

KEMIAN LAITOS  
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

## Grafeenimateriaalien käyttö ibuprofeenin kuljetuksessa

Kandidaatintutkielma  
12.5.2021.  
Veera Nikkola



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO



## Tiivistelmä

Tässä kandidaatintutkielmassa perehdytään grafeeniin ja sen johdannaisiin nanomateriaaleina, sekä materiaalien käyttöön lääkeaineiden kohdennetussa kuljetuksessa. Tutkielmassa arvioidaan erityisesti grafeenin käyttömahdollisuuksia ibuprofeenin kuljetuksessa perustuen grafeenin ainutlaatuisiin ominaisuuksiin. Kirjallisuuskatsauksena toteutetussa tutkielmassa pohditaan myös grafeenimateriaalien käyttöön liittyviä haasteita ja mahdollisia uhkia, joita on tutkittava ennen prekliinisiä tutkimuksia, *in vivo* ja *in vitro*.

## **Esipuhe**

Tämän kandidaatin tutkielma kirjoitettiin keväällä 2021 Jyväskylän yliopistossa kemian laitoksella. Kandidaattitutkielman kirjallisuuskatsaus aloitettiin alkuvuodesta ja saatiin päätökseen toukokuussa 2021.

Kiitän professori Maija Nissistä loistavasta ohjauksesta ja kanssaopiskelijoitani saamastani tuesta opintojen varrella.

## Sisällysluettelo

<b>Tiivistelmä</b> .....	iii
<b>Esipuhe</b> .....	iv
<b>Käytetyt lyhenteet</b> .....	vi
<b>1 Johdanto</b> .....	1
<b>2 Grafeenimateriaalit</b> .....	2
2.1 Grafeeni.....	2
2.2 Grafeenioksidi.....	3
<b>3 Grafeenimateriaalien toksisuus</b> .....	5
<b>4 Grafeenimateriaalien funktionalisointi</b> .....	7
4.1 Kitosaani (CS).....	7
4.2 Polyetyyliyglykoli (PEG) ja Porfyriini (FeN <sub>4</sub> ).....	9
<b>5 Ibuprofeeni</b> .....	12
<b>6 Ibuprofeenin kuljetus grafeenimateriaaleilla</b> .....	14
6.1 Lääkeaineen sitoutuminen .....	14
6.2 Grafeenimateriaalien siirtyminen soluun .....	15
6.2 Lääkeaineen hallittu irtoaminen.....	16
<b>7 Yhteenveto</b> .....	17
<b>Kirjallisuusluettelo</b> .....	19

**Käytetyt lyhenteet**

<b>COX-1</b>	Syklo-oksigenaasi 1
<b>COX-2</b>	Syklo-oksigenaasi 2
<b>CS</b>	Kitosaani
<b>CTP</b>	Kamptoteesi
<b>FeN4</b>	Porfyriini
<b>FeN4G</b>	Porfyriini-grafeeni
<b>GO</b>	Grafeenioksidi
<i>in vitro</i>	Solunkasvatusmaljalla tehty tutkimus
<i>in vivo</i>	Elävässä organismissa tehty tutkimus
<b>PEG</b>	Polyetyleeniglykoli
<b>PCGO</b>	Proteiinilla päällystetty grafeenioksidi



## 1 Johdanto

Hiili on materiaalina paitsi orgaanisen elämän perusta, myös hybridisaatio-ominaisuuksiltaan varsin poikkeuksellinen alkuaine.<sup>1</sup> Grafeeni on yksi hiilen allotroopeista. Grafeenia ja sen johdannaisia on tutkittu vielä varsin lyhyen ajanjakson ajan, mutta materiaaleista löytyy jo paljon tutkimustietoa. Grafeenille on kehitetty useita mahdollisia käyttökohteita nanomateriaalina muun muassa energian varastointilaitteissa, erilaisissa sensoreissa ja lääketieteellisissä sovelluksissa, kuten lääkeaineiden kuljetuksessa ja antibakteerisena materiaalina.<sup>2</sup>

Grafeenilla on materiaalina ainutlaatuisia ominaisuuksia, kuten esimerkiksi suuri reaktiopinta-ala.<sup>2</sup> Grafeenimateriaalien reaktiopinta-ala on jopa neljä kertaa suurempi kuin muiden lääkeaineiden kuljetukseen käytettävien nanomateriaalien pinta-ala.<sup>3</sup> Myös grafeeni-nanomateriaalien pieni koko (nanometriluokka), stabiilisuus ja erinomainen yhteensopivuus biologisten komponenttien kanssa ovat ominaisuuksia, joiden uskotaan tulevaisuudessa avaavan uusia mahdollisuuksia lääkeaineiden kohdennettuun kuljettamiseen ja annosteluun. Kohdennetulla lääkeannostelulla voidaan esimerkiksi suojella terveitä elimiä lääkeaineiden vahingollisilta haittavaikutuksilta ja vähentää tarvittavaa lääkeaineen määrää, koska lääkeaine kulkeutuu vain haluttuun kohteeseen.<sup>4</sup> Lääkeaineiden kohdennetusta kuljetuksesta löytyy erityisen paljon tutkimustietoa syöpähoitojen tehostamisessa. Näiden tutkimusten teoreettisia mekanismeja on esitetty ja sovellettu myös tässä ibuprofeenin kohdennettua kuljettamista käsittelevässä tutkielmassa.

Ibuprofeeni on professori Stewart Adamsin 1961 kehittämä yksi maailman eniten käytetyistä tulehduskipulääkkeistä. Ibuprofeenia käytetään hyvin laajasti erilaisten kiputilojen hoitoon, kuten esimerkiksi kuumeeseen ja päänsärkyyn.<sup>5</sup> Ibuprofeenilla on kuitenkin esimerkiksi vatsaa ärsyttäviä haittavaikutuksia, joilta voitaisiin mahdollisesti suojautua käyttämällä grafeeni-nanomateriaaleja lääkeaineen kohdennetussa kuljetuksessa.<sup>6</sup> Ibuprofeenia myydään Suomessa myös ilman reseptiä, ja se tunnetaan parhaiten kauppaniemellä Burana.

Grafeenimateriaalien käyttöä lääkeaineiden kuljetuksessa on tutkittu *in vivo* ja *in vitro*, mutta ennen prekliinisiä tutkimuksia on vielä tutkittava muun muassa materiaalin optimaalista valmistustapaa, kokoa ja materiaalin vuorovaikutuksia elävien solujen kanssa<sup>3</sup>.



