

KEMIAN LAITOS
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

**Grafeeni Alzheimerin taudin hoidossa
ja diagnosoinnissa**

Kandidaatintutkielma
12.05.2021
Jenni Rive



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Tiivistelmä

Tässä kandidaatintutkielmassa käsitellään grafeenia ja grafeenipohjaisia materiaaleja Alzheimerin taudin hoidossa ja diagnosoinnissa. Grafeenipohjaisista materiaaleista tarkastellaan tarkemmin grafeenia, grafeenioksidia sekä pelkistettyä grafeenioksidia ja näiden ominaisuuksia. Tutkielmassa perehdytään, kuinka näitä materiaaleja ja niiden ominaisuuksia voidaan hyödyntää Alzheimerin taudin varhaisessa diagnosoinnissa ja myöhemmin hoidossa. Erilaisten kokeellisten tutkimusten perusteella grafeenipohjaisilla materiaaleilla on havaittu monia hyödyllisiä ominaisuuksia, joiden perusteella on kehitetty uusia potentiaalisia diagnosointi- ja hoitomuotoja Alzheimerin tautiin.

Esipuhe

Kandidaatintutkielman kirjallisuuskatsaus aloitettiin helmikuussa 2021 ja saatiin valmiiksi toukokuussa 2021. Kirjallisuuslähteiden haussa käytettiin pääasiassa Google Scholar -hakukonetta, Scopus-tietokantaa sekä Web of Science -tietokantaa. Tutkielman ohjaajana toimi professori Maija Nissinen.

Haluan kiittää professori Maija Nissistä hyvästä ohjauksesta sekä kemiaan ja lääketieteeseen pohjautuvasta mielenkiintoisesta aiheesta. Haluan myös kiittää kurssikavereitani tuesta ja palautteesta kirjoitusprosessin aikana.

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	iii
Esipuhe	iv
Sisällysluettelo	v
Käytetyt lyhenteet	vi
1 Johdanto	1
2 Grafeenipohjaiset materiaalit	2
2.1 Grafeeni.....	2
2.2 Grafeenioksidi.....	3
2.3 Pelkistetty grafeenioksidi.....	4
3 Grafeeni Alzheimerin taudin diagnosoinnissa	5
3.1 Biosensorit	6
3.1.1 Pelkistetty grafeenioksidikenttätransistori	7
3.1.2 Sähkökemiallinen nanobiosensori.....	8
3.2 Resveratroligrafeenioksidikoetin	10
4 Grafeeni Alzheimerin taudin hoidossa	13
4.1 Fototerminen hoito.....	14
4.2 Grafeenikvanttipisteet	16
4.3 Lääkkeiden vaikutusten seuranta	17
5 Yhteenveto	18
Kirjallisuusluettelo	20

Käytetyt lyhenteet

GO	Grafeenioksidi
Aβ	β -amyloidi
T-Tau	Tau-proteiini
<i>in vitro</i>	Eliön tai solun ulkopuolella tehty tutkimus
FET	Kenttätransistori
gFET	Grafeenikenttätransistori
rGO-FET	Pelkistetty grafeenioksidikenttätransistori
miRNA	mikroRNA
Dox	Doksorubisiini
CTAB	Setyyli(trimetyyli)ammoniumbromidi
ssDNA	Yksijuosteinen DNA
Res	Resveratrol
Res-GO	Resveratrol-päällystetty grafeenioksidi
NIR	Lähi-infrapuna
ThS	Tioflaviini-S
GO-ThS	Tioflaviini-S -muunneltu grafeenioksidi
ACh	Asetylikoliini
AchE	Asetylikoliiniesteraasientsyymi
GQD	Grafeenikvanttipiste
<i>in vivo</i>	Elävässä eliössä tehty tutkimus

1 Johdanto

Alzheimer on neurodegeneratiivinen sairaus, joka rappeuttaa aivojen hermosoluja eli neuroneja aiheuttaen lopulta niiden kuoleman. Alzheimerin taudin on todettu johtuvan pääasiassa elimistön normaalisti liukoisten proteiinien, β -amyloidin ja Tau-proteiinin, polymeroitumisesta ja laskostumisesta virheellisesti. β -amyloidin ja Tau-proteiinin virheellinen laskostuminen johtuu esimerkiksi geneettisistä mutaatioista, ikääntymisestä tai muista ulkoisista tekijöistä. Proteiinien konformaatioiden muutokset aiheuttavat neuronien toiminnan heikentymisen ja lopulta solukuoleman. Alzheimerin tauti on yleisin dementiaa aiheuttava muistisairaus eikä siihen ole olemassa parantavaa hoitokeinoa.¹ Taudin yleisyyden vuoksi uusia diagnosointi- ja hoitokeinoja kehitetään jatkuvasti ja nanomateriaaleista esimerkiksi grafeeni on osoittanut lupaavia ominaisuuksia.²

