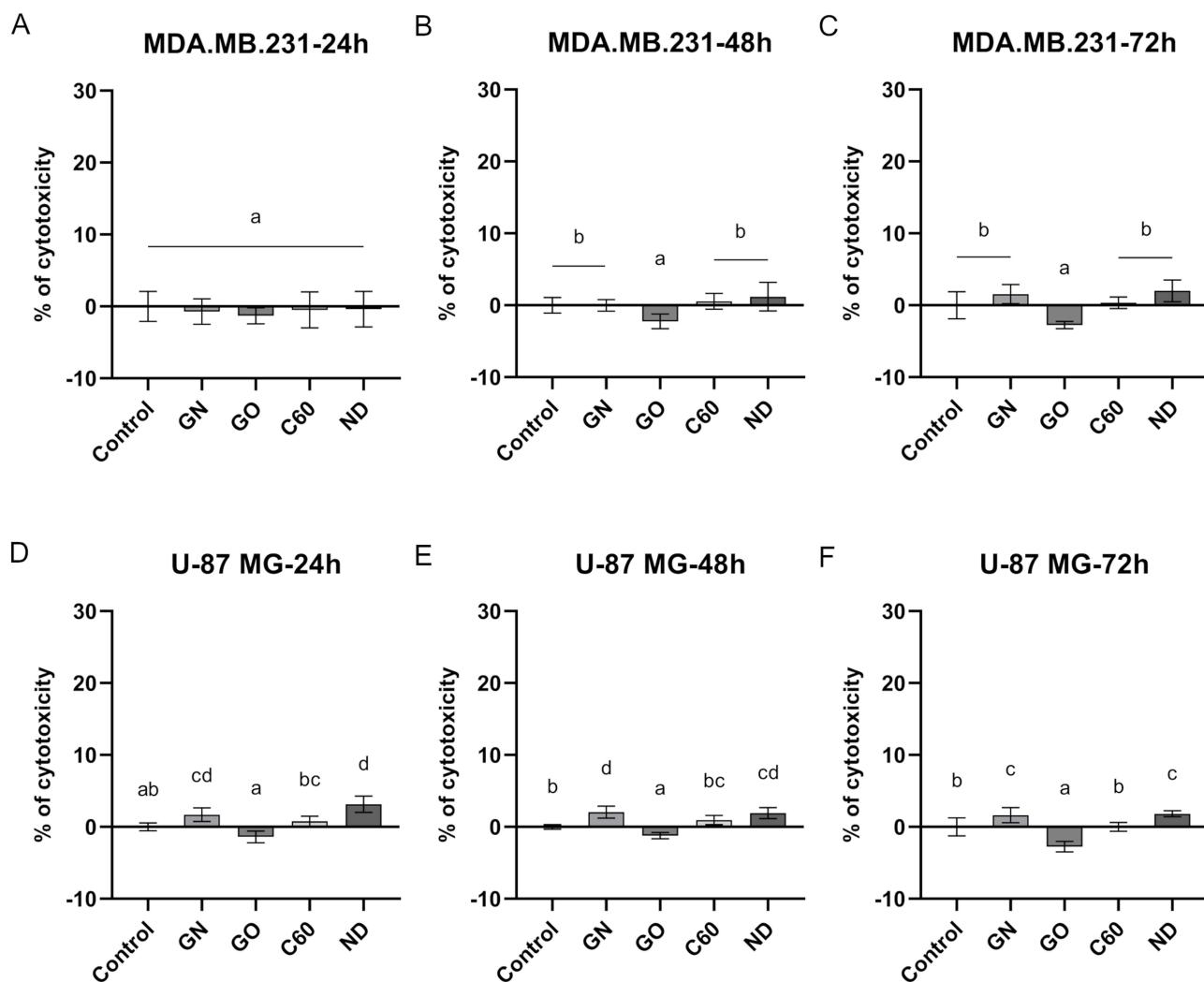


**Figure 5** Morphological characterization of the U-87 MG human glioblastoma grade IV cell line, seeded on GN and ND nanofilms after 24 hours, 48 hours, and 72 hours.

percentage of dead cells was lower than in the control group, maintaining the values of 9.27% and 13.22%, respectively (Figure 10).

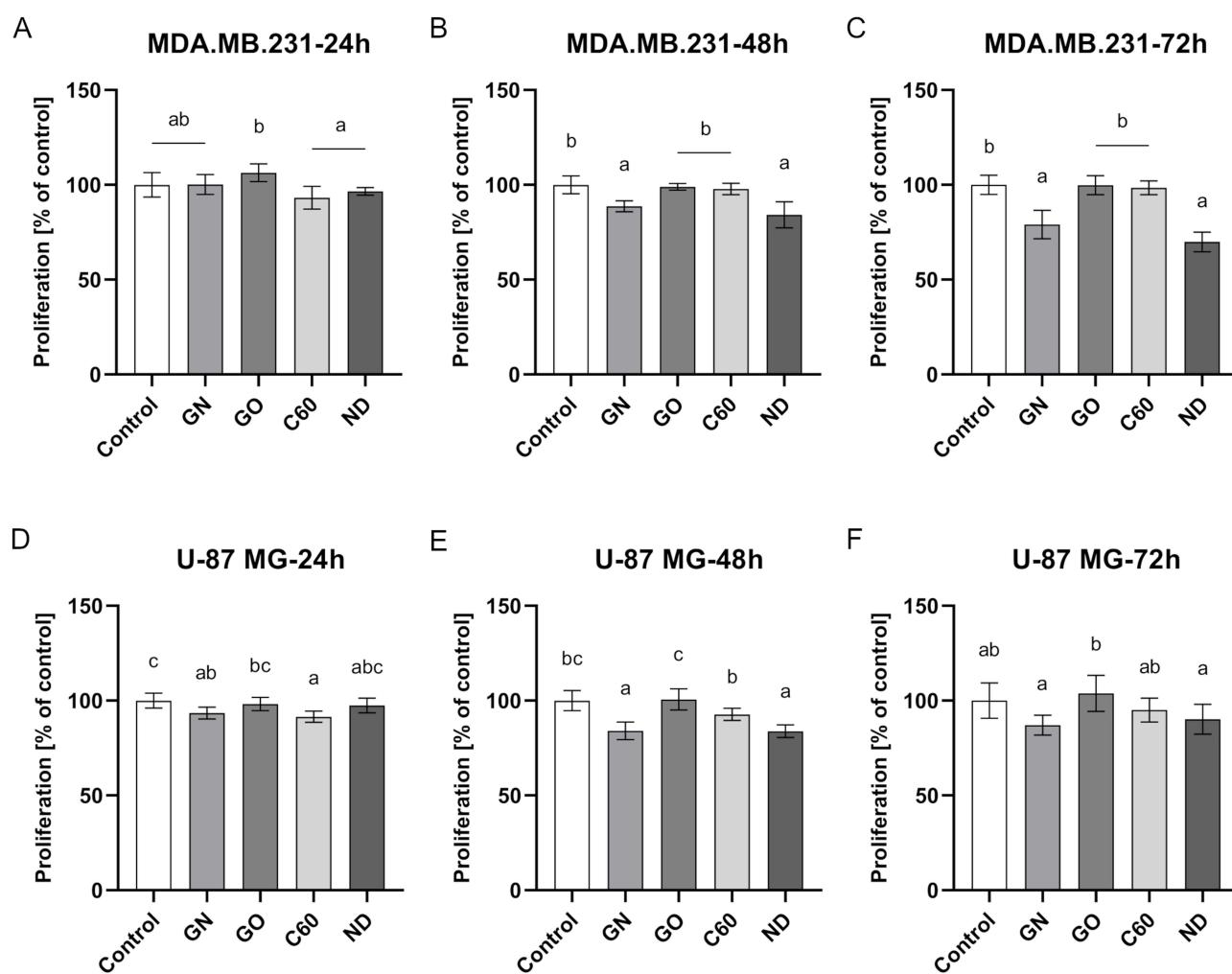
## Discussion

The aim of the study was to evaluate whether carbon-based nanomaterials such as GN, GO, C60, and ND may serve as potential components of ECM that will affect and reduce tumor oncogenic potential, particularly by reducing the proliferation rate of cancer cells and enhancing their adhesion to the ECM. The fundamental issue in applying nanomaterials in cancer treatment is safety. Desirable nanomaterials in cancer treatment should be characterized by biocompatibility. For that reason, the analysis of the cell membrane integrity was performed. The analysis revealed that all nanomaterials used in the experiment did not harm the cell membrane of MDA.MB.231 cells. However, GN and ND nanofilms exhibited low toxicity against U-87 MG cells. Graphene takes the form of flakes, as shown in the TEM images. Dried GN nanofilm was characterized by a rough surface, as revealed by SEM and AFM analyses. The cell morphology images showed that U-87 MG cells were bigger than MDA.MB.231 cells and formed clusters. Together, these could have contributed to higher LDH leakage from U-87 MG cells, indicating cell membrane damage. This finding is in line with Akhavan and Ghaderi's thesis.<sup>28</sup> According to the literature, one of the proposed toxicity mechanisms of GN assumes cell membrane damage through physical interactions with nanomaterial.<sup>29</sup> The surface of GN enables its interactions with cell membrane lipids,<sup>30</sup> which may also underlie the moderate toxicity of GN nanofilm against U-87 MG cells. ND nanofilm also caused moderate toxicity against the glioblastoma grade IV cell line. As was shown in the morphological



**Figure 6** Membrane integrity of MDA.MB.231 (**A–C**) and U-87 MG (**D–F**) cells after 24 hours, 48 hours, and 72 hours incubation period on certain carbon-based nanofilms determined by LDH assay. Results are presented as the percentage of cytotoxicity (mean with standard deviation; n=6). Different letters above the columns indicate statistically significant differences between groups (p<0.05).

images, some fragments of ND tended to detach and were internalized by the cells or formed clusters on their surface. The adhesion of ND nanofilm may be influenced by the formation of the non-diamond phase, the generation of voids during the drying process, and the differences between the thermal expansion coefficient of ND nanofilm and surrounding phases.<sup>31</sup> Our previous study showed that ND in the form of hydrocolloid disturbs the cell membrane integrity in glioblastoma grade IV cell lines T98G and U-118 MG.<sup>25</sup> Interestingly, both GN and ND nanofilms did not influence the cell membrane integrity of MDA.MB.231 cells. Diamond nanofilms are thin layers of amorphous sp<sup>2</sup>-bonded carbon bound to crystalline phases of sp<sup>3</sup>-bonded carbon. ND nanofilm characteristics are similar to those of macroscale diamond.<sup>32</sup> According to the literature, ND nanofilm biocompatibility depends on the atomic-bound structure and hydrogen content. Biocompatibility also depends on the cell line.<sup>25</sup> However, it is considered a biocompatible nanomaterial,<sup>33</sup> which was revealed by the analysis performed on MDA.MB.231 cells. Those results were in line with the analysis performed on a bioprinted 3D model, where no toxicity was observed after treatment of MDA.MB.231 cells with ND. Moreover, our previous study<sup>25</sup> showed that the addition of the same ND nanoparticles in the form of hydrocolloidal suspension at the concentration of 20 mg/L into the cell culture medium of non-cancer HFF-1 cells did not cause any morphological changes after 24 hours of incubation. Moreover, ND at the concentration of 50 mg/L caused a significant decrease in intracellular ROS and mitochondrial superoxide level, which led to a higher metabolic activity of

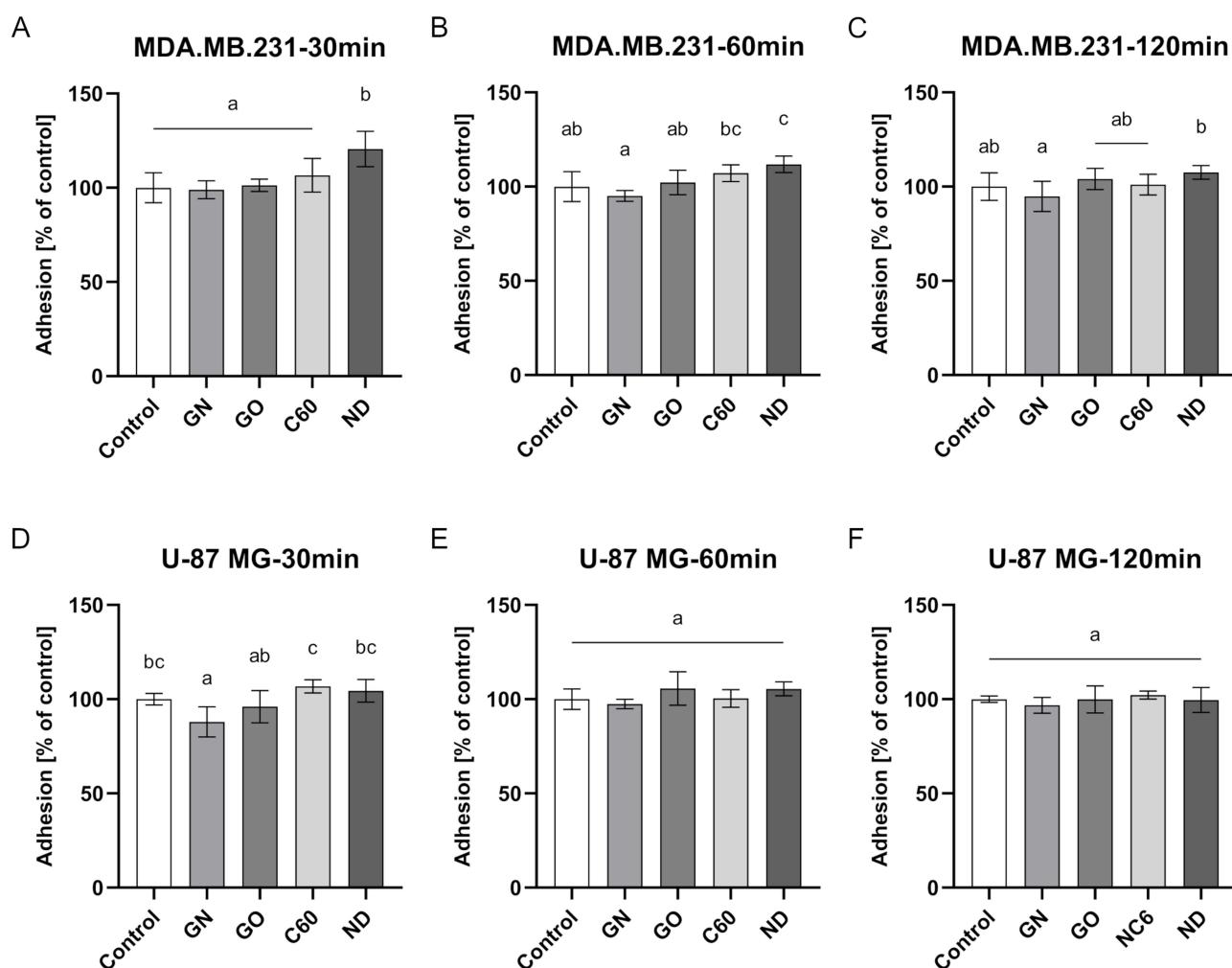


**Figure 7** Proliferation of MDA.MB.231 (**A–C**) and U-87 MG (**D–F**) cells after 24 hours, 48 hours, and 72 hours incubation period on certain carbon-based nanofilms determined by LDH assay. Results are presented as the percentage of control (mean with standard deviation; n=6). Different letters above the columns indicate statistically significant differences between groups (p<0.05).

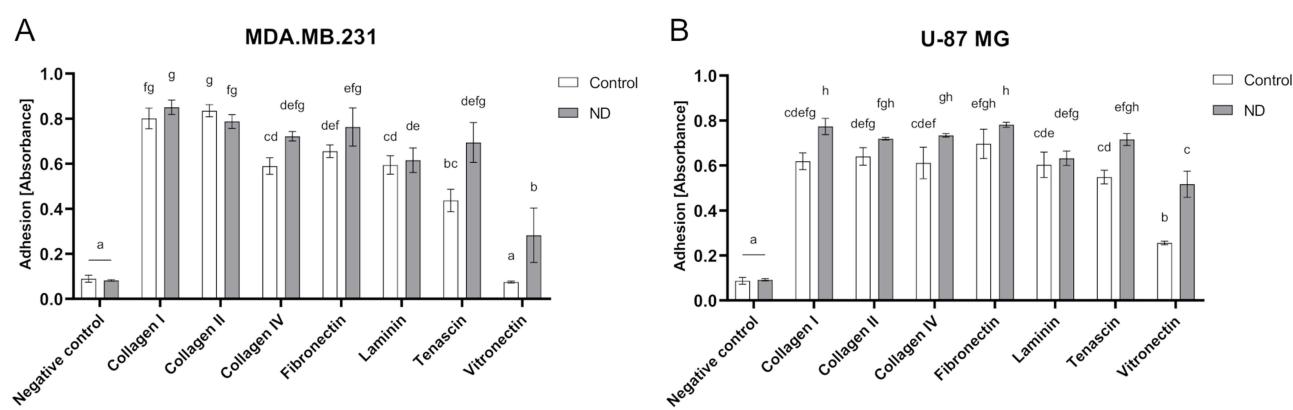
the tested fibroblast cell-line HFF-1. Those findings indicate that currently tested ND may not be toxic to non-cancer cells.

The desired effect of the nanomaterial was to inhibit the cell proliferation rate. The proliferation analysis revealed that GN and ND nanofilm significantly inhibit the proliferation of MDA.MB.231 cells after 48 hours. This effect was also maintained after 72 hours. The same tendency was observed in the case of U-87 MG cells. However, after 72 hours, there were no significant changes observed. Studies performed on hepatocellular carcinoma cell-line C3A showed that the thin layer of ND nanofilm decreases the level of proteins responsible for cell proliferation, which leads to a decreased population of cancer cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle.<sup>18</sup> The mechanochemical signaling caused by ND nanofilms, which disturbs the expression of specific proteins related to mitosis and proliferation, may underlie the phenomenon of decreased proliferation of MDA.MB.231 cells.

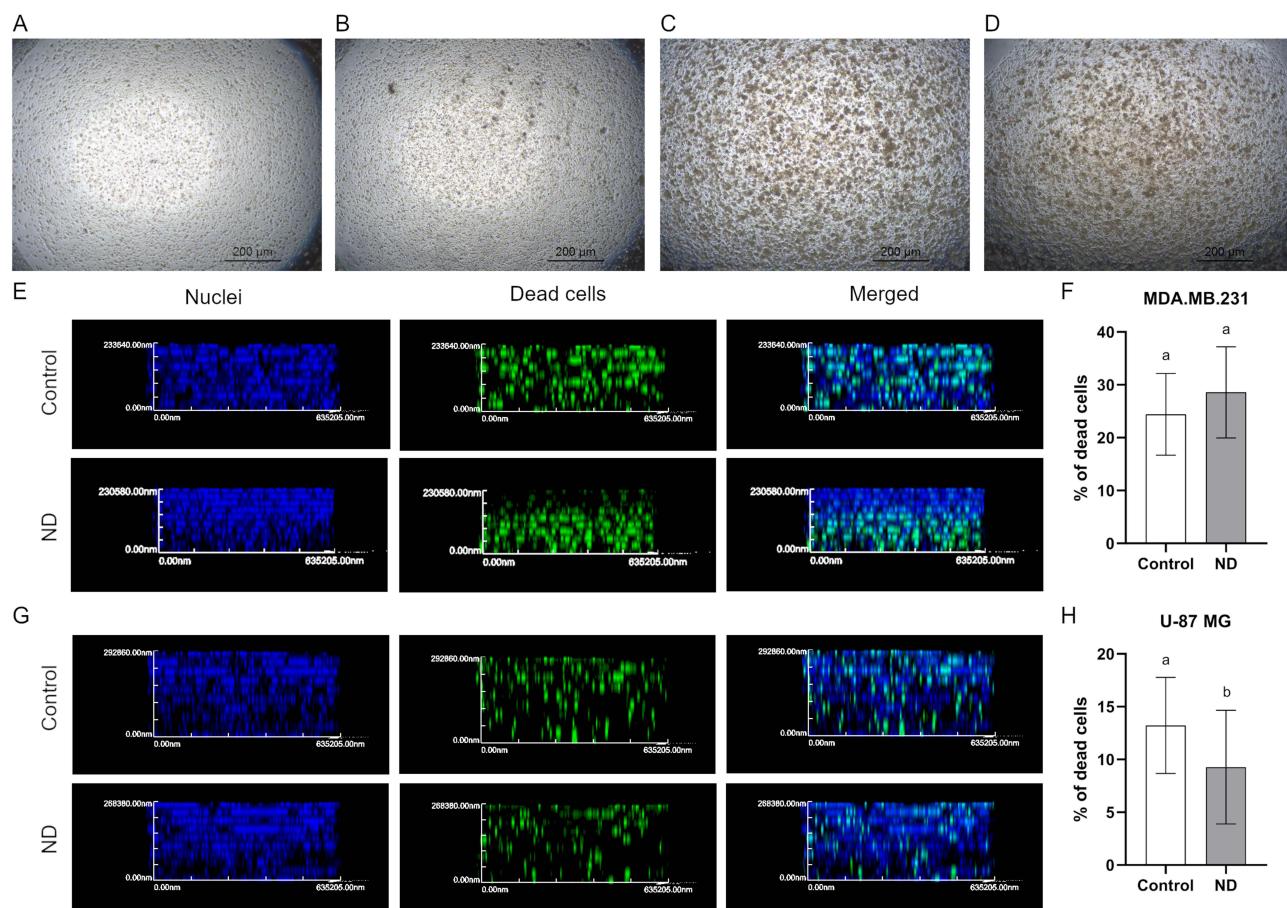
Another feature that should characterize a nanomaterial suitable for creating a niche that will stabilize the ECM after tumor resection is its pro-adhesive nature; hence, an analysis of adhesion was performed. The analysis revealed that ND nanofilm enhances the adhesion of MDA.MB.231 cells during the first 30 minutes after seeding. This finding is in line with those obtained by Guo et al.<sup>34</sup> Studies performed on Hela cells showed that ND can enhance cell adhesion, thus inhibiting cell migration by impairing the assembly of the cellular cytoskeleton. Another possible mechanism of this phenomenon was the disruption of the epithelial–mesenchymal transition (EMT) signaling pathway by decreasing the



**Figure 8** Cell adhesion of the MDA.MB.231 (**A–C**) and U-87 MG (**D–F**) cells after 30 minutes, 60 minutes, and 120 minutes after cell seeding on GN, GO, C60, and ND nanofilms determined by measuring total LDH. Results are presented as the percentage of control (mean with standard deviation; n=6). Different letters above the columns indicate statistically significant differences between groups (p<0.05).



**Figure 9** Cell adhesion of MDA.MB.231 (**A**) and U-87 MG (**B**) cells after 2 hours of incubation on certain ECM components covered with ND determined by ECM Cell Adhesion Array. Results are presented as the percentage of control (mean with standard deviation; n=3). Different letters above the columns indicate statistically significant differences between groups (p<0.05).



**Figure 10** Images performed using inverted microscope of control, MDA.MB.231 (**A**), and U-87 MG (**C**) bioprinted 3D models (view from above) and MDA.MB.231 (**B**) and U-87 MG (**D**) models treated with 100 mg/L ND. Section through a bioprinted 3D model made of MDA.MB.231 cells, ND (**G**), and U-87 MG (**F**). Cell nuclei were stained with DAPI, and dead cells were stained using Image-IT™ DEAD Green™ Viability Stain (Thermo Fisher Scientific). (**F** and **H**) The results are presented as the mean with standard deviation. Different letters above columns indicate statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

level of transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) caused by ND.<sup>34</sup> Another study concerning the adhesion of osteoblasts to ND coatings showed that the nanocrystalline layer of ND can promote adhesion.<sup>35</sup> As the adhesion of cancer cells plays a major role in cancer progression,<sup>36</sup> we have also investigated cell adhesion to particular ECM components covered with ND. The analysis revealed that ND treatment enhances the adhesion of both breast cancer and glioblastoma grade IV cell lines to tenascin and vitronectin. Enhanced adhesion to collagen I and collagen IV was also noted in the case of U-87 MG cells. According to the literature, numerous isoforms of tenascin are produced through alternative splicing of nine fibronectin type III regions. Different splicing isoforms are characterized by specific biological functions.<sup>37</sup> The most common tenascins present in the microenvironment of breast cancer tumors are those containing the D and B domains, which are connected with the invasive phenotype.<sup>38</sup> Tenascin is also over-expressed in the ECM of the invasive phenotype of glioblastoma.<sup>39</sup> In general, tenascin can directly interact with various cell adhesion receptors, thereby influencing their functions.<sup>40</sup> The presence of this protein in ECM may inhibit focal adhesion and promote cell migration and angiogenesis.<sup>41</sup> One of the first observations concerning tenascin revealed that cells did not adhere well to the ECM component, which in turn led to a higher proliferation rate.<sup>42</sup> However, our studies proved that the addition of ND can weaken the activity of tenascin, enhancing adhesion and thus inhibiting MDA.MB.231 cell proliferation. Another important protein present in the tumor microenvironment is vitronectin. The addition of ND enhanced the adhesion of both MDA.MB.231 and U-87 MG cells to this protein. The interaction between vitronectin and integrins can activate signaling pathways that regulate cytoskeleton reorganization, lipid metabolism, intracellular ion transport, and gene expression.<sup>43</sup> Another finding was the enhanced adhesion to collagen I and IV covered with ND observed in the U-87

MG cell line. According to the literature, collagen I has two exclusive domains: the matrix interaction domain and the cell interaction domain.<sup>44</sup> The first one is for impairing the structural properties of collagen fibrils. It has binding sites for proteoglycans such as dermatan sulfate or keratin sulfate, while the other is responsible for signal transduction and ECM remodeling. This domain has binding sites for matrix metalloproteinases, integrins, discoidin domain receptors, and matricellular proteins.<sup>45</sup> Collagen type IV mediates the process that leads to collagen sheet formation. These domains are the major components of the basement membrane.<sup>45</sup> Enhanced adhesion to those components may possibly lead to the remodeling of damaged ECM after tumor resection.

## Conclusion

ND nanofilm is a nontoxic and pro-adhesive nanomaterial that might be used to stabilize and partially replenish the niche after breast tumor resection. ND nanofilm enhances the adhesion of breast cancer cell lines during the first 60 minutes after cell seeding. By coating ECM components with ND, enhanced adhesion to tenascin and vitronectin was observed. Moreover, the nanofilm can decrease the proliferation rate of MDA.MB.231 cells. However, ND nanofilm caused cell membrane damage in U-87 MG cells and did not enhance the adhesion of the glioblastoma cell line. ND nanofilm was capable of decreasing the proliferation rate of the glioblastoma grade IV cell line, but only after 48 hours. In that case, the nanofilm caused enhanced adhesion to tenascin, vitronectin, collagen I, and collagen IV. Although nanomaterials such as GO and C60 were biocompatible for MDA.MB.231 and U-87 MG cell lines, they did not significantly influence the proliferation for adhesion of tested cells.

## Abbreviations

AFM, atomic force microscopy; C60, fullerene; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; ECM, extracellular matrix; EMEM, Eagle's Minimum Essential Medium; FBS, fetal bovine serum; GN, graphene; GO, single-layer graphene oxide; LDH, lactate dehydrogenase; LDE, laser Doppler electrophoresis; ND, diamond nanoparticles; PBS, phosphate-buffered saline; SEM, scanning electron microscope; SD, standard division; TEM, transmission electron microscope; ZP, zeta potential.

## Data Sharing Statement

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

## Acknowledgments

The manuscript is part of the PhD thesis of Barbara Wójcik.

## Author Contributions

All authors made a contribution to the presented work, whether that is in the conception, study design, execution, acquisition of data, analysis and interpretation, or in all these areas; took part in revising or critically reviewing the article; gave final approval of the version to be published; have agreed on the journal to which the article has been submitted; and agree to be accountable for all aspects of the work.

## Funding

This research was funded by the National Science Centre, Poland, project number 2020/37/B/NZ7/03532.

## Disclosure

The authors declare no conflicts of interest in this work.