## 2 Grafeenimateriaalit

### 2.1 Grafeeni

Hiiliatomeilla on kyky muodostaa erilaisia sidoksia, jotka mahdollistavat useita erilaisia allotrooppirakenteita, kuten pallomaisen fullereenin ja kiderakenteisen timantin. Grafeeni on levymäinen, yhden atomikerroksen paksuinen hiilen allotrooppirakenne, jossa hiiliatomit muodostavat hunajakennomaisen rakenteen.<sup>1</sup> Rakenne on yksi maailman vahvimista johtuen hiiliatomien välisistä lyhyistä kovalenttisista sidoksista.<sup>7</sup>

Jokaisella hiiliatomilla on neljä valenssielektronia. Grafeenin rakenteessa kolme hiilen valenssielektroneista muodostaa hybridisoituneet  $sp^2$ -orbitaalit ja neljäs valenssielektroni muodostaa  $p_z$ -orbitaalin.  $sp^2$ -hybridiorbitaalit muodostavat viereisen hiilen kanssa  $\sigma$ -sidoksen ja  $p_z$ -orbitaali viereisen hiilen  $p_z$ -orbitaalin kanssa  $\pi$ -sidoksen.<sup>7</sup>

Grafeenia voidaan valmistaa hiilestä useilla eri tavoilla, joko mekaanisesti tai kemiallisesti. Mekaaninen kuorinta on vanhin grafeenin valmistusmenetelmä, jossa pyrolyyttistä hiiltä (HOPG) kuoritaan teipillä, johon grafeenikerrokset jäävät kiinni. Kuorintaa toistamalla saadaan aikaan suhteellisen helposti ohuita grafeenilevyjä, mutta menetelmänä se on tehoton eikä siten sovellu kaupalliseen käyttöön. Grafeenia voidaan valmistaa myös grafeenioksidista pelkistämällä. Menetelmä on suosittu, sillä sen etuina ovat tehokkuus, edullisuus ja hyvä prosessoitavuus. Grafeenioksidi (GO) dispergoituu veteen, jolloin sen happea sisältävät funktionaaliset ryhmät reagoivat veden kanssa, ja muodostuu yksittäisiä grafeenilevyjä. Menetelmässä käytetään kuitenkin paljon ei-ympäristöystävällisiä kemikaaleja ja valmistusprosessissa on räjähdysvaara korkean valmistuslämpötilan takia. Muita grafeenin valmistamiseen käytettyjä menetelmiä ovat epitaksaalinen kasvatus esimerkiksi SiC:stä, hiilinanoputkien avaaminen ja kemialliset höyrypäälystykset.<sup>8</sup>

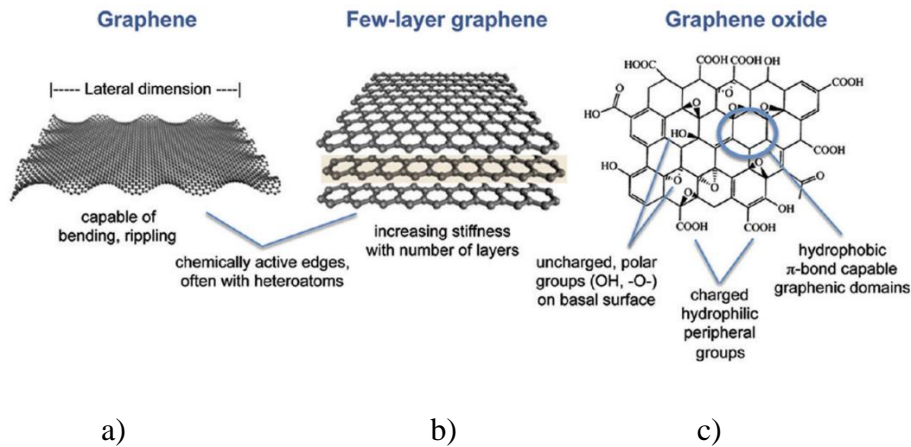
Veteen liukenemattomalla grafeenilla on erityisiä optisia, sähköisiä, mekaanisia ja lämpöominaisuuksia, joiden takia sen käyttömahdollisuudet kiinnostavat tutkijoita.<sup>9</sup> Grafeenilla on myös poikkeuksellisen suuri reagointipinta-ala. Koska grafeenimateriaalit ovat tasomaisia, materiaalin jokaisella atomilla on teoriassa mahdollisuus muodostaa sidoksia materiaalin molemmilta puolilta lääkeaineiden ja muiden lääkeaineen kuljetukseen tarvittavien ligandien kanssa.<sup>3</sup> Suurempi reaktiopinta-ala mahdollistaa teoriassa myös suurempien lääkeainemäärien kuljetuksen.<sup>2</sup>

## 2.2 Grafeenioksidi

Grafeenioksidi on hapetettu grafeenista. Se sisältää karboksyyli-, hydroksyyli- ja epoksiryhmiä.<sup>3</sup> GO:a voidaan valmistaa vahvojen happojen avulla, esimerkiksi käyttämällä rikki- tai typpihappoa. Hapettamiseen voidaan käyttää myös esimerkiksi Hummersin menetelmää<sup>10</sup>, jossa hapetukseen käytetään kaliumpermanganaatin ja rikkihapon seosta.<sup>9</sup> Hummersin menetelmässä hyödynnetään mekaanista, fysikaalista ja kemiallista kuorintaa vahvojen happojen avulla. Menetelmää käytetään erityisesti silloin, kun tavoitteena on valmistaa suuria määriä grafeenioksidia. Hummersin menetelmää käyttäessä grafeenioksidilevyjen muotoon ei voi vaikuttaa. Tulevaisuudessa optimaalinen muoto kuljetinmateriaalin voitaisiin valmistaa hyödyntämällä fysikaalisen kemian menetelmiä, kuten sähkökemialla.<sup>3</sup>

GO:n tarkkaa rakennetta ei tunneta, mutta karboksyylihapporyhmät sijoittuvat usein rakenteen reunoille. Hydroksyyli- ja epoksiryhmät taas todennäköisimmin löytyvät rakenteen keskeltä (kuva 1).<sup>11</sup> GO:n rakenne sisältää noin 45 m-% hiiliatomeita.<sup>9</sup> Grafeenioksidia käytetään usein useampia kerroksia päällekkäin, sillä kerrokset jäykistävät grafeenioksidin rakennetta. GO:n kerrosten ja reaktiopinta-alan suhde on käänteisesti verrannollinen.<sup>11</sup> Grafeenioksidin tasoja pitävät kiinni toisissaan  $\pi$ - $\pi$ -sidokset ja vetysidokset.<sup>2</sup>