Grafeeni saatiin eristettyä grafiitista ensimmäisen kerran vuonna 2004. Grafeenilla on ainutlaatuisia fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia verrattuna muihin hiilinanomateriaaleihin. Tämän vuoksi se on kiinnostanut muun muassa kemistejä, fyysikoita ja bioteknologeja sen löytämisestä lähtien. Grafeenin sähköisiä ominaisuuksia on käytetty hyödyksi muun muassa erilaisten biosensoreiden ja koettimien valmistuksessa, joilla voidaan tunnistaa erilaisten sairauksien, kuten Alzheimerin taudin, biomarkkereita. Grafeenin suurta ominaispinta-alaa ja optisia ominaisuuksia voidaan käyttää myös hyödyksi sairauksien hoidossa, esimerkiksi Alzheimerin taudissa lääkkeiden vaikutusten seurannassa sekä polymeroituneiden proteiinien hajotuksessa.³

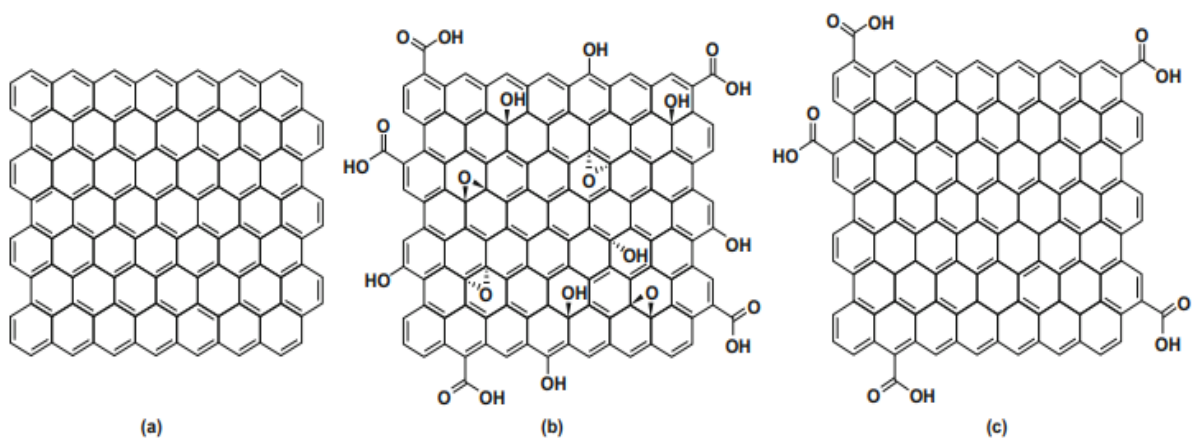
Alzheimerin taudin varhainen diagnosointi on sairauden hoidossa ensisijaista, sillä vaurioiden edetessä liian pitkälle ei ole olemassa hoitokeinoa. Grafeenipohjaisilla biosensoreilla ja koettimilla pystytään tunnistamaan Alzheimerin taudin biomarkerit nopeasti ja edullisesti verrattuna perinteisiin diagnosointimuotoihin. Varhaisen diagnosoinnin jälkeen grafeenin ominaisuuksia voidaan hyödyntää sairauden hoidossa.² Nanomateriaalina grafeeni kykenee muun muassa ohittamaan aivojen veriaivoesteen ja optisten ominaisuuksien ansioista sitä voidaan käyttää esimerkiksi kohdennetussa lämpöhoidossa.^{2,3}

2 Grafeenipohjaiset materiaalit

Muutaman kerroksen paksuinen grafeeni saatiin eristettyä grafiitista vuonna 2004, ja siitä asti se on kiinnostanut tutkijoita erinomaisten kemiallisten ja fysikaalisten ominaisuuksiensa vuoksi.³ Grafeeni on monien hiiliallotrooppien, kuten grafiitin, hiilinanoputkien ja fullereenien, perusrakenne. Valmistamalla ja muokkaamalla erilaisia grafeenipohjaisia materiaaleja saadaan yhdistettyä hydrofiilisiä ja hydrofobisia ominaisuuksia, mitkä tekevät niistä erinomaisia materiaaleja erilaisiin biologiin sekä lääketieteellisiin sovelluksiin.⁴ Grafeenia ja siitä muokattuja materiaaleja on tutkittu esimerkiksi monissa biolääketieteen sovelluksissa, jotka liittyvät erilaisten sairauksien diagnosointiin ja hoitoon.