## References

1. Li L, Zhang F, Liu Z, et al. Immunotherapy for triple-negative breast cancer: combination strategies to improve outcome. *Cancers*. 2023;15(1). doi:10.3390/cancers15010321
2. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the national comprehensive cancer network. *Cancer*. 2012;118(22):5463–5472. doi:10.1002/cncr.27581

3. Miglietta F, Fabi A, Generali D, et al. Optimizing choices and sequences in the diagnostic-therapeutic landscape of advanced triple-negative breast cancer: an Italian consensus paper and critical review. *Cancer Treat Rev.* **2023**;114:102511. doi:10.1016/j.ctrv.2023.102511
4. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.* **2007**;13(15):4429–4434. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-3045
5. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* **2015**;65(2):87–108. doi:10.3322/caac.21262
6. Insua-Rodríguez J, Oskarsson T. The extracellular matrix in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* **2016**;97:41–55. doi:10.1016/j.addr.2015.12.017
7. Mohiuddin E, Wakimoto H. Extracellular matrix in glioblastoma: opportunities for emerging therapeutic approaches. *Am J Cancer Res.* **2021**;11(8):3742–3754.
8. Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol Med.* **2014**;6(11):1359–1370. doi:10.15252/emmm.201302627
9. Predina J, Eruslanov E, Judy B, et al. Changes in the local tumor microenvironment in recurrent cancers may explain the failure of vaccines after surgery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2013**;110(5):415–424. doi:10.1073/pnas.1211850110
10. Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene.* **2016**;35(10):1216–1224. doi:10.1038/onc.2015.192
11. Guo F, Zhang Y, Bai L, Cui J. Natural killer cell therapy targeting cancer stem cells: old wine in a new bottle. *Cancer Lett.* **2023**;570:216328. doi:10.1016/j.canlet.2023.216328
12. Walker C, Mojares E, Del Río Hernández A. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. *Int J Mol Sci.* **2018**;19(10):3028. doi:10.3390/ijms19103028
13. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* **2010**;123(24):4195–4200. doi:10.1242/jcs.023820
14. Tufail M, Cui J, Wu C. Breast cancer: molecular mechanisms of underlying resistance and therapeutic approaches. *Am J Cancer Res.* **2022**;12(7):2920–2949.
15. Lah TT, Novak M, Breznik B. Brain malignancies: glioblastoma and brain metastases. *Semin Cancer Biol.* **2020**;60:262–273. doi:10.1016/j.semcancer.2019.10.010
16. Malik R, Lelkes PI, Cukierman E. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol.* **2015**;33(4):230–236. doi:10.1016/j.tibtech.2015.01.004
17. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell.* **2005**;8(3):241–254. doi:10.1016/j.ccr.2005.08.010
18. Sosnowska M, Kutwin M, Strojny B, et al. Diamond nanofilm normalizes proliferation and metabolism in liver cancer cells. *Nanotechnol Sci Appl.* **2021**;14:115–137. doi:10.2147/NSA.S322766
19. Wang SP, Guo JG, Jiang Y. The size- and chirality-dependent elastic properties of graphene nanofilms. *J Comput Theor Nanosci.* **2013**;10(1):250–256. doi:10.1166/jctn.2013.2687
20. Verma R, Kumar Gupta S, Lamba NP, et al. Graphene and graphene based nanocomposites for bio-medical and bio-safety applications. *ChemistrySelect.* **2023**;8(6). doi:10.1002/slct.202204337
21. Ansar SA, Aggarwal S, Arya S, et al. An intuitionistic approach for the predictability of anti-angiogenic inhibitors in cancer diagnosis. *Sci Rep.* **2023**;13(1):1–14. doi:10.1038/s41598-023-32850-8
22. Fahmi T, Branch LD, Nima ZA, et al. Mechanism of graphene-induced cytotoxicity: role of endonucleases. *J Appl Toxicol.* **2017**;37(11):1325–1332. doi:10.1002/jat.3462
23. Wu J, Yang R, Zhang L, et al. Cytotoxicity effect of graphene oxide on human MDA-MB-231 cells. *Toxicol Mech Methods.* **2015**;25(4):312–319. doi:10.3109/15376516.2015.1031415
24. Harhaji L, Isakovic A, Raicevic N, et al. Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene. *Eur J Pharmacol.* **2007**;568(1–3):89–98. doi:10.1016/j.ejphar.2007.04.041
25. Wójcik B, Zawadzka K, Jaworski S, et al. Dependence of diamond nanoparticle cytotoxicity on physicochemical parameters: comparative studies of glioblastoma, breast cancer, and hepatocellular carcinoma cell lines. *Nanotoxicology.* **2023**;17:310–337. doi:10.1080/17435390.2023.2218925
26. Moradi E, Naserzadeh P, Brouki Millan P, et al. Selective cytotoxicity mechanisms and biodistribution of diamond nanoparticles on the skin cancer in C57 mouse. *Biomed Mater.* **2022**;17(1):015013. doi:10.1088/1748-605X/ac3d99
27. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* **2012**;9(7):676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
28. Akhavan O, Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano.* **2010**;4(10):5731–5736. doi:10.1021/nn101390x
29. Achawi S, Pourchez J, Feneon B, et al. Graphene-based materials in vitro toxicity and their structure–activity relationships: a systematic literature review. *Chem Res Toxicol.* **2021**;34(9):2003–2018. doi:10.1021/acs.chemrestox.1c00243
30. Sanchez VC, Jachak A, Hurt RH, et al. Biological interactions of graphene-family nanomaterials. *Chem Res Toxicol.* **2012**;25:15–34. doi:10.1021/tx200339h
31. Handschuh-Wang S, Wang T, Tang Y. Ultrathin diamond nanofilms—Development, challenges, and applications. *Small.* **2021**;17(30):1–26. doi:10.1002/smll.202007529
32. Luo D, Schricker SR. *Handbook of Nanomaterials Properties*. Springer Science & Business Media; **2014**:10.1007/978-3-642-31107-9.
33. Roy RK, Lee KR. Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: a review. *J Biomed Mater Res.* **2007**;83(1):72–84. doi:10.1002/jbm. b.30768
34. Guo Q, Li L, Gao G, et al. Nanodiamonds inhibit cancer cell migration by strengthening cell adhesion: implications for cancer treatment. *ACS Appl Mater Interfaces.* **2021**;13(8):9620–9629. doi:10.1021/acsami.0c21332
35. Yang L, Sheldon BW, Webster TJ. Orthopedic nano diamond coatings: control of surface properties and their impact on osteoblast adhesion and proliferation film growth conditions for diamond coatings. *J Biomed Mater Res.* **2008**;91A(2):548–556. doi:10.1002/jbm.a.32227
36. Emery LA, Tripathi A, King C, et al. Early dysregulation of cell adhesion and extracellular matrix pathways in breast cancer progression. *Am J Pathol.* **2009**;175(3):1292–1302. doi:10.2353/AJPATH.2009.090115
37. Meiners S, Geller HM. Long and short splice variants of human tenascin differentially regulate neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci.* **1997**;10(1–2):100–116. doi:10.1006/mcne.1997.0643

38. Castro NP, Osório CABT, Torres C, et al. Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. *Breast Cancer Res.* **2008**;10(5):1–14. doi:10.1186/bcr2157
39. Rolle K, Nowak S, Wyszko E, et al. Promising human brain tumors therapy with interference RNA intervention (iRNAi). *Cancer Biol Ther.* **2010**;9 (5):397–407. doi:10.4161/cbt.9.5.10958
40. Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal.* **2009**;3(3–4):287–310. doi:10.1007/s12079-009-0075-1
41. Wawrzyniak D, Grabowska M, Głodowicz P, et al. Down-regulation of tenascin-C inhibits breast cancer cells development by cell growth, migration, and adhesion impairment. *PLoS One.* **2020**;15:1–25. doi:10.1371/journal.pone.0237889
42. Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell.* **1986**;47(1):131–139. doi:10.1016/0092-8674(86)90374-0
43. Schwartz I, Seger D, Shaltiel S. Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol.* **1999**;31(5):539–544. doi:10.1016/S1357-2725(99)00005-9
44. Sweeney SM, Orgel JP, Fertala A, et al. Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates. *J Biol Chem.* **2008**;283(30):21187–21197. doi:10.1074/jbc.M709319200
45. Payne LS, Huang PH. The pathobiology of collagens in glioma. *Mol Cancer Res.* **2013**;11(10):1129–1140. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0236

**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>

1 SUPPLEMENTARY MATERIALS

2 **Cell line-dependent adhesion and inhibition of  
3 proliferation on carbon-based nanofilms**

4 Barbara Wójcik<sup>1</sup>, Katarzyna Zawadzka<sup>1</sup>, Ewa Sawosz<sup>1</sup>, Małwina Sosnowska<sup>1</sup>, Agnieszka  
5 Ostrowska<sup>1</sup>, Mateusz Wierzbicki<sup>1</sup>

6

7 <sup>1</sup> Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences,  
8 Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland

9

10 Correspondence: Mateusz Wierzbicki

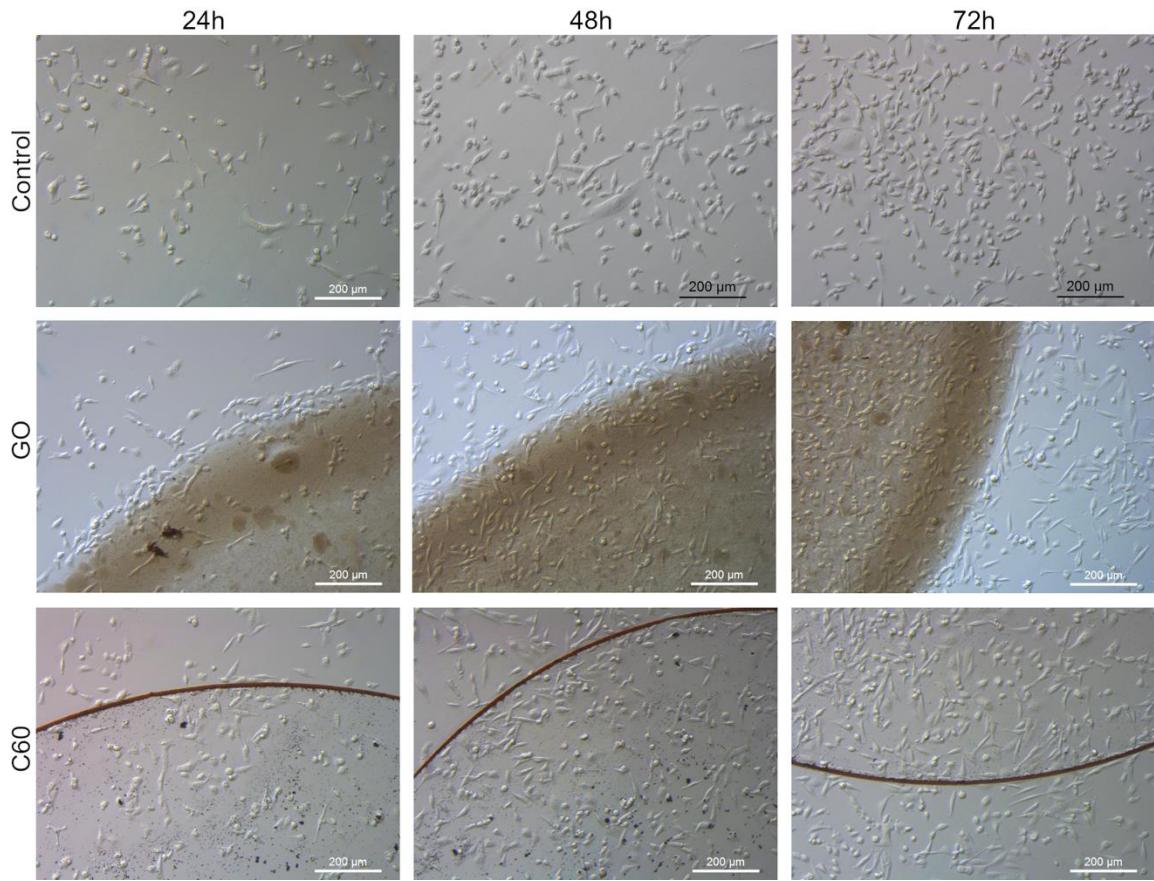
11 Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences,  
12 Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland

13 Tel +48 22 5936676

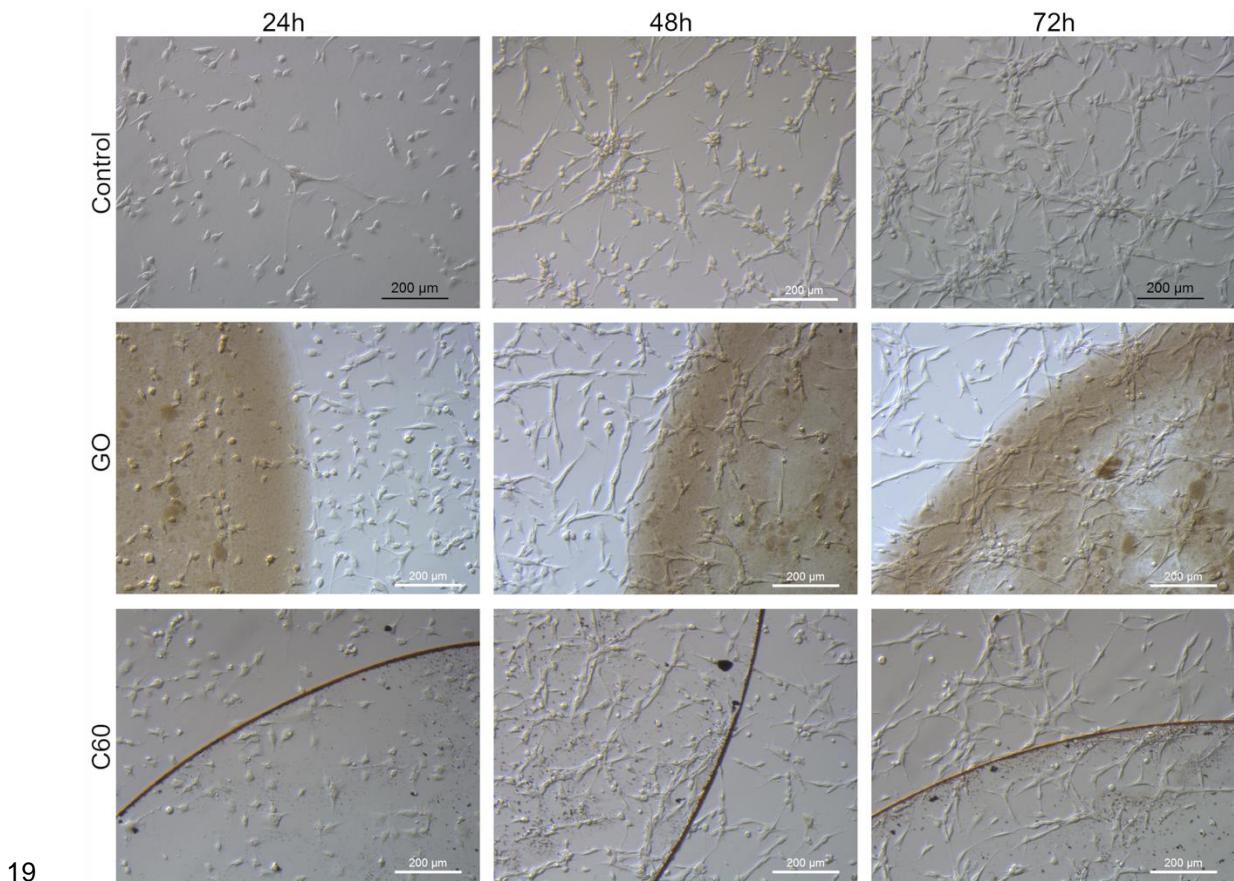
14 Email mateusz\_wierzbicki@sggw.edu.pl

15 **Morphological analysis**

16



17 **FIGURE S1** Morphological characterization of MDA.MB.231 human breast adenocarcinoma,  
18 seeded on GO and C60 nanofilms after 24 hours, 48 hours, and 72 hours.



19  
20 **FIGURE S2** Morphological characterization of U-87 MG glioblastoma grade IV cells seeded on  
21 GO and C60 nanofilms after 24 hours, 48 hours, and 72 hours.

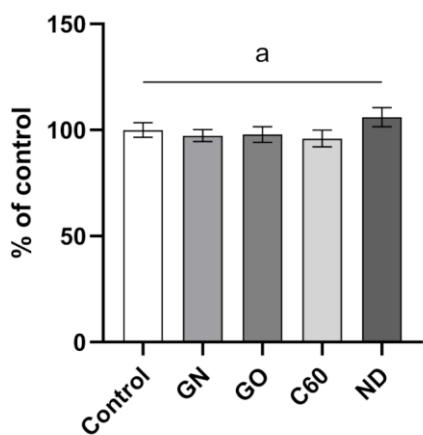
22 **Interference analysis**

23 In order to avoid false results of the analysis based on the lactate dehydrogenase (LDH)  
24 measurements for nanofilms made of graphene (GN), graphene oxide (GO), fullerene (C60), and  
25 diamond nanoparticles (ND) used in the experiments, an interference test was performed. The  
26 analysis revealed no significant influence of the tested nanofilms compared with the control  
27 (Figure 3S).

28 In order to perform interference analysis, 50 µL of colloidal suspensions of tested  
29 nanomaterials were placed at the bottom of a 96-well plate (Nunc, Thermo Fisher Scientific) and  
30 dried under sterile conditions. After nanomaterials were fully dried, 100 µL of cell culture medium  
31 - EMEM (ATCC, Manassas, VA, USA) was added to a triplicate of wells that were not covered

32 with nanofilm (control group), the same amount of EMEM was added to the wells with nanofilms  
33 and incubated for 24 hours in humanified atmosphere. Subsequently, a lactate dehydrogenase  
34 activity assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was performed. 50  $\mu$ l of cell culture  
35 media was transferred into a new plate, followed by mixing with 100  $\mu$ l of LDH reaction mixture.  
36 Spectrophotometer reading was performed after 30 minutes at 490 nm (reference wavelength:  
37 690 nm) using a microplate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). The results are  
38 presented as the percentage of the control. Each group consisted of three replicates.

### Interference analysis



39  
40 **FIGURE S3** LDH interference analysis. Interactions of LDH reagent and nanomaterials are  
41 presented as the percentage of control from three replicates with the standard deviation. Different  
42 letters above the columns indicate statistically significant differences between the groups ( $p \leq$   
43 0.05).  
44

Warszawa, 27.03.2024r.

**mgr inż. Barbara Wójcik**  
barbara\_wojcik1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii  
Szkoly Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik B, Zawadzka K, Sawosz Chwalibóg E, Sosnowska-Ławnicka M, Ostrowska A, Wierzbicki M. Cell Line-Dependent Adhesion and Inhibition of Proliferation on Carbon-Based Nanofilms. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2023; Volume 16:41–57” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: wykonaniu wszystkich analiz, których wyniki przedstawione są zarówno w artykule jak i w suplementie dołączonym do artykułu; opracowaniu oraz wizualizacji uzyskanych danych; oraz na napisaniu i redakcji manuskryptu.

Podpis



Warszawa, 27.03.2024r.

**mgr inż. Katarzyna Zawadzka**  
katarzyna\_zawadzka1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik B, Zawadzka K, Sawosz Chwalibóg E, Sosnowska-Ławnicka M, Ostrowska A, Wierzbicki M. Cell Line-Dependent Adhesion and Inhibition of Proliferation on Carbon-Based Nanofilms. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2023;Volume 16:41–57” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na weryfikacji uzyskanych danych.

Podpis  


Warszawa, 27.03.2024r.

**prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg**  
ewa\_sawosz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik B, Zawadzka K, Sawosz Chwalibóg E, Sosnowska-Ławnicka M, Ostrowska A, Wierzbicki M. Cell Line-Dependent Adhesion and Inhibition of Proliferation on Carbon-Based Nanofilms. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2023;Volume 16:41–57” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w stworzeniu koncepcji badań oraz weryfikacji danych uzyskiwanych w trakcie analiz.

Podpis



Warszawa, 27.03.2024r.

**dr Malwina Sosnowska-Ławnicka**  
malwina\_sosnowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoly Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik B, Zawadzka K, Sawosz Chwalibóg E, Sosnowska-Ławnicka M, Ostrowska A, Wierzbicki M. Cell Line-Dependent Adhesion and Inhibition of Proliferation on Carbon-Based Nanofilms. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2023;Volume 16:41–57” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na walidacji stosowanych metod.

Podpis

*Malwina Sosnowska-Ławnicka*

Warszawa, 27.03.2024r.

**dr inż. Agnieszka Ostrowska**  
agnieszka\_ostrowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Wójcik B, Zawadzka K, Sawosz Chwalibóg E, Sosnowska-Ławnicka M, Ostrowska A, Wierzbicki M. Cell Line-Dependent Adhesion and Inhibition of Proliferation on Carbon-Based Nanofilms. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2023;Volume 16:41–57" mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu zdjęć preparatów przygotowanych do wizualizacji za pomocą transmisyjnej oraz skaningowej mikroskopii elektronowej.

*A. Ostrowska*  
Podpis

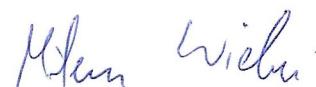
Warszawa, 27.03.2024r.

**dr hab. Mateusz Wierzbicki, prof. SGGW**  
mateusz\_wierzbicki@sggw.edu.pl

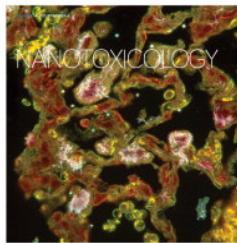
**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik B, Zawadzka K, Sawosz Chwalibóg E, Sosnowska-Ławnicka M, Ostrowska A, Wierzbicki M. Cell Line-Dependent Adhesion and Inhibition of Proliferation on Carbon-Based Nanofilms. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2023;Volume 16:41–57” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w przygotowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodologii oraz recenzji i redakcji manuskryptu.



Podpis



# Dependence of diamond nanoparticle cytotoxicity on physicochemical parameters: comparative studies of glioblastoma, breast cancer, and hepatocellular carcinoma cell lines

Barbara Wójcik, Katarzyna Zawadzka, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Malwina Sosnowska, Agnieszka Ostrowska, Marta Grodzik, Artur Małolepszy, Marta Mazurkiewicz-Pawlicka & Mateusz Wierzbicki

**To cite this article:** Barbara Wójcik, Katarzyna Zawadzka, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Malwina Sosnowska, Agnieszka Ostrowska, Marta Grodzik, Artur Małolepszy, Marta Mazurkiewicz-Pawlicka & Mateusz Wierzbicki (2023) Dependence of diamond nanoparticle cytotoxicity on physicochemical parameters: comparative studies of glioblastoma, breast cancer, and hepatocellular carcinoma cell lines, Nanotoxicology, 17:4, 310-337, DOI: [10.1080/17435390.2023.2218925](https://doi.org/10.1080/17435390.2023.2218925)

**To link to this article:** <https://doi.org/10.1080/17435390.2023.2218925>



[View supplementary material](#)



Published online: 01 Jun 2023.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 114



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)



Citing articles: 1 [View citing articles](#)

RESEARCH ARTICLE



## Dependence of diamond nanoparticle cytotoxicity on physicochemical parameters: comparative studies of glioblastoma, breast cancer, and hepatocellular carcinoma cell lines

Barbara Wójcik<sup>a</sup> , Katarzyna Zawadzka<sup>a</sup> , Sławomir Jaworski<sup>a</sup> , Marta Kutwin<sup>a</sup> , Malwina Sosnowska<sup>a</sup> , Agnieszka Ostrowska<sup>a</sup> , Marta Grodzik<sup>a</sup> , Artur Małolepszy<sup>b</sup> , Marta Mazurkiewicz-Pawlak<sup>b</sup> and Mateusz Wierzbicki<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, University of Life Sciences, Warsaw, Poland; <sup>b</sup>Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland

### ABSTRACT

Reports on the cytotoxicity of diamond nanoparticles (ND) are ambiguous and depend on the physicochemical properties of the material and the tested cell lines. Thus, the aim of this research was to evaluate the influence of thirteen types of diamond nanoparticles, differing in production method, size, and surface functional groups, on their cytotoxicity against four tumor cell lines (T98G, U-118 MG, MCF-7, and Hep G2) and one non-tumor cell line (HFF-1). In order to understand the dependence of diamond nanoparticles on physicochemical properties, the following parameters were analyzed: viability, cell membrane damage, morphology, and the level of intracellular general ROS and mitochondrial superoxide. The performed analyses revealed that all diamond nanoparticles showed no toxicity to MCF-7, Hep G2, and HFF-1 cells. In contrast, the same nanomaterials were moderately toxic for the glioblastoma T98G and U-118 MG cell lines. In general, the effect of the production method did not influence ND toxicity. Some changes in cell response after treatment with modified nanomaterials were observed, with the presence of carboxyl groups having a more detrimental effect than the presence of other functional groups. Although nanoparticles of different sizes caused similar toxicity, nanomaterials with bigger particles caused a more pronounced effect.

### ARTICLE HISTORY

Received 5 February 2023  
Revised 4 May 2023  
Accepted 22 May 2023

### KEYWORDS

Toxicity; diamond nanoparticles; tumor; nanoparticles surface modifications

## Introduction

Carbon nanomaterials are promising agents for biomedical applications. They are thought to be invaluable in such fields as designing drug delivery systems (Ansari et al. 2016), antibacterial agents (Chang et al. 2019), bioimaging (Peng et al. 2017), or even antitumor agents (Vervald et al. 2020). They are manufactured in different sizes, shapes, and chemical compositions in order to meet certain requirements of those specific usages (Ibrahim et al. 2018). One of their representatives, diamond nanoparticles (ND), gained widespread interest as they possess unique properties, such as biocompatibility, low toxicity, stable fluorescence, and facile functionalization (Qin et al. 2021). It is believed that oxidative-stress-mediated DNA damage and micronucleus formation underlie ND cytotoxicity (Adach et al.

2016). There are many factors underlying carbon nanomaterial cytotoxicity, including size, shape, charge complexity, chemical compositions, surface functionalization, aggregation tendency, and production methods (Lewinski, Colvin, and Drezek 2008).

The unique properties of ND mean that they are increasingly investigated in the context of their potential use in tumor treatment. Grade IV glioblastoma is one of the most aggressive tumors and very often leads to a patient's death (Brar et al. 2022). The median survival time of patients who suffer from this kind of tumor is 12.6 months (Carlsson, Brothers, and Wahlestedt 2014). Although there are many therapeutic strategies available, from chemo- and radiotherapy to surgical resection (Carlsson, Brothers, and Wahlestedt 2014), they

seem to be insufficient. Due to intratumor heterogeneity, necrosis, high mitotic activity, resistance to apoptosis, microvascular proliferation, and the ability to infiltrate adjoining tissues (Tilak et al. 2021), the treatment remains challenging. Moreover, since 2009 there has not been any improvement in the chemotherapeutic treatment of grade IV glioblastoma (Brar et al. 2022). A similar situation may be observed in the case of breast cancer. This type of disease consists of a heterogeneous group of tumors (Tachibana et al. 2008), with different morphologies, molecular features, and responses to treatment (Rakha, Tse, and Quinn 2023). Current treatment strategies involve adjuvant chemotherapy, radiotherapy, surgery, and immunotherapy (Jain et al. 2023). However, those strategies have their limitations and remain unsuccessful for many patients, as around 0.69 million people die each year because of breast cancer (Sung et al. 2021). Similar statistics are observed for hepatocellular carcinoma. According to scientific reports, 0.7 million people die annually because of this illness (Niu et al. 2020). There are many therapeutic strategies available, such as surgical resection, liver transplantation, embolization, chemotherapy, and radiotherapy (Sedighi et al. 2023). Yet the approach of applying surgical intervention is the most effective one. However, it is successful only for approximately 15% of patients (Zhou et al. 2009). For that reason, an urgent need for novel therapeutic strategies has emerged.