Grafeenioksidin polaariset hydroksyyli- ja epoksiryhmät ovat varauksettomia. Ne mahdollistavat ei-kovalenttisen sitoutumisen esimerkiksi vetysidosten avulla ja kemiallisia reaktioita erilaisten funktionaalisten ryhmien kanssa. Grafeenioksidissa on myös muokkaamatonta grafeenia, joka voi muodostaa  $\pi$ -sidoksia aromaattisten materiaalien kanssa.<sup>2</sup> Grafeenioksidin funktionaaliset ryhmät ja sen muodostamia kemiallisia sidoksia on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. a) Muokkaamattoman grafeenin hunajakennomainen rakenne, josta grafeeni voi muodostaa b) 2-20 tasoisia levyjä. c) Grafeenioksidin (GO) rakenne, jossa karboksyyli- ja epoksiryhmät ovat rakenteen reunoilla ja hydroksyyli- ja epoksiryhmät rakenteen keskiosissa. Grafeenioksidi sisältää myös muokkaamatonta grafeenia, joka voi muodostaa  $\pi$ - $\pi$ -sidoksia. Reprinted with permission from<sup>11</sup>. Copyright (2011) American Chemical Society.

Grafeenioksidia voidaan muokata kovalenttisin tai ei-kovalenttisin menetelmin. Kovalenttisiin menetelmiin kuuluu atomien ja molekyylien lisääminen grafeenin rakenteeseen ja reaktiot funktionaalisten ryhmien kanssa, kuten esimerkiksi epoksiryhmän reaktio aminoryhmän kanssa. Ei-kovalenttiset menetelmät perustuvat mm. van der Waals -voimiin, elektrostaattisiin vuorovaikutuksiin, vetysidoksiin ja  $\pi$ -sidoksien muodostumiseen. Pienet lääkeainemolekyylit, kuten esimerkiksi ibuprofeeni, sitoutuvat grafeenioksidiin ei-kovalenttisesti.<sup>3</sup>

Grafeenioksidin epoksiryhmille ominaisia reaktioita ovat nukleofiiliset substituutioreaktiot, jossa epoksiryhmä aukeaa hydroksyyli-ryhmäksi. Nukleofiili, esimerkiksi aminoryhmä, luovuttaa elektroniparin ja muodostaa kovalenttisen sidoksen hiiliatomiin. Hydroksyyli-ryhmä voi grafeenioksidin pinnalla deprotonoitua, reagoida nukleofiilinä tai esimerkiksi muodostaa estereitä reagoidessaan happojen kanssa.

### 3 Grafeenimateriaalien toksisuus

Grafeenimateriaalien toksisuuteen vaikuttavat sekä materiaalin kemialliset että fysikaaliset ominaisuudet. Materiaalien toksisuus on vahvasti sidoksissa materiaalin funktionaalisiin ryhmiin ja niiden määrään materiaalin pinnalla. Toksisuuteen vaikuttaa myös materiaalin valmistustapa ja puhtaus.<sup>12</sup>

Grafeeni ja grafeenioksidi eivät kumpikaan ole biohajoavia eli elimistö ei sellaisenaan pysty poistamaan niitä elimistöstä. Grafeenikuljettimen funktionalisoinnilla, kuten esimerkiksi polymeerin PEG lisäämisellä, on kuitenkin todettu olevan biohajoavuutta ja vesiliukoisuutta lisääviä vaikutuksia.<sup>12</sup>

Grafeenimateriaalin toksisuuden on tutkittu liittyvän keskeisesti myös materiaalin kokoon. Tulehduksellisia reaktioita tutkittaessa mikrokokoisen grafeenioksidin vaste oli nanokokoista materiaalia suurempi.<sup>2</sup> Kuljettimen kokoa voidaan kasvattaa lisäämällä useampia grafeenikerroksia päällekkäin, mikä kuitenkin lisää materiaalin jäykkyyttä, ja vaikuttaa materiaalin soluläpäisevyyteen. Optimaaliseen kokoon vaikuttaa myös kuljetettavan lääkeaineen kuljetuskohde. Esimerkiksi verenkierrosta aivoihin kulkeutuvien lääkeaineiden kanssa pitää huomioida veriaivoeste, joka on fyysinen este verenkierrosta aivoihin kulkeutuville aineille.<sup>11</sup> Grafeenimateriaalien muoto eroaa myös biologisista komponenteista.<sup>2</sup> Rakenteen terävät kulmat voivat rikkoa solukalvoa.<sup>12</sup>

Grafeenioksidin toksisuuteen vaikuttaa merkittävästi myös materiaalin konsentraatio elimistössä. Grafeenioksidin on tutkittu olevan genotoksinen aine, joka aiheuttaa vaurioita DNA:ssa. Grafeeni aiheuttaa DNA-vaurioita jo hyvin pieninä määrinä (1 µg/mL), kun taas esimerkiksi vertailuna tutkitun lääkeainekuljetinmateriaalin SiO<sub>2</sub>:n todettiin aiheuttavan vahinkoa vasta suurissa pitoisuuksissa (100 µg/mL).<sup>12</sup>

Grafeenioksidin hydrofobiset osat voivat vaikuttaa suoraan solukalvon hydrofobiseen ulkoosaan aiheuttaen vahinkoa. Suorien solukalvoon kohdistuvien vaikutusten lisäksi grafeenimateriaalit aiheuttavat oksidatiivista stressiä kohdesoluissa. Oksidatiivinen stressi kohdesolussa aiheutuu reaktiivisista happiryhmistä, joiden määrän arvellaan kasvavan materiaalin konsentraation ja altistusajan kasvaessa. Reaktiiviset happiryhmät syntyvät esimerkiksi hydroksyyliyhdyntien irrotessa grafeenioksidista. Vapaa happiatomi reagoi

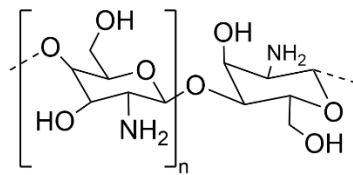
ympäristön kanssa helposti, koska atomilla on pariton määrä ulkoelektroneja. Antioksidantit voivat korjata ja eliminoida syntyneitä reaktiivisia happiryhmiä elimistössä.<sup>12</sup>

