

Grafeenin biologiset sovellukset

Kandidaatintutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

13.12.2018

Ia-Beate Liljedahl

Tiivistelmä

Tämä kandidaatintutkielma käsittelee grafeenin biologisia sovelluksia, jotka tutkielmassa eritellään sovelluksiin bioteknologiassa, biologisessa terapiassa, soluviljelyssä ja antibakteerisissa materiaaleissa. Tutkielmassa perehdytään lisäksi eri grafeenimateriaaleihin, grafeeniin liittyviin haasteisiin ja grafeenin tulevaisuuden näkymiin.

Tutkimusprojektissa perehdyttiin fenyylialaniinijohdannaisten hydrogeeleihin. Projektin aikana syntetisoitiin kanelifenyylialaniinia ja valmistettiin hydrogeeliä Fmoc-fenyylialaniinia käyttäen. Kanelifenyylialaniinista mitattiin NRM-spektri ja Fmoc-fenyylialaniinista valmistettua hydrogeeliä kuvattiin optisella mikroskoopilla.

Esipuhe

Kandidaatintutkielman kirjallisen osan työstäminen aloitettiin syyskuussa 2018 ja saatiin valmiiksi joulukuussa 2018. Tutkielman kirjallisuuslähteiden etsinnässä käytettiin pääasiassa SciFinder- ja Web of Science -tietokantoja. Tutkimusprojekti tehtiin lokakuun 2018 ja marraskuun 2018 aikana Jyväskylän yliopiston Nanotiedekeskuksessa. Tutkielman ohjaajana toimi professori Maija Nissinen ja tutkimusprojektin ohjaajana tohtoritutkija Efstratios Sitsanidis.

Haluan kiittää ohjaajiani Maija Nissistä ja Efstratios Sitsanidista hyvästä ohjauksesta.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ	i
ESIPUHE	ii
SISÄLLYSLUETTELO	iii
KÄYTETYT LYHENTEET	iv
1 JOHDANTO	1
2 GRAFEENIMATERIAALIT JA NIIDEN OMINAISUUDET	1
2.1 GRAFEENI	1
2.2 GRAFEENIOKSIDI	3
2.3 PELKISTETTY GRAFEENIOKSIDI	3
3 GRAFEENIN HYÖDYNTÄMINEN BIOTEKNOLOGIASSA	4
3.1 BIOSENSORIT	4
3.1.1 SÄHKÖKEMIAALLISET BIOSENSORIT	4
3.1.2 OPTISET BIOSENSORIT	6
3.1.3 ZIKA-VIRUKSEN HAVAITSEMINEN	6
3.2 BIOLOGINEN KUVANTAMINEN	7
3.3 KUDOSTEKNOLOGIA	8
4 GRAFEENI BIOLOGISESSA TERAPIASSA	9
4.1 TERAPEUTTISET ALUSTAT	9
4.2 VALOHOITO	10
5 SOLUVILJELY JA ANTIBAKTEERISET MATERIAALIT	12
6 HAASTEET JA TULEVAISUUS	13
7 KIRJALLISUUSLUETTELO	14

Käytetyt lyhenteet

AFP	A-fetoproteiini
Chip-on-board	Pintaliitoskomponenttien valmistustekniikka
CNT	Hiilinanoputki
CRGO	Kemiallisesti pelkistetty grafeenioksidi
CT	Tietokonetomografia
CVD	Kemiallinen kaasufaasipinnoitus
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
dsDNA	Kaksijuosteinen DNA
ERGO	Sähkökemiallisesti pelkistetty grafeenioksidi
FEB	Kenttävaikutusbiotunnistus
GBN	Grafeeniin perustuva nanomateriaali
GFN	Grafeeniin perustuva nanomateriaali
GNP	Grafeeninanopartikkeli
GNR	Grafeeninanonauha
GO	Grafeenioksidi
GQD	Grafeenikvanttipiste
MRI	Magneettikuvantaminen
NGO	Nanografeenioksidi
PAI	Fotoakustinen kuvantaminen
PDMS	Polydimetyylisiloksaani
PDT	Fotodynaaminen terapia
PEI	Polyeetteri-imidi
PEG	Polyetyleeniglykoli
PET	Polyetyleenitereftalaatti
PET	Positroniemissiotomografia
PTT	Fototerminen terapia

PVP	Polyvinyyli pyrrolidoni
r-GO	Pelkistetty grafeenioksidi
ROS	Reaktiiviset happea sisältävät yhdisteet
SNP	Yksittäisen nukleotidin polymorfismi
ssDNA	Yksijuosteinen DNA
TPMI	Kaksifotoninen fluoresenssi
TRGO	Termisesti pelkistetty grafeenioksidi

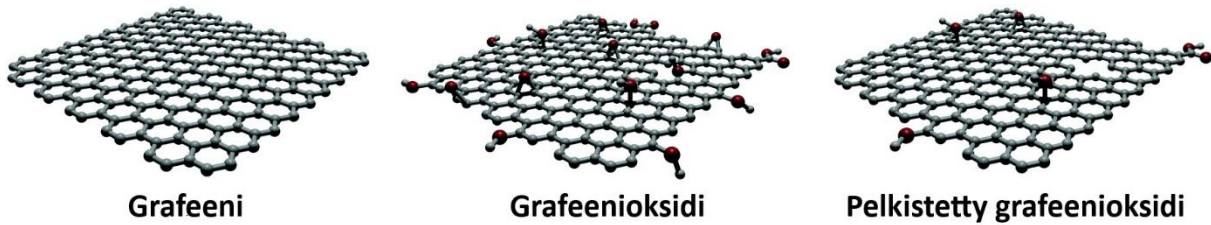
1 Johdanto

Grafeeni on hiilen yksi allotrooppinen muoto, joka koostuu yhden atomikerroksen paksuisesta sp^2 -hybridisoituineista hiiliatomeista. Grafeenin IUPAC:n mukainen määritelmä tuli voimaan vuonna 1997. Vuonna 1999 valmistettiin levy, joka koostui useista grafeenikerroksista ja 2004, valmistettiin yksittäisiä grafeenikerroksia Scotch-teippi -menetelmällä.¹ Grafeenin ominaisuudet, kuten suuri pinta-ala, bioyhteensopivuus sekä korkea funktionaalisuusaste mahdollistavat sen käytön esimerkiksi biologisessa kuvantamisessa sekä terapeuttisena alustana esimerkiksi lääkekuljetuksessa.² Biologisiin käyttökohteisiin kuuluvat myös grafeenin hyödyntäminen fototermisessä hoidossa ja biologiseen tunnistukseen tarvittavissa biosensoreissa grafeenin sähköisten ja optisten ominaisuuksien ansiosta.² Grafeenioksidi on yhden atomikerroksen paksuinen grafeenin johdannainen, jota voidaan valmistaa grafiittioksidista ja syntetisoida Hummersin menetelmällä.³ Se on bioyhteensopiva ja hydrofiilinen materiaali, jonka happiryhmät mahdollistavat sen edelleen funktionalisoinnin ja hyödyntämisen esimerkiksi terapeuttisena alustana lääkkeiden kuljetuksessa.⁴