Currently, chemotherapy or its combination with other treatments is the main approach of choice in the treatment of tumors. However, due to the chemoresistance acquired by tumor cells during treatment, it can often be insufficiently effective. One of the main causes of chemotherapy failure is the chemoresistance acquired by tumor cells during treatment. It is believed that the most common mechanism of chemoresistance is drug efflux via adenine triphosphate – binding proteins (ABC) (Chow et al. 2011). Chemoresistance is common in stage IV glioblastoma (Dymova, Kulagina, and Richter 2021), breast cancer (Shivhare and Das 2023) and hepatocellular carcinoma (Marin et al. 2020). According to Chow et al. (2011) ND is able to improve the treatment of chemotherapeutic breast and liver tumors in mice by overcoming drug leakage. Moreover, ND is able to cross the blood-brain

barrier (Moscarillo et al. 2019), which is still a major challenge for effective drug delivery to the central nervous system. According to Zupančič and Veranič (2022), ND currently plays an important role in the search for the most effective carriers for various types of drugs. Recent scientific reports also point to the potential use of ND in targeted therapy (Wu et al. 2023). Since ND may become a potential drug delivery platform, its toxicity needs to be thoroughly investigated, taking into account the differences in physicochemical properties of different ND. Surface functionalization, production method, morphology, aggregation, surface functionalization are factors that may affect the toxicity of ND (Zhu et al. 2012).

ND can be produced using numerous methods, such as detonation, laser ablation, high-energy ball milling of high pressure, high-temperature diamond microcrystals (HPHT), plasma-assisted chemical vapor deposition (CVD), electron irradiation of carbon ‘onions,’ autoclave synthesis from supercritical fluids, chlorination of carbides, and ultrasound cavitation (Keremidarska et al. 2014). Detonation and laser ablation are the most common techniques. In this study, detonation-generated ND and laser-generated ND are compared.

Detonation-generated ND are synthesized during the detonation of strong explosives with a negative oxygen balance (Stehlik et al. 2021); the detonation is performed in a closed volume (Baidakova et al. 2013). The resultant product, detonation soot, may contain up to 25 wt.% impurities, such as other carbon allotropes, metals, and oxides, and therefore needs to be purified. The process of removing impurities can influence the potential cytotoxicity displayed by newly prepared detonation-generated ND powder (Keremidarska et al. 2014). Laser-generated ND are produced by high-power hydroshocks generated by laser light pulses. Here, the target is placed under a layer of an optically transparent liquid at a fixed distance. The laser beam is focused on the liquid generating the light-hydraulic effect (Baidakova et al. 2013).

During the production process, surface modifications may be introduced to ND. They can be functionalized with hydroxyl ( $-\text{OH}$ ), amino ( $-\text{NH}_2$ ), carboxyl ( $-\text{COOH}$ ), and other groups. The presence of those groups changes the chemical properties of ND and provides interactions of ND with organic

molecules (Tu et al. 2006). Moreover, the presence of the –OH and –COOH groups may easily change the type of biomolecule binding from quite weak and nonspecific non-covalent binding into stronger and more stable covalent binding (Reina et al. 2019). Hence, it is important to investigate the influence of surface functionalization on ND cytotoxicity and biocompatibility.

Another factor underlying the *in vitro* cytotoxicity of ND is size. This parameter is also connected with aggregation. In general, aggregates are formed through van der Waals interactions, which are stronger when the nanomaterial size is smaller. Moreover, for ND smaller than 10 nm in diameter, some additional mechanisms of tight aggregation, with the formation of crystal-like structures, may be encountered (Tu et al. 2006). Particle size is also related to ND reactivity (Tervonen et al. 2009), with ND smaller than 5 nm showing different properties from those of ND larger than 100 nm (Tu et al. 2006). Although ND are said to be biocompatible carbon-based nanomaterials (Zhang et al. 2012) and ND size was suggested to play no significant role in their biocompatibility (Schrand, Hens, and Shenderova 2009), particles smaller than 10 nm in diameter exhibit some toxicity against certain living systems (Barhoum et al. 2022). ND cytotoxicity is also connected with the volume of nanoparticles that are able to enter the cell body. It is generally accepted that more effective internalization is observed for smaller nanoparticles (Manzanares and Ceña 2020). However, the optimal size for an effective uptake was assessed to lie within a range of 2–50 nm (Jiang et al. 2008).

We hypothesize that physicochemical parameters such as size, production method, or the presence of functional groups on the surface of ND may be crucial for their cytotoxic potential against the breast cancer MCF-7, grade IV glioblastoma T98G and U-118 MG, and hepatoma Hep G2 tumor cell lines and the non-tumor HFF-1 cell line of human fibroblasts. Although many studies concerning ND cytotoxicity have been reported in the past several decades, such extensive screening tests are still missing. The presented studies are the first to compare the toxic effects of thirteen different ND produced by different methods and with different functionalizations on five different cell lines representing three different tumors and non-tumor cells.

## Materials and methods

### Nanomaterials

The first group of ND, composed of four nanoparticles, was purchased from US Research Nanomaterials (Houston, TX, USA). Those nanomaterials differ by the presence of different functional groups. ND-nf is not functionalized at all, while ND-NH<sub>2</sub> has amino groups on its surface, ND-COOH is functionalized with carboxyl groups, and ND-OH is functionalized with hydroxyl groups. All ND were produced as a powder using the detonation technique. The average size of ND is in the range of 2–10 nm.

The second group of ND was purchased from SkySpring Nanomaterials (Houston, TX, USA). Those ND differ in size. The average size of ND-B is in a range of 10–20 nm, while that of ND-S is in a range of 3–4 nm.

The third group of ND was purchased from Ray Techniques Ltd. (Jerusalem, Israel). Those nanomaterials differ in the presence of different functional groups and production methods. RayND and RayND-AL were produced as ND powder during laser synthesis. The average size of RayND grains is in the range of 4–5 nm, while that of RayND-AL is in the range of 4–4.5 nm. Moreover, RayND-AL was hydroxylated and nitrogenized. According to the manufacturer, this nanomaterial does not contain metallic impurities. Furthermore, the ash residue is maintained at a level lower than 0.02 wt.%.

RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, and RT-DND-LN were produced as ND powder using the detonation technique. All nanomaterials were purified, obtaining an ash residue at a level lower than 0.1 wt.%. The average size of the ND particles is in the range of 3.5–6 nm. According to the manufacturer, RT-DND is free of metallic and graphite impurities. RT-DND-EN, RT-DND-A, and RT-DND-LN are nitrogenized. All three nanomaterials are lyophobic. Moreover, RT-DND-A and RT-DND-LN are hydrophobic, while RT-DND-EN is hydrophilic. RT-DND-LN is functionalized with hydroxyl groups. This nanomaterial is hydrophobic and lyophobic.

All nanomaterials were dispersed in ultrapure water to obtain a concentration of 1000 mg/L and then sonicated for 5 min, at intervals of 1 min of sonication and a 30-s break (500 W, 20 kHz), using VC 505 Ultrasonic Liquid Processor with a cup horn

(Sonics & Materials, Newtown, CT, USA). Prior to use, suspensions of ND were sonicated for 1 min (500 W, 32 kHz). For cell treatment ND 10 $\times$  concentrated water suspensions were diluted in cell medium to obtain final concentrations of 5, 20, 50, and 100 mg/L.

### **Physicochemical analysis of nanomaterials**

The ultrastructure analysis of ND was performed using a JEM-1220 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) at 80 keV with a Morada 11-megapixel camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany).

Raman spectra were collected using a Renishaw inVia spectrometer with a 514-nm laser source. The sample was measured as soon as it was prepared, and the spectra were collected from 5 different spots. Each spot was irradiated for 5 s with a laser power intensity of 0.5 mW.

Analysis of the zeta potential (ZP) and the hydrodynamic diameter was performed using a Zeta Sizer Nano-ZS90 analyzer (Malvern, Worcestershire, UK). ZP measurements were made using laser Doppler electrophoresis with the Smoluchowski approximation. Hydrodynamic diameter measurements were made using dynamic light scattering (DLS) with a scattering angle of 90°, with the refraction index for the solvent of 1.330. For DLS, the samples were centrifuged (5 min, 4000 RPM) prior to the analysis. All measurements were performed at 25 °C. ZP and hydrodynamic diameter of ND at a final concentration of 20 mg/L were measured in ultrapure water and in cell culture medium EMEM (ATCC) supplemented with 10% of ND hydrocolloids immediately after adding nanomaterials and after 24 h of incubation at 37 °C.

### **Cell lines**

Five cell lines were used in the study: two grade IV glioblastoma cell lines, T98G and U-118 MG; the breast adenocarcinoma cell line MCF-7; the hepatocellular carcinoma cell line Hep G2; and the non-tumor cell line HFF-1 fibroblasts. All cell lines were characterized by the type of adherent cells and were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). T98G, MCF-7, and Hep G2 were cultured in Eagle's Minimum Essential

Medium (EMEM, ATCC) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and a 1% antibiotic mix (antibiotic-antimycotic, Gibco) of penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), and Gibco amphotericin B (0.25 µg/mL). U-118 MG and HFF-1 were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, ATCC) supplemented with FBS and 1% antibiotic-antimycotic. In the case of U-118 MG, FBS was maintained at a level of 10%, while in HFF-1 it was 15%. All cell lines were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere that contained 5% CO<sub>2</sub>.

Cells were seeded at a density of 1.5  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL for the viability assay and 1  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL for the membrane integrity assay. For both analyses, cells were seeded on a 96-well microplate (Nunc, Thermo Fisher Scientific) in 100 µL of culture medium per well. The membrane integrity assay required lowering FBS to 10% for the HFF-1 cell line. In order to perform morphological analysis, cells were seeded at a density of 5  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL on a 6-well microplate (Corning, NY, USA) in 3 mL of culture medium per well. For the investigation of the reactive oxygen species level, cells were seeded at a density of 1.3  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL for T98G; 2  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL for U-188 MG, MCF-7, and HFF-1; and 4  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL for Hep G2 on a 15 µ-plate 96-well black microplate (ibiTreat, ibidi, GmbH, Gräfelfing, Germany) in 150 µL of culture medium per well. Twenty-four hours after seeding, when the cells were fully attached, 10% of the culture medium was exchanged with the same volume (10 µL per well on a 96-well microplate, 300 µL on a 6-well microplate, and 15 µL on an ibiTreat 96-well plate) of ND water suspensions, obtaining final concentrations of 5, 20, 50, and 100 mg/L. Control groups were treated with the solvent, in this case, ultrapure water. The cells were incubated for a further 24 h before the tests were performed. For the determination of reactive oxygen species, the incubation with ND lasted for 3 h.

### **Viability assay**

A PrestoBlue HS cell viability reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) was used for the evaluation of cell viability after ND treatment. This assay is based on the reduction of resazurin to highly fluorescent resorufin. The change in fluorescence

intensity, relative to that of a control group, indicates changes in the reducing power of living cells, enabling the quantitative measurement of viability in the treated samples. The analysis was performed in three independent experiments with four replicates for each group.

After the incubation with ND was done, 10% of the culture medium was exchanged with the same volume (10 µL) of PrestoBlue HS reagent, followed by 90 min of incubation at 37 °C. Additionally, the reagent was added to wells containing the cell culture medium itself, in order to evaluate the background fluorescence. The plates were protected from light. The fluorescence intensity was measured at an excitation wavelength of 560 nm and an emission wavelength of 590 nm, using a microplate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).

The results are presented as % of the control and were calculated from the following formula:

$$\% \text{ of the control} = \frac{A - B}{C - B} \times 100\%$$

where A is the mean fluorescence of the treated group, B is the mean fluorescence of the background, and C is the mean fluorescence of the control. Moreover, in order to exclude the potential influence of the nanomaterials used in the experiments, an interference analysis was performed on the obtained data. The results of this analysis are presented in the *Supplementary Materials*.

### **Cell membrane integrity**

A CyQUANT LDH cytotoxic assay (Thermo Fisher Scientific) was used for the assessment of the amount of lactate dehydrogenase (LDH) in the cell culture medium, an elevated level of which indicates plasma membrane damage. The assay is based on the conversion of lactate to pyruvate by LDH via NAD<sup>+</sup> reduction to NADH, which is then used by diaphorase to reduce tetrazolium salt to a red formazan. The amount of color product is directly proportional to the level of LDH and can be measured calorimetrically. The assay provides a quantitative measurement of extracellular LDH and hence cellular toxicity. The analysis was performed in three independent experiments with four replicates for each group. The lysis buffer was added to the wells in triplicate to evaluate the maximum

level of LDH in the samples and incubated for 45 min at 37 °C. For the evaluation of spontaneous LDH leakage, 10% of the cell culture medium (10 µL) was exchanged with the same volume of ultrapure water in another triplet of wells (control group). The microplates were then centrifuged (6 min, 200 × g) in order to remove the arisen clusters of ND, followed by the transfer of 50 µL of supernatant to a new plate. Afterward, 100 µL of LDH reaction mixture was added to all the wells and incubated for 30 min at room temperature protected from light. After the incubation, 100 µL of stop solution was added to each well. Spectrophotometer readings were performed at a wavelength of 490 nm (reference wavelength: 690 nm) in a microplate reader (Tecan Group Ltd.)

The results are presented as % cytotoxicity and were calculated from the following formula:

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{A - \text{spontaneous LDH leakage}}{\text{MAX LDH} - \text{spontaneous LDH leakage}} \times 100\%$$

where A is the mean absorbance of the treated samples, MAX LDH is the mean absorbance of the triplet of wells in which the cells were lysed, and spontaneous LDH leakage is the mean absorbance of the control group samples.

In this case, the interference analysis was also performed. The obtained data are presented in the *Supplementary Materials*.

### **Morphological analysis**

In order to perform the morphological evaluation, viable cells were visualized without any staining. For live imaging, a Leica DMI8 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a Leica MC 190 HD camera was used.

### **Assessment of reactive oxygen species**

CM-H2DCFDA (general oxidative stress indicator, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) and MitoSOX Red (mitochondrial superoxide indicator, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) were used for the investigation of reactive oxygen species (ROS) induction after ND treatment. After 3 h of incubation with nanomaterials, samples were washed twice with warm Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions (HBSS, Thermo Fisher Scientific), followed by staining with CM-H2DCFDA and MitoSOX Red diluted in HBSS at a final concentration of  $5\ \mu\text{M}$  for both dyes. Then, the cells were incubated for 15 min at  $37^\circ\text{C}$ . Afterward, the samples were again washed twice in warm HBSS, and the nuclei were stained with Hoechst 33342 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) diluted in full culture medium at a final concentration of  $5\ \mu\text{g/mL}$ . After 20 min of incubation at  $37^\circ\text{C}$ , the samples were washed twice with warm HBSS and full culture medium supplemented with  $25\ \mu\text{M}$  HEPES (Thermo Scientific). The ROS level was analyzed with an FV-1000 confocal microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) equipped with an incubation chamber that maintained a temperature of  $37^\circ\text{C}$  (Solent Scientific Ltd, Portsmouth, United Kingdom). Cells were imaged sequentially using a  $20\times$  objective at excitation and emission wavelengths of 495/525 nm (CM-H2DCFDA), 510/580 nm (MitoSOX Red), and 350/461 nm (Hoechst 33342). The analysis was performed in two independent experiments with three replicates for each group. ROS levels were expressed as a sum of pixel values per cell. Analysis and cell counting were performed using Fiji software (Schindelin et al. 2012). The cell number on each image was assessed by thresholding the channel with stained cell nuclei, followed by watershed segmentation and analysis of particle function.

The results are presented as % of the control and were calculated from the following formula:

$$\text{Integrated density per cell} = \frac{P}{K} \times 100\%$$

where  $P$  is the sum of pixels of the treated sample and  $K$  is the mean pixel value per cell of the control group.

### Statistical analysis

The data obtained from the cell membrane integrity and viability assays were analyzed using multi-factorial analysis of variance: two-way ANOVA with GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, CA, USA). The differences between experimental and control groups were tested using Dunnett's multiple comparison test. Differences with  $p < 0.5$  were considered significant ( $*p \leq 0.05$ ;  $** p < 0.01$ ;  $*** p < 0.001$ ). The data obtained from the assessment of reactive

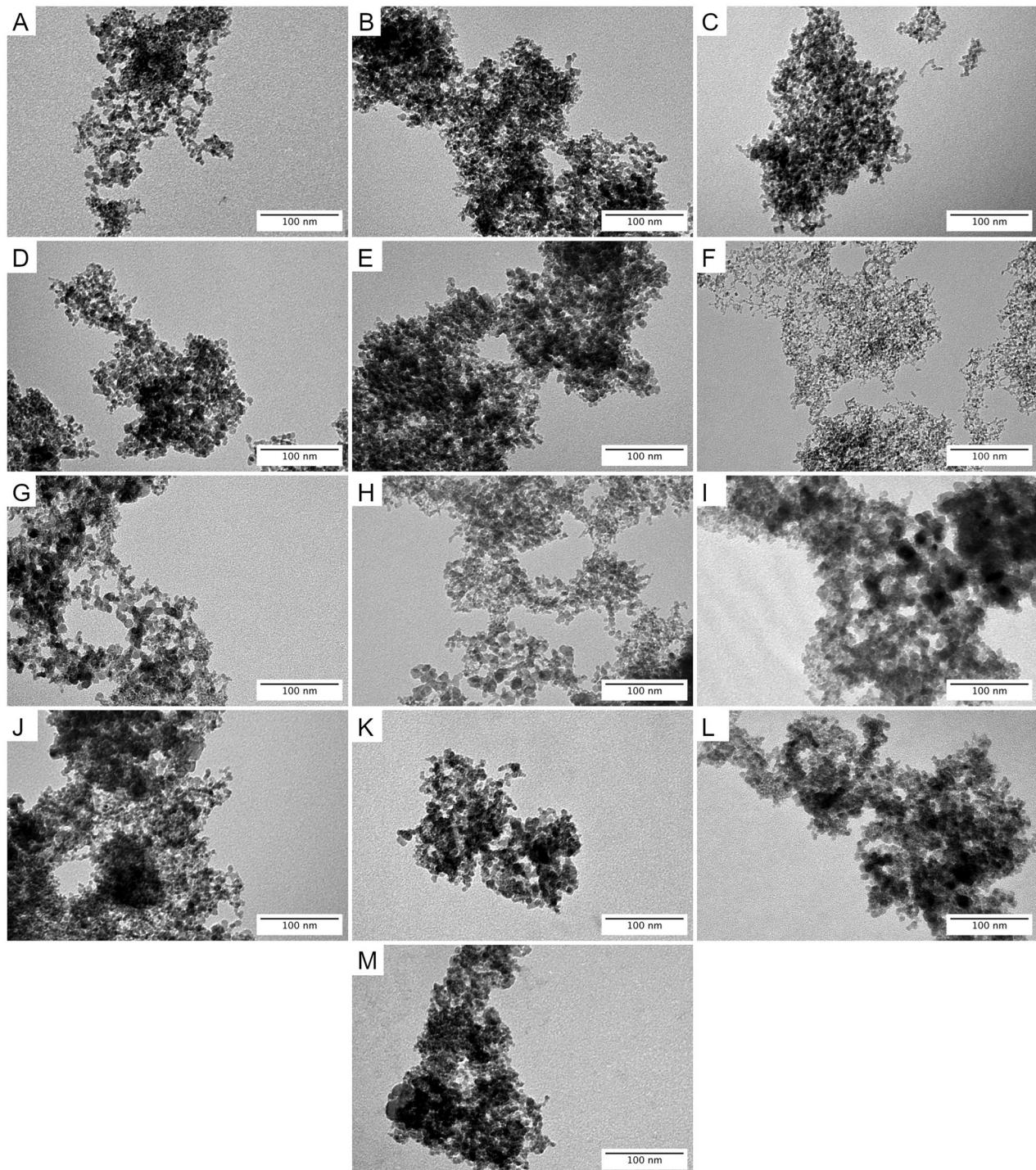
oxygen species were analyzed using mono-factorial analysis of variance: one-way ANOVA with Statgraphics® Plus 4.1 (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, USA). The differences between groups were tested using Tukey's HSD multiple-range test. Differences with  $p < 0.05$  were considered significant. All means are presented with the standard deviation.

## Results

### Physicochemical analysis of nanomaterials

The physicochemical properties of ND were determined by investigating the nanoparticles' Raman spectrum, hydrodynamic size, and zeta potential. The morphology and particle size of the nanomaterials were analyzed with transmission electron microscopy (TEM) (Figure 1). The characterization of the nanomaterials used in the study is shown in Table 1, along with the results of the TEM analysis of the particle size and the hydrodynamic diameter of the studied nanomaterials. The analysis of the hydrodynamic diameter revealed that ND-nf of the detonation synthesis displayed the lowest mean hydrodynamic diameter (194.30 nm) when suspended in ultrapure water, while RayND-AL and RayND of the laser synthesis were characterized by the highest mean hydrodynamic diameter values (329.53 nm and 327.63 nm, respectively). The size distribution by volume of nanomaterials suspended in water is shown in Figure 2. ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B and ND-S have a similar size distribution with peak values around 150 nm. The distribution values of the remaining nanomaterials had peak values around 200 nm (RT-DND-EN), 250 nm (RayND-AL, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN), 280 nm (RT-DND and RayND).

RT-DND-A displayed the smallest mean hydrodynamic diameter (100.92 nm) when suspended in a cell culture medium. Moreover, ND-NH<sub>2</sub> and ND-OH were characterized by the biggest mean hydrodynamic diameter values (324.17 nm and 324.00 nm, respectively) right after their administration into the cell culture medium. However, after 24 h of incubation, the biggest hydrodynamic diameter was obtained by the laser-synthesized RayND and RayND-AL (352.57 nm and 365.57 nm, respectively).



**Figure 1.** TEM images of the nanomaterials used in the experiments: (A) ND-nf, (B) ND-NH<sub>2</sub>, (C) ND-COOH, (D) ND-OH, (E) ND-B, (F) ND-S, (G) RayND, (H) RayND-AL, (I) RT-DND, (J) RT-DND-EN, (K) RT-DND-A, (L) RT-DND-L, (M) RT-DND-LN. The ultrastructure analysis of ND was performed using a transmission electron microscope at 80 keV.

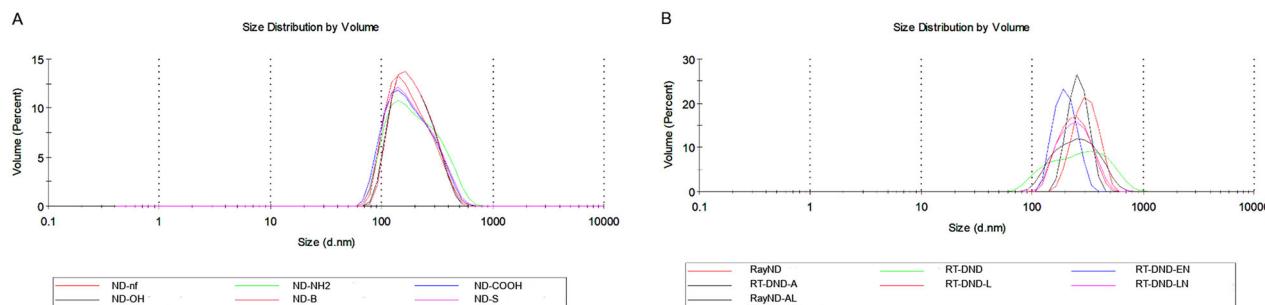
The data in Table 2 show the zeta potentials (ZPs) of the studied nanomaterials in ultrapure water suspension, in cell culture medium immediately after adding nanoparticles (0 h), and in cell culture medium after 24 h of incubation. The analysis revealed that laser-synthesized RayND was the

least stable in water suspension, with a ZP of 6.68 mV. However, in the cell culture medium, the stability increased to -11.13 mV after 24 h in the full medium. The reverse trend was observed for the second laser-synthesized ND with functional groups on their surface (i.e. RayND-AL); their ZP

**Table 1.** Characterization of nanomaterials used in the experiment.

Company	Designation	Name	Production method	Size assessed by TEM [nm]	Diameter [nm] ± SD in ultrapure water	Diameter (DLS) [nm] ± SD in full medium 0 h	Diameter (DLS) [nm] ± SD in full medium 24 h
Group I Diamond nanoparticles produced by US Research Nanomaterials (Houston, TX, USA)	ND-nf	Diamond nanoparticles	detonation	2–10	194.30 ± 4.40	281.67 ± 4.10	244.77 ± 4.32
	ND-NH <sub>2</sub>	Diamond nanoparticles with amino groups	detonation	2–10	212.27 ± 1.52	324.17 ± 9.16	237.40 ± 3.42
	ND-COOH	Diamond nanoparticles with carboxyl groups	detonation	2–10	196.57 ± 1.00	315.34 ± 3.62	245.67 ± 2.08
	ND-OH	Diamond nanoparticles with hydroxyl groups	detonation	2–10	192.43 ± 4.25	324.00 ± 5.63	241.20 ± 2.92
Group II Diamond nanoparticles produced by SkySpring Nanomaterials (Houston, TX, USA)	ND-B	Diamond nanoparticles with big particles	detonation	4–14	205.33 ± 1.70	246.37 ± 12.29	249.33 ± 4.11
	ND-S	Diamond nanoparticles with small particles	detonation	2–9	199.50 ± 3.99	272.17 ± 3.48	232.33 ± 4.20
Group III Diamond nanoparticles produced by Ray Techniques Ltd. (Jerusalem, Israel)	RayND	Laser-synthesized diamond nanoparticles	laser ablation	4–13	327.63 ± 7.40	212.30 ± 9.89	352.57 ± 5.36
	RayND-AL	Hydroxylated and nitrogenized diamond nanoparticles	laser ablation	4–11	329.53 ± 0.50	292.13 ± 3.78	365.57 ± 30.64
	RT-DND	Detonation-produced diamond nanoparticles	detonation	4–16	249.60 ± 5.30	168.07 ± 5.70	308.80 ± 20.08
	RT-DND-EN	Hydrophilic diamond nanoparticles	detonation	4–9	269.50 ± 14.03	244.00 ± 23.48	231.83 ± 12.35
	RT-DND-A	Nitrogenized diamond nanoparticles	detonation	4–11	302.57 ± 9.41	100.94 ± 16.23	277.95 ± 16.62
	RT-DND-L	Hydroxylated diamond nanoparticles	detonation	4–10	261.27 ± 15.03	124.40 ± 9.61	200.93 ± 23.19
	RT-DND-LN	Hydrophobic diamond nanoparticles	detonation	4–14	272.30 ± 15.03	311.00 ± 7.35	285.47 ± 3.18

DLS measurements were made on nanodiamond suspensions with a concentration of 20 mg/L.



**Figure 2.** The size distribution by volume of nanomaterials suspended in ultrapure water (A) ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, (B) RayND, RT-DND, DT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, RayND-AL.

changed in full medium from  $-21.95\text{ mV}$  to  $-6.63\text{ mV}$ , indicating a decrease in stability. Ultrapure water suspension of ND-S was the most stable, with a ZP of  $35.28\text{ mV}$ . After being added to cell culture medium, all ND were characterized by a negative ZP. Moreover, the stability of most ND diluted in cell culture medium decreased. After 24 h

of incubation in full medium, RT-DNDs were the most stable.

Raman spectrum analysis (Figure 3) revealed that all samples show the presence of the diamond band around  $1318\text{--}1324\text{ cm}^{-1}$ . The matching parameters for the Raman spectra are shown in Table 3.

**Table 2.** Zeta potentials (ZPs) in ultrapure water suspension, full medium after 0 h of incubation, and full medium after 24 h of incubation were measured by laser Doppler electrophoresis (LDE).