Grafeenimateriaalien käytössä on huomioitava, että hydrofiilinen GO voi hajota muodostaen stabiileja kolloideja. Materiaalin valmistustavasta riippuen grafeenimateriaaliin voi jäädä epäpuhtauksia tai jäännösväliaineita, joilla voi olla haitallaisia biologisia vaikutuksia.<sup>11</sup> Esimerkiksi Hummersin menetelmää käyttäessä materiaaliin voi jäädä permanganaattijäämiä. Permanganaatti-ioni voi toimia hapettimena ja se voisi siten vaikuttaa esimerkiksi veren pH-arvoon sitä nostavasti. Grafeenimateriaalin pesuvaiheet ovat epäpuhtauksien takia merkittävässä asemassa, mutta toisaalta peseminen voi aiheuttaa levyn geeliytymisen.<sup>11</sup>

## 4 Grafeenimateriaalien funktionalisointi

### 4.1 Kitosaani (CS)

GO:iin voidaan kiinnittää kovalenttisesti biohajoavaa kitosaania (CS). Kitosaani on lineaarinen, hydrofobinen polymeeri (kuva 2), jota voidaan valmistaa deasetyloimalla kitiniä esimerkiksi sienistä tai hyönteisistä. Kitosaanin kemialliset ominaisuudet riippuvat polymeeriketjun pituudesta. Kitosaanin on tutkittu kiinnittyvän limakalvojen pinnoille sitä paremmin mitä suurempi sen molekyylipaino on.<sup>13</sup> Kitosaani liukenee hyvin veteen ja se on varaukseltaan positiivinen.<sup>14</sup> Biohajoavuutensa vuoksi se voisi olla ihanteellinen materiaali grafeenioksidin pinnalle, lääkeaineiden kuljettamiseen ja niiden hallittuun vapautumiseen elimistössä.<sup>8</sup> Kitosaanin on tutkittu hajoavan lysosomien entsyymien toiminnan vaikutuksesta, joten sen metabolisoituminen olisi mahdollista myös ihmiskehossa.<sup>14</sup>

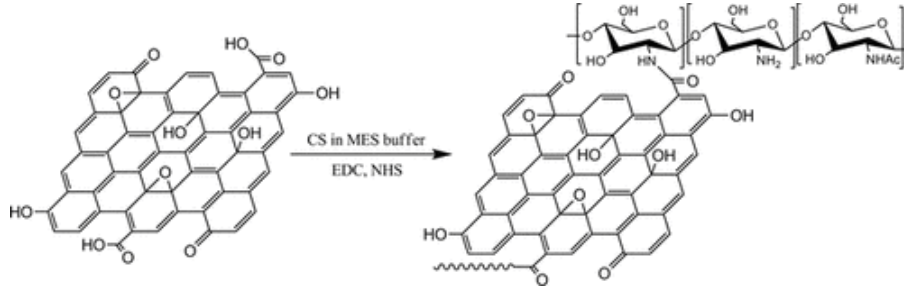


Kuva 2. Kitosaani (CS) on polymeeri, joka muodostuu peräkkäisistä D-glukosamiini- ja N-asetyyli-D-glukosamiinimonomeereistä.

Kitosaanin ominaisuudet muuttuvat pH:n mukaan reversiibelisti, mitä voidaan hyödyntää lääkeaineiden kontrolloidun vapautumisen säätelyssä. Kun pH on  $< 4$ , kitosaanin aminoryhmät ovat täysin protonoituneita ja molekyyli liukenee veteen. pH:ssa 5–7 polymeeri on pääosin deprotonoitunut, ja polymeerien väliset repulsiot kasvavat, mikä aiheuttaa polymeerin kiertymisen. pH:n ylittäessä kahdeksan tapahtuu GO-CS:n aggregoituminen suolojen ja proteiinien vaikutuksesta. pH vaikuttaa myös GO-CS:n kokoon. GO-CS:n koko pH:ssa 4 on keskimäärin 300 nm, mutta pH:ssa 6 kuljetinmateriaalin koko pienenee 260 nm:iin. Materiaalin koko kasvaa merkittävästi, kun pH liuoksessa on yli 11.<sup>15</sup>

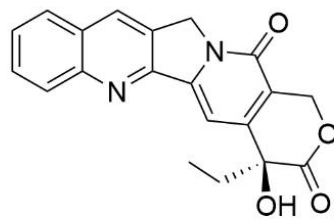
Pienet, steroidittomat lääkeaineet voivat kiinnittyä GO-CS-materiaaliin muodostamalla sidoksia nimenomaan grafeenioksidin kanssa. GO:n ja kitosaanin välinen vuorovaikutus

puolestaan on kovalenttinen ja perustuu kitosaanin aminoryhmän ja grafeenioksidin karboksyylihapon muodostamaan amidisidoksen<sup>15</sup> (kuva 3).



Kuva 3. Kitosaanin kiinnittyminen grafeenioksidiin amidisidoksella. Reprinted with permission from<sup>15</sup>. Copyright (2011) WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Bao *et al.*:n<sup>13</sup> tutkimuksissa lääkeaineen kuljetusta GO-CS-levyissä tutkittiin kamptotesiinin (CTP) avulla. CTP:n todettiin kiinnittyvän GO-CS levyssä grafeenioksidin pinnalle  $\pi$ - $\pi$  -sidoksilla ja hydrofobisilla vuorovaikutuksilla. Kiinnittyvän CTP:n määrän laskettiin vastaavan jopa 20 painoprosenttia lääkeaineen kuljettajaan nähden.<sup>15</sup> CTP:llä on ibuprofeenin kanssa samanlaisia kemiallisia ominaisuuksia, sillä se on aromaattinen ja veteen huonosti liukeneva sen poolittomien hiilivetysidosten takia. (Kuva 4).



Kuva 4. Syöpälääkkeenä käytetty kamptotesiini (CTP). CTP kiinnittyy grafeenioksidin pinnalle  $\pi$  -  $\pi$ -sidoksilla ja hydrofobisilla vuorovaikutuksilla.

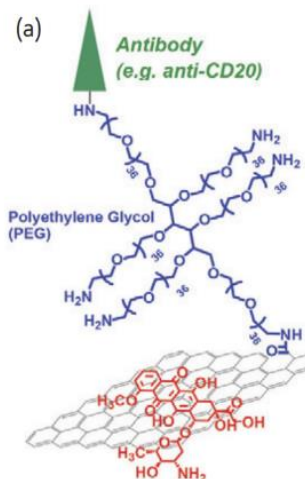
Kitosaanin merkittävin rooli GO-CS-CTP:ssä on sen kyky vuorovaikuttaa negatiivisesti varautuneen solukalvon kanssa elektrostaattisilla vuorovaikutuksilla mahdollistaen

lääkeaineen vapautumisen kohdesoluun.<sup>15</sup> Kitosaani on antikoagulantti<sup>13</sup>, joka estää veren hyytymistä. Jos GO-CS-materiaaliin kiinnittyy antikoagulantti lääke, kuten esimerkiksi ibuprofeeni, voi ominaisuus elimistössä vahvistua, ja aiheuttaa mahdollisesti suurempia ongelmia veren hyytymisen ongelmista kärsiville potilaille.