2.1 Grafeeni

Grafeeni on yksi hiilen allotrooppisista muodoista. Se on kaksikulotteinen taso, joka koostuu sp^2 -hybridisoituneista hiiliatomeista, jotka muodostavat yhteensä neljä sidosta: kolme σ -sidosta muihin hiiliatomeihin sekä yhden π -sidoksen kohtisuoraan σ -sidosten tasoa vastaan. Näin hiiliatomit muodostavat grafeeniin kuusikulmaisen hunajakennoverkkorakenteen (kuva 1). Hunajakennoverkkorakenteen takia grafeenissa on kaksi hiiliatomia yhtä alkeiskoppia kohden, ja tämän vuoksi varauksen kuljettajat eli elektronit ovat käytännössä relativistisia hiukkasia, eli ne ovat lähes massattomia. Näin ollen grafeenilla on monia hyviä ominaisuuksia, kuten hyvä sähkön johtavuus, joustavuus sekä lämmönjohtokyky.⁵



Kuva 1. Grafeenin (a), grafeenioksidin (b) sekä pelkistetyn grafeenioksidin rakenteet (c).⁶ Reprinted from ref. 6., Copyright © 2018, Thabitha P. Dasari Shareena et al.

Suspendoidulla grafeenilla on erittäin hyvä varauksen kuljettajien liikkuvuus ($200\,000\text{ cm}^2\text{ V}^{-1}\text{ s}^{-1}$). Tämä johtuu varauksen kuljettajien erittäin pienestä efektiivisestä massasta ja delokalisoituneista π -sidoksista. Yksikerroksinen grafeeni on läpinäkyvä näkyvälle valolle, ja se absorboi näkyvää valoa vain noin 2,3 %.³ Tätä ominaisuutta voidaan käyttää hyödyksi lääketieteellisissä sovelluksissa. Grafeeni on kaikkien aikojen ohuin ja vahvin materiaali, se on läpäisemätön kaasuille ja sillä on korkea pinta-ala-tilavuussuhde.⁷

Korkean ominaispinta-alan ansiosta grafeenilla on erinomainen proteiinien adsorptiokapasiteetti, mahdollisesti suurempi kuin muilla nanomateriaaleilla. Yksikerroksista grafeenilevyä voidaan käyttää substraattina myös muiden molekyylien sekä erilaisten funktionaalisten ryhmien adsorptioon. Siihen voidaan adsorboida esimerkiksi kitosaani- tai foolihappomolekyylejä. Tällaisella pinnan muokkaamisella grafeenista saadaan tehtyä hyvä alusta esimerkiksi lääketieteellisiin sovelluksiin ja kokeisiin. Grafeenilla on myös sytotoksisia ominaisuuksia, ja tämän johdosta grafeenimateriaalit voivat aiheuttaa solujen kutistumista, irtautumista tai solukuoleman.³

Grafeenia voidaan valmistaa esimerkiksi grafiitista mekaanisella kuorinnalla. Tällä tavalla valmistetut grafeenilevyt ovat tarpeeksi isoja esimerkiksi kenttätransistorien sekä anturien valmistukseen. Muita mahdollisia valmistusmenetelmiä grafeenille ovat muun muassa kasvattaminen yksikiteisellä piikarbidilla (SiC) tai hiilinanoputkien purkaminen.³

2.2 Grafeenioksidi

Grafeenioksidi (GO) on grafeenin johdannainen, joka sisältää happipitoisia ryhmiä, kuten karboksyyli-, epoksi- ja hydroksyyli-ryhmiä (kuva 1). Nämä ryhmät lisäävät molekyylien ja nanomateriaalien adsorptiota ja desorptiota ja tekevät grafeenioksidilevyistä vesiliukoisia eli hydrofiilisiä.⁸ Happipitoisten ryhmien ansiosta grafeenioksidilevyyn voidaan liittää myös muita toiminnallisia molekyylejä kovalenttisesti, heikoilla vuorovaikutuksilla tai sähköisillä vuorovaikutuksilla. Grafeenioksidin voidaan liittää esimerkiksi doksorubisiinimolekyylejä (Dox) tai erilaisia vasta-aineita disulfididoksilla.⁴ Grafeenioksidi ei kuitenkaan johda sähköä toisin kuin grafeeni, sillä suurin osa sp^2 -hybridisoituneista hiilistä on muuttunut sp^3 -hybridisoituneiksi. Mikäli grafeenioksidista halutaan tehdä sähköä johtava, täytyy se pelkistää.⁹