Sample	Ultrapure water	Full medium 0h	Full medium 24h
	ZP (LDE) [mV] ± SD		
ND-nf	26.00 ± 0.47	-12.53 ± 2.45	-10.80 ± 1.11
ND-NH <sub>2</sub>	20.88 ± 0.81	-8.12 ± 0.25	-11.03 ± 0.40
ND-COOH	26.33 ± 0.36	-6.98 ± 0.49	-11.35 ± 0.76
ND-OH	28.28 ± 2.34	-7.51 ± 0.29	-10.60 ± 0.50
ND-B	27.00 ± 0.96	-7.37 ± 0.97	-10.70 ± 0.57
ND-S	35.28 ± 1.88	-7.38 ± 0.31	-9.85 ± 1.17
RayND	6.68 ± 0.45	-8.55 ± 0.87	-11.13 ± 0.85
RayND-AL	-21.95 ± 0.44	-9.64 ± 0.73	-6.63 ± 1.37
RT-DND	-10.48 ± 0.40	-9.48 ± 0.51	-11.65 ± 0.93
RT-DND-EN	-28.85 ± 0.78	-11.25 ± 0.67	-11.63 ± 0.69
RT-DND-A	-23.98 ± 1.11	-9.63 ± 0.71	-11.80 ± 1.18
RT-DND-L	25.10 ± 0.99	-8.73 ± 0.82	-11.58 ± 0.68
RT-DND-LN	-25.83 ± 2.11	-8.59 ± 1.53	-11.55 ± 0.62

All ZP measurements were performed at an ND concentration of 20 mg/L. The results are presented as the mean ( $n=4$ ) with standard deviation (SD).

### Viability assay

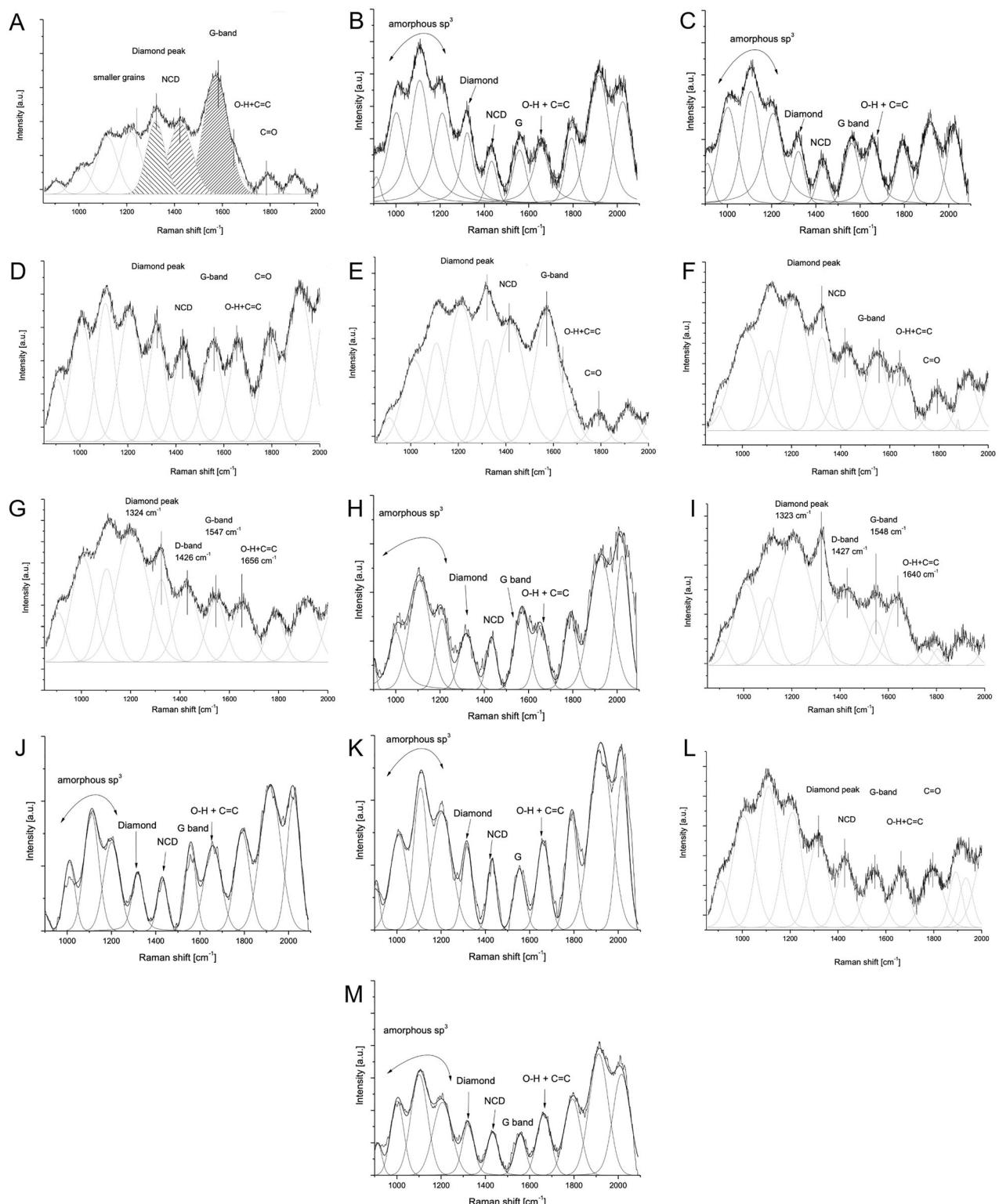
In order to assess whether the PrestoBlue HS test was suitable for the nanomaterials used in the experiments, an interference assay was performed. The analysis did not reveal any significant influence of the tested ND compared with the control (the results of the interference analysis are shown in the Supplementary Materials, Figure 1S).

The PrestoBlue HS test revealed that the highest cytotoxicity in the T98G cell line (Figure 4(A,B)) was obtained following treatment with laser-synthesized RayND at a concentration of 50 mg/L and RayND-AL at a concentration of 100 mg/L, with a 26% and 24% decrease in cell viability compared with the control group, respectively. Moreover, after RayND-AL administration, a dose-dependent effect was observed. Furthermore, a dose-dependent decrease in T98G cells was also observed after treatment with the following nanomaterials: ND-OH (5% loss in viability at a concentration of 100 mg/L), RT-DND-EN (18% loss at the highest tested concentration), and RT-DND-LN (17% loss at the highest tested concentration). Analysis of functionalized nanomaterials showed that ND-NH<sub>2</sub> and ND-COOH at a concentration of 50 mg/L caused a 5% and 7% decrease in cell metabolic activity, respectively. Both ND-B and ND-S caused cytotoxicity in T98G cells, although not in a dose-dependent manner. The highest cytotoxicity in that group was observed after the administration of ND-S at a concentration of 50 mg/L, causing a 10% decrease in cell viability.

After treating the U-118 MG cell line (Figure 4(C,D)) with nanomaterials, the greatest decrease in cell viability was obtained after the administration of RT-DND at a concentration of 100 mg/L and RayND at a concentration of 50 mg/L, with a 38% and 35% decrease, respectively. Moreover, after treatment with the above-mentioned nanomaterials, a dose-dependent effect was observed. Another nanomaterial that induced a dose-dependent loss in cell metabolic activity was RT-DND-EN, which caused a 25% decrease at the highest tested concentration. Furthermore, RayND at a concentration of 50 mg/L influenced cells, causing a 25% loss in metabolic activity. The analysis performed revealed that unlike ND-nf, modified nanomaterials displayed cytotoxicity in the U-118 MG cell lines. The highest toxicity among the modified ND was observed after treatment with the following nanomaterials: ND-NH<sub>2</sub> at a concentration of 50 mg/L, causing a 21% loss in cell viability; ND-COOH at a concentration of 5 mg/L, also causing a 21% loss in cell viability; and ND-OH at a concentration of 20 mg/L, causing a 19% decrease in comparison with the control group. However, no dose-dependent effect was observed. After treatment with ND of different sizes, only ND-B at concentrations of 50 mg/L and 100 mg/L displayed cytotoxic potential, causing a 28% and 18% decrease in cell viability, respectively.

No nanomaterial from all the tested ones caused cytotoxic effects in breast cancer cell line MCF-7 (Figure 4(E,F)). Interestingly, they all increased cell metabolic activity. ND-nf and nanomaterials with functional groups on their surface caused a dose-dependent rise, with the highest value of 205% of the control for ND-NH<sub>2</sub> at a concentration of 100 mg/L. After treatment with ND of different sizes, a dose-dependent effect was also observed. ND-B and ND-S caused a 54% and 84% increase in cell metabolic activity at the highest concentrations, respectively. Nanomaterials of different production methods also caused higher metabolic activity in comparison with the control group. The highest increase (71%) was observed after the administration of laser-synthesized RayND.

The only nanomaterial that displayed a toxic effect in the Hep G2 cell line (Figure 4(G,H)) was RT-DND-LN at a concentration of 5 mg/L, causing a 9% decrease in cell metabolic activity in comparison with the control group. ND-nf and modified



**Figure 3.** Raman spectrum analysis of the following nanomaterials: (A) ND-nf, (B) ND-NH<sub>2</sub>, (C) ND-COOH, (D) ND-OH, (E) ND-B, (F) ND-S, (G) RayND, (H) RayND-AL, (I) RT-DND, (J) RT-DND-EN, (K) RT-DND-A, (L) RT-DND-L, (M) RT-DND-LN. Raman spectra were collected using a 514-nm laser source. The sample was measured as soon as it was prepared, and the spectra were collected from 5 different spots. Each spot was irradiated for 5 s with a laser power intensity of 0.5 mW.

nanomaterials all caused an increase in cell viability in a dose-dependent manner, obtaining the following values at the highest tested concentrations:

153% of the control (ND-nf), 154% of the control (ND-NH<sub>2</sub>), 154% of the control (ND-COOH), and 150% of the control (ND-OH). Moreover, the same

**Table 3.** Matching parameters for the Raman spectra.

Sample	Band	Peak location [cm <sup>-1</sup> ]	Full width at half maximum (FWHM)
ND-nf	Diamond	1320	76
	NCD band	1424	100
	G band	1572	102
ND-NH <sub>2</sub>	Diamond	1318	79
	NCD band	1429	64
	G band	1562	75
ND-COOH	Diamond	1321	64
	NCD band	1431	60
	G band	1562	77
ND-OH	Diamond	1321	70
	NCD band	1431	77
	G band	1552	78
ND-B	Diamond	1320	71
	NCD band	1420	117
	G band	1572	103
ND-S	Diamond	1324	62
	NCD band	1424	89
	G band	1548	87
RayND	Diamond	1324	64
	NCD band	1426	91
	G band	1547	77
RayND-AL	Diamond	1318	78
	NCD band	1433	52
	G band	1570	76
RT-DND	Diamond	1323	46
	NCD band	1427	151
	G band	1548	62
RT-DND-EN	Diamond	1318	59
	NCD band	1430	52
	G band	1558	55
RT-DND-A	Diamond	1318	55
	NCD band	1430	46
	G band	1554	59
RT-DND-L	Diamond	1318	83
	NCD band	1431	70
	G band	1550	79
RT-DND-LN	Diamond	1322	63
	NCD band	1433	61
	G band	1557	59

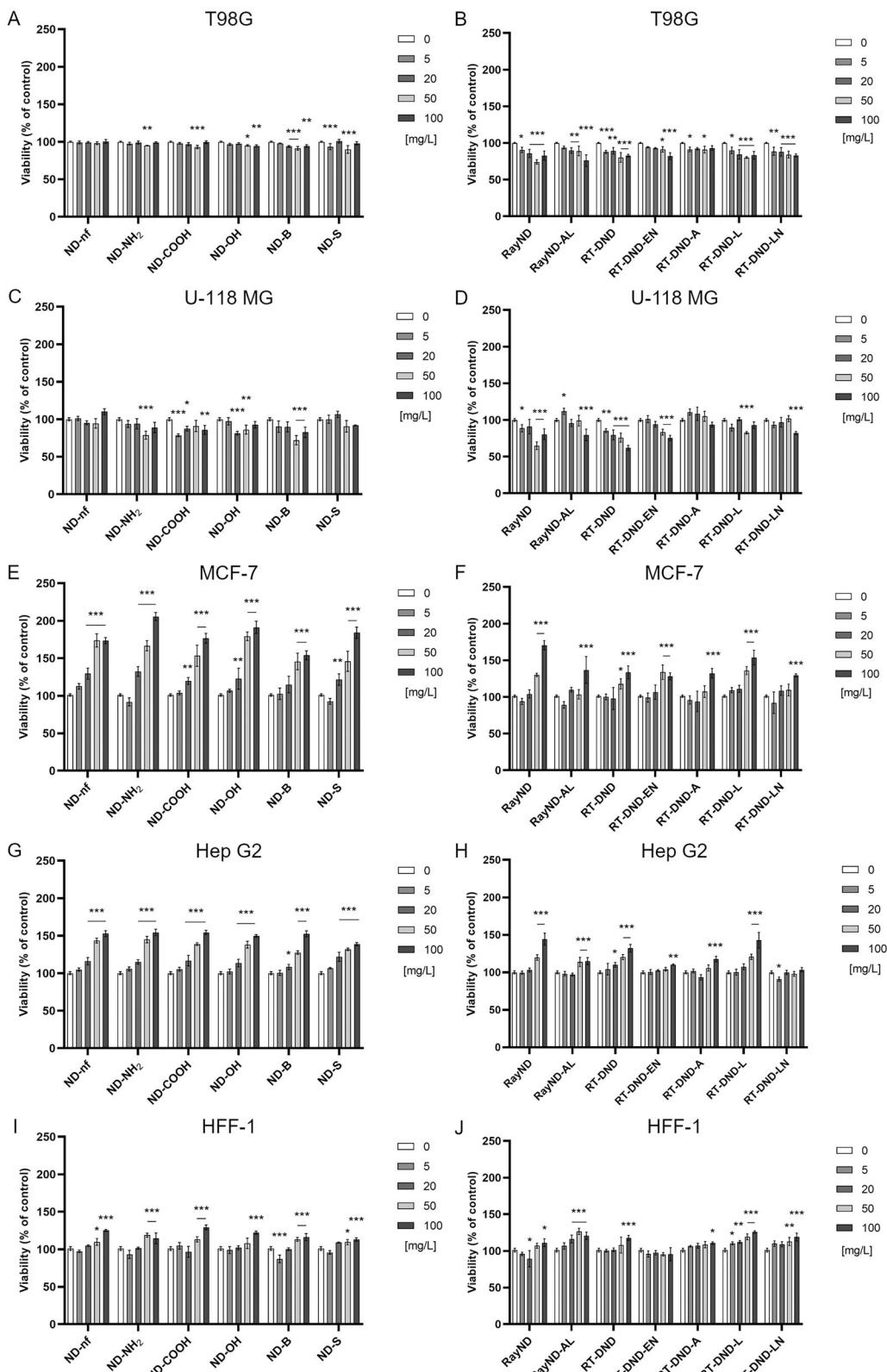
tendency was observed after treating the cells with ND-B and ND-S. Cell viability increased in a dose-dependent manner, reaching a 52% and 39% increase in comparison with the control group, respectively, at the highest tested concentration. Laser- and detonation-synthesized nanomaterials obtained from Ray Techniques Ltd. were not toxic in the Hep G2 cell line, causing an increase in metabolic activity of 44% (RayND), 15% (RayND-AL), 32% (RT-DND), 10% (RT-DND-EN), 18% (RT-DND-A), and 42% (RT-DND-L) at the highest tested concentration.

The only nanomaterials that exhibited cytotoxic potential in the HFF-1 cell line (**Figure 4(I,J)**) were ND-B at a concentration of 50 mg/L and RayND at a concentration of 20 mg/L, causing a 13% and 11% decrease in cell viability, respectively. However, an increase in metabolic activity after ND treatment

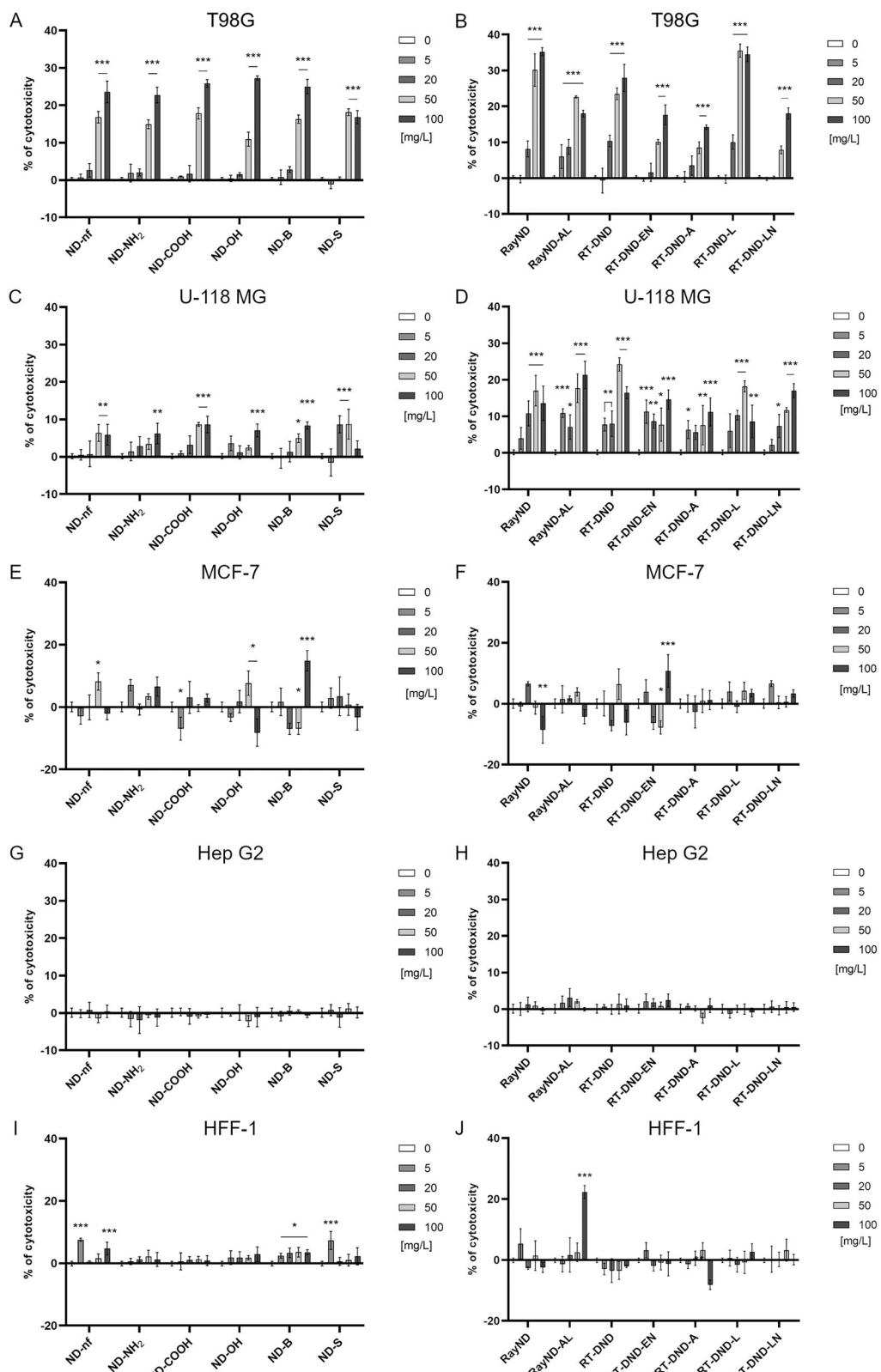
was observed. Almost all tested nanomaterials increased the viability of non-tumor cells, except RT-DND-EN, which did not influence HFF-1 cells. ND-nf and ND with functional groups on their surface increased cell viability in a dose-dependent manner, obtaining a rise of 25% (ND-nf), 15% (ND-NH<sub>2</sub>), 29% (ND-COOH), and 22% (ND-OH) at a concentration of 100 mg/L. ND of different sizes, ND-B and ND-S, also induced a rise in cell metabolic activity, of 16% and 13%, respectively. RT-DND-L and RT-DND-LN induced a dose-dependent increase in cell metabolic activity as well, of 26% and 19%, respectively, at the highest tested concentration.

### Membrane integrity assay

In order to exclude the potential influence of used nanomaterials on the data obtained from the cell membrane integrity assay, an interference analysis was performed. The analysis did not reveal any significant influence of the tested ND compared with the control (the results of the interference analysis are shown in the [Supplementary Materials, Figure 2S](#)). A lactate dehydrogenase leakage measurement (LDH test) was performed in order to evaluate whether the tested nanomaterials damage the cell membrane. The analysis revealed that almost every tested nanomaterial disturbed the cell membrane integrity of T98G cells (**Figure 5(A,B)**) in a dose-dependent manner. It turned out that the highest cytotoxic potential was displayed by laser-synthesized RayND at a concentration of 100 mg/L and by the one produced by the detonation method, RT-DND-L, at concentrations of 50 mg/L and 100 mg/L, obtaining cytotoxicity levels of 35%, 36%, and 35%, respectively. ND-nf and functionalized ND damaged the cell membrane, causing 24% (ND-nf), 23% (ND-NH<sub>2</sub>), 26% (ND-COOH), and 27% (ND-OH) cytotoxicity at the highest tested concentration. This group of ND had the ability to damage the cell membrane in a dose-dependent manner. ND of different sizes were also capable of disturbing the cell membrane integrity. ND-B induced a dose-dependent increase in LDH leakage, obtaining 25% cytotoxicity at the highest tested concentration, while ND-S was characterized by 18% cytotoxicity at a concentration of 50 mg/L and 17% cytotoxicity at a concentration of 100 mg/L. In the case of laser-synthesized RayND-AL, cell membrane damage was observed even at



**Figure 4.** Viability of the T98G (A,B), U-118 MG (C,D), MCF-7 (E,F), Hep G2 (G,H), and HFF-1 (I,J) cells after a 24-h incubation period with the following nanomaterials: ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, as determined by the PrestoBlue HS assay. The results are presented as an average with the standard deviation indicating the percentage difference compared to the control (the control was considered 100%) Stars above the columns indicate statistically significant differences between the groups (\*p ≤ 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001).



**Figure 5.** Membrane integrity of the T98G (A,B), U-118 MG (C,D), MCF-7 (E,F), Hep G2 (G,H), and HFF-1 (I,J) cells after a 24-h incubation period with the following nanomaterials: ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, as determined by the LDH assay. Results are presented as the percentage of cytotoxicity (mean with standard deviation). Stars above the columns indicate statistically significant differences between the groups (\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

the lowest tested concentration of 5 mg/L, with 6% cytotoxicity. RayND, RT-DND, and RT-DND-L disturbed the cell membrane integrity at a concentration of 20 mg/L and higher in a dose-dependent manner. RT-DND caused 28% cytotoxicity at a concentration of 100 mg/L.

The U-118 MG cell line (Figure 5(C,D)) was also vulnerable to ND, as every tested nanomaterial caused an elevated level of LDH leakage. The highest value was observed after treatment with RayND-AL at a concentration of 100 mg/L (21% cytotoxicity) and RT-DND at a concentration of 50 mg/L (24% cytotoxicity). In the first group of nanomaterials, ND-nf and ND-COOH caused perforations in the cell membrane at concentrations of 50 mg/L and 100 mg/L, obtaining 6% cytotoxicity for ND-nf for both concentrations and 9% cytotoxicity for ND-COOH, also for both concentrations. ND-NH<sub>2</sub> and ND-OH damaged the cell membrane integrity only at the highest tested concentration (100 mg/L), with 6% and 7% cytotoxicity, respectively. After treatment with ND of different sizes, a dose-dependent cytotoxic effect was observed only after ND-B treatment, causing 8% cytotoxicity at a concentration of 100 mg/L. ND-S disturbed the cell membrane integrity at concentrations of 20 mg/L and 50 mg/L, with 9% cytotoxicity for both concentrations. In the group of ND obtained from Ray Techniques, although every tested nanomaterial influenced the cell membrane, only RT-DND-LN was characterized by a dose-dependent cytotoxicity, obtaining 17% cytotoxicity at a concentration of 100 mg/L.

Only a few ND tested caused perforations in the MCF-7 cell membrane (Figure 5(E,F)). ND-nf caused an elevated leakage of LDH at a concentration of 50 mg/L, with 8% cytotoxicity. Moreover, the increased percentage of cytotoxicity was observed after treatment with ND-nf and ND-OH at a concentration of 50 mg/L (8% cytotoxicity for both), ND-B at a concentration of 100 mg/L (15% cytotoxicity), and RT-DND at a concentration of 100 mg/L (11% cytotoxicity). Furthermore, some of the ND caused a decreased level of LDH in the cell culture medium. As a result, negative values of the percentage cytotoxicity were obtained. This phenomenon was noticed after treatment with ND-COOH at a concentration of 5 mg/L and ND-B at a concentration of 50 mg/L, with -7% cytotoxicity for both. Moreover, a similar outcome was observed after the

administration of RayND at a concentration of 100 mg/L and RT-DND-EN at a concentration of 50 mg/L, causing -9% and -8% cytotoxicity, respectively.

The analysis performed did not reveal any negative effect of the tested nanomaterials on the cell membrane integrity of Hep G2 cells (Figure 5(G,H)).

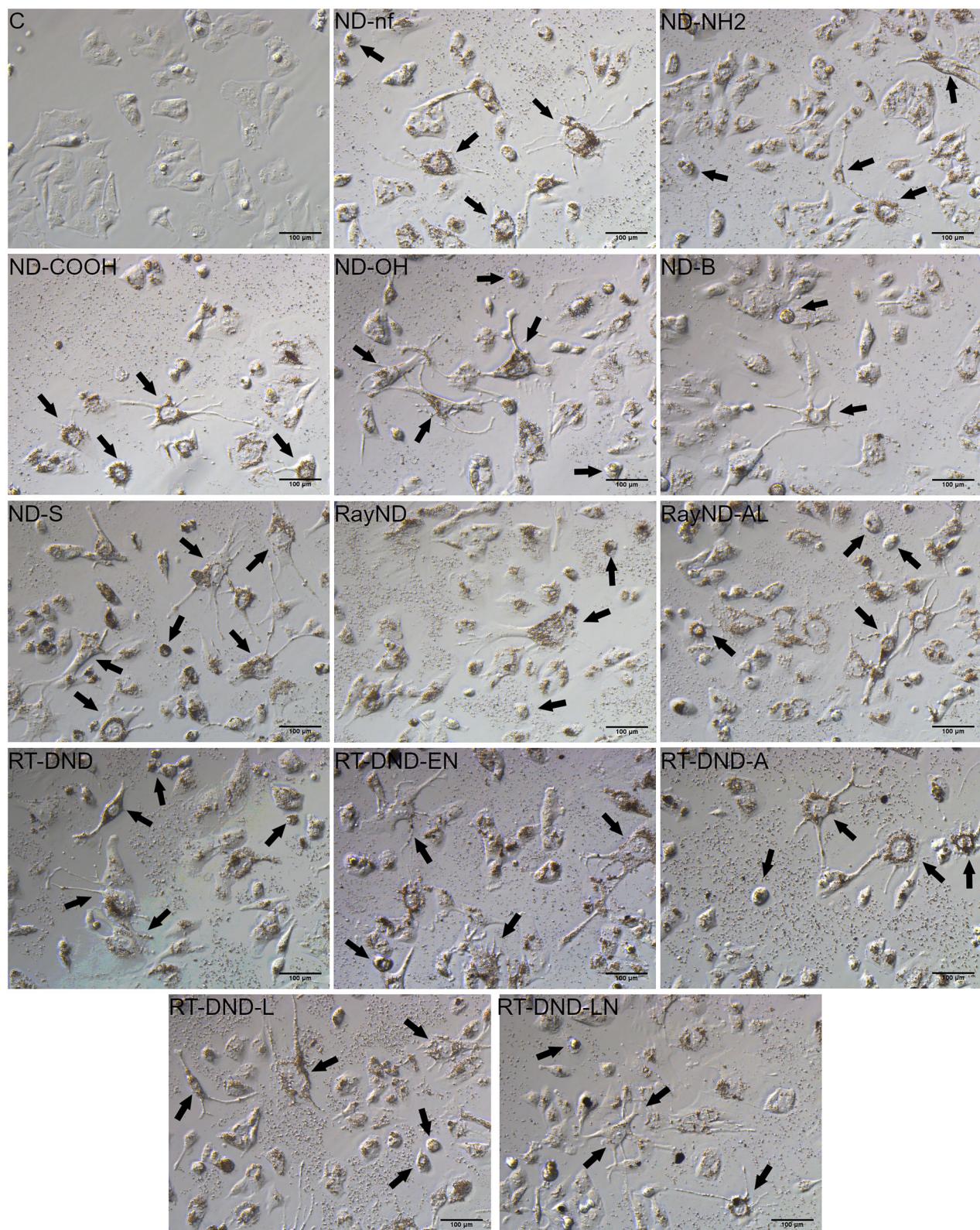
In order to assess whether ND influence the cell membrane integrity of non-tumor cells, the same analysis was performed on the fibroblast cell line HFF-1 (Figure 5(G,H)). An elevated level of LDH leakage was observed after treatment with ND-nf at concentrations of 5 mg/L and 100 mg/L, causing 5% and 5% cytotoxicity, respectively. Modified ND did not damage the cell membrane integrity. ND-B caused an elevated percentage of cytotoxicity at every tested concentration, obtaining values in a range of 2%-4% cytotoxicity, while ND-S caused 7% cytotoxicity at a concentration of 5 mg/L. The highest cytotoxicity observed was obtained after treatment with laser-synthesized RayND-AL at a concentration of 100 mg/L, causing 22% cytotoxicity. Detonation-produced ND did not display any negative effect on the cell membrane integrity of HFF-1 cells.