Reumunán-Lopétz *et al.*<sup>16</sup> tutkivat *in vivo* natriumdiklofenaakin lääkeaineen päällystämistä kitosaanilla. Päällystetyn kuljetinmateriaalin pintaan voidaan lisätä enteerisiä polymeerejä, jotka estävät suun kautta annosteltavan lääkkeen hajoamisen vatsalaukussa. Pinnan polymeerit mahdollistavat lääkeaineen kuljetuksen vatsalaukun ohi suoliston alueelle, jossa kitosaani pystyy kiinnittymään suoliston limakalvolle, ja josta lääkeaine vapautuu verenkiertoon. Kitosaanin toiminta perustuu mukoadheesioon kitosaanin ja limakalvojen välillä ja tiukkoihin tight-junction-liitoksiin.<sup>13</sup>

## 4.2 Polyetyyliglykoli (PEG) ja Porfyriini (FeN4)

Lääkeaineiden kohdennetussa kuljetuksessa lupaavia tuloksia on saatu myös käyttämällä polyeteleeniglykolia (PEG), joka kiinnittyy grafeenioksiidiin kovalenttisesti kitosaanin tavoin muodostaen amidisidoksen. PEG:n käyttö perustuu molekyylin terminaalisiin amiiniryhmiin, jotka pystyvät muodostamaan sidoksia ligandien kanssa kohdemolekyylin pinnalla.<sup>17</sup>

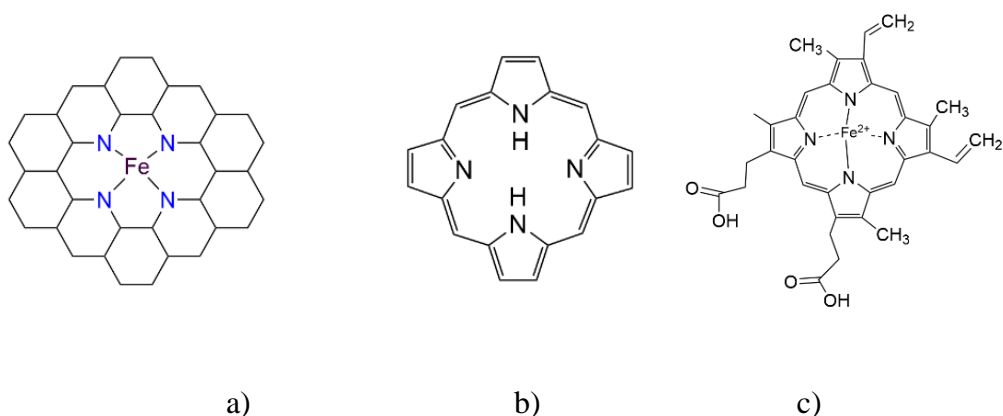


Kuva 5. PEG-funktionalisoitu grafeeni, johon on kiinnittynyt doksorubiini  $\pi - \pi$ -sidoksilla.

Reprinted from<sup>17</sup>. Copyright (2011) Elsevier Ltd.

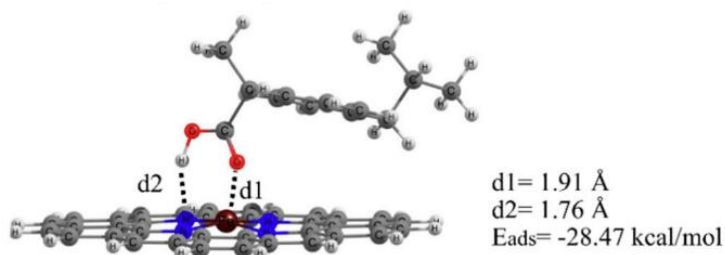


Grafeenimateriaaleihin voidaan myös lisätä lääkeaineen kuljetukseen sopivia nanomateriaaleja. Grafeeniin voidaan lisätä suuri rengasrakenteinen porfyriinin kaltainen rakenne, joka sisältää typpi-atomeita.<sup>4</sup> Porfyriini kaltainen rakenne kiinnittyy grafeenin pintaan ei-kovalenttisesti.<sup>3</sup> Lääkeaineiden kuljetuksessa voidaan hyödyntää Fe-porfyriinia (FeN4) (kuva 6), jossa porfyriiniin lisätty rauta-atomi koordinoituu ligandiin neljällä sidoksella. Rakenne on samankaltainen biologisen molekyylin, hemoglobiinin kanssa.<sup>4</sup>



Kuva 6. Porfyriinin kaltainen rakenne grafeenilevyssä (FeN4G) (a), yksinkertaisen porfyriinin rakenne (b) ja hemoglobiinin rakenne (c).

FeN4:n on havaittu aiheuttavan suuremman lääkeaineen absorptioenergian (-28,5 kcal/mol) kiinnittyessään grafeeniin (kuva 7) kuin muihin vastaavasti valmistettuihin grafeenimateriaaleihin (fullereeni, hiilinanoputki). Absorptioenergia kertoo absorboituneen ibuprofeenin määrän, johon vaikuttaa esimerkiksi materiaalin atomien ja lääkeaineen atomien lyhyempi etäisyys toisistaan.<sup>4</sup>



Kuva 7. Ibuprofeenin absorptio FeN4G-systeemissä. Rights managed by Taylor & Francis.<sup>4</sup>

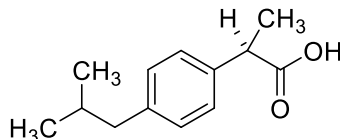
Yksi grafeenimateriaalien käytön eduista on materiaalien suuri pinta-ala. FeN4G:hen lisättävän porfyryriinin kaltaisen osan kiinnittymiseen tarvittava pinta-ala on selvästi kitosaania ja polyetyyliglykolia suurempi, sillä sekä kitosaani että PEG kasvattavat pinta-alaansa (pituutta) grafeenimateriaalista ulospäin. Toisaalta kitosaania ja PEG:a käytettäessä lääkeaineet absorboituvat suoraan grafeenimateriaalin pintaan, joten vähän tilaa vievällä ligandilla ei välttämättä saavuteta suurta kilpailuetua verrattuna FeN4G:hen. FeN4G-kuljettimet voisivat mahdollistaa lääkeaineen kuljetukseen, mutta todennäköisesti materiaaliin tarvitaan myös polymeerejä ohjaamaan kuljetettava molekyyli kohdesoluun.