Suuri määrä reaktiivisia happea sisältäviä ryhmiä lisää DNA-vaurioita.⁴ Grafeenin hapettumisen laajuudella on siis merkitystä GO:n toksisuudelle, ja hapettumisen laajuus riippuu taas

valmistusmenetelmästä.¹⁰ Toksisuus riippuu hiilen ja hapen suhteesta GO:ssa sekä esimerkiksi annoksen suuruudesta ja GO-levyn muodosta.⁴

Grafeenioksidia valmistetaan yleensä Hummerin menetelmällä¹¹, jossa grafiitin pinnalle levitetään rikkihappoa (H_2SO_4), natriumnitraattia (NaNO_3) ja kaliumpermanganaattia (KMnO_4).⁴ Nämä yhdisteet ovat voimakkaita hapettimia ja saavat myös aikaan grafiitin pilkkoutumisen grafeeniksi.⁴ Grafeenioksidia voidaan valmistaa myös muilla menetelmillä, esimerkiksi kuorimalla grafiittioksidia ja lisäämällä sen läheisyyteen voimakkaita hapettimia, kuten väkevää typpihappoa (HNO_3) tai väkevää fosforihappoa (H_3PO_4) kaliumpermanganaatin kanssa.¹⁰

2.3 Pelkistetty grafeenioksidi

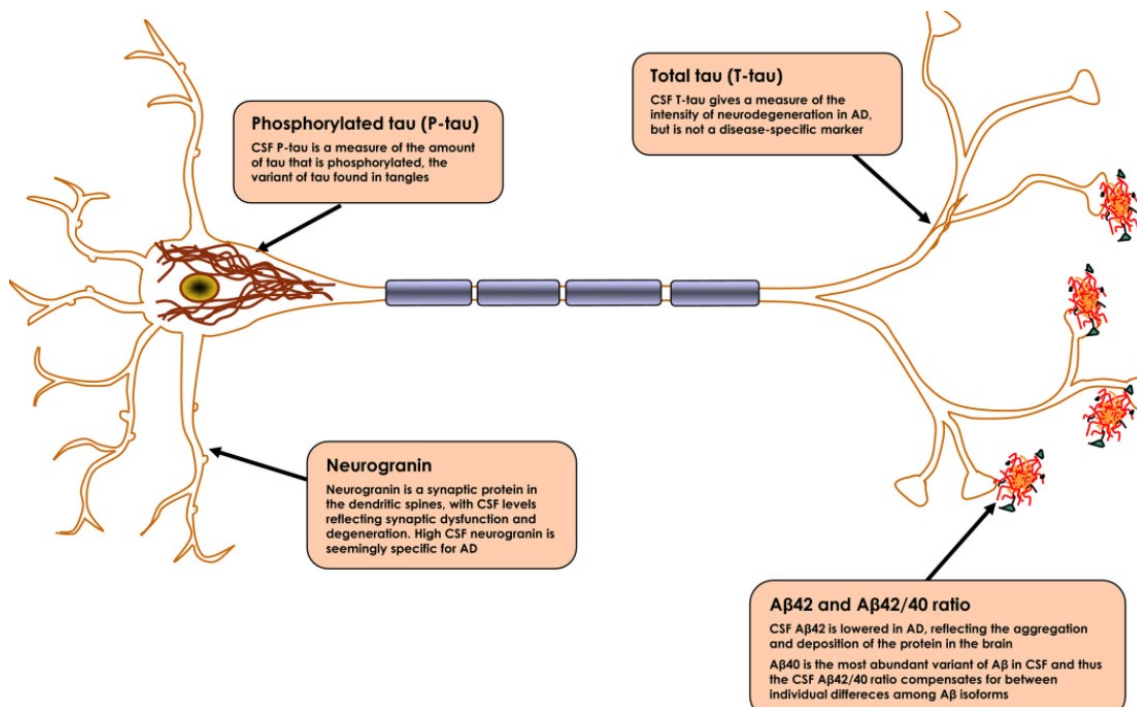
Pelkistettyä grafeenioksidia (rGO) voidaan valmistaa pelkistämällä grafeenioksidia esimerkiksi kemiallisesti tai sähkökemiallisesti. Pelkistetyssä grafeenioksidissa on kuitenkin vielä läsnä joitakin happea sisältäviä ryhmiä (kuva 1). Sähkökemiallisesti pelkistettyä grafeenioksidia (ERGO) valmistetaan poistamalla happea sisältäviä ryhmiä grafeenioksidista sähkökemiallisesti. Tämä on tehokas menetelmä, kun halutaan lisätä sähkönjohtavuutta sekä elektroninsiirtonopeutta.⁸ Kemiallisesti pelkistettyä grafeenioksidia (CRGO) voidaan valmistaa erilaisilla pelkistimillä. Hyvin vahvoilla pelkistimillä, kuten litiumalumiinihydridillä (LAH), pelkistettäessä ongelmana ovat sivureaktiot. Vahvat pelkistimet nimittäin reagoivat yleensä myös liuottimen kanssa.⁹