2 Grafeenimateriaalit ja niiden ominaisuudet

2.1 Grafeeni

Grafeenin fysikaalisiin ja kemiallisiin ominaisuuksiin lukeutuvat suuri pinta-ala, hyvä sähkön- ja lämmönjohtokyky sekä suuri funktionaalisuusaste.² Grafeeni on puolijohde ja sen kyky johtaa elektroneja on suuri.⁴ Grafeeni on mekaanisesti vahva materiaali johtuen sen sisältämisestä hiili-hiili-kaksoissidoksista. Monien hiilyhdisteiden, kuten grafiitin, hiilinanoputkien sekä fullereenin rakennusaine on grafeeni. Grafeeniin pystytään liittämään molekyyliä π -sidoksilla, ja lisäksi se on hydrofobinen materiaali. Näiden ominaisuuksien johdosta esimerkiksi lääkemolekyylien liittäminen grafeeniin on mahdollista.³ Grafeenia on syntetisoitu grafiitista käyttäen Scotchin pilkkomista, jossa grafiittia hajotetaan mekaanisesti.¹ Muita käytettyjä grafeenin synteesimenetelmiä ovat esimerkiksi nestefaasimenetelmä, grafiittioksidia ja fluoridia sisältävä pilkkomismenetelmä, interkalaatio sekä kemiallinen kaasufaasipinnoitus eli CVD.¹ Grafeenista voidaan valmistaa erilaisia grafeeninanomateriaaleja (Kuva 1), ja niihin liitettyjen yhdisteiden avulla voidaan muokata grafeenimateriaalien vesiliukoisuutta, bioyhteensopivuutta sekä selektiivisyyttä. Liitetyt yhdisteet voivat olla polymeerejä tai makromolekyyliä, kuten DNA, proteiinit, entsyymit, polyvinyylipyrrolidoni (PVP) ja polyetyleeniglykoli (PEG).¹



Kuva 1. Grafeenin ja sen johdannaisten, grafeenioksidin ja pelkistetyn grafeenioksidin, rakenteet.⁵ [Chem. Soc. Rev., 2017, 46, 4400-4416] – Published by The Royal Society of Chemistry.

Jotta grafeeniin perustuvia nanomateriaaleja voidaan käyttää biologisessa systeemissä, täytyy grafeeni muokata vesiliukoiseksi, sillä grafeenin luontainen kyky liueta veteen on alhainen.³ Grafeenin vesiliukoisuuden parantamisessa käytetyt yhdisteet saattavat aiheuttaa toksisuutta. Usein käytettyjä liukoisuutta parantavia yhdisteitä biolääketieteessä ovat polyetyleeniglykoli (PEG) sekä sen polymeerijohdannainen Pluronic F108. Yhdisteiden käytön vaikutuksesta grafeenin liukoisuus paranee, mutta grafeenipinnan kemiallinen muoto muuttuu merkittävästi. Pluronic 108 vuorovaikuttaa grafeenin hydrofobisten alueiden kanssa, kun taas PEG-yhdiste pystyy liukenemaan hydrofiiliseen vesiliuokseen. Pluronic 108:n ja grafeenin muodostama yhdiste aiheuttaa hiirillä solun apoptoottista kuolemaa ajan kuluessa. On todettu, että apoptoosin aiheuttaa nimenomaan grafeeni, eikä Pluronic 108.⁶ Kyseisissä tutkimuksissa käytettiin pelkästään grafeenia, jonka huomattiin lisäävän mitokondriossa sijaitsevan ROS-yhdisteen kasvua, mikä johti solun metabolisen toiminnan vähentymiseen ja usein myös solun apoptoottiseen kuolemaan.³ Lisäksi joissain tapauksissa seurauksena oli solun tukirangan toimintahäiriö. Elävissä organismeissa tehdyt tutkimukset ovat myös osoittaneet muokkaamattoman grafeenin myrkyllisyyden solussa.³

Grafeenin nanopartikkelien soluun pääsyn jälkeen ne voivat vuorovaikuttaa DNA:n kanssa.³ Partikkelien fysikaalisista tai kemiallisista ominaisuuksista johtuen ne voivat olla genotoksisia ja seurauksena voi olla solun kuolema. Tärkeitä fysikaalisia ominaisuuksia ovat esimerkiksi partikkelin muoto, atomikerrosten lukumäärä, hydrofobisuus ja lateraalinen koko. Kemiallisia ominaisuuksia puolestaan funktionaaliset ryhmät ja partikkelien kanssa vuorovaikuttavat molekyylit. Ominaisuuksien suhteellinen tärkeys vaihtelee riippuen grafeenimateriaalista sekä solu- tai kudostyypistä. Erityisesti elävissä organismeissa grafeenin toksisuudella on suuri merkitys, johtuen erilaisten solumuotojen suuresta määrästä ja systeemin monimutkaisuudesta.³

2.2 Grafeenioksidi

Yksi grafeenista valmistettu johdannainen on grafeenioksidi GO (Kuva 1). Grafeenioksidia voidaan valmistaa grafiittioksidia pilkkomalla, jonka jälkeen grafeenioksidin syntetisointiin käytetään muokattua Hummersin menetelmää.⁷ Menetelmässä käytetään grafiittioksidin lisäksi hapettavaa yhdistettä, kuten kaliumpermanganaattia, rikkihappoa tai natriumnitraattia, minkä vaikutuksesta grafiittioksidikerrokset hajoavat. Grafeenioksidilevyn rakennetta kuvataan Lerf-Klinowskin mallilla.³ Sen mukaan grafeenioksidilevyssä atomit ovat sp^2 -hybridisoituineita, mutta satunnaisesti myös sp^3 -hybridisoituneita. Grafeenioksidilevyssä voi olla epoksidi- tai alkoholiryhmiä sekä levyn reunoissa karboksyylihaporyhmiä. Pinnalla olevat happea sisältävät ryhmät saavat aikaan grafeenioksidin vesiliukoisuuden, eli grafeenioksidi on hydrofiilinen materiaali. Grafeenioksidilevyyn on mahdollista liittää lukematon määrä erilaisia funktionaalisia ryhmiä, jotka voidaan liittää hydrofobisesti, kovalenttisesti, elektrostaattisesti tai π -sidoksia käyttäen. Esimerkkejä liitetystä yhdisteistä ovat doksorubisiini, polyetyleni, polyetyleeniglykolidiamiini sekä disulfidia sisältävä vasta-aine.³ Grafeenioksidin funktionalisointi on tärkeää grafeenimateriaalien hyödyntämisen kannalta, ja liitetyt ryhmät parantavat materiaalien vesiliukoisuutta, selektiivisyyttä sekä bioyhteensopivuutta.¹ Grafeenioksidia käytetäänkin biologisissa systeemeissä sen hyvän vesiliukoisuuden ja bioyhteensopivuuden johdosta.⁸