### **Morphological analysis**

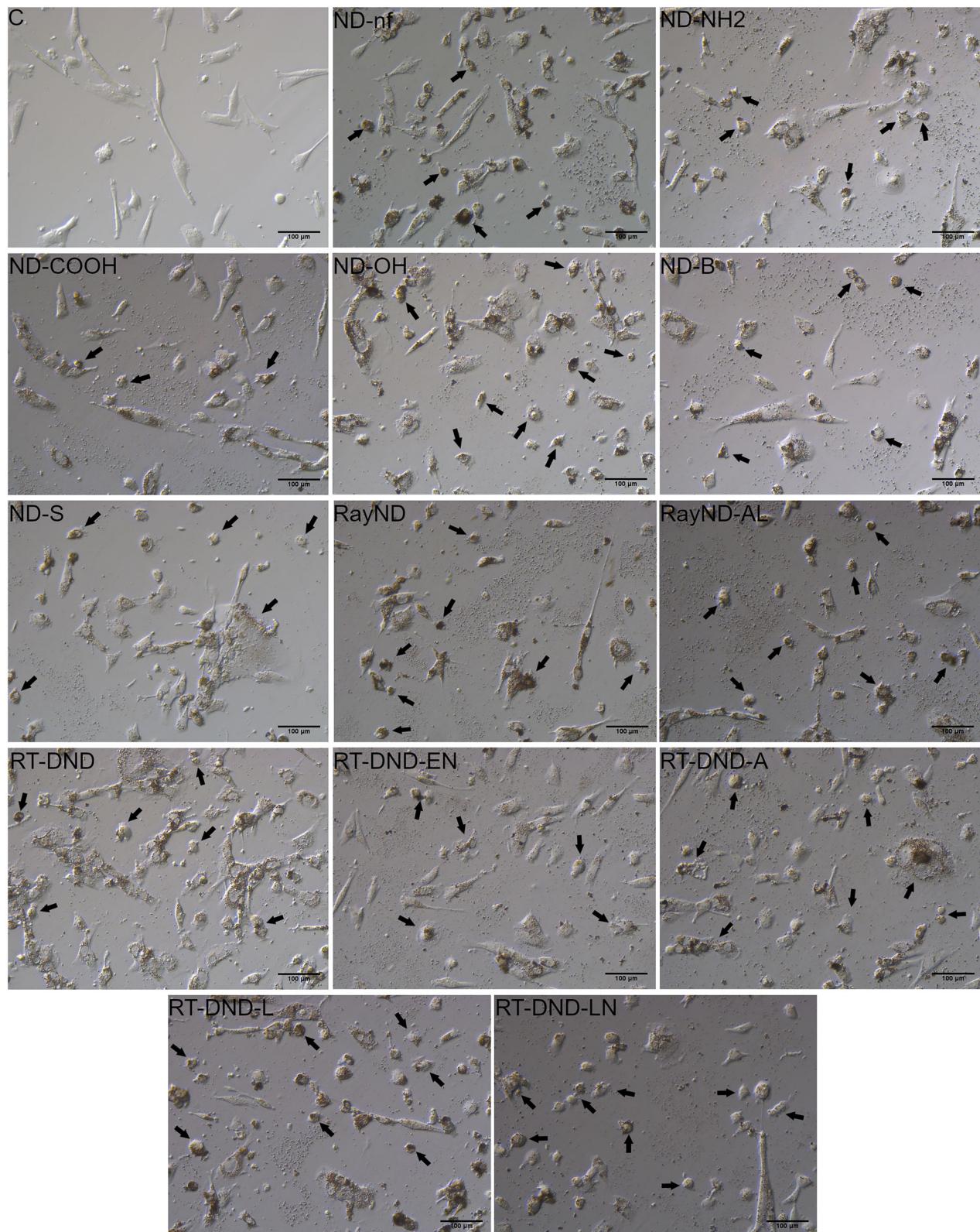
In order to evaluate the changes in cell morphology caused by the nanomaterials, live imaging 24 h after ND administration was performed. The analysis revealed that all types of ND were taken up by the cells or were adsorbed on their surface. ND agglomerates were visible as black spots, located mainly in the perinuclear area (Figures 6–8).

Treatment with the tested nanomaterials caused changes in T98G cell morphology. In each tested group, the cells behaved in two ways: some of them began to shrink, whereas others tended to form long and thin cellular appendages. Only treatment with ND-NH<sub>2</sub> did not cause the shortening of cell protrusions. Moreover, nanomaterials caused the T98G cells to form clusters to a lesser extent (Figure 6).

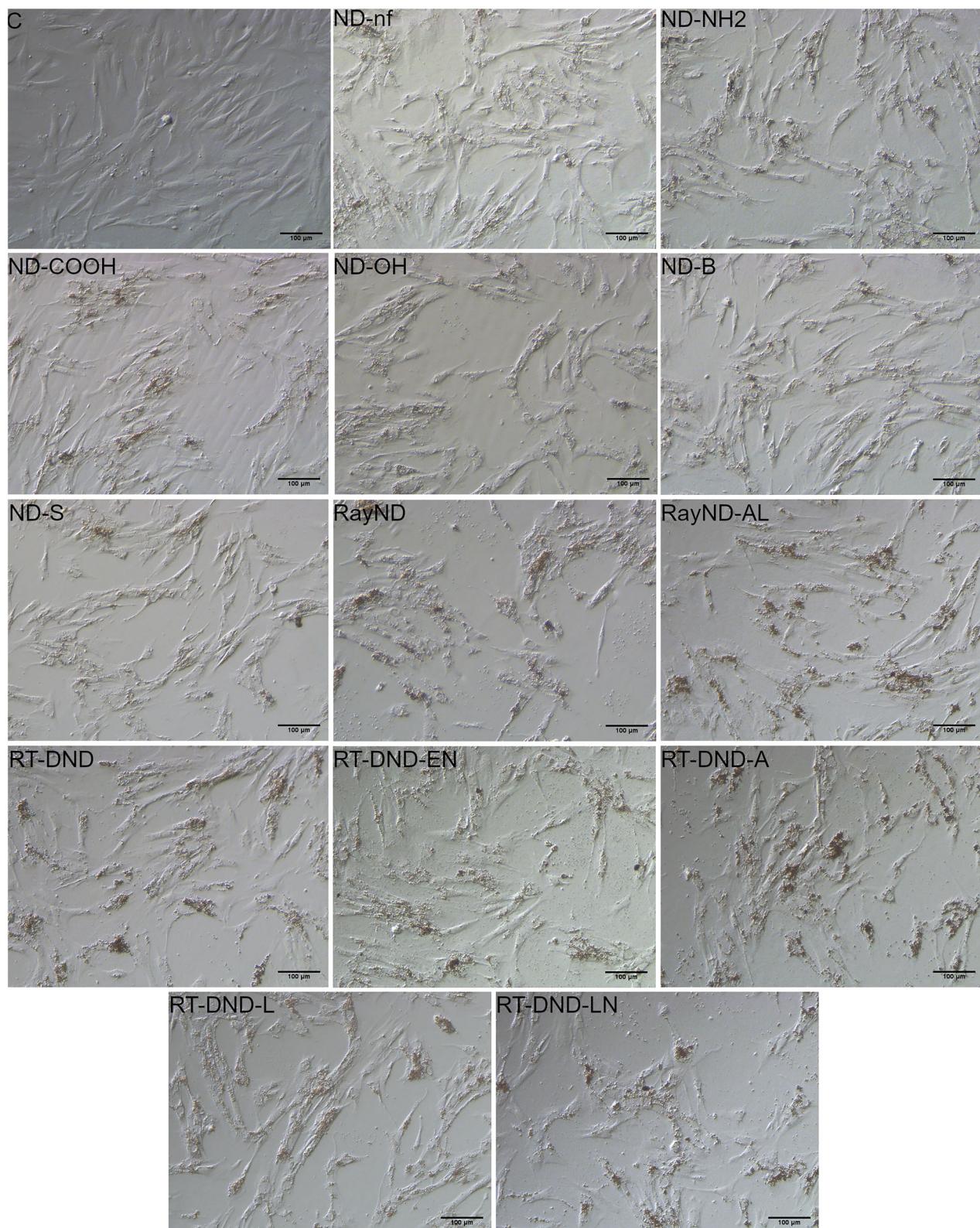
The U-118 MG cells also changed their morphology after ND treatment. Unlike the control group, ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-OH, and ND-S make cells form clusters. Moreover, after ND treatment, the cells began to shorten their cell protrusions, with some



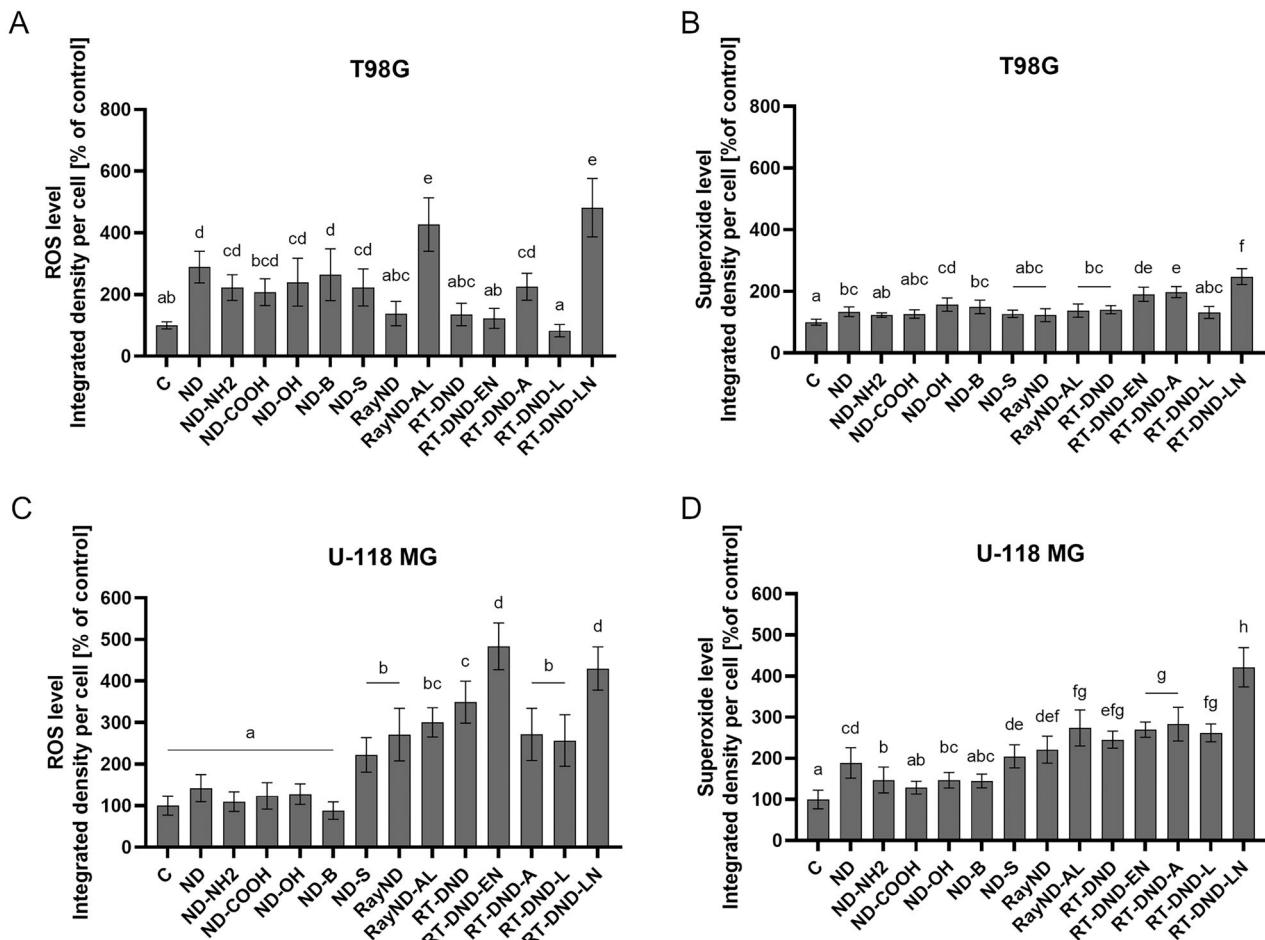
**Figure 6.** Morphological characterization of the T98G human glioblastoma multiforme. Cells were treated with the following nanomaterials: ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, at a concentration of 20 mg/L. The incubation with nanomaterials lasted for 24 h. The control group (C) was treated with ultrapure water. Arrows indicate changes in cell morphology.



**Figure 7.** Morphological characterization of the U-118 MG human glioblastoma. Cells were treated with the following nanomaterials: ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, at a concentration of 20 mg/L. The incubation with nanomaterials lasted for 24 h. The control group (C) was treated with ultrapure water. Arrows indicate changes in cell morphology.



**Figure 8.** Morphological characterization of the HFF-1 human foreskin fibroblast. Cells were treated with the following nanomaterials: ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, at a concentration of 20 mg/L. The incubation with nanomaterials lasted for 24 h. The control group (C) was treated with ultrapure water.



**Figure 9.** The level of intracellular ROS and mitochondrial superoxide after 3 h of incubation of the T98G and U-118 MG cell lines with the following nanomaterials: ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, at a concentration of 50 mg/L, as determined using CM-H2CFDA and MitoSOX Red indicators. The results are presented as integrated density per cell (% of the control). Different letters above the columns indicate statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

of the cells changing their shape from elongated to round. More detached cells were observed in the treated groups than in the control group (Figure 7).

After ND administration, no significant changes in HFF-1 external morphology were observed (Figure 8). The morphology of the MCF-7 and Hep G2 cells is presented in the Supplementary Materials (Figures 3S and 4S). In that case, no significant changes in cell morphology were observed either. Only after RT-DND treatment did Hep G2 cells form a bigger vacuole.

#### Assessment of reactive oxygen species

Staining with CM-H2DCFRA and MitoSOX Red was performed to evaluate the general oxidative stress and mitochondrial superoxide level after treatment with ND. The analysis revealed that almost all

nanomaterials apart from RayND, RT-DND, RT-DND-EN, and RT-DND-L trigger enhanced ROS production in the T98G cell line (Figure 9(A)). The highest level of ROS was observed after treatment with laser-synthesized RayND-AL and detonation-synthesized RT-DND-LN, obtaining 427% and 482% of the control, respectively. Nanomaterials of different sizes, ND-B and ND-S, also caused an elevated level of ROS at a similar level, with 264% and 223% of the control, respectively. ND-nf and its modifications induced oxidative stress at a similar level, obtaining the following values of the ROS level: 289% of the control (ND-nf), 223% of the control (ND-NH<sub>2</sub>), 208% of the control (ND-COOH), and 240% of the control (ND-OH). Moreover, the highest level of mitochondrial superoxide (248% of the control) was observed after RT-DND-LN treatment (Figure 9(B)). The effect of ND size on the level of mitochondrial superoxide

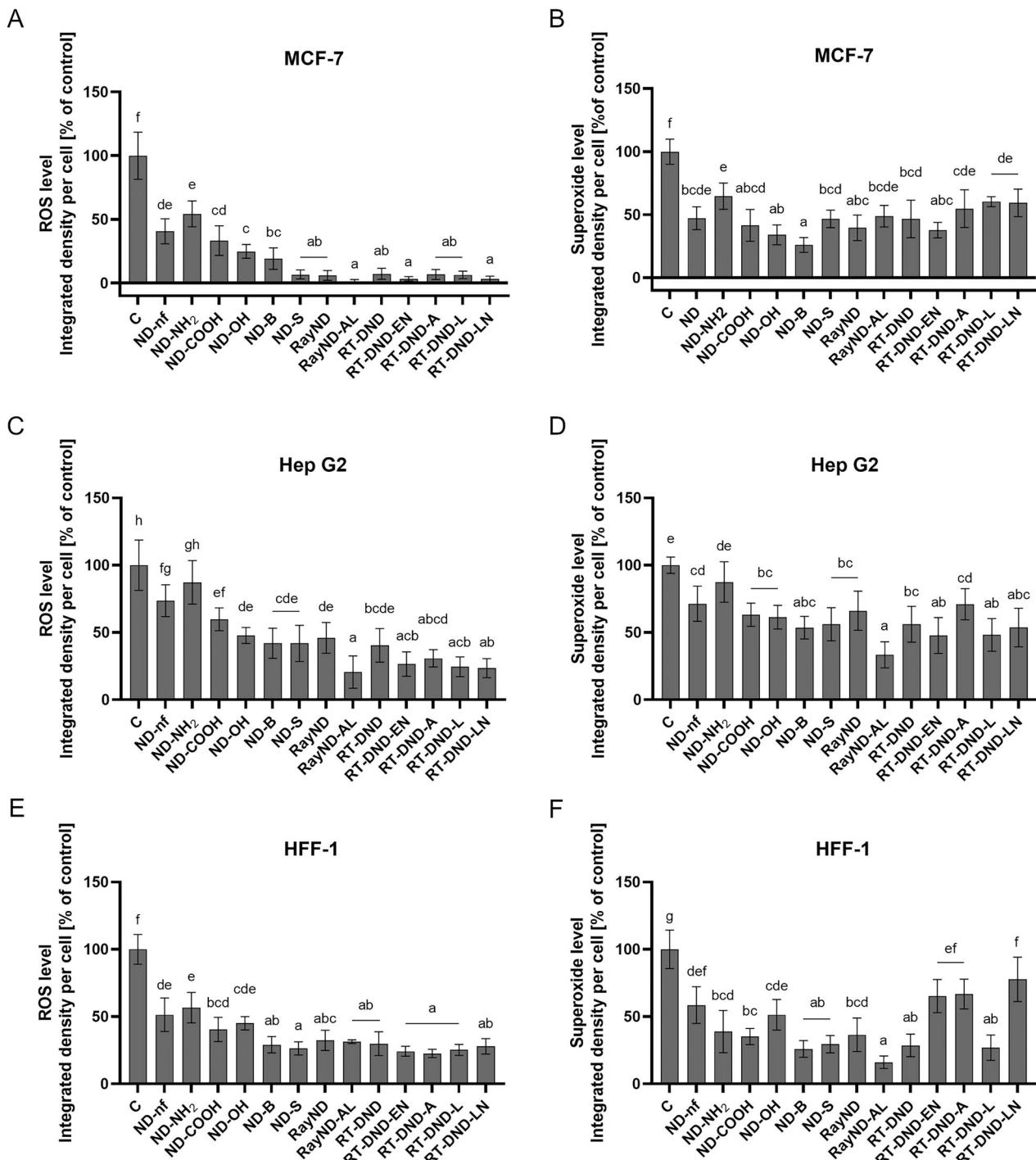
was also evaluated. The analysis showed that ND-B, unlike NS-S, triggers enhanced production of superoxide, reaching 149% of the control. A similar effect was obtained after treatment with ND-nf (134% of the control). Although ND-NH<sub>2</sub> and ND-COOH enhanced the general oxidative stress, they did not affect the level of mitochondrial superoxide. However, the presence of a hydroxyl group (ND-OH) caused an increased level of superoxide, obtaining 157% of the control.

After treating the U-118 MG cells with ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, and ND-B, no increase in ROS level was observed ([Figure 9\(C\)](#)). The highest increase was obtained following treatment with detonation-synthesized RT-DND-EN (483% of the control) and RT-DND-LN (430% of the control). RT-DND also caused an elevated level of ROS, obtaining a value of 349% of the control. After introducing laser-synthesized RayND-AL into the U-118 MG cell culture, the general oxidative stress was assessed to be at a level of 301% of the control. A similar level of ROS was observed among groups treated with the following nanomaterials: ND-S (222% of the control), RT-DND-L (257% of the control), RayND (271% of the control), and RT-DND-A (272% of the control). Analysis of the superoxide level in U-118 MG cells after ND treatment revealed that ND-COOH and ND-B did not display any significant effect on the measured parameter ([Figure 9\(D\)](#)). The remaining tested nanomaterials caused an increased level of superoxide in the cells. The highest rise was observed after treatment with detonation-synthesized RT-DND-LN, with a value of 422% of the control. Moreover, adding ND-nf to the U-188 MG cell culture increased the superoxide level to 189%, which was comparable to the effect of ND-OH (147% of the control). ND-NH<sub>2</sub> also affected the measured parameter; this group was characterized by a superoxide level of 147% of the control. Treatment with ND-S resulted in an elevated level of mitochondrial superoxide (205% of the control). Laser-synthesized RayND and RayND-AL caused enhanced production of superoxide at a comparable level of 221% and 274% of the control, respectively.

Treatment of MCF-7 cells with ND resulted in a decreased ROS level ([Figure 10\(A\)](#)). The highest decrease was obtained after applying the following nanomaterials: ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND-EN,

RT-DND-A, RT-DND-L, and RT-DND-LN. The ROS level in those groups varied from 1% of the control (RayND-AL) to 7% of the control (ND-S and RT-DND-A). ND of different sizes, ND-B and ND-S, trigger a comparable decrease in ROS level. Moreover, the highest level of ROS was observed after treatment with ND-nf (41% of the control) and ND-NH<sub>2</sub> (54% of the control). Analysis of the mitochondrial superoxide level also revealed that ND display the ability to lower the concentration of superoxide in MCF-7 cells ([Figure 10\(B\)](#)). The highest decrease was observed after ND-COOH, ND-OH, ND-B, RayND, and RT-DND-EN were introduced to the cell culture. The superoxide level in those groups varied from 26% of the control (ND-B) to 42% of the control (ND-COOH). The analysis performed also revealed that ND-B displays a greater ability to reduce mitochondrial superoxide than ND-S (47% of the control). The highest level of superoxide was observed after treatment with ND-nf (47% of the control), RayND-AL (49% of the control), RT-DND-A (55% of the control), RT-DND-LN (59% of the control), RT-DND-L (60% of the control), and ND-NH<sub>2</sub> (65% of the control).

The analysis performed on HepG2 cells revealed that all nanomaterials apart from ND-NH<sub>2</sub> caused a decrease in ROS level ([Figure 10\(C\)](#)). The lowest level of ROS was observed after treatment with RayND-AL (21% of the control), RT-DND-LN (23% of the control), RT-DND-L (25% of the control), RT-DND-EN (27% of the control), and RT-DND-A (31% of the control). In contrast, the highest level of ROS was obtained in the group treated with ND-nf and ND-NH<sub>2</sub> (74% and 87% of the control, respectively). Moreover, the analysis of the mitochondrial superoxide level also revealed that only ND-NH<sub>2</sub> did not affect the superoxide level in HepG2 cells ([Figure 10\(D\)](#)). Other nanomaterials decreased the measured parameter. The highest decrease was observed after treatment with the following ND: ND-B, RayND-AL, RT-DND-EN, and RT-DND-LN. The superoxide level in those groups ranged from 33% (RayND-AL) to 54% (RT-DND-LN). In contrast, nanomaterials of different sizes, ND-B and ND-S, did not cause significant changes. Furthermore, the highest level of mitochondrial superoxide was obtained after treatment with ND-nf and RT-DND-A (71% of the control for both nanomaterials).



**Figure 10.** The level of intracellular ROS and mitochondrial superoxide after 3 h of incubation of the MCF-7, Hep G2, and HFF-1 cell lines with the following nanomaterials: ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, at a concentration of 50 mg/L, as determined using CM-H2CFDA and MitoSOX Red indicators. The results are presented as integrated density per cell (% of the control). Different letters above the columns indicate statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

The analysis performed on the non-tumor cell line HFF-1 also revealed a lower level of ROS after treatment with all tested nanomaterials (Figure 10(E)). The lowest level of ROS was observed after

treatment with the following nanomaterials: ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-A, RT-DND-L, and RT-DND-NL. Nanomaterials of different sizes, ND-B and ND-S,

caused a similar decrease in ROS level regardless of the size, obtaining values of 29% and 26% of the control, respectively. All nanomaterials purchased from Ray Techniques Ltd. also caused a similar effect regardless of the production method used. Treatment with the laser-synthesized ND RayND and RayND-AL caused a decrease to 31% and 32% of the control, respectively. Detonation-produced ND caused the ROS level to drop to 24% of the control for RT-DND-EN, 23% of the control for RT-DND-A, 25% of the control for RT-DND-L, and 28% of the control for RT-DND-LN. The general oxidative stress was maintained at the same level for ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, and ND-OH and ranged from 45% of the control (ND-OH) to 57% of the control (ND-NH<sub>2</sub>). ND-COOH was similar to ND-nf and ND-OH with respect to the decrease in ROS level it caused, with a value of 40% of the control. Moreover, treatment with all the tested nanomaterials resulted in a decreased level of mitochondrial superoxide (Figure 10(F)). The lowest level of superoxide was obtained following treatment with laser-synthesized RayND-AL (16% of the control). A similar effect was caused by the nanomaterials of different sizes, ND-B (26% of the control) and ND-S (29% of the control), and the detonation-synthesized nanomaterials, RT-DND (29% of the control) and RT-DND-L (27% of the control). Furthermore, the highest mitochondrial superoxide level was observed after RT-DND-LN (78% of the control), RT-DND-A (67% of the control), RT-DND-EN (65% of the control), and ND-nf (59% of the control). Moreover, an effect similar to that obtained after treatment with ND-nf was triggered by ND-NH<sub>2</sub> (39% of the control) and ND-OH (51% of the control). ND-COOH caused mitochondrial superoxide to drop to 35% of the control.

The images from the confocal microscope for the T98G, U-118 MG, Hep G2 MCF-7, and HFF-1 cells are presented in the Supplementary Materials (Figures 5S–8S).

## Discussion

Due to the poor pharmacokinetics and the occurrence of chemo-resistance, currently available therapeutic strategies for tumor treatment need to be improved and optimized. As ND have far-reaching biomedical applications, an urgent need for the assessment of their toxicity has emerged. Presently,

there are no extensive screening studies concerning the influence of size, chemical surface functionalization, and production method. To assess the structural features of ND used in experiments, we have analyzed Raman spectra. A shift toward a lower wavenumber indicates the presence of diamond crystallites with a diameter below 20 nm (Afandi et al. 2018; Popov et al. 2017). The appearance of a broad band of low intensity around 1250 cm<sup>-1</sup> confirms the presence of fine ND grains (Popov et al. 2017). The bands in the region of 1500–1800 cm<sup>-1</sup> indicate the appearance of surface functional groups and carbon with sp<sub>2</sub> hybridization (Popov et al. 2017). The presence of the characteristic G band around 1550 cm<sup>-1</sup> indicates the appearance of stretching vibrations of the graphite plane (Korepanov et al. 2017). The presence of the band around 1430 cm<sup>-1</sup> is attributed to the presence of nanocrystalline diamond or ultra-nanocrystalline diamond (Gottlieb et al. 2016). Wide bands below 1350 cm<sup>-1</sup> indicate the presence of sp<sub>3</sub> hybridized carbon (Popov et al. 2017). The peak around 1150 cm<sup>-1</sup> is characteristic of trans-poly-acetylene particles (Afandi et al. 2018). Nanodiamonds functionalized with hydroxyl groups are characterized by the presence of intense bands around 1640 cm<sup>-1</sup> and 1760 cm<sup>-1</sup>. The presence of a band around

1640 cm<sup>-1</sup> in non-functionalized ND samples is related to the natural presence of water on the ND surface (Popov et al. 2017; Mochalin et al. 2011). When ND are excited with a laser of 355–532 nm, the D-band appears only in the background (Popov et al. 2017).