Erinomaisen sähkönjohtavuuden vuoksi rGO:a voidaan käyttää erilaisten sähkökemiallisten ja biologisten sensoreiden valmistuksessa. Materiaali on erittäin herkkä pienillekin muutoksille sähköisessä tai biologisessa ympäristössä, joten sen avulla voidaan tunnistaa ympäristön muutoksia.³ Pelkistettyä grafeenioksidia voidaan myös levittää helposti grafeenioksidikerrokseen elektrodin pinnalla parantamaan sähkönjohtavuutta. Näin elektrodin pinnalla on sekä GO- että rGO-kerros, jotka molemmat parantavat elektrodin ominaisuuksia.⁸

Yksikerroksisella rGO:lla on grafeenin lailla suuri pinta-ala, mikä mahdollistaa muun muassa lääkeaineiden kiinnittämisen siihen sekä niiden kuljetuksen. Pelkistetyn grafeenioksidin laaja pinta sisältää funktionaalisia ryhmiä, jotka vuorovaikuttavat erilaisten biologisten molekyylien, kuten DNA:n ja proteiinien kanssa. Näiden vuorovaikutusten avulla rGO:a voidaan muokata kemiallisesti.⁶

3 Grafeeni Alzheimerin taudin diagnosoinnissa

Alzheimerin taudin kehittymiseen ja diagnosointiin liittyy keskeisesti aivoihin kertyvä β -amyloidiproteiini ($A\beta_{1-42}$) ja hyperfosforyloitunut tau-proteiini (t-Tau). β -amyloidia sakkautuu eri puolille aivoja, pääasiassa neuronien ulkopuolelle muodostaen amyloidiplakkeja. Tämä saa aikaan hyperfosforyloituneiden tau-proteiinien muuttumisen solun sisäiseksi hermosäiekimpuiksi, jotka kertyvät neuronien sisään lähelle solukeskusta (kuva 2). Nämä yhdessä häiritsevät hermosolujen välistä viestintää synapseissa sekä aiheuttavat lopulta hermosolujen solukuoleman. Tau-proteiineista muodostuneet hermosäiekimput estävät myös ravinteiden ja muiden molekyylien kuljetuksen hermosoluissa.¹



Kuva 2. $A\beta_{42/40}$:n ja t-Tau:n kertyminen hermosoluihin väärin laskostuneina. Väärin laskostuessaan $A\beta$ kerääntyy neuronien ympäristöön, lähinnä päätelevyjen lähelle ja t-Tau neuronien solukeskuksen sisään. Esiintyessään väärin laskostuneina ne aiheuttavat neuronien vajaatoimintaa.¹² Reprinted from ref. 12. © 2018 The Association for the Publication of the Journal of Internal Medicine.

$A\beta_{1-42}$ ja t-Tau ovat normaalisti liukoisia elimistössä, mutta esimerkiksi geneettisten mutaatioiden, ikääntymisen tai ulkoisten tekijöiden vaikutuksesta ne saattavat laskostua väärin. Alzheimerin taudin

kehittyminen alkaa, kun amyloidiprekursoriproteiinin (APP) pilkkoutuminen muuttuu, mikä saa aikaan liukenemattoman A β 1-42 tuotannon ja kertymisen aivokudokseen. A β 1-42 oligomeroituu ja diffundoituu synaptisiin rakoihin häiriten neuronien välistä viestintää. Lopulta A β 1-42 polymeroituu amyloidifibrilleiksi. Tämä saa aikaan kinaasien aktivaation, joka aiheuttaa t-Tau:n hyperfosforylaation ja polymerisaation liukenemattomiksi solunsisäisiksi hermosäiekimpuiksi. Tämä johtaa lopulta epänormaaliin neuronien toimintaan ja niiden solukuolemaan.¹