Grafeenioksidilevyssä olevat hapettuneet funktionaaliset ryhmät ovat kuitenkin mahdollisia solumyrkyllisyyden aiheuttajia.⁹ Grafeenioksidin aiheuttaman solumyrkyllisyyden on huomattu riippuvan solulinjasta. Eri tutkimuksista saadut tulokset ovat osoittaneet, että myrkyllisyyden määrä kuitenkin vaihtelee.³ Grafeenioksidin myrkyllisyyden on raportoitu olevan vähäistä ja riippuvainen annoksen määrästä. Ihmisen fibroblastisoluja viljeltäessä, solumyrkyllisyyttä on huomattu aiheutuvan grafeenioksidin pitoisuuden ollessa yli $50 \mu\text{g/ml}$.⁹ Ihmisen A549 epiteelisoluissa grafeenioksidin myrkyllisyyden on havaittu riippuvan annoksesta.⁹

2.3 Pelkistetty grafeenioksidi

Pelkistettyä grafeenioksidia, r-GO (Kuva 1), voidaan valmistaa grafiittioksidista tai grafeenioksidista. Grafeenioksidista pelkistetty grafeenioksidi r-GO voi olla termisesti (TRGO), kemiallisesti (CRGO) tai sähkökemiallisesti (ERGO) pelkistettyä grafeenioksidia.¹⁰ Pelkistetyn grafeenioksidin sanotaan olevan grafeenin ja grafeenioksidin välimuoto. Se on yksikerroksinen rakenne, jossa on sekä grafeenin että grafeenioksidin ominaisuuksia.⁵ Verrattuna grafeenioksidin sisältämiin funktionaalsiin ryhmiin, pelkistetyssä muodossa

funktionaalisia ryhmiä on vähemmän, sillä suurin osa niistä poistuu pelkistettyä grafeenioksidia valmistettaessa. Pelkistetty grafeenioksidi on hydrofobinen materiaali, ja se voi aiheuttaa solussa toksisuutta. Toksisuuteen solussa vaikuttavat esimerkiksi r-GO-levyjen välimatkat. r-GO:n on todettu olevan toksisempi silloin, kun materiaalina on nauhamainen tai hiutalemainen r-GO.⁵ Eri valmistusmenetelmillä valmistettujen r-GO-levyjen pinnan kemialliset ominaisuudet voivat erota toisistaan, ja onkin huomattu, että r-GO-partikkelit, jotka ovat ohuita ja teräviä, aiheuttavat eniten toksisuutta.⁵

3 Grafeenin hyödyntäminen bioteknologiassa

3.1 Biosensorit

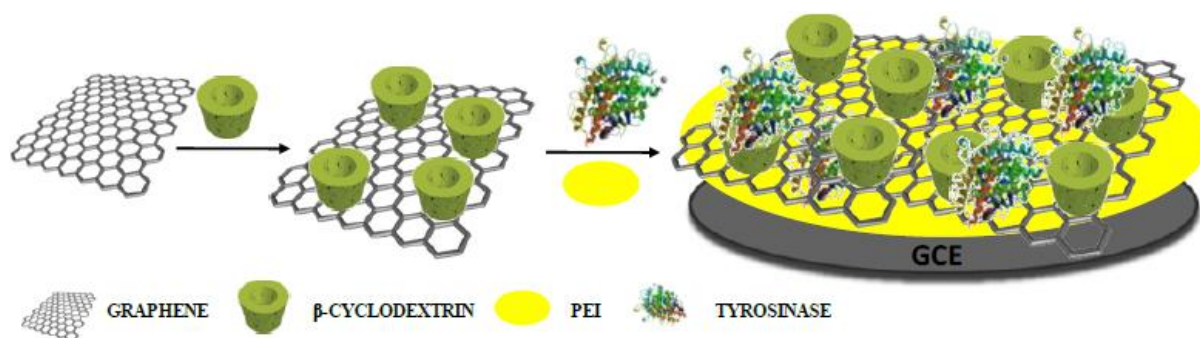
Biosensoreiden avulla pystytään havaitsemaan lukuisia biologisesti aktiivisia yhdisteitä, jotka kertovat esimerkiksi elimistön terveydellisestä tilasta tai ympäristön turvallisuudesta.¹⁰ Biosensorit voivat havaita eri yhdisteitä sensitiivisesti tai selektiivisesti niiden spektrokemiallisten, sähkökemiallisten ja magnetokemiallisten ominaisuuksien avulla. Grafeenimateriaalien käyttö biosensoreissa on mahdollista puolijohteisen grafeenin erityisten ominaisuuksien, kuten sähkökemiallisten ominaisuuksien ja läpinäkyvyyden ansiosta. Grafeenia voidaan hyödyntää esimerkiksi sähkökemiallisissa ja optisissa biosensoreissa.¹⁰ Biosensoreissa voidaan käyttää sekä muokkaamatonta grafeenia, grafeenioksidia, että pelkistettyä grafeenioksidia.⁴ Grafeenipohjaiset biosensorit koostuvat kahdesta eri osasta, jotka ovat biomolekyylistä koostuva reseptori ja grafeeniin pohjautuvasta materiaalista koostuva muunnin.¹⁰ Reseptori vuorovaikuttaa yhden analyytin tai analyyteistä koostuvan ryhmän kanssa. Tunnistettava biomolekyyli liittyy reseptoriin, ja muunnin muuttaa yhdisteestä saadun signaalin määritettävissä olevaksi signaaliksi.¹⁰

3.1.1 Sähkökemialliset biosensorit

Biomolekyylien havaitsemiseen käytetään sähkökemiallisia biosensoreita muun muassa niiden herkkyuden vuoksi.² Grafeenin erityisten ominaisuuksien, kuten sähkökemiallisuuden ja läpinäkyvyyden takia sitä voidaan käyttää sensoreissa elektrodimateriaalina. Kemiallinen biosensori muuttaa kemiallisesta yhdisteestä peräisin olevan signaalin analyttiseksi signaaliksi. Sähkökemiallisen biosensorin avulla pystytään tunnistamaan esimerkiksi vetyperoksidi H_2O_2 sekä pieniä biomolekyyliä. Vetyperoksidin havaitsemista voi vait kuitenkin vaikeuttaa muut elektroaktiiviset yhdisteet. Grafeenipohjaisilla biosensoreilla voidaan vähentää elektroaktiivisten yhdisteiden hapettumisesta ja pelkistymisestä johtuvaa ylienergiaa. On

myös huomattu, että tyyppeä sisältävää grafeenin eli N-grafeenin avulla ylipotentiaali pienenee enemmän kuin käytettäessä tyyppeä sisältämätöntä grafeenielektroodia.¹¹ N-grafeenin kyky vähentää ylipotentiaalia johtuu rakenteen sisältämistä typpiryhmistä, happiryhmistä ja rakenteellisista vajaavuuksista.¹¹ Grafeenielektrodin elektroninsiirtonopeus on suurempi kuin grafiitista koostuvan tai paljaan elektrodin.