FeN4G- ja PEG-funktionalisoidut materiaalit voisivat olla vähemmän toksinen lääkeaineen kuljetusmateriaalivaihtoehto, sillä niissä käytetään grafeenioksidin sijaan puhdasta grafeenia.

## 5 Ibuprofeeni

Ibuprofeeni (*R/S*)-2-[4 – (2 – metyylipropyyli)fenyyl]propanihappo (kuva 8) on yksi maailman eniten käytetyistä steroidittomista lääkeaineista kivun ja tulehduksen hoitoon.<sup>5</sup> Ibuprofeenia käytetään myös monien pitkäaikaissairauksien, kuten nivelreuman, hoitoon. Ibuprofeenista voidaan hyötyä tutkimusten mukaan myös Alzheimerin ja Parkinsonin tautien hoidossa.<sup>18</sup>

Ibuprofeeni on raseeminen seos, jossa metyyliiryhmän kolmiulotteinen suunta muuttuu kiraalisen hiilen ympärillä. Metyyliiryhmä on kiinnittynyt ibuprofeenissa 2-hiileen, ja se muodostaa enantiomeerit *R*(-) ja *S*(+).<sup>5</sup> Enantiomeerit eroavat toisistaan kahdella tavalla: ne polarisoivat valoa eri suuntaan ja reagoivat kemiallisesti eri tavalla kiraalisen hiilen kohdalla. Ibuprofeenissa on karboksyylihapporyhmä ja aromaattinen rengas. Karboksyylihapot ovat heikkoja happoja, mutta vesiliuoksessa O-H-ryhmä voi deprotonoitua, jolloin ryhmän varaus muuttuu negatiiviseksi.



Kuva 8. Ibuprofeenin rakenne.

Ibuprofeeni suun kautta nautittuna hajoaa ja imeytyy verenkiertoon plasmaproteiineihin vatsan seinämien kautta. Vaikka ibuprofeenissa on karboksyylihapporyhmä, se ei liukene hyvin veteen pitkän hiiliketjun takia ( $pK_A = 5,3$ ).<sup>18</sup>

Ibuprofeeni on ei-selektiivinen inhibiittori, joka estää syklo-oksigenaasin erittymistä (COX). Ibuprofeeni vaikuttaa sekä COX-1 että COX-2 entsyymien erittymiseen. COX-1 ja COX-2 ovat välittäjäaineita, jotka vaikuttavat prostanoidien eritykseen esimerkiksi vahingoittuneista soluista.<sup>18</sup> Erityisesti COX-2 entsyymien erityks lisääntyy tulehdusreaktion yhteydessä,<sup>6</sup> jolloin prostanoidien erityksen estäminen vaikuttaa kivun, tulehduksen ja kuumeen syntymiseen.<sup>18</sup>

Ibuprofeeni voi aiheuttaa muiden tulehduskipulääkkeiden tavoin vaurioita sekä ohut- että paksusuoleen. Suuremmat pitoisuudet käytössä lisäävät haittavaikutuksia. Yleisimpiä

haittavaikutuksia ovat ripuli ja raudanpuutosanemia, mutta myös vakavampia haittavaikutuksia, kuten munuaisten vajaatoimintaa, havaitaan erityisesti vanhemmalla väestöllä. Lääkeaineen käyttöä ei suositella ihmisille, jotka kärsivät astmasta keuhkoputkia supistavan vaikutuksen takia, eikä niille, jotka käyttävät verenhennuslääkkeitä. Ibuprofeeni vaikuttaa verihituleiden aggregaatioon pidentäen vuotoaika.<sup>6</sup>

## 6 Ibuprofeenin kuljetus grafeenimateriaaleilla

Ibuprofeenin kohdennetusta lääkehoidosta voitaisiin hyötyä erityisesti tapauksissa, jossa ibuprofeenia joudutaan annostelevaan suuria määriä.<sup>4</sup> Lääkeaineiden kuljetukseen sopivia nanomateriaaleja, kuten metallioksidgeja, polymeerisiä misellejä ja hiilinanoputkia, on tutkittu jo pidemmän aikaa. Grafeenin ja grafeenioksidin on tutkittu voivan kuljettaa lääkeainetta jopa 200 % kertainen määrä muihin lääkeainekuljettimiin nähden.<sup>3</sup>

### 6.1 Lääkeaineen sitoutuminen

Ibuprofeenissa on kaksi funktionaalista ryhmää, karboksyylihapporyhmä ja bentseenirengas. Ibuprofeeni voi kiinnittyä ei-kovalenttisesti grafeenioksidin pintaan muodostaen  $\pi - \pi$ -sidoksia. Myös vetysidokset grafeenioksidin ja ibuprofeenin välillä voivat sitoa lääkeaineen GO:n pintaan.

Kuten jo aikaisemmin grafeenioksidin funktionalisointikappaleessa esitettiin, grafeenioksidin karboksyylihapporyhmään voi kiinnittyä polymeerejä tai muita ligandeja, jotka vaikuttavat muun muassa nanomateriaalin solun läpäisevyyteen ja auttavat grafeenioksidia kiinnittymään kohdesolun solukalvon reseptoreihin<sup>2</sup>. Ibuprofeeni voidaan kiinnittää FeN<sub>4</sub>:ssa (kuva 7) grafeeniin liitettyyn porfyriinin kaltaiseen osaan. Ibuprofeenin ja kitosaanin välisestä sidoksesta ei löydy tutkimusaineistoa. Teoriassa olisi mahdollista, että ibuprofeenin karboksyylihappo kiinnittyisi kitosaanin hydroksyyliiryhmiin muodostaen esterin. Tällöin ibuprofeenin hallitussa irtoamisessa voitaisiin hyödyntää kitosaanin ominaisuuksien muuttumista ympäristön pH:n muuttuessa.