Alzheimerin taudin diagnosoinnissa on käytetty yleisesti neurokuvantamista sekä erilaisia muistitestejä. Myös joitakin biosensoreja on kehitetty tunnistamaan Alzheimerin taudin biomarkkereita. Biomarkkerien tunnistuksen uskotaan olevan paras lähestymistapa pitämään tauti kurissa ja hoitamaan sitä ajoissa.⁸ Nanoteknologian menetelmien toivotaan nopeuttavan, tarkentavan sekä halventavan diagnosointia. Grafeenilla on todettu olevan tähän soveltuvia ominaisuuksia.²

3.1 Biosensorit

Biosensorit ovat laitteita, jotka koostuvat biologisesta sitovasta komponentista sekä signaalin muunnoksen havaitsevasta komponentista eli muuntajasta. Biologinen sitova komponentti eli reseptori tunnistaa kohdemolekyylin ja muuntaja muuttaa kemiallisen signaalin mitattavaksi.² Erityisesti sähkökemiallisiin menetelmiin perustuvat nanobiosensorit ovat kiinnostaneet tutkijoita niiden kustannustehokkuuden ja muiden etujen, kuten helpon käytön vuoksi.⁸

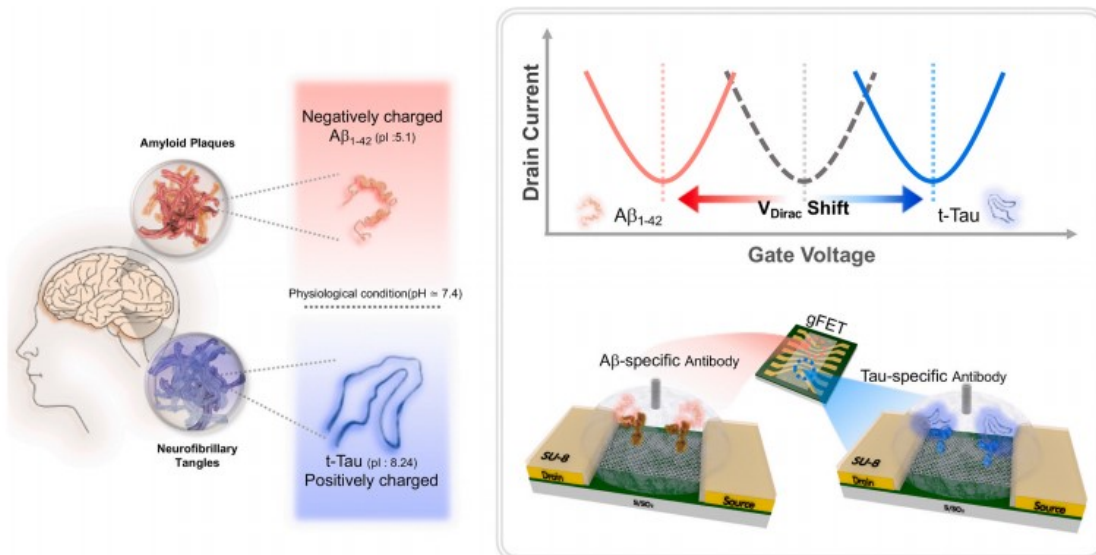
Grafeeni on yksi käytetyimmistä hiilinanomateriaaleista biosensoreissa, joilla tunnistetaan Alzheimerin taudin biomarkkereita. Grafeenista valmistetut biosensorit pystyvät havaitsemaan erittäin alhaisia biomarkkeripitoisuuksia, mikä johtuu muutoksista grafeenin sähköisissä ominaisuuksissa, kun havainnoitavaa ainetta on läsnä tai sitä puuttuu.² Grafeenilla on myös suuri pinta-ala suhteessa tilavuuteen, hyvä johtavuuskyky, nopea elektroninsiirtokyky ja se on erittäin vahvaa. Muun muassa nämä ominaisuudet tekevät siitä erinomaisen nanomateriaalin biosensoreihin.¹³

Grafeenilla on myös haitallisia vaikutuksia biologisissa ympäristöissä, mikä tulee ottaa huomioon biosensoreiden valmistuksessa. Esimerkiksi grafeenin ja proteiinien vuorovaikutus biologisissa nesteissä voi muuttaa proteiinin fysikaalisia ominaisuuksia ja vahingoittaa immuunipuolustusjärjestelmää.⁴ Grafeenimateriaalien sytotoksisuus tulee myös ottaa huomioon biosensorien valmistuksessa. Toksisuus riippuu monesta eri tekijästä, kuten grafeenikerroksien lukumäärästä, materiaalin jäykkyydestä, hydrofobisuudesta ja pinnan funktionaalisuudesta. Grafeeni

itsessään on hydrofobinen, joten sitä tulee muokata erilaisilla funktionaalisilla ryhmillä, jotta siitä saadaan sopiva materiaali erilaisiin biologisiin sovelluksiin.⁶ Vesiliukoisuuden parantaminen saattaa kuitenkin myös lisätä grafeenin toksisuutta soluja kohtaan.⁴ Useampia grafeenipohjaisia biosensoreja käytetään kuitenkin *in vitro* eli solun ulkopuolella, joten ne eivät pääse vahingoittamaan ihmisen elimistön soluja.