Dopamiini on hormoni, jonka konsentraation muutokset kertovat elimistön terveydellisestä tilasta.² Se on sähkökemiallisesti aktiivinen yhdiste, joten se voidaan havaita sähkökemiallisella grafeenibiosensorilla. Dopamiinin havaitsemista voi kuitenkin häiritä samankaltaisen hapettumispotentiaalin omaava askorbiinihappo, mutta grafeenilla muokatun elektrodin avulla dopamiini pystytään määrittämään selektiivisesti.¹² Tutkimuksessa dopamiinin havaitsemiseen käytettiin tyrosiinientsyymillä käsiteltyä grafeeni- β -syklodekstriini biosensoria (Kuva 2).¹³ Dopamiinin havaitseminen osoittautui olevan hyvin herkkää ja selektiivistä, ja valmistetun biosensorin osoitettiin soveltuvan dopamiinin havaitsemiseen lääketuotteissa, ihmisseerumissa sekä virtsassa.



Kuva 2. Dopamiinin havaitsemisessa käytetty grafeeni- β -syklodekstriini biosensori.¹³

Grafeenista rakentuvan sähkökemiallisen immunosensorin avulla pystytään havaitsemaan proteiineja ja DNA:ta.² Immunosensorin rakenteessa on primäärinen vasta-aine (Ab_1), joka liittyy havaittavaan proteiiniin sekä useita primääriseen vasta-aineeseen liittyviä sekundaarisia vasta-aineita (Ab_2). Grafeenioksidista koostuvaan sähkökemialliseen immunosensoriin pystytään liittämään Ab_2 -vasta-ainetta runsaasti sen suuren pinnan alan sekä rakenteessa olevien happiryhmien ansiosta. Grafeeniin perustuvaa sähkökemiallista immunosensoria on käytetty myös syövän biologisen indikaattorin, α -fetoproteiinin (AFP), sensitiiviseen tunnistamiseen.¹⁴ Tutkimuksessa funktionalisoituja grafeenilevyjä käytettiin sensorialustana laajentamaan elektrodin pintaa sekä sitouttamaan suuri määrä Ab_1 -vasta-ainetta.

3.1.2 Optiset biosensorit

Optisten biosensoreiden toiminta perustuu grafeenioksidin kykyyn fluoresoida infrapunavalon aallonpituudesta ultraviolettivalon aallonpituuteen.² Grafeenioksidi pystyy myös sammuttamaan muiden fluoresoivien väriaineiden fluoresenssit. Esimerkki optisesta biosensorista on fluoresenssiresonanssienergiansiirtobiosensori eli FRET-sensori. FRET-sensorissa molekyylin virittyminen siirtyy ei-radiatiivisesti grafeenioksidein.

Grafeenista rakentuvia FRET-sensoreita on kehitetty yksijuosteisen DNA:n (ssDNA) tutkimiseen.² ssDNA voidaan adsorboida grafeenioksidin pinnalle grafeenioksidin aromaattisten ryhmien sekä nukleiinihapon emästen välisten hydrofobisten ja π - π vuorovaikutusten avulla. Tämän jälkeen grafeenioksidin pinnalle voidaan lisätä komplementaarinen sekvenssi, jolloin muodostuu kaksijuosteinen DNA (dsDNA). dsDNA pystytään poistamaan GO:n pinnalta sen ja grafeenin välisen heikon vuorovaikutuksen takia. Grafeenioksidin pinnalle sitoutunut DNA pystytään määrittämään sekä ilmaisemaan määrällisesti GO:n optisten ominaisuuksien ja nukleiinihappoihin kohdistuvien vuorovaikutusten ansiosta.²

Grafeenia on käytetty trombiinia havaitsevassa optisessa biosensorissa.¹⁰ Trombiinin tunnistaminen perustuu fluoresenssiväriaineella merkityn aptameerin tunnistukseen, ja grafeenia käytetään siinä aptameerin substraattina. Grafeeni sammuttaa fluoresenssisignaalin, joka aiheutuu fluoresenssiresonanssienergian siirtymisestä väriaineesta grafeeniin. Kun trombiinia lisätään, muodostuu neliosainen trombiinikompleksi, jonka affiniteetti grafeenille on heikko. Kompleksin muodostumisen vaikutuksesta aiheutunut konformaation muuttuminen saa aikaan konfiguraation, jossa väriaine ei ole enää vuorovaikutuksessa grafeenilevyn kanssa, ja tällöin grafeeni ei enää sammuta fluoresenssiä.¹⁰

3.1.3 Zika-viruksen havaitseminen

Afsahi *et al.*¹⁵ ovat kehittäneet grafeeniin perustuvan biosensorin, jolla voidaan havaita Zika-virustartunta. Biosensorisiruina käytetyt grafeenisirut muokattiin kemiallisella kaasufaasipinnoituksella (CVD), ja yksikerroksiset grafeenikalvot kasvatettiin niin ikään CVD-tekniikan avulla. Tutkimuksessa grafeenibiosensorisiruja luettiin käyttäen Agile R100-systeemiä, jossa oli kaksi uloslukukanavaa; I-kanava, joka näytti kanavan läpi kulkevan virran sekä C-kanava, joka näytti biosensorista nesteeseen kulkevan kapasitanssin. Tutkimuksessa käytettiin jälkimmäistä. Sensorisirut funktionalisoitiin käyttäen hiiren Anti-Zika NS1-

proteiinia. ZIKV NS1 rekombinantiantigeeni laimennettiin haluttuun konsentraatioon, ja laimennokset lisättiin yksittäisille biosensorisiruille sensorivasteen aikaansaamiseksi.¹⁵

Grafeenibiosensorisirussa hyödynnettiin kenttävaikutusbiotunnistusta (FEB).¹⁵ FEB-tunnistuksessa grafeenin kanavassa kulkeva virta sekä porttikapasitanssi muuttuvat silloin, kun sopivat biologiset kohteet tehdään liikkumattomiksi eristeportissa. Tutkimuksessa osoittautui, että grafeenibiosensorin herkkyys kasvoi, mikä voitiin havaita transkonduktanssin kasvun perusteella.¹⁵ Anti-Zika NS1 -proteiinia grafeenibiosensorilla testattiin lisäämällä yksittäiselle biosensorille ZIKV NS1 tai JEV NS1 -proteiinia. Osoittautui, että JEV NS1 jakaa osan aminohapposekvenssistä Anti-ZIKV NS1 -proteiinin kanssa, minkä perusteella JEV NS1 onkin mahdollinen ristireagoija. Tutkimustuloksia analysoitaessa ilmeni kuitenkin, että ZIKV NS1 -proteiinin C-vaste oli 8% ja ettei JEV NS1 aiheuttanut määritettävää sensorivastetta, kun sitä altistettiin anti-ZIKV NS1 -proteiinille. Täten biosensori on selektiivinen ZIKV NS1 -antigeeniä kohtaan.¹⁵