Morphological analysis revealed that all ND formed clusters on the surface of T98G, U-188 MG, MCF-7, HepG2, and HFF-1 cells or were taken up by the cells. This finding is in line with a study in which cellular uptake of ND was proved for HeLa cells using TEM imaging and a quantitative radio-labeling technique (Zhang et al. 2012). Moreover, clathrin-mediated endocytosis was suggested to be a dominant uptake mechanism for ND internalization (Faklaris et al. 2009). The uptake of ND is crucial for the initialization of nanomaterial-cell interactions, the process that determines their cellular fate. It seems that the morphological features of ND may influence the internalization stage of endocytosis and thus the rate by which nanomaterials

are taken up. The uptake may be linked to the contact surface area and the local sharpness at the interaction point. Although ND with sharp edges have no difficulties in anchoring to the cell membrane, they may find it hard to internalize afterward (Zhang et al. 2017). ND cytotoxicity and biocompatibility depend on a range of factors, from the production method, size, and chemical surface functionalization to the type of biological model tested. For that reason, viability and cell membrane integrity assays were performed using 13 different types of nanomaterials (ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN), 4 different tumor cell lines (T98G, U-118 MG, MCF-7, Hep G2), and 1 non-tumor cell line (HFF-1). Many studies show that ND with no surface functionalization cause limited or no cytotoxicity (Schrand et al. 2007; Strojny et al. 2018). This statement is in line with the results obtained from viability assays. The analysis revealed that almost all detonation-produced ND displayed no cytotoxicity against the breast tumor cell line MCF-7, the hepatocellular carcinoma cell line Hep G2, and the fibroblast cell line HFF-1. There was even an increase in cell viability observed after DND-ND. Some studies also suggest that ND are characterized by the ability to enhance the process of wound healing (Pacelli et al. 2017; Mytych, Wnuk, and Rattan 2016). However, the study by Mytych, Wnuk, and Rattan (2016) indicates a biphasic dose-response curve of normal diploid human facial skin fibroblasts. The analysis performed by the researchers showed that ND with an average size of less than 10 nm lost the healing properties and caused cytotoxicity at a concentration of 50 mg/L and higher. However, our study on the foreskin fibroblast cell line HFF-1 did not confirm that finding, as regardless of the production method, size, or functional groups, the cells were characterized by a higher than 100% viability at a concentration of 100 mg/L. Only two ND caused a slight decrease in viability: detonation-generated ND-B with an average size of 10–20 nm at a concentration of 5 mg/L and laser-synthesized RayND with an average size of 4–5 nm at a concentration of 20 mg/L. No cytotoxic effect of higher concentrations may be linked with the number of nanoparticles that are able to enter the cell body, which is directly determined by their concentrations and

exposure duration (Barhoum et al. 2022). Higher nanomaterial concentrations may enhance their aggregation. As the average diameter size of agglomerated nanomaterials rises, they may not be able to enter the cell body, which can lead to decreased toxicity (Jeevanandam et al. 2018).

During the analysis, functionalized nanomaterials (ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, and ND-OH), in contrast to ND-nf (size 2–10 nm), displayed cytotoxicity against the grade IV glioblastoma cell lines T98G and U-118 MG. The same results were obtained by Ray et al. on the SK-N-MC neuronal cells (ND size 3–6 nm) (Roy et al. 2018). In contrast, Wierzbicki et al. (2017) proved that non-functionalized ND (size 2–7 nm) caused a cytotoxic effect against U-118 and U87 cells at a concentration of 100 mg/L and higher. Interestingly, both studies indicate that higher doses of ND do not mean a more pronounced cytotoxic effect. This phenomenon might be linked to the sensitivity of neuronal cells to ROS generated by nanomaterials (Roy et al. 2018). Our study revealed that dose-dependent cytotoxicity is caused only by ND-OH, RayND-AL, RT-DND-EN, and RT-DNS-LN when administrated to T98G cells and RT-DND and RT-DND-EN when administrated to U-118 MG cells. The highest cytotoxicity to T98G was observed after treatment with laser-synthesized RayND and RayND-AL (25% decrease in viability). This finding may indicate that the production method may influence ND cytotoxicity (Lewinski, Colvin, and Drezek 2008). Moreover, the highest decrease in U-118 MG cell viability was observed after the administration of RT-DND at a concentration of 100 mg/L (38% decrease). This nanomaterial was not functionalized, and the average size of particles was in a range of 3.5–6 nm. In this study, three other detonation-generated ND with no chemical surface functionalization were used: ND-nf (size 2–10 nm), ND-B (size 10–20 nm), and ND-S (size 3–4 nm). Our study showed that apart from RT-DND, only ND-B triggered cytotoxicity (28% decrease in viability at a concentration of 50 mg/L). As ND-B and ND-S were purchased from the same company and they differed only in size, it is highly likely that bigger ND may be more toxic to U-118 MG cells. Moreover, as the purity of the mentioned DNDs was maintained at a different level, the study indicates that from a cytotoxic point of view, the purification method

may be as important as the process of production itself.

As was shown in the TEM images (Figure 1), ND used in the study were characterized by a crystalline form. It was suggested that such nanomaterials can easily damage the cell membrane. Nanomaterials driven by surface and intramolecular forces adheres to a cell membrane which may result in local deformation, lipid restructuring and domain formation. Moreover, these processes may lead to the formation of pores as well as the passive translocation of nanomaterial due to invagination or lipid extraction from the membrane (Chen and Bothun 2014). For that reason, the cell membrane integrity assay was performed. The results were consistent with those obtained from the viability assay. Treatment with ND did not change the level of LDH leakage in HepG2 cells. The results of both the membrane integrity assay and the viability assay are in line with the findings of Paget et al. (2014). The research team proved the non-cytotoxicity of ND with different diameters in six human cell lines: HepG2, Caki-1, Hek-293, HT29, and A549 (Paget et al. 2014).

Although there was no decrease in MCF-7 cell viability observed, the following nanomaterials caused increased LDH leakage: ND-nf (50 mg/L), ND-OH (50 mg/L), ND-B (100 mg/L), and RT-DND-EN (100 mg/L), which may indicate cell membrane damage. All mentioned nanomaterials were produced using the detonation technique. Laser-synthesized ND did not affect the cell membrane integrity. ND-S, unlike ND-B, did not cause increased LDH leakage, although it is said that ND cytotoxicity depends on ND size, with smaller nanomaterials producing a stronger effect (Dworak et al. 2014). However, it was also suggested that smaller nanoparticles are able to penetrate the smallest pores, such as those present in the nuclear membrane (Turcheniuk and Mochalin 2017). For that reason, ND-S may not affect the cell membrane integrity.

Most of the nanomaterials tested did not influence the cell membrane integrity of HFF-1 cells. However, the following ND caused enhanced LDH leakage: ND-nf (5 and 100 mg/L), ND-B (all concentrations tested), ND-S (5 mg/L), and RayND-AL (100 mg/L). Interestingly, laser-synthesized RayND, which caused decreased viability of HFF-1 cells, did not damage the cell membrane. This phenomenon

may be linked to the complex mechanism of ND cytotoxicity (Schrand et al. 2007). Nanomaterials might be effectively taken up by cells without damaging the cell membrane and still trigger DNA damage and micronuclei formation (Adach et al. 2016). As well as they may induce oxidative stress and the formation of mitochondrial superoxide. Changes in zeta potential and hydrodynamic diameter may indicate that ND are capable of adsorbing serum proteins on their surface. The protein corona might influence the cytotoxicity of the tested nanomaterials (Khanal et al. 2020). Although ND characterized by a positive zeta potential (such as RayND) may decrease cell viability, ND with a negative zeta potential (such as RayND-AL) may exhibit stronger cellular influences (Namdar and Nafisi 2018) due to the greater ability to adsorb proteins on their surface (Horie et al. 2012).

Interestingly, all nanomaterials tested affected T98G and U-118 MG cell membrane integrity, causing enhanced LDH leakage. Moreover, treatment with ND also had an impact on the metabolic activity of the cells. This may indicate a higher sensitivity of glioblastoma cell lines to ND treatment. The results obtained during the experiment are in line with those obtained by Hinzmann et al. (2014), showing a small decrease in glioma U87 cell viability after treatment with detonation-synthesized ND. The most pronounced cytotoxic effect on T98G cells was observed after treatment with laser-synthesized RayND at a concentration of 100 mg/L (35% cytotoxicity) and with ND produced using the detonation technique, RT-DND-LN, at a concentration of 50 and 100 mg/L (35% and 36% cytotoxicity, respectively). Furthermore, the highest cytotoxicity in U-118 MG cells was observed after introducing laser-synthesized RayND-AL at a concentration of 100 mg/L (21% cytotoxicity) and detonation RT-DND at a concentration of 50 mg/L (24% cytotoxicity) into the cell culture. This finding may indicate that the production method did not influence ND cytotoxicity. The study by Vaitkuviene et al. (2015) performed on neuronal cells showed no cytotoxic potential of ND with an average diameter of 35 nm. All nanomaterials used in this study had a diameter smaller than 35 nm and influenced cell membrane integrity. This phenomenon may indicate that in the case of cytotoxicity in glioblastoma cells, the size of ND can play a crucial role. However, after

treatment of T98G cells with ND-B and ND-S at the highest tested concentration (100 mg/L), ND-B (size 10–20 nm) caused 25% cytotoxicity, and ND-S (size 3–4 nm) only 17% cytotoxicity, while in U-118 MG cells, similar values were obtained for both nanomaterials. After treatment with ND-B at a concentration of 100 mg/L, cytotoxicity was assessed to be at a level of 8%. Treatment with ND-S at a concentration of 20 and 50 mg/L caused 9% cytotoxicity for both concentrations.

Analysis of the levels of reactive oxygen species and mitochondrial superoxide revealed that all ND tested have the ability to lower both parameters in the human breast adenocarcinoma MCF-7, human hepatocellular carcinoma Hep G2, and human foreskin fibroblast HFF-1 cell lines. Moreover, all mentioned cell lines displayed higher viability after treatment with ND. According to Chen et al. (2017), this phenomenon may be linked to the fact that ND exhibit multi-enzyme mimetic activity of oxidase, catalase, and peroxidase, which strongly depends on pH value. Different pH values in the tumor cell environment, such as extracellular fluids (pH~ 6.5), endosomes (pH~ 5–6), or lysosomes (pH 4–5) (Li et al. 2014), may trigger the enzyme-like antioxidant activity. Because direct interaction of nanoparticles with cell membrane can lead to oxidative-stress-mediated damage (Jiang et al. 2008), the anti-oxidative activity of ND may have a positive effect on cell survival. It seems that only the presence of a –NH<sub>2</sub> group on the surface of ND did not enhance the ROS level in the Hep G2 cell line. Similarly, no significant changes in mitochondrial superoxide level in Hep G2 cells were observed after treatment with ND-NH<sub>2</sub> and ND-nf. In contrast, laser-synthesized RayND-AL and detonation-synthesized RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, and RT-DND-LN led to a greater decrease in ROS. Notably, apart from RayND-AL, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, and RT-DND-LN, ND-B, too, led to a reduction in mitochondrial superoxide level, which is one of the most prominent sources of ROS (Indo et al. 2015). However, no significant changes in cell metabolic activity were observed after treatment with both ND-S and ND-B.

According to recent reports, ND (diameter 3–4 nm, purity >95%) did not influence the level of ROS in MCF-7 cells (Daniluk et al. 2019). However, our study revealed that MCF-7 cells exhibited a

lower level of ROS after ND treatment. Although all nanomaterials significantly decreased the measured parameter, it is worth pointing out that the highest level of ROS was observed after treatment with ND-NH<sub>2</sub>, as in the case of Hep G2 cells, which may indicate that ND functionalized with –NH<sub>2</sub> groups have the weakest antioxidant properties. Although there were no significant differences in reducing the general ROS level between ND-B and ND-S, ND-B displayed a greater ability to reduce the formation of mitochondrial superoxide. No cytotoxicity and reduced oxidative stress after treatment with carboxylated ND were also found for yeast (Kaluç and Thomas 2022). Interestingly, non-tumor HFF-1 cells also displayed a higher viability and a lower level of ROS after ND treatment.

As in previously discussed research models, ND-NH<sub>2</sub> exhibited the weakest antioxidant activity, but only when it comes to the general ROS level. In the case of mitochondrial superoxide, the weakest antioxidant properties were displayed by ND, RT-DND-EN, RT-DND-A, and RT-DND-LN. Moreover, the greatest antioxidant activity (reduction in general oxidative stress) was exhibited by ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-A, RT-DND-EN, RT-DND-L, and RT-DND-LN. This activity in cells seems to be beneficial, as ROS are involved in aging processes (Indo et al. 2015). ROS play a dual role in non-tumor cells; they act as second messengers, but when their level is imbalanced, they may lead to cell death, causing damage to DNA, proteins, and lipids (Liu et al. 2020). Overall, it seems that regardless of size, production method, and surface chemistry, ND are biocompatible with HFF-1 cells. They may also display beneficial properties by reducing the general oxidative stress level and the level of mitochondrial superoxide, thus enhancing cell viability. According to recent reports, ROS generation in glioblastoma is involved in drug resistance. Moreover, as ROS affect the cell cycle, they also play a role in tumor progression. However, enhanced ROS production leads to the induction of apoptosis or autophagy (Olivier et al. 2021). The treatment of grade IV glioblastoma U-118 MG and T98G cells with ND caused a higher level of ROS and mitochondrial superoxide. Those two cell lines were vulnerable to ND treatment, which was proven by all analyses performed. RT-DND and RT-DND-EN enhanced the production of mitochondrial

superoxide. Moreover, after introducing ND-nf, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, and ND-B into the U-118 MG cell culture, no significant increase in the general ROS level was observed. However, ND-nf and ND-NH<sub>2</sub> increased the level of mitochondrial superoxide. Interestingly, in U-118 MG cells, the ND-induced ROS production depended on particle size, as the smaller ND-S particles caused both a higher level of general ROS and a higher level of mitochondrial superoxide. ND treatment also caused an enhanced level of ROS in HeLa cells (Mytych et al. 2014), endothelial cells (Solarska et al. 2012), and lymphocytes (Dworak et al. 2014). It was also suggested that the induction of ROS generation by ND may be cell specific (Horie et al. 2012), which would confirm our findings. Furthermore, in the U-118 MG cell line, unlike in the T98G cell line, the level of general oxidative stress also depended on the production method. Our analysis revealed that the nanomaterials produced with the detonation technique, RT-DND-EN and RT-DND-LN, exhibited the greatest induction of ROS production. Moreover, treatment with RT-DND-L also caused the highest level of mitochondrial superoxide (422% of the control).

## Conclusion

Our study showed the dualistic nature of ND and confirmed that the biocompatibility and toxicity of those nanomaterials are cell-specific. The analyses performed revealed that the human breast adenocarcinoma MCF-7 cell line, the human hepatocellular carcinoma Hep G2 cell line, and the human foreskin fibroblast HFF-1 cell line responded similarly to ND treatment. The above-mentioned experimental models exhibited higher metabolic activity and decreased production of general ROS and mitochondrial superoxide. The only differences were observed after conducting the analysis of cell membrane integrity. Some ND displayed the ability to impair the cell membrane, but this phenomenon did not influence the viability of the tested cells, which rose in a dose-dependent manner. Furthermore, two glioblastoma cell lines, T98G and U-118 MG, also responded similarly to ND treatment. In that case, mild cytotoxicity was observed. Both cell lines displayed decreased viability, a higher level of LDH leakage (which indicates cell membrane damage), and an increased level of

general ROS and mitochondrial superoxide. It seems that ND cytotoxicity might be connected with general oxidative stress. The highest toxicity in T98G and U-118 MG cells was obtained following treatment with nanomaterials purchased from Ray Techniques Ltd. In general, the production method did not influence ND toxicity. Surface modifications with carboxyl groups caused a more pronounced toxic effect than other modifications. Applying nanomaterials of different sizes produced similar results, but ND-B seemed to have a more detrimental effect. However, ND-S induced greater production of ROS and mitochondrial superoxide on U-118 MG cells.

## Acknowledgment

The manuscript is part of the PhD thesis of Barbara Wójcik.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## Funding

This research was funded by the National Science Center, Poland, project number [2020/37/B/NZ7/03532].

## ORCID

Barbara Wójcik  <http://orcid.org/0000-0002-0968-0204>

Katarzyna Zawadzka  <http://orcid.org/0000-0003-0112-7460>

Sławomir Jaworski  <http://orcid.org/0000-0002-4619-941X>

Marta Kutwin  <http://orcid.org/0000-0001-7059-7875>

Malwina Sosnowska  <http://orcid.org/0000-0002-1882-0846>

Agnieszka Ostrowska  <http://orcid.org/0000-0001-8781-6106>

Marta Grodzik  <http://orcid.org/0000-0001-5359-1885>

Artur Małolepszy  <http://orcid.org/0000-0001-5073-4975>

Marta Mazurkiewicz-Pawlak  <http://orcid.org/0000-0002-2520-7476>

Mateusz Wierzbicki  <http://orcid.org/0000-0003-3623-8929>

## Data availability statement

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

## References

- Adach, K., M. Fijalkowski, G. Gajek, J. Skolimowski, R. Kontek, and A. Blaszczyk. 2016. "Studies on the Cytotoxicity of Diamond Nanoparticles against Human Cancer Cells and Lymphocytes." *Chemico-Biological Interactions* 254: 156–166. doi:[10.1016/J.CBI.2016.06.004](https://doi.org/10.1016/J.CBI.2016.06.004).
- Afandi, A., A. Howkins, I. W. Boyd, and R. B. Jackman. 2018. "Nanodiamonds for Device Applications: An Investigation of the Properties of Boron-Doped Detonation Nanodiamonds." *Scientific Reports* 8 (1): 17–19. doi:[10.1038/s41598-018-21670-w](https://doi.org/10.1038/s41598-018-21670-w).
- Ansari, S. A., R. Satar, M. A. Jafri, M. Rasool, W. Ahmad, and S. Kashif Zaidi. 2016. "Role of Nanodiamonds in Drug Delivery and Stem Cell Therapy." *Iranian Journal of Biotechnology* 14 (3): 130–141. doi:[10.15171/ijb.1320](https://doi.org/10.15171/ijb.1320).
- Baidakova, M. V., Y. A. Kukushkina, A. A. Sitnikova, M. A. Yagovkina, D. A. Kirilenko, V. V. Sokolov, M. S. Shestakov, et al. 2013. "Structure of Nanodiamonds Prepared by Laser Synthesis." *Physics of the Solid State* 55 (8): 1747–1753. doi:[10.1134/S1063783413080027](https://doi.org/10.1134/S1063783413080027).
- Barhoum, A., M. L. García-Betancourt, J. Jeevanandam, E. A. Hussien, S. A. Mekkawy, M. Mostafa, M. M. Omran, et al. 2022. "Review on Natural, Incidental, Bioinspired, and Engineered Nanomaterials: History, Definitions, Classifications, Synthesis, Properties, Market, Toxicities, Risks, and Regulations." *Nanomaterials* 12 (2): 177. doi:[10.3390/nano12020177](https://doi.org/10.3390/nano12020177).
- Brar, H. K., J. Jose, Z. Wu, and M. Sharma. 2022. "Tyrosine Kinase Inhibitors for Glioblastoma Multiforme : Challenges and Opportunities for Drug Delivery." *Pharmaceutics* 15 (1): 59. doi:[10.3390/pharmaceutics15010059](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010059).
- Carlsson, S. K., S. P. Brothers, and C. Wahlestedt. 2014. "Emerging Treatment Strategies for Glioblastoma Multiforme." *EMBO Molecular Medicine* 6 (11): 1359–1370. doi:[10.15252/emmm.201302627](https://doi.org/10.15252/emmm.201302627).
- Chang, B.-M., L. Pan, H.-H. Lin, and H.-C. Chang. 2019. "Nanodiamond-Supported Silver Nanoparticles as Potent and Safe Antibacterial Agents." *Scientific Reports* 9 (1): 13164. doi:[10.1038/s41598-019-49675-z](https://doi.org/10.1038/s41598-019-49675-z).
- Chen, K. L., and G. D. Bothun. 2014. "Nanoparticles Meet Cell Membranes: Probing Nonspecific Interactions Using Model Membranes." *Environmental Science & Technology* 48 (2): 873–880. doi:[10.1021/es403864v](https://doi.org/10.1021/es403864v).
- Chen, T. M., X. M. Tian, L. Huang, J. Xiao, and G. W. Yang. 2017. "Nanodiamonds as pH-Switchable Oxidation and Reduction Catalysts with Enzyme-like Activities for Immunoassay and Antioxidant Applications." *Nanoscale* 9 (40): 15673–15684. doi:[10.1039/c7nr05629j](https://doi.org/10.1039/c7nr05629j).
- Chow, E. K., X.-Q. Zhang, M. Chen, R. Lam, E. Robinson, H. Huang, D. Schaffer, et al. 2011. "Nanodiamond Therapeutic Delivery Agents Mediate Enhanced Chemoresistant Tumor Treatment." *Science Translational Medicine* 3 (73) doi:[10.1126/scitranslmed.3001713](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001713).
- Daniluk, K., M. Kutwin, M. Grodzik, M. Wierzbicki, B. Strojny, J. Szczepaniak, J. Bałaban, et al. 2019. "Use of Selected Carbon Nanoparticles as Melittin Carriers for MCF-7 and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells." *Materials* 13 (1): 90. doi:[10.3390/ma13010090](https://doi.org/10.3390/ma13010090).
- Dworak, N., M. Wnuk, J. Zebrowski, G. Bartosz, and A. Lewinska. 2014. "Genotoxic and Mutagenic Activity of Diamond Nanoparticles in Human Peripheral Lymphocytes in Vitro." *Carbon* 68: 763–776. doi:[10.1016/j.carbon.2013.11.067](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.11.067).
- Dymova, M. A., E. V. Kuligina, and V. A. Richter. 2021. "Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Glioblastoma." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (12): 6385. doi:[10.3390/ijms22126385](https://doi.org/10.3390/ijms22126385).
- Faklaris, O., V. Joshi, T. Irinopoulou, P. Tauc, M. Sennour, H. Girard, C. Gesset, et al. 2009. "Photoluminescent Diamond Nanoparticles for Cell Labeling: Study of the Uptake Mechanism in Mammalian Cells." *ACS Nano* 3 (12): 3955–3962. doi:[10.1021/nn901014j](https://doi.org/10.1021/nn901014j).
- Gottlieb, S., N. Wöhrl, S. Schulz, and V. Buck. 2016. "Simultaneous Synthesis of Nanodiamonds and Graphene via Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition (MW PE-CVD) on Copper." *SpringerPlus* 5 (1): 568. doi:[10.1186/s40064-016-2201-x](https://doi.org/10.1186/s40064-016-2201-x).
- Hinzmann, M., S. Jaworski, M. Kutwin, J. Jagiełło, R. Koziński, M. Wierzbicki, M. Grodzik, et al. 2014. "Nanoparticles Containing Allotropes of Carbon Have Genotoxic Effects on Glioblastoma Multiforme Cells." *International Journal of Nanomedicine* 9 (1): 2409–2417. doi:[10.2147/IJN.S62497](https://doi.org/10.2147/IJN.S62497).
- Horie, M., L. K. Komaba, H. Kato, A. Nakamura, K. Yamamoto, S. Endoh, K. Fujita, et al. 2012. "Evaluation of Cellular Influences Induced by Stable Nanodiamond Dispersion; the Cellular Influences of Nanodiamond Are Small." *Diamond and Related Materials* 24: 15–24. doi:[10.1016/j.diamond.2012.01.037](https://doi.org/10.1016/j.diamond.2012.01.037).
- Ibrahim, M., Y. Xue, M. Ostermann, A. Sauter, D. Steinmueller-Nethl, S. Schweißberg, A. Krueger, et al. 2018. "In Vitro Cytotoxicity Assessment of Nanodiamond Particles and Their Osteogenic Potential." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 106 (6): 1697–1707. doi:[10.1002/jbm.a.36369](https://doi.org/10.1002/jbm.a.36369).
- Indo, H. P., H.-C. Yen, I. Nakanishi, K.-I. Matsumoto, M. Tamura, Y. Nagano, H. Matsui, et al. 2015. "A Mitochondrial Superoxide Theory for Oxidative Stress Diseases and Aging." *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 56 (1): 1–7. doi:[10.3164/jcbn.14-42](https://doi.org/10.3164/jcbn.14-42).
- Jain, M., A. Mishra, V. Yadav, H. Shyam, S. Kumar, S. K. Mishra, and P. Ramakant. 2023. "Long-Term Yogic Intervention Decreases Serum Interleukins IL-10 and IL-1 $\beta$  and Improves Cancer-Related Fatigue and Functional Scale during Radiotherapy/Chemotherapy in Breast Cancer Patients: A Randomized Control Study." *Supportive Care in Cancer* 31 (1): 1–8. doi:[10.1007/s00520-022-07487-4](https://doi.org/10.1007/s00520-022-07487-4).
- Jeevanandam, J., A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne, and M. K. Danquah. 2018. "Review on Nanoparticles and Nanostructured Materials: History, Sources, Toxicity and Regulations." *Beilstein Journal of Nanotechnology* 9 (1): 1050–1074. doi:[10.3762/bjnano.9.98](https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98).
- Jiang, W., B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, and W. C. W. Chan. 2008. "Nanoparticle-Mediated Cellular Response is Size-Dependent." *Nature Nanotechnology* 3 (3): 145–150. doi:[10.1038/nnano.2008.30](https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30).