3.1.1 Pelkistetty grafeenioksidikenttätransistori

Alzheimerin taudin biomarkkereita, eli β -amyloidia ($A\beta$) ja tau-proteiinia (t-Tau), voidaan tunnistaa elimistön sisäisistä nesteistä, kuten veren plasmasta ja aivo-selkäydinnesteestä käyttäen pelkistettyä grafeenioksidikenttätransistoria (field-effect transistor eli FET). Erilaiset grafeenipohjaiset FET-biosensorit (gFET) ovat osoittautuneet lupaaviksi grafeenien hyödyllisten ominaisuuksien (korkea varauksenkuljetuskyky, selektiivisyys ja kemiallinen kestävyys) takia sekä sen takia, että biomolekyylit voidaan havaita ilman leimausta. Kaksiulotteinen pelkistetty grafeenioksidikenttätransistori (rGO-FET) sisältää myös monia sitoutumiskohtia reseptorien kiinnittymiseen. Tällaisella erittäin herkällä rGO-FET-biosensorilla voidaan havaita samanaikaisesti molemmat Alzheimerin taudin biomarkerit ja β -amyloidista tarkemmin $A\beta_{1-42}$.¹⁴



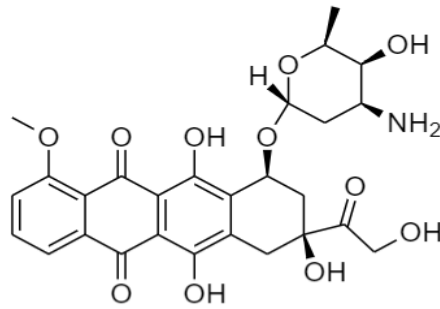
Kuva 3. Pelkistetyn grafeenipohjaisen kenttätransistorin (rGO-FET) toimintamalli $A\beta_{1-42}$ ja t-Tau:n tunnistuksessa. Negatiivisesti varautunut $A\beta_{1-42}$ saa aikaan siirtymän vasemmalle kenttätransistorin hilajännitteessä ja t-Tau saa aikaan siirtymän oikealla positiivisen varauksensa vuoksi.¹⁴ Reprinted from ref. 14. Copyright 2020, with permission from Elsevier.

Alzheimerin taudin biomarkkereilla on erilaiset sähköiset ominaisuudet elimistön fysiologisissa nesteissä, sillä A β 1-42 on negatiivisesti varautunut ja t-Tau on positiivisesti varautunut. Negatiivisen varauksen takia A β 1-42 aiheuttaa sensorissa pelkistysreaktion (n-doping), kun taas t-Taun positiivinen varaus aiheuttaa hapettumisen (p-doping).^{14,15} Erilaisen varauksen vuoksi biomarkerit aiheuttavat vastakkaiset V_{dirac} siirtymät biosensorin rGO-kanavissa ja näin ne voidaan tunnistaa. V_{dirac} kuvaa ambipolaarisia ominaisuuksia rGO-kanavien Dirac-pisteen ympärillä. Grafeenin Dirac-piste on sen sähköisen vyön rakenteen ominaisuus ja se on esimerkiksi rGO-FET-biosensorille noin $55,76 \pm 16,37$ mV.¹⁴

rGO-FET-biosensoria testattiin fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa, joka toimi kontrolliliuoksena, sekä veren plasmassa ja aivoselkäydinnesteessä. A β 1-42:n havaitaan paremmin aivo-selkäydinnesteestä ja fosfaattipuskuroidusta suolaliuoksesta kuin veren plasmasta, mikä johtuu plasman muista proteiineista (albumiinit, lipoproteiinit), jotka häiritsevät A β 1-42:n havaitsemista. T-Tau:n havaitaan puolestaan yhtä tarkasti plasmasta, aivo-selkäydinnesteestä ja fosfaattipuskuroidusta suolaliuoksesta.¹⁴