Analyysin mahdollinen käyttö diagnoositarkoituksessa määritettiin seerumissa käyttäen kahta eri laimennosta.¹⁵ Siitä huolimatta, että seerumin laimentaminen alensi sensorin kokonaisvastetta, paransi se vaihteluosuuden kerrointa (CV%). Kokeellisesti tehdyn diagnostisen testin CV%-arvo pitäisi olla $\leq 20\%$, ja kun se on $\leq 10\%$ testiä pidetään luotettavana. Laimennoksessa 1:10 arvo oli 19,89% ja laimennoksessa 1:100 9,17%. Jälkimmäisen arvon perusteella analyysi voisi olla mahdollinen kliinisessä ympäristössä. Käytetty Agile R100 FEB -alusta on lupaava pohjan Zika-viruksen kliiniselle tunnistamiselle ja aikaisen infektion testaamiseen.¹⁵

3.2 Biologinen kuvantaminen

Biologisessa kuvantamisessa havaitaan biologisia komponentteja diagnostisessa tarkoituksessa. Biologisen kuvantaminen on tärkeää, koska sen avulla terveydellisiä olosuhteita pystytään havaitsemaan sekä elävissä organismeissa että elimistön ulkopuolella tehdyissä tutkimuksissa.³ Biokuvantamistekniikat voidaan jakaa optiseen kuvantamiseen, radionukliseen kuvantamiseen, magneettikuvantamiseen, fotoakustiseen kuvantamiseen (PAI), tietokonetomografiaan (CT) sekä multimodaaliseen kuvantamiseen.¹ Grafeenioksidia on käytetty biologisessa kuvantamisessa sen bioyhteensopivuuden ja optisten ominaisuuksien takia.² Biokuvantamisessa käytettävien materiaalien täytyy olla hyvin spesifisiä, myrkyttömiä sekä herkkiä.¹ Grafeenilla pystytään alentamaan biologisessa kuvantamisessa käytettävien koettimien toksisuutta, mutta selektiivisyyden ja herkkyuden aikaansaaminen on vielä haaste.

Biologisessa kuvantamisessa materiaaleja ovat grafeenikvanttipisteet (GQD) ja GO-materiaalit.¹

Optisessa kuvantamisessa hyödynnetään näkyvää valoa ja fotonien ominaisuuksia kudosten ja elimien visualisointiin reaaliaikaisesti.¹ Optisessa kuvantamisessa on hyödynnetty tyypellä muokattuja GQD- ja GO-materiaaleja. Optiseen kuvantamiseen kuuluu fluoresenssikuvantaminen, joka perustuu fluoresoivista kohteista emittoituihin fotoneihin. Kaksifotoninen fluoresenssi (TPMI) on optinen kuvantamismenetelmä, jonka avulla saadaan yksityiskohtaista tietoa biologisten systeemien solunsisäisistä toiminnoista. Menetelmän signaalihäiriösuhde on kuitenkin korkea. Raman-kuvantamisessa käytetään hyväksi fotonien sirontaa, joka johtuu molekyylien värähtelyeksitaatioitiloista.

Radionuklidikuvaus pystyy jäljittämään tarkasti radioaktiivisesti merkityt aineet elävissä organismeissa.² Etuina radionuklidikuvauksessa on sen alhainen taustasignaali sekä sen vaatima pieni signaalimonistus. Radionuklidikuvauksessa voidaan hyödyntää grafeenioksidia. Grafeenioksidimateriaaleja hyödyntävässä MRI-kuvaustekniikassa on korkea spatiaalinen resoluutio, ja sitä on käytetty anatomiatutkimuksissa ja kudosten toiminnan tutkimuksessa.

PAI-kuvantamistekniikassa on myös hyödynnetty grafeenioksidia. Menetelmässä käytetään ultraääniresoluutiota elinten ja kudosten kuvantamiseen, ja sen etuna on radiotaajuusaaltoja alhaisempi hajonta biologisissa näytteissä. Positroniemissiotomografiassa (PET) on myös hyödynnetty grafeenioksidia. PET-kuvauksen avulla pystytään määrittämään radioisotoopin konsentraatio elävässä organismissa.²

3.3 Kudosteknologia

Kudosteknologia on kehittyvä alue, jonka tavoitteena on korvaavien materiaalien kehittäminen kudoksen toiminnan muokkaamista sekä kudoksen ominaisuuksien ylläpitämistä ja korjaamista varten.¹ Biologiset substituentit, jotka tunnetaan myös tukirakenteina, on valmistettu biohajoavista materiaaleista. Perinteisellä elintensiirrolla on rajoitteita trauman, infektion, kasvaimen tai epämuodostuman aiheuttamien kudonvaurioiden korjaamisessa. Tietyt materiaalit, kuten hydrogeelit, eivät ole mekaanisesti riittävän vahvoja solulle, jotta ne voisivat kiinnittyä ja kasvaa. Kehon kudoksilla on erilaisia mekaanisia, sähköisiä ja fysikaalisia ominaisuuksia, ja yksittäisten materiaalien fysikaaliset ja biologiset ominaisuudet ovat erilaisia kuin kudosten.¹

GBN-materiaalien ominaisuudet mahdollistavat niiden käytön materiaalien vahvistamisessa, kuten kudosteknologiassa. GO sekä r-GO ovat helposti muokattavissa, koska niiden pinnalla

olevat funktionaaliset ryhmät pystyvät vuorovaikuttamaan eri biomolekyylien kanssa. r-GO ja muut GO-komposiitit ovatkin materiaaleja, joita käytetään kudosteknologiassa niiden rakenteellisen joustavuuden ansiosta. GO pystyy indusoimaan erityisiä solutoimintoja ja suoraa soluerilaistumista sekä mukauttamaan solujen välisiä vuorovaikutuksia.¹ GBN-materiaalien kyky ylläpitää korkeaa elinkelpoisuutta erilaistumisen jälkeen pitkän ajanjakson ajan on oleellista uusiutuvassa lääketieteessä.¹

4 Grafeeni biologisessa terapiassa

4.1 Terapeuttiset alustat

Grafeenin suuren pinta-alan, sp²-hybridisoituneiden hiilien, sekä sen sisältämien happiryhmien ansiosta yksittäiseen grafeeniatomikerroslevyyn pystytään liittämään lääkeainemolekyyliä molemmille puolille.² Kuljetukseen käytettävä GO koostuu yleensä yhdestä, kahdesta tai kolmesta levystä, jotka ovat 1-2 nm paksuisia. Lisäksi grafeenioksidi on bioyhteensopiva, veteen liukeneva ja stabiili materiaali. Grafeenioksidin pystytään liittämään suuri määrä lääkeainemolekyyliä tai geenejä. Lisäksi GO:ssa olevat COOH- ja OH-ryhmät mahdollistavat erilaisten systeemien, kuten DNA:n, biomolekyylien ja proteiinien liittämisen sen pinnalle.⁴ Ihanteellinen kuljetin kohdistaa terapeuttiset tekijät tarkasti niiden kohteeseen ja suojaa niitä hajoamiselta. Siten kuljetin vähentää epätoivottuja sivuvaikutuksia ja terapeuttisten tekijöiden laimentumista, sekä mahdollisesti kasvattaa tehokkuutta.³ Tämän takia kuljettimen on oltava stabiili ja inertti ja sen fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien on mahdollistettava sen kulkeminen monimutkaisten fysiologisten ympäristöjen läpi.