- Kaluç, N., and P. B. Thomas. 2022. "A Carboxylated Nanodiamond Reduces Oxidative Stress and Shows No Sign of Toxicity in Yeast." *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures* 30 (4): 487–494. doi:[10.1080/1536383X.2021.1960509](https://doi.org/10.1080/1536383X.2021.1960509).
- Keremidarska, M., A. Ganeva, D. Mitev, T. Hikov, R. Presker, L. Pramatarova, and N. Krasteva. 2014. "Comparative Study of Cytotoxicity of Detonation Nanodiamond Particles with an Osteosarcoma Cell Line and Primary Mesenchymal Stem Cells." *Biotechnology, Biotechnological Equipment* 28 (4): 733–739. doi:[10.1080/13102818.2014.947704](https://doi.org/10.1080/13102818.2014.947704).
- Khanal, D., Q. Lei, G. Pinget, D. A. Cheong, A. Gautam, R. Yusoff, B. Su, et al. 2020. "The Protein Corona Determines the Cytotoxicity of Nanodiamonds: Implications of Corona Formation and Its Remodelling on Nanodiamond Applications in Biomedical Imaging and Drug Delivery." *Nanoscale Advances* 2 (10): 4798–4812. doi:[10.1039/d0na00231c](https://doi.org/10.1039/d0na00231c).
- Korepanov, V. I., H.-O Hamaguchi, E. Osawa, V. Ermolenkov, I. K. Lednev, B. J. M. Etzold, O. Levinson, et al. 2017. "Carbon Structure in Nanodiamonds Elucidated from Raman Spectroscopy." *Carbon* 121: 322–329. doi:[10.1016/j.carbon.2017.06.012](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.06.012).
- Lewinski, N., V. Colvin, and R. Drezek. 2008. "Cytotoxicity of Nanoparticles." *Small* 4 (1): 26–49. doi:[10.1002/smll.200700595](https://doi.org/10.1002/smll.200700595).
- Li, Y., Y. Tong, R. Cao, Z. Tian, B. Yang, and P. Yang. 2014. "In Vivo Enhancement of Anticancer Therapy Using Bare or Chemotherapeutic Drug-Bearing Nanodiamond Particles." *International Journal of Nanomedicine* 9 (1): 1065–1082. doi:[10.2147/IJN.S54864](https://doi.org/10.2147/IJN.S54864).
- Liu, Y., H. Liu, L. Wang, Y. Wang, C. Zhang, C. Wang, Y. Yan, et al. 2020. "Amplification of Oxidative Stress: Via Intracellular ROS Production and Antioxidant Consumption by Two Natural Drug-Encapsulated Nanoagents for Efficient Anticancer Therapy." *Nanoscale Advances* 2 (9): 3872–3881. doi:[10.1039/d0na00301h](https://doi.org/10.1039/d0na00301h).
- Manzanares, D., and V. Ceña. 2020. "Endocytosis: The Nanoparticle and Submicron Nanocompounds Gateway into the Cell." *Pharmaceutics* 12 (4): 371. doi:[10.3390/pharmaceutics12040371](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040371).
- Marin, J. J. G., R. I. R. Macias, M. J. Monte, M. R. Romero, M. Asensio, A. Sanchez-Martin, C. Cives-Losada, et al. 2020. "Molecular Bases of Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma." *Cancers* 12 (6): 1663. doi:[10.3390/cancers12061663](https://doi.org/10.3390/cancers12061663).
- Mochalin, V. N., O. Shenderova, D. Ho, and Y. Gogotsi. 2011. "The Properties and Applications of Nanodiamonds." *Nature Nanotechnology* 7 (1): 11–23. doi:[10.1038/nnano.2011.209](https://doi.org/10.1038/nnano.2011.209).
- Moscariello, P., M. Raabe, W. Liu, S. Bernhardt, H. Qi, U. Kaiser, Y. Wu, T. Weil, H. J. Luhmann, and J. Hedrich. 2019. "Unraveling In Vivo Brain Transport of Protein-Coated Fluorescent Nanodiamonds." *Small* 15: 1902992. doi:[10.1002/smll.201902992](https://doi.org/10.1002/smll.201902992).
- Mytych, J., A. Lewinska, A. Bielak-Zmijewska, W. Grabowska, J. Zebrowski, and M. Wnuk. 2014. "Nanodiamond-Mediated Impairment of Nucleolar Activity is Accompanied by Oxidative Stress and DNMT2 Upregulation in Human Cervical Carcinoma Cells." *Chemico-Biological Interactions* 220: 51–63. doi:[10.1016/j.cbi.2014.06.004](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.06.004).
- Mytych, J., M. Wnuk, and S. I. S. Rattan. 2016. "Low Doses of Nanodiamonds and Silica Nanoparticles Have Beneficial Hormetic Effects in Normal Human Skin Fibroblasts in Culture." *Chemosphere* 148: 307–315. doi:[10.1016/j.chemosphere.2016.01.045](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.045).
- Namdar, R., and S. Nafisi. 2018. "Nanodiamond Applications in Skin Preparations." *Drug Discovery Today* 23 (5): 1152–1158. doi:[10.1016/j.drudis.2018.04.006](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.04.006).
- Niu, C., L. Wang, W. Ye, S. Guo, X. Bao, Y. Wang, Z. Xia, et al. 2020. "CCAT2 Contributes to Hepatocellular Carcinoma Progression via Inhibiting miR-145 Maturation to Induce MDM2 Expression." *Journal of Cellular Physiology* 235 (9): 6307–6320. doi:[10.1002/jcp.29630](https://doi.org/10.1002/jcp.29630).
- Olivier, C., L. Olivier, L. Lalier, and F. M. Vallette. 2021. "Drug Resistance in Glioblastoma: The Two Faces of Oxidative Stress." *Frontiers in Molecular Biosciences* 7: 1–16. doi:[10.3389/fmolb.2020.620677](https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.620677).
- Pacelli, S., F. Acosta, A. R. Chakravarti, S. G. Samanta, J. Whitlow, S. Modaresi, R. P. H. Ahmed, et al. 2017. "Nanodiamond-Based Injectable Hydrogel for Sustained Growth Factor Release: Preparation, Characterization and in Vitro Analysis." *Acta Biomaterialia* 58: 479–491. doi:[10.1016/J.ACTBIO.2017.05.026](https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2017.05.026).
- Paget, V., J. A. Sergent, R. Grall, S. Altmeyer-Morel, H. A. Girard, T. Petit, C. Gesset, et al. 2014. "Carboxylated Nanodiamonds Are Neither Cytotoxic nor Genotoxic on Liver, Kidney, Intestine and Lung Human Cell Lines." *Nanotoxicology* 8 (Suppl 1): 46–56. doi:[10.3109/17435390.2013.855828](https://doi.org/10.3109/17435390.2013.855828).
- Peng, Z., X. Han, S. Li, A. O. Al-Youbi, A. S. Bashammakh, M. S. El-Shahawi, and R. M. Leblanc. 2017. "Carbon Dots: Biomacromolecule Interaction, Bioimaging and Nanomedicine." *Coordination Chemistry Reviews Elsevier* 343: 256–277. doi:[10.1016/j.ccr.2017.06.001](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.06.001).
- Popov, M., V. Churkin, A. Kirichenko, V. Denisov, D. Ovsyannikov, B. Kulnitskiy, I. Perezhogin, et al. 2017. "Raman Spectra and Bulk Modulus of Nanodiamond in a Size Interval of 2–5 nm." *Nanoscale Research Letters* 12 (1): 4–9. doi:[10.1186/s11671-017-2333-0](https://doi.org/10.1186/s11671-017-2333-0).
- Qin, J.-X., X.-G. Yang, C.-F. Lv, Y.-Z. Li, K.-K. Liu, J.-H. Zang, X. Yang, et al. 2021. "Nanodiamonds: Synthesis, Properties, and Applications in Nanomedicine." *Materials & Design* 210: 110091. doi:[10.1016/j.matdes.2021.110091](https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.110091).
- Rakha, E. A., G. M. Tse, and C. M. Quinn. 2023. "An Update on the Pathological Classification of Breast Cancer." *Histopathology* 82 (1): 5–16. doi:[10.1111/his.14786](https://doi.org/10.1111/his.14786).
- Reina, G., L. Zhao, A. Bianco, and N. Komatsu. 2019. "Chemical Functionalization of Nanodiamonds: Opportunities and Challenges Ahead." *Angewandte Chemie* 131 (50): 18084–18095. doi:[10.1002/ange.201905997](https://doi.org/10.1002/ange.201905997).
- Roy, U., V. Drozd, A. Durygin, J. Rodriguez, P. Barber, V. Atluri, X. Liu, et al. 2018. "Characterization of Nanodiamond-Based anti-HIV Drug Delivery to the Brain." *Scientific Reports* 8 (1): 1603. doi:[10.1038/s41598-017-16703-9](https://doi.org/10.1038/s41598-017-16703-9).

- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, et al. 2012. "Fiji: An Open Platform for Biological Image Analysis." *Nature Methods* 9 (7): 676–682. doi:[10.1038/nmeth.2019.Fiji](https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.Fiji).
- Schrand, A. M., S. A. C. Hens, and O. A. Shenderova. 2009. "Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications." *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* 34 (1–2): 18–74. doi:[10.1080/10408430902831987](https://doi.org/10.1080/10408430902831987).
- Schrand, A. M., H. Huang, C. Carlson, J. J. Schlager, E. Omachi Sawa, S. M. Hussain, L. Dai, et al. 2007. "Are Diamond Nanoparticles Cytotoxic?" *The Journal of Physical Chemistry B* 111 (1): 2–7. doi:[10.1021/jp066387v](https://doi.org/10.1021/jp066387v).
- Sedighi, M., Z. Mahmoudi, S. Abbaszadeh, M. R. Eskandari, M. Saeinasab, and F. Sefat. 2023. "Nanomedicines for Hepatocellular Carcinoma Therapy: Challenges and Clinical Applications." *Materials Today Communications Elsevier* 34: 105242. doi:[10.1016/j.mtcomm.2022.105242](https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.105242).
- Shivhare, S., and A. Das. 2023. "Cell Density Modulates Chemoresistance in Breast Cancer Cells through Differential Expression of ABC Transporters." *Molecular Biology Reports* 50 (1): 215–225. doi:[10.1007/s11033-022-08028-2](https://doi.org/10.1007/s11033-022-08028-2).
- Solarska, K., A. Gajewska, W. Kaczorowski, G. Bartosz, and K. Mitura. 2012. "Effect of Nanodiamond Powders on the Viability and Production of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by Human Endothelial Cells." *Diamond and Related Materials* 21: 107–113. doi:[10.1016/j.diamond.2011.10.020](https://doi.org/10.1016/j.diamond.2011.10.020).
- Stehlik, S., J. Henych, P. Stenclova, R. Kral, P. Zemenova, J. Pangrac, O. Vanek, et al. 2021. "Size and Nitrogen Inhomogeneity in Detonation and Laser Synthesized Primary Nanodiamond Particles Revealed via Salt-Assisted Deaggregation." *Carbon* 171: 230–239. doi:[10.1016/j.carbon.2020.09.026](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.09.026).
- Strojny, B., E. Sawosz, M. Grodzik, S. Jaworski, J. Szczepaniak, M. Sosnowska, M. Wierzbicki, et al. 2018. "Nanostructures of Diamond, Graphene Oxide and Graphite Inhibit CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 Enzymes and Downregulate Their Genes in Liver Cells." *International Journal of Nanomedicine* 13: 8561–8575. doi:[10.2147/IJN.S188997](https://doi.org/10.2147/IJN.S188997).
- Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, et al. 2021. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: a Cancer Journal for Clinicians* 71 (3): 209–249. doi:[10.3322/caac.21660](https://doi.org/10.3322/caac.21660).
- Tachibana, K., D. Yamasaki, K. Ishimoto, and T. Doi. 2008. "The Role of PPARs in Cancer." *PPAR Research* 2008: 1–15. doi:[10.1155/2008/102737](https://doi.org/10.1155/2008/102737).
- Tervonen, T., I. Linkov, J. R. Figueira, J. Steevens, M. Chappell, and M. Merad. 2009. "Risk-Based Classification System of Nanomaterials." *Journal of Nanoparticle Research* 11 (4): 757–766. doi:[10.1007/s11051-008-9546-1](https://doi.org/10.1007/s11051-008-9546-1).
- Tilak, M., J. Holborn, L. A. New, J. Lalonde, and N. Jones. 2021. "Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Targeting in Glioblastoma Multiforme." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (4): 1831. doi:[10.3390/ijms22041831](https://doi.org/10.3390/ijms22041831).
- Tu, J.-S., E. Perevedentseva, P.-H. Chung, and C.-L. Cheng. 2006. "Size-Dependent Surface CO Stretching Frequency Investigations on Nanodiamond Particles." *The Journal of Chemical Physics* 125 (17): 174713. doi:[10.1063/1.2370880](https://doi.org/10.1063/1.2370880).
- Turcheniuk, K., and V. N. Mochalin. 2017. "Biomedical Applications of Nanodiamond (Review)." *Nanotechnology* 28 (25): 252001. doi:[10.1088/1361-6528/aa6ae4](https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa6ae4).
- Vaitkuviene, A., V. Ratautaite, A. Ramanaviciene, K. Sanen, R. Paesen, M. Ameloot, V. Petrakova, et al. 2015. "Impact of Diamond Nanoparticles on Neural Cells." *Molecular and Cellular Probes* 29 (1): 25–30. doi:[10.1016/j.mcp.2014.10.005](https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.10.005).
- Vervald, A. M., S. A. Burikov, A. M. Scherbakov, O. S. Kudryavtsev, N. A. Kalyagina, I. I. Vlasov, E. A. Ekimov, et al. 2020. "Boron-Doped Nanodiamonds as Anticancer Agents: En Route to Hyperthermia/Thermoablation Therapy." *ACS Biomaterials Science & Engineering* 6 (8): 4446–4453. doi:[10.1021/acsbiomaterials.0c00505](https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00505).
- Wierzbicki, M., S. Jaworski, M. Kutwin, M. Grodzik, B. Strojny, N. Kurantowicz, K. Zdunek, et al. 2017. "Diamond, Graphite, and Graphene Oxide Nanoparticles Decrease Migration and Invasiveness in Glioblastoma Cell Lines by Impairing Extracellular Adhesion." *International Journal of Nanomedicine* 12: 7241–7254. doi:[10.2147/IJN.S146193](https://doi.org/10.2147/IJN.S146193).
- Wu, J., X. Du, D. Zhang, J. Cui, X. Zhang, X. Duan, J. F. Trant, et al. 2023. "A Nanodiamond Chemotherapeutic Folate Receptor-Targeting Prodrug with Triggerable Drug Release." *International Journal of Pharmaceutics* 630: 122432. doi:[10.1016/j.ijpharm.2022.122432](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122432).
- Zhang, B., X. Feng, H. Yin, Z. Ge, Y. Wang, Z. Chu, H. Raabova, et al. 2017. "Anchored but Not Internalized: Shape Dependent Endocytosis of Nanodiamond." *Scientific Reports* 7 (1): 1–9. doi:[10.1038/srep46462](https://doi.org/10.1038/srep46462).
- Zhang, X., W. Hu, J. Li, L. Tao, and Y. Wei. 2012. "A Comparative Study of Cellular Uptake and Cytotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes, Graphene Oxide, and Nanodiamond." *Toxicology Research* 1 (1): 62–68. doi:[10.1039/c2tx20006f](https://doi.org/10.1039/c2tx20006f).
- Zhou, Q., X. Sun, L. Zeng, J. Liu, and Z. Zhang. 2009. "A Randomized Multicenter Phase II Clinical Trial of Mitoxantrone-Loaded Nanoparticles in the Treatment of 108 Patients with Unresected Hepatocellular Carcinoma." *Nanomedicine* 5 (4): 419–423. doi:[10.1016/j.nano.2009.01.009](https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.01.009).
- Zhu, Y., J. Li, W. Li, Y. Zhang, X. Yang, N. Chen, Y. Sun, et al. 2012. "The Biocompatibility of Nanodiamonds and Their Application in Drug Delivery Systems." *Theranostics* 2 (3): 302–312. doi:[10.7150/thno.3627](https://doi.org/10.7150/thno.3627).
- Zupanić, D., and P. Veranić. 2022. "Nanodiamonds as Possible Tools for Improved Management of Bladder Cancer and Bacterial Cystitis," *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (15): 8183. doi:[10.3390/ijms23158183](https://doi.org/10.3390/ijms23158183).

## **Supplementary materials**

### **Dependence of diamond nanoparticle cytotoxicity on physicochemical parameters: comparative studies of glioblastoma, breast cancer, and hepatocellular carcinoma cell lines**

Barbara Wójcik<sup>a</sup>, Katarzyna Zawadzka<sup>a</sup>, Sławomir Jaworski<sup>a</sup>, Marta Kutwin<sup>a</sup>, Malwina Sosnowska<sup>a</sup>, Agnieszka Ostrowska<sup>a</sup>, Marta Grodzik<sup>a</sup>, Artur Małolepszy<sup>b</sup>, Marta Mazurkiewicz-Pawlicka<sup>b</sup>, Mateusz Wierzbicki<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, 02-786 Warsaw, Poland; barbara\_wojcik1@sggw.edu.pl (B.W.); katarzyna\_zawadzka@sggw.edu.pl (K.Z.); slawomir\_jaworski@sggw.edu.pl (S.J.), marta\_prasek@sggw.edu.pl (M.K.); malwina\_sosnowska@sggw.edu.pl (M.S.); agnieszka\_ostrowska@sggw.edu.pl (A.O.); marta\_grodzik@sggw.edu.pl (M.G.); mateusz\_wierzbicki@sggw.edu.pl (M.W.)

<sup>b</sup> Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, 00-654 Warsaw, Poland; Artur.Malolepszy@pw.edu.pl (A.M.); marta.pawlicka@pw.edu.pl (M.M.P.)

\* Correspondence: mateusz\_wierzbicki@sggw.edu.pl

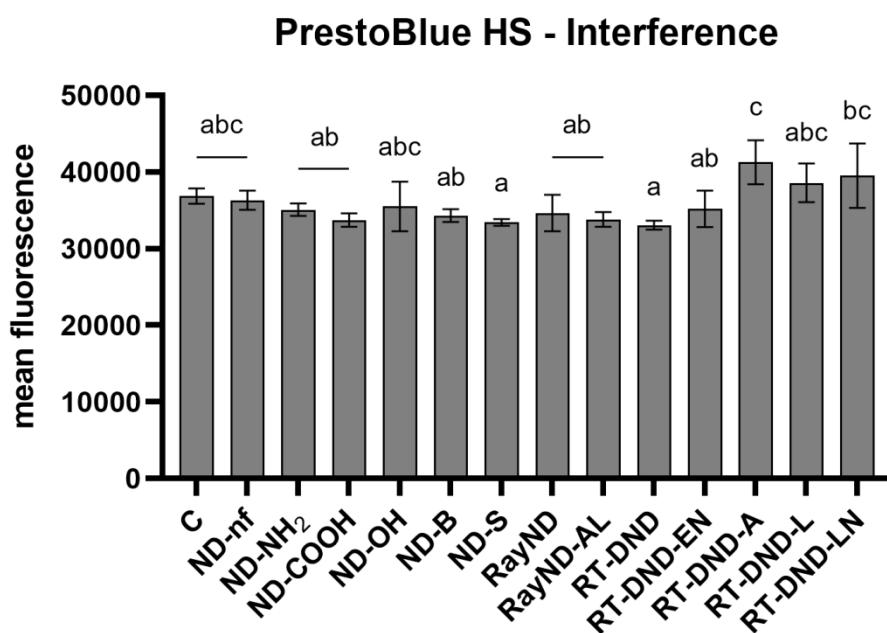
### **Interference analysis**

In order to avoid false results of the analysis of the cell viability and membrane integrity assays for the nanomaterials used in the experiments, an interference test was performed. The analysis did not reveal any significant influence of the tested ND compared with the control.

Firstly, 90 µL of the complete growth medium EMEM (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 1% antibiotic-antimycotic mix (Gibco) was added to the 96-well microplate (Nunc, Thermo Fisher

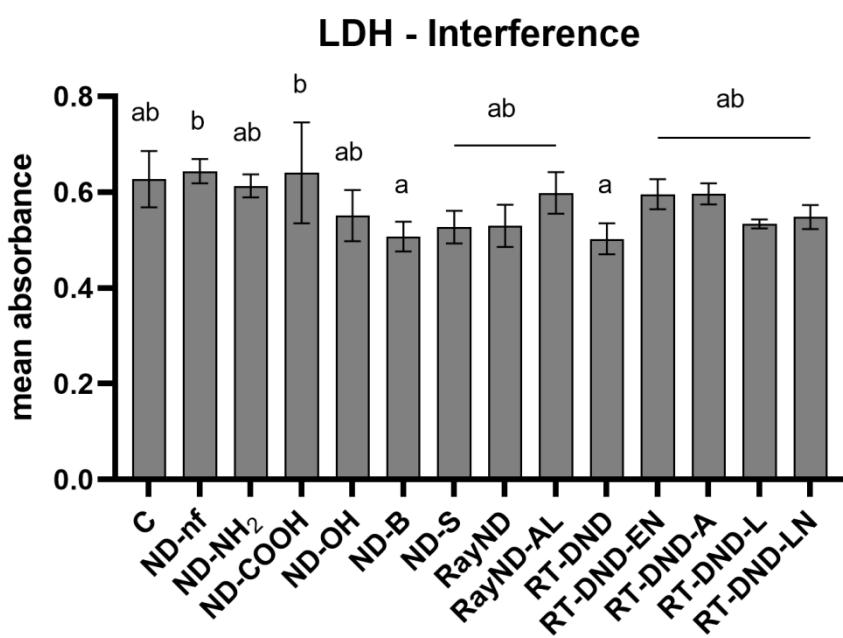
Scientific). Subsequently, 10 µL of a 10x concentrated nanomaterial suspension was added in order to obtain the final concentration of 100 mg/l. Instead of ND suspensions, ultrapure water (10 µl) was added to the control group. Afterward, the samples were incubated in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C for 24 h.

The PrestoBlue HS and LDH interference analyses (Thermo Fisher Scientific) were carried out in the same way as the cytotoxicity assays but without the presence of the cells. For the viability assay interference (Fig. 1S), 10 µl of complete growth medium was exchanged with the same volume of PrestoBlue HS reagent, followed by 90 min of incubation at 37 °C. The samples were protected from light. After that, the fluorescence intensity was measured at an excitation wavelength of 560 nm and an emission wavelength of 590 nm, using a microplate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).



**Figure 1S.** PrestoBlue HS interference analysis. Interactions of PrestoBlue HS reagent and nanomaterials are presented as the mean fluorescence from three replicates with the standard deviation. Different letters above the columns indicate statistically significant differences between the groups ( $p \leq 0.05$ ).

For the LDH (Thermo Fisher Scientific) interference analysis (Fig. 2S), the prepared microplates were incubated for 24 h. After that time, they were centrifuged for 6 min, 200 x g, followed by the transfer of 50 µl of supernatant into a fresh microplate. Next, 100 µl of the reaction mixture was added to each well. The samples were then incubated for 30 min at room temperature, protected from light. Spectrophotometer readings were performed at a wavelength of 490 nm (reference wavelength: 690 nm) in a microplate reader (Tecan Group ltd.).



**Figure 2S.** LDH interference analysis. Interactions of LDH reagent and nanomaterials are presented as the mean absorbance from three replicates with the standard deviation. Different letters above the columns indicate statistically significant differences between the groups ( $p \leq 0.05$ ).

### Morphological analysis

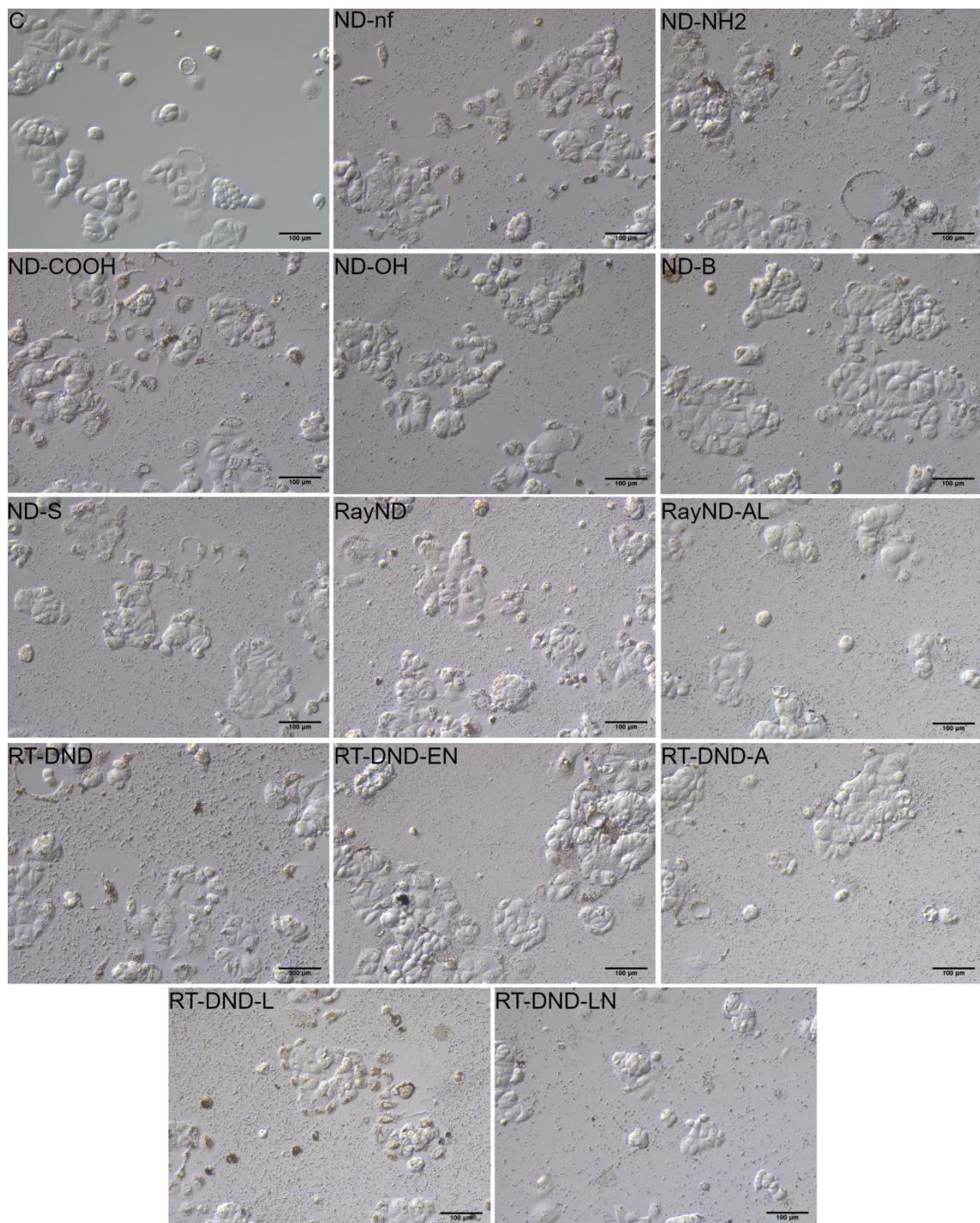


Figure 3S. Morphological characterization of the MCF-7 human breast adenocarcinoma.

Cells were treated with the following nanomaterials: ND, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, at a concentration of 20 mg/L. The incubation with nanomaterials lasted for 24 h. The control group (C) was treated with ultrapure water.