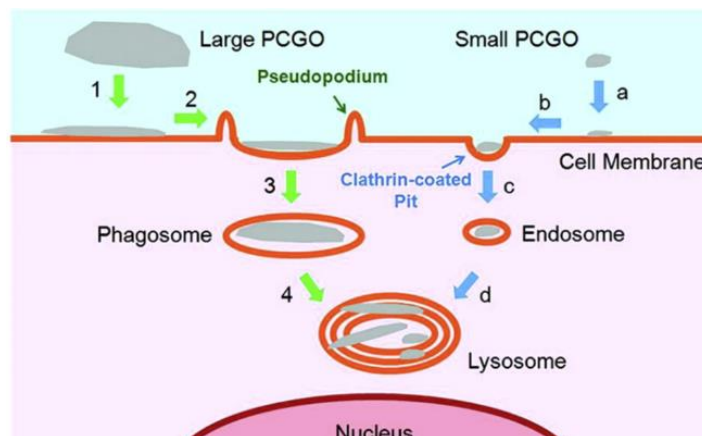
Grafeenioksidilla on suuri reagointipinta-ala, johon voidaan kiinnittää useita lääkeaineita tai reseptoreita samanaikaisesti. Zang *et al.*<sup>19</sup> ovat onnistuneesti kiinnittäneet sekä doksorubisiinin että kamptoteesin samanaikaisesti grafeenioksidilevylle.<sup>3</sup> Tulehduskipulääkkeinä käytettyjen ibuprofeenin ja parasetamolien kuljettaminen samanaikaisesti grafeenioksidilevyltä voisi mahdollistaa tulevaisuudessa esimerkiksi tulehdustilojen tehokkaamman hoidon.

GO:n sitoutumista ja sen irtoamista kohdesolun kaksikerroksisesta lipidikalvosta on tutkittu vain vähän. Liu *et al.*:in<sup>20</sup> tutkimuksissa grafeenioksidin on tutkittu fysiologisessa liuoksessa

olevan varaukseltaan negatiivinen. Solukalvolla on  $\text{Na}^+$ - ja  $\text{Ca}^{2+}$ -ioneita, joiden on todettu voivan sitoutua GO:n pintaan neutraloiden materiaalin varauksen. Solukalvon pääryhmät ovat myös vahvasti hydratoituneita, jolloin hydratoitumiselle alttiit grafeenioksidin funktionaaliset ryhmät voisivat muodostaa repulsiivisia entropisia voimia, ja siten sitoutua solukalvon pinnalle.<sup>20</sup>

## 6.2 Grafeenimateriaalien siirtyminen soluun

Grafeenimateriaali siirtyä solun sisään kahdella eri tavalla riippuen materiaalin koosta (kuva 9). Mu *et al.*<sup>21</sup> tutkivat *in vitro* proteiinilla päällystettyä grafeenioksidia (500 nm) (PCGO). PCGO siirtyi soluun klaritiinivälitteisen endosytoosin avulla. Suuremmat grafeenioksidi levyt ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) puolestaan siirtyvät solun sisään fagosytoosin avulla. Molemmat PCGO:t päätyivät tutkimuksissa lysosomiin, jossa sisältö pilkotaan entsyymien avulla.



Kuva. 9 Suuremmat proteiinilla päällystetyt GO:t siirtyvät soluun fagosytoosin avulla (1-4), kun taas pienemmät GO:t pääsevät soluun endosytoosin avulla (a-d). Reprinted from with permission from<sup>12</sup>. Copyright (2012) American Chemical Society.

## 6.2 Lääkeaineen hallittu irtoaminen

Passiivisessa lääkeaineiden vapautumisessa lääkkeen vapautumista elimistössä ei voida annostella tai ajoittaa ajallisesti. Nanomateriaalit voisivat tulevaisuudessa mahdollistaa kontrolloidun lääkeaineen vapautumisen. Lääkeaineiden hallittu irrottautuminen lääkeaineen kuljetinmateriaalista voi tapahtua kehon sisäisten mekanismien avulla, kuten esimerkiksi pH:n muutoksen stimuloimana, tai se voidaan saada aikaan kehon ulkopuolelta esimerkiksi magneettikentän avulla.<sup>3</sup>

Ibuprofeenin ja grafeenioksidin väliset vetysidokset deprotonoituvat happamissa olosuhteissa, mikä irrottaa ibuprofeenin kuljetinmateriaalista.<sup>2</sup> Jos kuljetin vuorattaisiin esimerkiksi kitosaanilla, ibuprofeenin irtoaminen ei tapahtuisi vielä vatsalaukussa, vaan lääkeaine vapautuisi verenkiertoon vasta ohutsuolesta, sillä kitosaani suojaa lääkeainetta deprotonoitumiselta. Grafeenioksidiin voitaisiin lisätä myös esimerkiksi PEG, jonka avulla lääkeaine voisi kiinnittyä kohdesolun pinnalle ja vapautua solun happamissa olosuhteissa soluun.

Lääkeaine voidaan kiinnittää grafeenioksidiin pH:n muutoksiin reagoivien polymeerien avulla. Lääkeaine voidaan siten vapauttaa ympäristön pH:ta muuttamalla.<sup>3</sup> Jos ibuprofeeni pystyttäisiin kiinnittämään suoraa esimerkiksi kitosaaniin, hallitussa irtoamisessa voitaisiin hyödyntää kitosaanin ominaisuuksien muuttumista ympäristön pH:n muuttuessa.

Lääkeaine voidaan irrottaa nanomateriaalista myös stimuloimalla ulkoisesti. Esimerkiksi grafeenin funktionalisoinnin  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ :lla on tutkittu mahdollistavan lääkeaineen vapautumisen ulkoisen magneettikentän muuttuessa.<sup>3</sup> Magneettikentän muuttamista voitaisiin mahdollisesti hyödyntää myös  $\text{Fe}_4\text{NG}$ :ssä ibuprofeenin vapauttamiseksi.

## 7 Yhteenveto

Grafeenimateriaalit ovat potentiaalisia lääkeaineen kuljettimina, sillä niillä on useita ainutlaatuisia ominaisuuksia, kuten suuri reaktiopinta-ala, joka voisi mahdollistaa suurempien lääkeainemäärien samanaikaisen kuljetuksen. Grafeenimateriaalit ovat myös suhteellisen helposti muokattavissa, ja ne muodostavat helposti sidoksia aromaattisten ja veteen liukenemattomien lääkeaineiden kanssa, kuten esimerkiksi ibuprofeenin kanssa.

Grafeenimateriaalien käytön etuna on myös se, että materiaalia on saatavilla luonnosta, se on ympäristöystävällistä ja suhteellisen edullista, sillä halvimmillaan sitä tuotetaan n. 1000 eurolla tonnia kohden. Sen käyttöä teollisuudessa rajoittaa kuitenkin materiaalien valmistusmenetelmien tehottomuus.<sup>8</sup> Grafeenimateriaalien käyttäminen lääkeaineen kohdennetussa kuljetuksessa vaatii uusia valmistusmenetelmiä, jotka ratkaisevat myös grafeenimateriaalien valmistusvaiheessa syntyvien epäpuhtauksien ja materiaalin terävien reunojen aiheuttamat ongelmat.