Kun lääkemolekyylit on liitetty grafeenimateriaaliin, ne kohdistetaan soluun tai kudokseen ja vapautetaan siellä.³ Kun kyseessä on passiivinen kohdistamismekanismi, laajaa funktionalisointia ei tarvita. Myös biojakautumien havaitseminen levyllä on mahdollista grafeenista rakentuvien terapeuttisten koettimien avulla.

Grafeenin ja grafeenioksidin kyky lähi-infrapuna-absorptioon mahdollistaa fototermisten vaikutusten hyödyntämisen hypertermian avulla.³ Hypertermiassa infrapunavaloa käytetään vain kohteena olevaan alueeseen, minkä on osoitettu kasvattavan soluläpäisevyyttä sekä grafeenikompleksien transfektiota sillä alueella, johon infrapunavaloo on kohdistettu. Grafeenista rakentuvia nanopartikkeleja on valmistettu siten, että ne pystytään kohdistamaan paikallista magneettikenttää käyttämällä.³ Spesifisempi vuorovaikutus soluun tai kudokseen voidaan saada aikaan sitomalla grafeenimateriaaliin ligandeja, jotka solupinnan reseptorit tunnistavat. Menetelmän avulla lääkeainegrafeenikompleksit pystytään kohdistamaan tiettyihin

solutyyppeihin tai kudoksiin. Lisäksi menetelmän avulla voidaan helpottaa solujen vastaanottoa sekä edistää solunsisäistä toimintaa.³

Jotta lääkkeen vaikutus saadaan aikaan sen kohteessa, lääke täytyy vapauttaa tehokkaasti sen toiminta-alueella. Lääkkeen vapauttamismekanismi riippuu grafeenialustan valmistustavasta sekä lääkemolekyylien sitomiseen käytetystä menetelmästä.³ Vähäisesti funktionalisoitujen grafeenimateriaalien tapauksessa sitomiseen käytetään yleensä π -sidoksia tai hydrofobista vuorovaikutusta, jolloin lääkemolekyylit voidaan vapauttaa muuttamalla ympäristön fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia, kuten pH:ta, jolloin sitoutumisaffiniteetti muuttuu.

π -vuorovaikutusten avulla tapahtuvaa fysikaalista adsorptiota voidaan käyttää syöpälääkkeiden sekä doksorubisiinin liittämiseksi nanografeenioksiidiin (NGO).² DOX- sekä CPT-antisyöpälääkeitä on esimerkiksi liitetty FA-NGO-levyille π -vuorovaikutusten ja hydrofobisten vuorovaikutusten avulla.² Kahdella syöpälääkkeellä käsitellyt foolihappokonjugaattia sisältävät NGO-levyt (FA-NGO) olivat kohdesoluille sytotoksisempia kuin yksittäisellä lääkkeellä käsitellyt foolihappoa sisältämättömät NGO-levyt.

Yksikierteistä nukleiinihappoa liitettäessä nukleotidimäs ja polyaromaattinen grafeeni vuorovaikuttavat keskenään.³ Adsorboitu geneettinen materiaali on suojassa hajoamiselta ja vapautuu solussa toivotusti. Jotta kaksijuosteista nukleiinihappoa pystytään kuljettamaan grafeenin avulla, täytyy grafeenia funktionalisoida sellaisia yhdisteillä, joita on jo hyödynnetty geeniterapiassa. Polyeetteri-imidiä (PEI) on käytetty GO:n funktionalisointiin geenikuljetusta varten. PEI:n avulla kaksoiskiertainen siRNA liittyi funktionalisoituun grafeeniin elektrostaattisella vuorovaikutuksella. PEI ja muut kationiset polymeerit auttavat negatiivisesti varautuneiden nukleiinihappojen kondensaatiota ja kompleksointia ja edistävät vuorovaikutuksia negatiivisesti varautuneiden solukalvojen kanssa.³ Grafeenin ja polymeerin tai muiden funktionaalisten yhdisteiden kompleksointi saattaa merkittävästi muuttaa grafeenilevyn kokoa ja geometriaa. Esimerkiksi PEI- ja PEG-yhdisteellä käsiteltyjen r-GO-levyjen koko pieneni ja niistä tuli enemmän pallonmuotoisia.³

4.2 Valohoito

Fotodynaaminen hoito (PDT) ja fototerminen hoito (PTT) ovat valohoidon muotoja.² PTT-hoidossa käytetään optisesti absorboivasta aineesta peräisin olevaa lähi-infrapunasäteilyä, minkä vaikutuksesta lämpötila kasvaa hoidettavalla alueella. Hoidon avulla voidaan tuhota syöpäsoluja. PTT jaetaan vahvaan ja heikkoon fototermiseen vaikutukseen. Heikon fototermisen vaikutuksen seurauksena lämpötila kasvaa hoidettavalla alueella vähemmän kuin

vahvaa fototermistä vaikutusta käyttäen ja vaikutus etenee yleensä apoptoottisen reitin kautta. Hoito vaikuttaa normaaleihin solutoimintoihin esimerkiksi parantamalla soluläpäisevyyttä, soluun pääsyä (*cellular uptake*) sekä metabolista soluhäiriötä. Lisäksi heikon fototermisen vaikutuksen seurauksena kasvainsolujen kyky uusia aiheuttamia vahinkoja vähenee. Vahvan fototermisen vaikutuksen seurauksena tapahtuu yleensä nekroottinen solukuolema solukalvon hajoamisen takia.¹⁶

Grafeenioksidilla ja pelkistetyllä grafeenioksidilla on luontaisesti korkea lähi-infrapuna-alueen absorbanssi, joten niitä voidaan mahdollisesti hyödyntää syövän hoidossa käytettävässä PTT-hoidossa.¹⁶ PEG-yhdisteellä käsiteltyjä nanografeenilevyjä testattiin hiirillä tehdyssä kokeessa. Koehiirien kasvaimia injektoidiin NGS-PEG-levyillä, minkä jälkeen kasvaimia säteilytettiin käyttäen lähi-infrapuna-alueen aallonpituutta. On osoitettu, että pelkistetty grafeenioksidi absorboi lähi-infrapuna-alueella paremmin kuin grafeenioksidi. NGO-PEG-levyjä valmistettaessa niillä huomattiin olevan hyvä muuntamistehokkuus sekä erinomainen bioyhteensopivuus. Levyihin liitettiin peptidiketju ja ne kohdistettiin syöpäsoluihin, jolloin syöpäsolut tuhoutuivat täysin. Tämän perusteella NGO-PEG-levyjä voitaisiin käyttää syövän PTT-hoidoissa.¹⁶