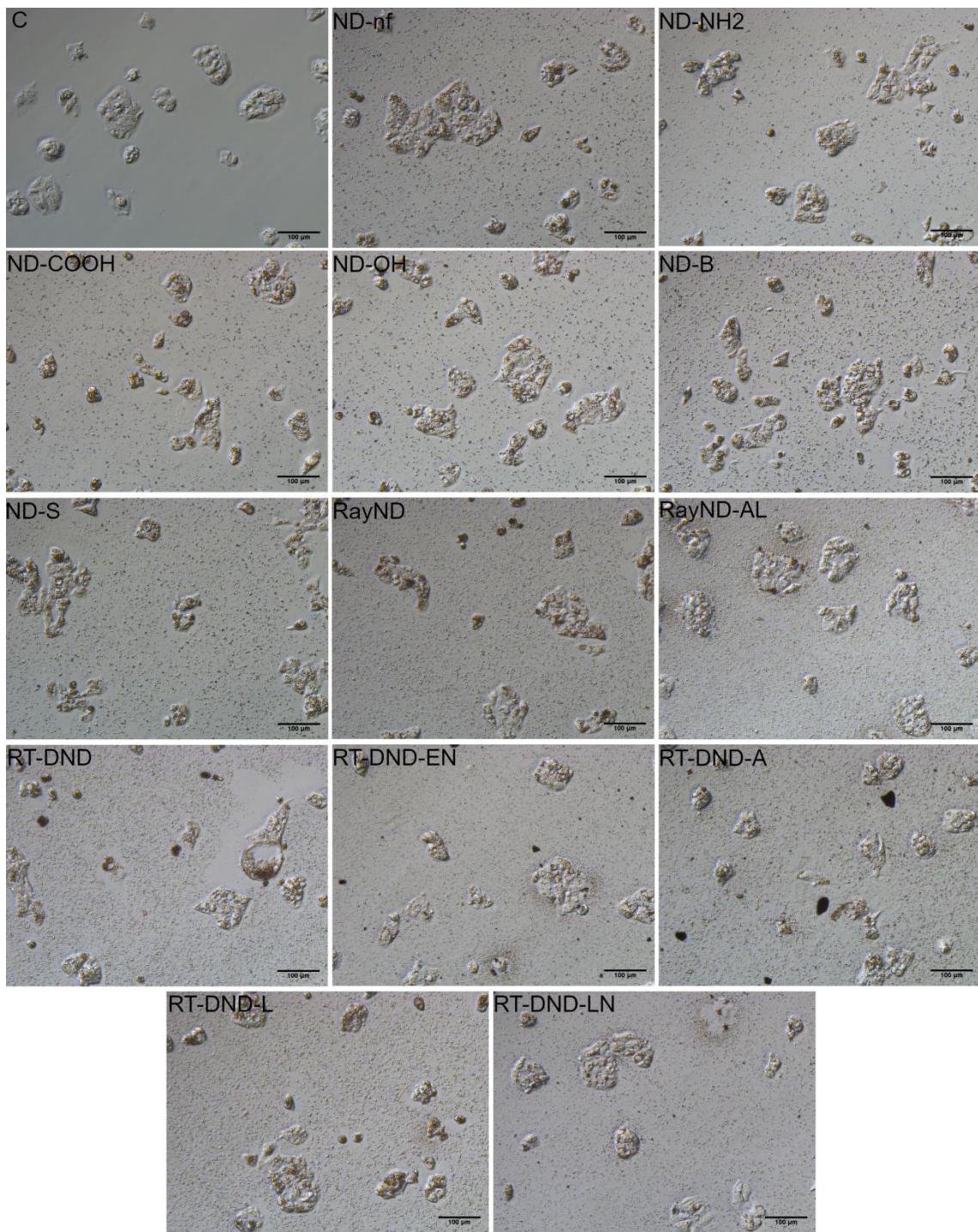
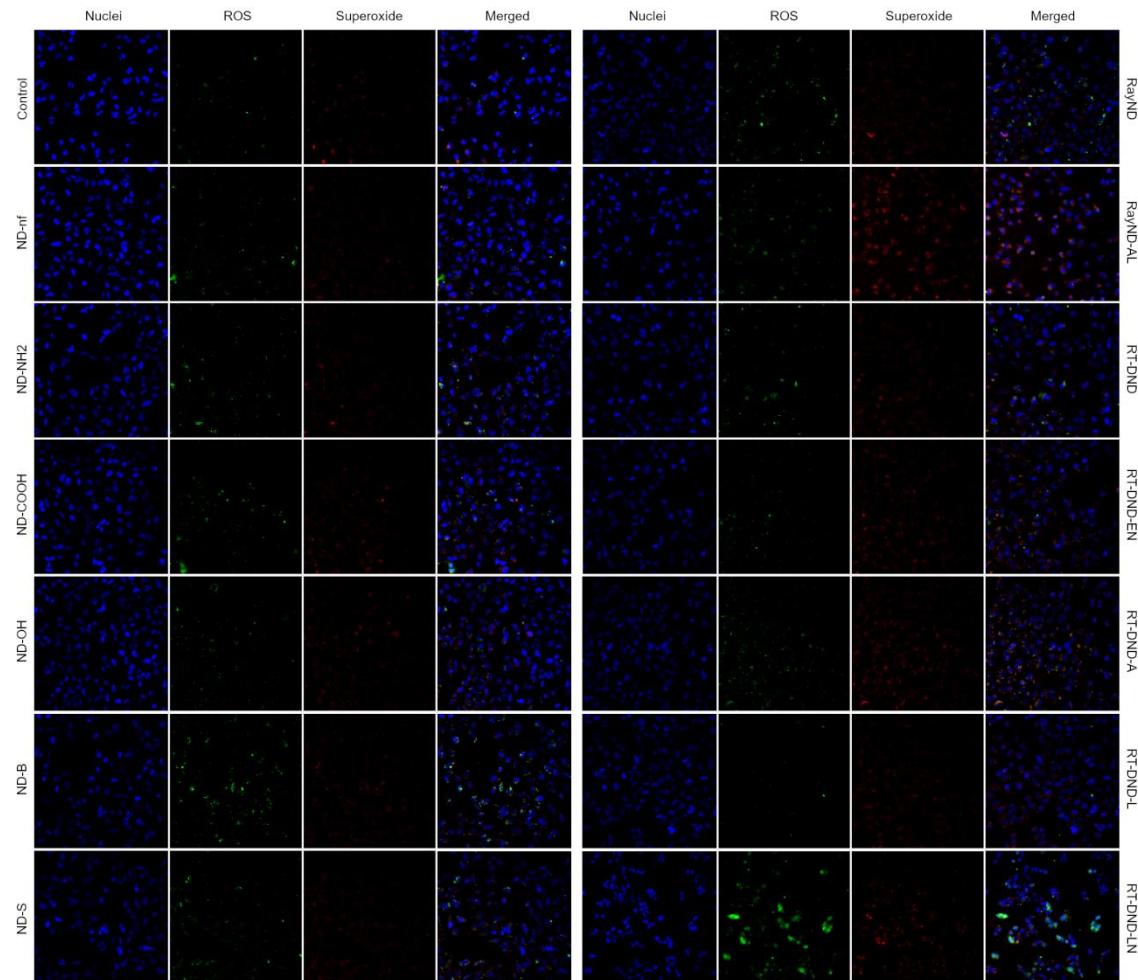


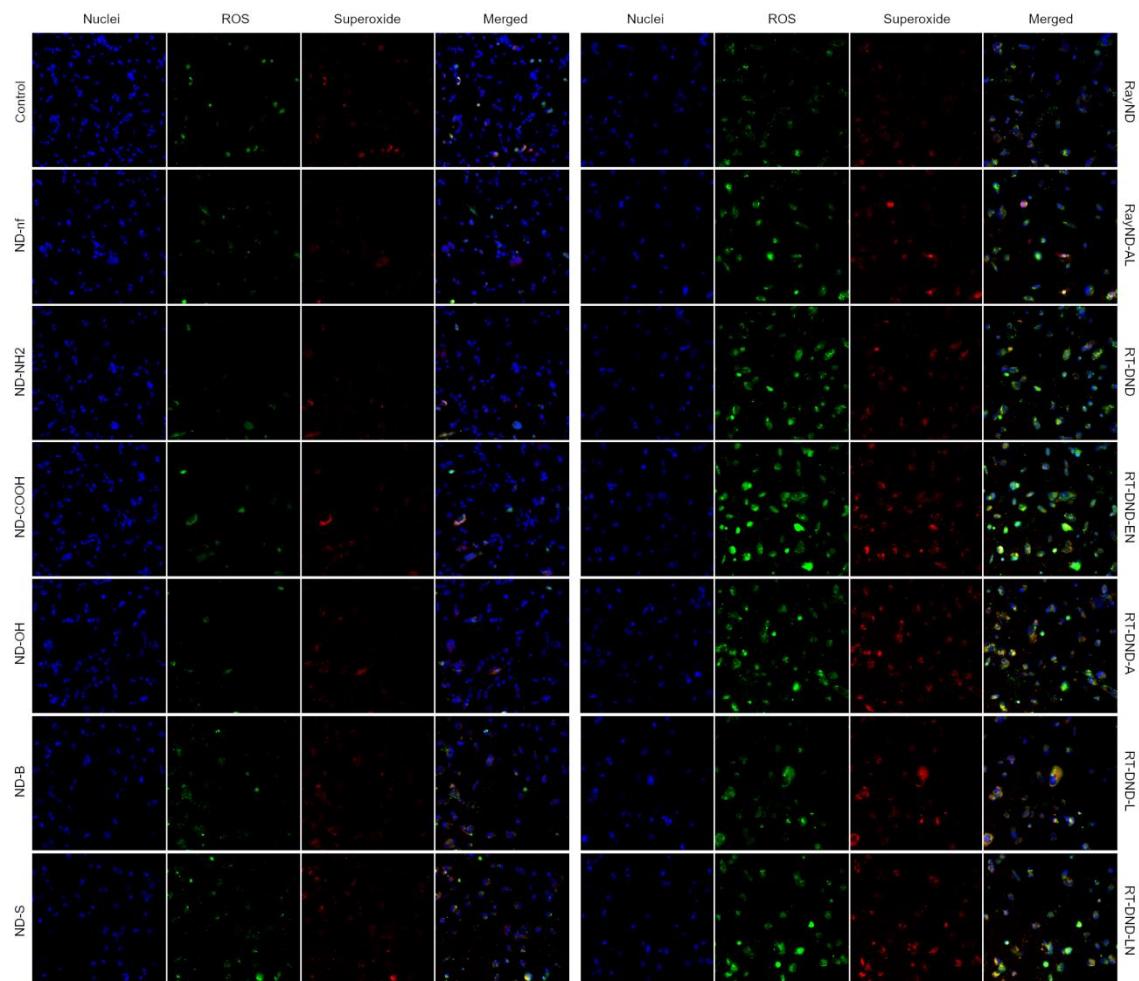
Figure 4S. Morphological characterization of the Hep G2 human hepatocellular carcinoma. Cells were treated with the following nanomaterials: ND, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, at a concentration of 20 mg/L. The

incubation with nanomaterials lasted for 24 h. The control group (C) was treated with ultrapure water.

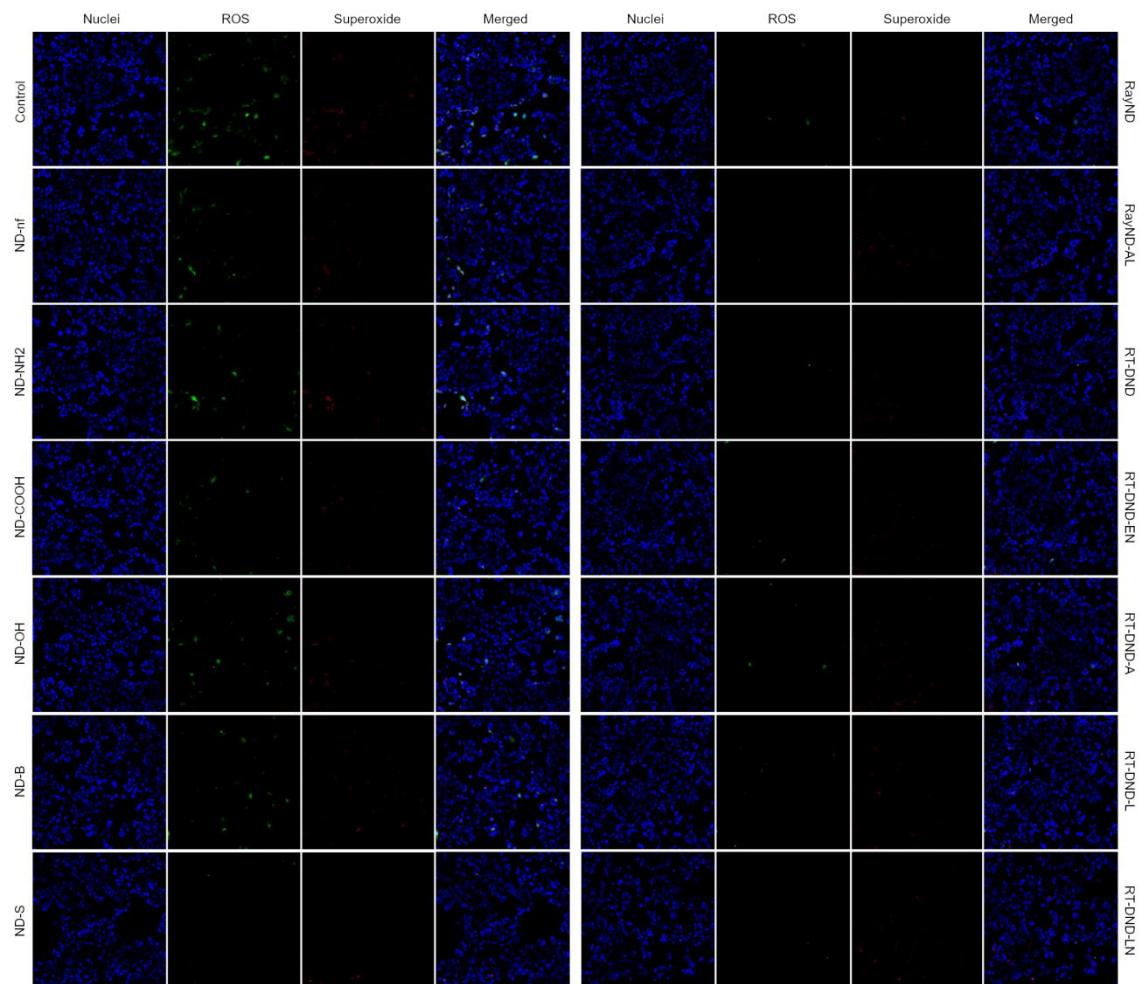
### Assessment of reactive oxygen species



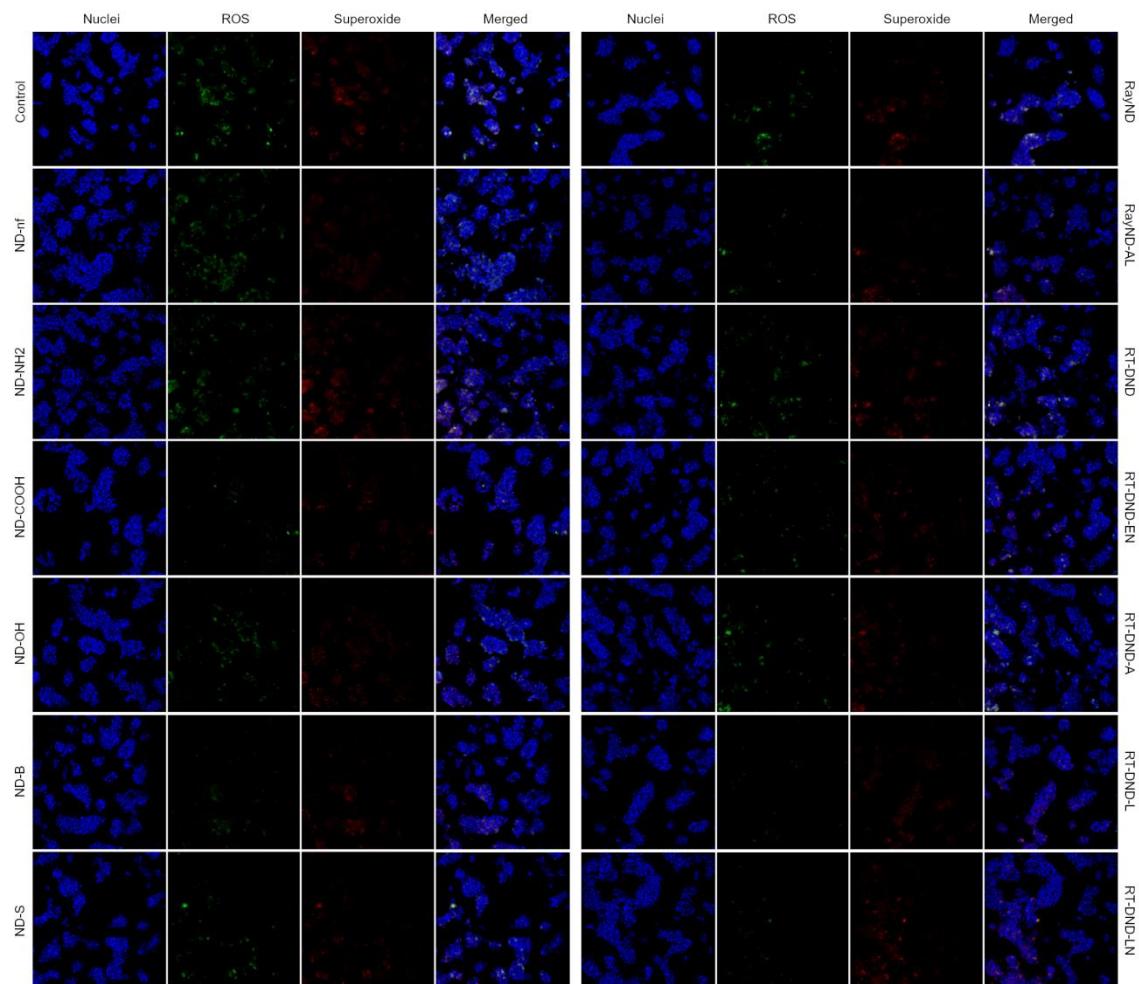
**Figure 5S.** The level of intracellular ROS and mitochondrial superoxide after 3 h of incubation of the T98G cell line with the following nanomaterials: ND, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, at a concentration of 50 mg/L, as determined using CM-H<sub>2</sub>CFDA and MitoSOX Red indicators.



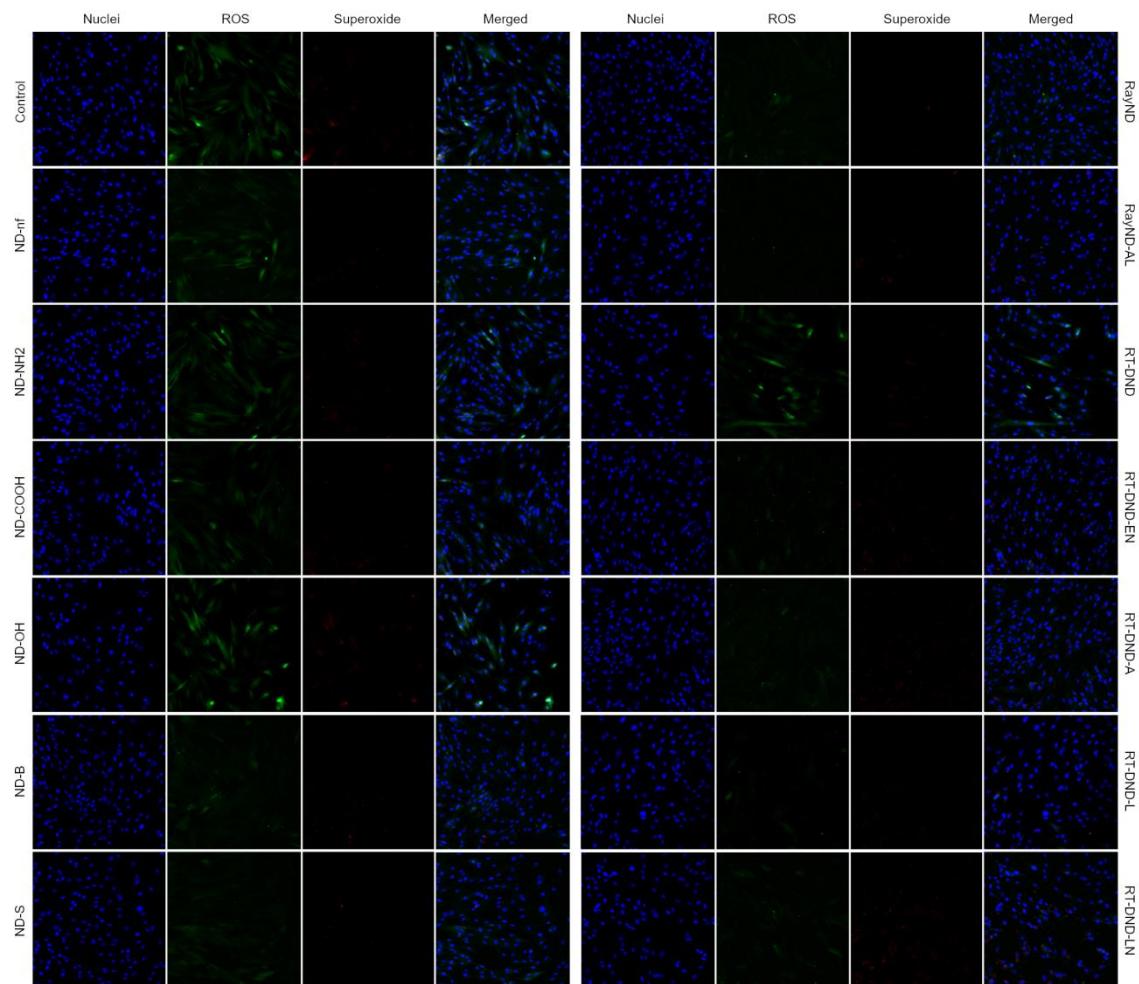
**Figure 6S.** The level of intracellular ROS and mitochondrial superoxide after 3 h of incubation of the U-118 MG cell line with the following nanomaterials: ND, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, at a concentration of 50 mg/L, as determined using CM-H<sub>2</sub>CFDA and MitoSOX Red indicators.



**Figure 7S.** The level of intracellular ROS and mitochondrial superoxide after 3 h of incubation of the MCF-7 cell line with the following nanomaterials: ND, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, at a concentration of 50 mg/L, as determined using CM-H<sub>2</sub>CFDA and MitoSOX Red indicators.



**Figure 8S.** The level of intracellular ROS and mitochondrial superoxide after 3 h of incubation of the Hep G2 cell line with the following nanomaterials: ND, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, at a concentration of 50 mg/L, as determined using CM-H<sub>2</sub>CFDA and MitoSOX Red indicators.



**Figure 9S.** The level of intracellular ROS and mitochondrial superoxide after 3 h of incubation of the HFF-1 cell line with the following nanomaterials: ND, ND-NH<sub>2</sub>, ND-COOH, ND-OH, ND-B, ND-S, RayND, RayND-AL, RT-DND, RT-DND-EN, RT-DND-A, RT-DND-L, RT-DND-LN, at a concentration of 50 mg/L, as determined using CM-H<sub>2</sub>CFDA and MitoSOX Red indicators.

Warszawa, 26.09.2023r.

**mgr inż. Barbara Wójcik**  
barbara\_wojcik1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Wójcik, Barbara, Katarzyna Zawadzka, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Małwina Sosnowska-Ławnicka, Agnieszka Ostrowska, Marta Grodzik, Artur Małolepszy, Marta Mazurkiewicz-Pawlicka, i Mateusz Wierzbicki. 2023. „Dependence of Diamond Nanoparticle Cytotoxicity on Physicochemical Parameters: Comparative Studies of Glioblastoma, Breast Cancer, and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines”. Nanotoxicology 17: 310–337” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: wykonaniu analiz, których wyniki przedstawione są w niniejszym artykule (za wyjątkiem analizy spektrum Ramana, która została wykonana we współpracy z Politechniką Warszawską); analizie oraz wizualizacji uzyskanych danych; przygotowaniem preparatów do wizualizacji za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej; napisaniu oraz redakcji manuskryptu.

Podpis



Warszawa, 26.09.2023r.

**mgr inż. Katarzyna Zawadzka**  
katarzyna\_zawadzka1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Katarzyna Zawadzka, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Małwina Sosnowska-Ławnicka, Agnieszka Ostrowska, Marta Grodzik, Artur Małolepszy, Marta Mazurkiewicz-Pawlicka, i Mateusz Wierzbicki. 2023. „Dependence of Diamond Nanoparticle Cytotoxicity on Physicochemical Parameters: Comparative Studies of Glioblastoma, Breast Cancer, and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines”. Nanotoxicology 17: 310–337” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na weryfikacji uzyskanych danych.

Podpis  
*Katarzyna Zawadzka*

Warszawa, 26.09.2023r.

**dr hab. Sławomir Jaworski, prof. SGGW**  
slawomir\_jaworski@sggw.edu.pl

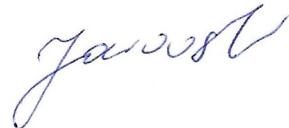
**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**

**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Katarzyna Zawadzka, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Małwina Sosnowska-Ławnicka, Agnieszka Ostrowska, Marta Grodzik, Artur Małolepszy, Marta Mazurkiewicz-Pawlak, i Mateusz Wierzbicki. 2023. „Dependence of Diamond Nanoparticle Cytotoxicity on Physicochemical Parameters: Comparative Studies of Glioblastoma, Breast Cancer, and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines”. Nanotoxicology 17: 310–337” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie formalnej przygotowanego manuskryptu.

Podpis



Warszawa, 26.09.2023r.

**dr Marta Kutwin**

marta\_prasek@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**

**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Katarzyna Zawadzka, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Małwina Sosnowska-Ławnicka, Agnieszka Ostrowska, Marta Grodzik, Artur Małolepszy, Marta Mazurkiewicz-Pawlicka, i Mateusz Wierzbicki. 2023. „Dependence of Diamond Nanoparticle Cytotoxicity on Physicochemical Parameters: Comparative Studies of Glioblastoma, Breast Cancer, and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines”. Nanotoxicology 17: 310–337” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na walidacji metod analitycznych stosowanych w toku realizacji badań.



Podpis

Warszawa, 26.09.2023r.

**dr Malwina Sosnowska-Ławnicka**  
malwina\_sosnowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Katarzyna Zawadzka, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Malwina Sosnowska-Ławnicka, Agnieszka Ostrowska, Marta Grodzik, Artur Małolepszy, Marta Mazurkiewicz-Pawlicka, i Mateusz Wierzbicki. 2023. „Dependence of Diamond Nanoparticle Cytotoxicity on Physicochemical Parameters: Comparative Studies of Glioblastoma, Breast Cancer, and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines”. Nanotoxicology 17: 310–337” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na walidacji metod analitycznych stosowanych w toku realizacji badań.

Podpis

Malwina Sosnowska-Ławnicka

Warszawa, 26.09.2023r.

**dr inż. Agnieszka Ostrowska**  
agnieszka\_ostrowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**  
**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Wójcik, Barbara, Katarzyna Zawadzka, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Małwina Sosnowska-Ławnicka, Agnieszka Ostrowska, Marta Grodzik, Artur Małolepszy, Marta Mazurkiewicz-Pawlicka, i Mateusz Wierzbicki. 2023. „Dependence of Diamond Nanoparticle Cytotoxicity on Physicochemical Parameters: Comparative Studies of Glioblastoma, Breast Cancer, and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines”. Nanotoxicology 17: 310–337” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu zdjęć preparatów przygotowanych do wizualizacji za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej.

*A. Ostrowska*  
Podpis

Warszawa, 26.09.2023r.

**dr hab. Marta Grodzik, prof. SGGW**  
marta\_grodzik@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**

**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Katarzyna Zawadzka, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Małwina Sosnowska-Ławnicka, Agnieszka Ostrowska, Marta Grodzik, Artur Małolepszy, Marta Mazurkiewicz-Pawlicka, i Mateusz Wierzbicki. 2023. „Dependence of Diamond Nanoparticle Cytotoxicity on Physicochemical Parameters: Comparative Studies of Glioblastoma, Breast Cancer, and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines”. Nanotoxicology 17: 310–337” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie formalnej przygotowanego manuskryptu.

Podpis



Warszawa, 26.09.2023r.

**dr Artur Małolepszy**  
Artur.Małolepszy@pw.edu.pl

Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Katarzyna Zawadzka, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Małwina Sosnowska-Lawnicka, Agnieszka Ostrowska, Marta Grodzik, Artur Małolepszy, Marta Mazurkiewicz-Pawlicka, i Mateusz Wierzbicki. 2023. „Dependence of Diamond Nanoparticle Cytotoxicity on Physicochemical Parameters: Comparative Studies of Glioblastoma, Breast Cancer, and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines”. Nanotoxicology 17: 310–337” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu analizy spektroskopii ramanowskiej próbek nanodiamentów oraz opisaniu wyników analizy.

Podpis



Warszawa, 26.09.2023r.

dr inż. Marta Mazurkiewicz-Pawlicka  
Marta.Pawlicka@pw.edu.pl

Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Wójcik, Barbara, Katarzyna Zawadzka, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Małwina Sosnowska-Ławnicka, Agnieszka Ostrowska, Marta Grodzik, Artur Małolepszy, Marta Mazurkiewicz-Pawlicka, i Mateusz Wierzbicki. 2023. „Dependence of Diamond Nanoparticle Cytotoxicity on Physicochemical Parameters: Comparative Studies of Glioblastoma, Breast Cancer, and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines”. Nanotoxicology 17: 310–337” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu analizy spektroskopii ramanowskiej próbek nanodiamentów oraz opisaniu wyników analizy.

*Marta Mazurkiewicz-Pawlicka*  
Podpis

Warszawa, 26.09.2023r.

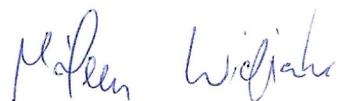
**dr hab. Mateusz Wierzbicki, prof. SGGW**  
mateusz\_wierzbicki@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Instytutu  
Biologii**

**Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy “Wójcik, Barbara, Katarzyna Zawadzka, Sławomir Jaworski, Marta Kutwin, Małwina Sosnowska-Ławnicka, Agnieszka Ostrowska, Marta Grodzik, Artur Małolepszy, Marta Mazurkiewicz-Pawlicka, i Mateusz Wierzbicki. 2023. „Dependence of Diamond Nanoparticle Cytotoxicity on Physicochemical Parameters: Comparative Studies of Glioblastoma, Breast Cancer, and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines”. Nanotoxicology 17: 310–337” mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w przygotowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodologii oraz recenzji i redakcji manuskryptu.

  
Podpis