Grafeenimateriaalien toksisuutta aiheuttavia tekijöitä on jo tutkittu *in vivo* ja *in vitro*, mutta prekliinistä tutkimusta niistä ei vielä ole. Muun muassa grafeenimateriaalien optimaalinen koko, konsentraatio, materiaaliin lisättävät ligandit ja mahdolliset haitalliset vuorovaikutukset elimistössä vaativat vielä lisätutkimuksia. Tutkimustietoa ei löydy vielä materiaalien mahdollisista pitkäaikaisvaikutuksista.

Lääkeaineen vapautuminen vasta ohutsuolessa voisi helpottaa ruuansulatuskanavaa rasittavien lääkeaineiden käyttöä. Ibuprofeeni on tulehduskipulääke, jonka yksi haittavaikutuksista on vatsavaivat, joista kärsii 10–45 % lääkeaineen käyttäjistä. Tulehduskipulääkkeiden käyttö kasvaa vanhenevan väestön keskuudessa ja suurin osa tulehduskipulääkkeiden vakavammista haittavaikutuksista kohdistuu vanhuksiin.<sup>6</sup> Kamptotesiinin tavoin ibuprofeeni voitaisiin kiinnittää grafeenioksidiin ja päällystää kitosaanilla ja enterisillä polymeereillä, jolloin lääkeaine imeytyisi vasta ohutsuolessa ja mahan limakalvot olisivat suojassa. Tästä voisi olla erityisesti apua lääkeaineen pitkäaikaiskäyttäjille.

Grafeenimateriaalien käyttöä lääkeaineiden kuljetuksessa on tutkittu erityisen paljon syöpähoitojen kehittämiseksi. Tulevaisuudessa grafeenimateriaalien avulla voisi olla mahdollista parantaa lääkkeiden tehokkuutta, säädellä lääkeaineen irtoamista ja suojata terveitä



kudoksia. Kohdennettu lääkeaineen kuljettaminen voisi myös mahdollistaa pienempien lääkeainemäärien käytön.

## Kirjallisuusluettelo

1. Gogotsi, Y., Controlling graphene properties through chemistry, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2011**, 2(19), 2509-2510.
2. Muthoosamy, K.; Geetha Bai, R. ja Manickam, S., Graphene and Graphene Oxide as a Docking Station for Modern Drug Delivery System, *Current drug delivery*, **2014**, 1-14.
3. Liu, J.; Cui, L. ja Losic, D., Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications, *Acc. Chem. Res.*, **2013**, 9(12), 9243-9257.
4. Gao, J.; Guo, C.; Wang, X.; Zhang, W.; Wang, Y. ja Vahabi, V., Porphyrin-like porous nanomaterials as drug delivery systems for ibuprofen drug, *Mol. Phys.*, **2020**, 118(12), 1-7.
5. Rainsford, K. D., *Ibuprofen: Pharmacology, Therapeutics and Side Effects*, 1. painos, Springer-Verlag, 2013.
6. Suomen Gastroenterologiyhdistys ja Suomen Reumatologinen Yhdistys, Tulehduskipulääkkeiden turvallinen käyttö, <https://www.duodecimlehti.fi/duo91740>. Viitattu 13.3.2021.
7. Wassei, J. K. ja Kaner, R. B., Oh, the places you'll go with graphene, *Acc. Chem. Res.*, **2013**, 46(10), 2244-2253.
8. Phiri, J.; Gane, P. ja Maloney, T. C., General overview of graphene: Production, properties and application in polymer composites, *Materials science & engineering. B, Solid-state materials for advanced technology*, **2017**, 215, 9-28.
9. Wang, X. ja Shi, G., An introduction to the chemistry of graphene, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *PCCP*, **2015**, 17(43), 28484-2854.
10. Hummers, W. S. ja Offeman, R. E., Preparation of Graphitic Oxide Preparation of Graphitic Oxide, **1958**, 1339.
11. Sanchez, V. C.; Jachak, A.; Hurt, R. H. ja Kane, A. B., Biological interactions of graphene-family nanomaterials: An interdisciplinary review, *Chem. Res. Toxic.*, **2012**, 25(1), 15-34.
12. Seabra, A. B.; Paula, A. J.; de Lima, R.; Alves, O. L. ja Durán, N., Nanotoxicity of graphene and graphene oxide, *Chem. Res. Toxic.*, **2014**, 27(2), 159-168.
13. Dodane, V., Vilivalam, V.D., Pharmaceutical applications of chitosan, *PSTT*, **1998**, 1(6), 246-251.
14. Prabakaran, M. ja Mano, J. F., Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems, *Drug delivery*, **2004**, 12(1), 41-57.

15. Bao, H.; Pan, Y.; Ping, Y.; Sahoo, N. G.; Wu, T.; Li, L.; Li, J. ja Gan, L. H., Chitosan-Functionalized graphene oxide as a nanocarrier for drug and gene delivery, *Small*, **2011**, 7(11), 1569-1578.
16. Barroso-Bujans, F.; Argüelles-Monal, W. M. ja Peniche, C., Advances in chitin science, *Jacques Andre publisher*, **1998**, 600-607.
17. Liu, Z.; Robinson, J. T.; Tabakman, S. M.; Yang, K. ja Dai, H., Carbon materials for drug delivery & cancer therapy, *Materials today*, **2011**, 316-322.
18. Bushra, R. ja Aslam, N., An overview of clinical pharmacology of ibuprofen, *Oman Med. J.*, **2010**, 25(3), 155-161.
19. Zhang, L.; Xia, J.; Zhao, Q.; Liu, L. ja Zhang, Z., Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs, *Small*, **2010**, 6(4), 537-544.
20. Liu, X. ja Chen, K. L., Interactions of graphene oxide with model cell membranes: Probing nanoparticle attachment and lipid bilayer disruption, *Langmuir*, **2015**, 31(44), 12076-12086.
21. Mu, Q.; Su, G.; Li, L.; Gilbertson, B. O.; Yu, L. H.; Zhang, Q.; Sun, Y. ja Yan, B., Size-Dependent Cell Uptake of Protein-Coated Graphene Oxide Nanosheets, *ASC App. Mater. Interfaces*, **2012**, 2259-2266.