PDT-hoidon on todettu olevan hyvä syöpähoitomuoto.¹⁶ Sen etuina perinteisiin hoitomuotoihin verrattuna ovat epäinvasiivisuus, spesifisyys sekä kyky hoitaa toistuvilla annoksilla ylittämättä kokonaisannosrajaa. Lisäksi PDT:sta ei aiheudu sivuvaikutuksia. PDT-prosessissa tarvitaan valoherkiste, happea ja valoa. Valoherkiste absorboi fotonin ja virittyy. Virittyneen tilan energia voi hävitä lämmön tai fluoresenssiemission vaikutuksesta. Vaihtoehtoisesti virittynyt singlettitila voi siirtyä alemman energian triplettiviritystilalle ja tuottaa reaktiivisia yhdisteitä kahden eri mekanismin avulla. Tyypin 1 mekanismissa valoherkistin siirtää virittyneeltä triplettitilalta elektronin eri reseptorimolekyyleille, jolloin syntyy vapaa radikaali. Tyypin 2 mekanismissa valoherkistin reagoi suoraan hapen kanssa tuottaen reaktiivista happea. PDT-hoidossa tyypin 2 mekanismin on todettu olevan merkittävämpi. Tuotetun hapen on havaittu reagoivan solukomponenttien kanssa ja siten tuhoavan kohteena olevan syöpäsolun. Grafeenioksidi voisi mahdollisesti tutkimusten perusteella kohdistaa valoherkistimen kuljetuksen tiettyyn soluun.¹⁶

PTT ja PDT ovat non-invasiivisia valohoitoimuotoja, joita voidaan ohjata etäältä.¹⁶ Hoitojen toksisuus on vähäistä ja ne ovat selektiivisiä. Yhdistettäessä PTT ja PDT terapeutinen vaikutus parantuu. Esimerkiksi nanokompleksi Pluronic/GO-MB kertyi merkittävästi kasvaimen sekä maksaan ja vain vähän pernaan, minkä jälkeen PTT:n, PDT:n sekä PDT-PTT-yhdistelmän terapeutinen indeksi arvioitiin.¹⁷ Kasvinkudoksia säteilytettiin laserilla tarkoituksena saada

valoherkistin tuottamaan hapetta PDT-hoitoa varten. PTT-hoidossa käytettiin lähi-infrapuna-alueen laseria ja kasvainkudoksen reaaliaikainen lämpötilanmuutos tallennettiin IR-lämpökuvaussysteemiin. Tulosten perusteella osoittautui, että vain PTT-PDT-yhdistelmähoidon vaikutuksesta terapeutinen tehokkuus parani huomattavasti ja kasvain tuhoutui täysin. Toisessa tutkimuksessa soluja käsiteltiin GO-PEG-Ce6-nanokompleksilla samankaltaisin tuloksin.¹⁸

5 Soluviljely ja antibakteeriset materiaalit

Grafeenilla ja sen johdannaisilla on kyky toimia soluviljelyssä substraatteina.¹⁹ Grafeenimateriaaleja on käytetty ihmissoluviljelyn mesenkymaalisten kantasolujen (hMSCs) substraattien pinnoitemateriaaleina. hMSCs-solujen säilyminen, profilointi sekä erilaistuminen ovat alttiita ympäristötekijöiden vaikutuksille, joita ovat muun muassa lähisolujen vaikutus, liukoisten kasvutekijöiden vuorovaikutukset tai solun ulkoiset matriisit. Ympäristötekijöiden vaikutusta voidaan kontrolloida grafeeniin perustuvilla materiaaleilla. Aluksi grafeenilla peitetään substraatti, joka voi olla esimerkiksi lasia, Si/SiO₂-rakenne, polyetylenitereftalaatti (PET) ja polydimetyylisiloksaani (PDMS). hMSCs-solut istutetaan testisiruille, ja niitä viljellään normaalissa kantasolukasvualustassa. Vertailtaessa grafeenilla päällystettyjä ja päällystämättömiä substraatteja, ei niiden elinkelpoisuudessa tai morfologiassa ollut merkittävää eroa. Eroa osoittautui olevan substraattien vaikutuksessa muuttaa hMSCs-kantasoluja eri solutyypeiksi. Kantasolut, jotka olivat grafeenilla päällystämättömissä pehmeissä substraateissa, eli PDMS- tai PET-substraateissa, erilaistuivat hermo- ja lihassoluiksi. Päällystämättömissä kovissa Si/SiO₂- ja lasisubstraateissa kantasolut eivät erilaistuneet. Grafeenilla päällystetyissä substraateissa kantasolut erilaistuivat luunmuodostajasoluiksi. Tämän perusteella grafeenilla todettiin olevan merkittävä vaikutus kantasolujen erilaistumisessa luusoluiksi. Tutkimusten perusteella grafeenilla päällystetyissä substraateissa solut kasvavat kehittyneellä soluadheesiolla, jakautumisella sekä erilaistumisella, joten grafeeni onkin mahdollinen substraattien pinnoitemateriaali soluviljelyä varten. Grafeenin ja kasvutekijöiden väliset vuorovaikutukset vaikuttavat grafeenin kykyyn nopeuttaa hMSCs-kantasolujen erilaistumista luusoluiksi, ja että grafeeni inhiboi kyseisten solujen erilaistumista rasvasoluiksi.¹⁹

Antibioottiresistenssi, joka on syntynyt perinteisten antibioottien liikkakäytön seurauksena, on nykyään merkittävä terveydellinen ongelma. Ongelman ratkaisemiseksi on kehitetty useita antibakteerisia lääkkeitä, kuten metalli- ja metallioksidinanopartikkeleja. Grafeeninanomateriaalien on niiden erityisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien johdosta

osoitettu olevan antibakteerisia. GBN-materiaaleihin perustuvia nanokomposiitteja on kehitetty muokkaamalla niiden pintaa biomolekyyleillä, polymeereillä ja epäorgaanisilla nanorakenteilla, joiden vaikutuksesta GBN-materiaalin toksisuus vähenee ja antibakteerinen tehokkuus kasvaa. GBN-materiaalien antibakteeriseen aktiivisuuteen liittyy useita mekanismeja, joten onkin välttämätöntä verrata GBN-materiaaleja sekä niiden vaikutusta eri bakteerilajeissa GBN-materiaalien fysikaalis-kemiallisiin ominaisuuksiin.¹

Grafeenimateriaalien antibakteerisen tehokkuus riippuu konsentraatiosta, materiaalin ominaisuuksista, altistusajasta sekä testatun bakteerin tyypistä. Bakteerin elinkelpoisuus vähenee konsentraatiossa kasvaessa sekä grafeenimateriaalille altistetun ajan kasvaessa. On osoitettu, että grafeenimateriaalien käyttö polymeerimatriiseissa vähentää bakteerisolun elinkelpoisuutta. Grafeenimateriaalien kyky vähentää bakteerisolun elinkelpoisuutta johtuu todennäköisesti niiden terävien reunojen aiheuttamasta bakteerikalvojen vahingoittamisesta, ja/tai oksidatiivisesta stressistä.⁹

6 Haasteet ja tulevaisuus

Grafeenin ja grafeenimateriaalien kehittäminen edistyy nopeasti. Grafeeninanomateriaalien toksisuutta pystytään vähentämään kontrolloimalla materiaalien kokoa, muotoa ja pintaa, mutta pitkän aikavälin toksisuuden vähentäminen on vielä keskeinen ongelma ratkaistavaksi. Tieto grafeenimateriaalien biohajoavuudesta sekä aineenvaihdunnasta on vielä rajallista. Fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien optimoinnilla sekä materiaalien pinnan muokkaamisella pystytään parantamaan grafeenijohdannaisten biohajoavuutta, minkä avulla voidaan tulevaisuudessa saavuttaa materiaalien erinomainen bioyhteensopivuus ja bioturvallisuus.²⁰

Eri tutkimuksissa käytettyjen grafeenimateriaalien toksikologisten vaikutusten vertaileminen on haastavaa materiaalien erilaisen koon, muodon, pinnan sekä valmistuksen vuoksi. Eri valmistustapojen seurauksena grafeenimateriaalin pinnalle sitoutuu erilainen määrä happea, minkä on osoitettu vaikuttavan materiaalien toksisuuteen soluissa ja muissa elävissä systeemeissä. Tulevaisuuden haasteena on standardisoida terminologia, grafeeninanomateriaalien valmistaminen sekä toksikologiset menetelmät. Standardisoinnin avulla tutkijat saavat välttämätöntä tietoa materiaalien fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista ja toksikologisista vaikutuksista, minkä johdosta materiaalien käytännön sovellukset ihmisissä helpottuisivat.²¹

7 Kirjallisuusluettelo

1. Shareena, T. P. D.; McShan, D.; Dasmahapatra, A. K. ja Tchounwou, P. B., A Review on Graphene-Based Nanomaterials in Biomedical Applications and Risks in Environment and Health, *Nano-Micro Lett.*, **2018**, *10*, 53.
2. Yang, Y.; Asiri, A. M.; Tang, Z.; Du, D. ja Lin, Y., Graphene based materials for biomedical applications, *Materials Today*, **2013**, *16*, 365-373.
3. MacCallion, C.; Burthem, J.; Rees-Unwin, K.; Golovanov, A. ja Pluen, A., Graphene in therapeutics delivery: Problems, solutions and future opportunities, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2016**, *104*, 235-250.
4. Shen, H.; Zhang, L.; Liu, M. ja Zhang, Z., Biomedical Applications of Graphene, *Theranostics*, **2012**, *2(3)*, 283-294.
5. Reina, G.; González-Domínquez, J. M.; Criado, A.; Vázquez, E.; Bianco, A. ja Prato, M., Promises, facts and challenges for graphene in biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, *46*, 4400-4416.
6. Sasidharan, A.; Panchakarla, L.S.; Sadanandan, A.R.; Ashokan, A.; Chandran, P.; Girish, C.M.; Menon, D.; Nair, S.V.; Rao, C.N. ja Koyakutty, M., Hemocompatibility and macrophage response of pristine graphene and functionalized graphene, *Small*, **2012**, *8(8)*, 1251-1263.
7. Dreyer, D.R.; Park, S.; Bielawski, C.W. ja Ruoff, R.S., The chemistry of graphene oxide, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 228-240.
8. Wu, C.; Zhang, Y.; Wu, X.; Yang, Y.; Zhou, X. ja Wu, H., Biological Applications of Graphene and Graphene Oxide, *Nano Biomed. Eng.*, **2012**, *4(4)*, 157-162.
9. Dong, H. S. ja Qi, S. J., Realising the potential of graphene-based materials for biosurfaces – A future perspective, *Biosurface and Biotribology*, **2015**, *1*, 229-248.
10. Pumera, M., Graphene in biosensing, *Materials Today*, **2011**, *14*, 308-315.
11. Shao, Y.; Zhang, S.; Engelhard, M. H.; Li, G.; Shao, G.; Wang, Y.; Liu, J.; Aksay, I. A. ja Lin, Y., Nitrogen-doped graphene and its electrochemical applications, *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 7491-7496.
12. Wang, Y.; Li, Y.; Tang, L.; Lu, J. ja Li, J., Application of graphene-modified electrode for selective detection of dopamine, *Electrochem. Commun.*, **2009**, *11*, 889-892.
13. Fritea, L.; Tertis, M.; Cosnier, S.; Cristea, S. ja Sandulescu, R., A Novel Reduced Graphene Oxide/ β -Cyclodextrin/Tyrosinase Biosensor for Dopamine Detection, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2015**, *10*, 7292-7302.
14. Du, D.; Zou, Z.; Shin, Y.; Wang, J.; Wu, H.; Engelhard, M.H.; Liu, J.; Aksay, I.A. ja Lin, Y., Sensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Based on Dual Signal Amplification

- Strategy of Graphene Sheets and Multienzyme Functionalized Carbon Nanospheres, *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 2989-2995.
15. Afsahi, S.; Lerner, M. B.; Goldstein, J. M.; Lee, J.; Tang, X.; Bagarozzi, D. A.; Pan, D.; Locascio, L.; Walker, A.; Barron, F. ja Goldsmith, B. R., Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection, *Biosensors and Bioelectronics*, **2018**, *100*, 85-88.
 16. Zhang, B.; Wang, Y.; Liu, J. ja Zhai, X., Recent Developments of Phototherapy Based on Graphene Family Nanomaterials, *Curr. Med. Chem.*, **2017**, *24*, 1-24.
 17. Sahu, A.; Choi, W.I.; Lee, J. H. ja Tae, G., Graphene oxide mediated delivery of methylene blue for combined photodynamic and photothermal therapy, *Biomaterials*, **2013**, *34(26)*, 6239-6248.
 18. Tian, B.; Wang, C.; Zhang, S.; Feng, L. ja Liu, Z., Photothermally Enhanced Photodynamic Therapy Delivered by Nano-Graphene Oxide, *ACS Nano*, **2011**, *5(9)*, 7000-7009.
 19. Yang, M.; Yao, J. ja Duan, Y., Graphene and its derivatives for cell biotechnology, *Analyst*, **2013**, *138*, 72-86.
 20. Zhang, B.; Wei, P.; Zhou, Z. ja Wei, T., Interactions of graphene with mammalian cells: Molecular mechanism and biomedical insights, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **2016**, *105*, 145-162.
 21. Guo, X. ja Mei, N., Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials, *J. Food and Drug Anal.*, **2014**, *22*, 105-115.