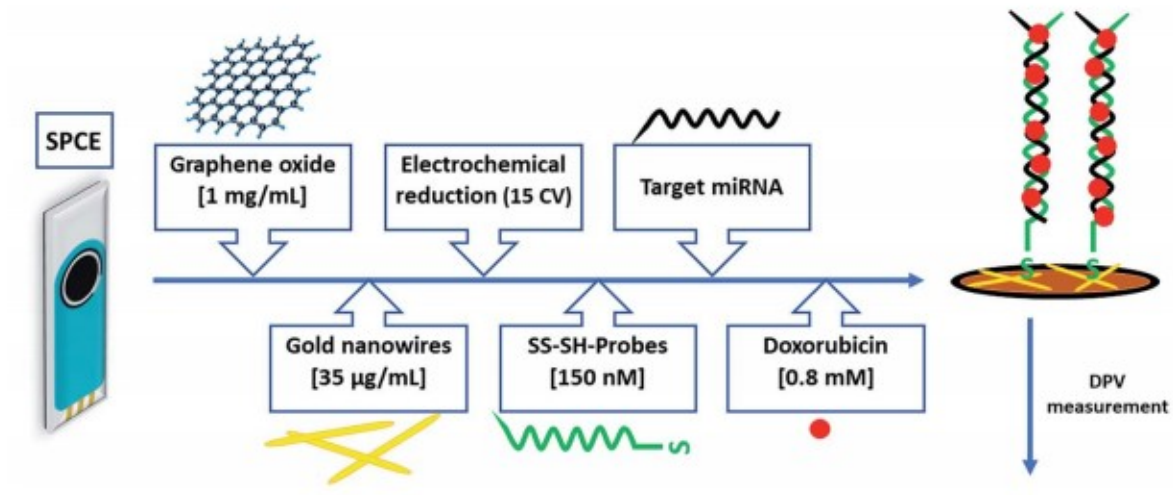
3.1.2 Sähkökemiallinen nanobiosensori

Pelkistetystä grafeenioksidista ja kultananolangoista valmistettu erittäin herkkä sähkökemiallinen nanobiosensori pystyy määrittämään mikroRNA-137 (miRNA-137) seerumia, joka on yksi Alzheimerin taudin biomarkkeri.⁸ miRNA on ei-koodaavaa RNA:ta, joka säätelee muun muassa geenien ilmentymistä ja edelleen proteiinien tuotantoa.¹³ miRNA-137 on ei-invasiivinen plasmassa oleva luotettava biomarkkeri, jonka määrä vähenee Alzheimerin taudissa.^{8,13} Tässä nanobiosensorissa sähkökemiallisesti pelkistettyä grafeenioksidia ja kultananolankoja käytettiin muuntamaan tulostetun hiilielektrodin pintaa. Biosensoriin lisättiin lisäksi sytotoksista doksorubisiini-antibioottia (Dox) sähkökemialliseksi leimaksi (kuva 4). Doksorubisiinia käytetään sähkökemiallisena leimana, sillä doksorubisiinin ja DNA:n vuorovaikutus on interkalaatiovuorovaikutusta eli Dox-molekyyleillä on suurempi affiniteetti kaksijuosteista DNA:ta kohtaan kuin yksijuosteista. Tämä on erittäin hyödyllistä, kun halutaan tunnistaa hybridisoituneiden miRNA-DNA-koettimien oligonukleotideja DNA-koettimella.⁸ Valmistettu sähkökemiallinen nanobiosensori kykeni erottamaan kohde-miRNA:n ja epäspesifiset miRNA:t erinomaisesti.⁸



Kuva 4. Doksorubisiinin rakenne.

Kultananolankoja muunnellaan myös setyyli trimetyyliammoniumbromidilla (CTAB), joka on hyvä eristämään DNA:ta kudoksista. CTAB-muunnellut kultananolangat levitetään GO-muunnellulle elektrodille ja GO pelkistetään sähkökemiallisesti. Tämän jälkeen pisara yksijuosteisella DNA:lla (ssDNA) tioloitua koetinta levitetään muunnellulle elektrodille, jolloin tioloidut koettimet kiinnittyivät kultananolankoihin. Seuraavaksi muunnellulle elektrodille eli nanobiosensorille lisätään komplementaarista miRNA-sekvenssiä sekä Dox-liuosta (kuva 5).⁸



Kuva 5. Kaaviokuva nanobiosensorin valmistuksesta. Tulostettua hiielektroodia (SPCE) muokataan GO:lla ja siihen lisätään kultananolangat, ssDNA-koetinta, kohde-miRNA ja doksorubisiinia.⁸
[RSC Adv., 2017,7, 55709–55719] - Published by The Royal Society of Chemistry.

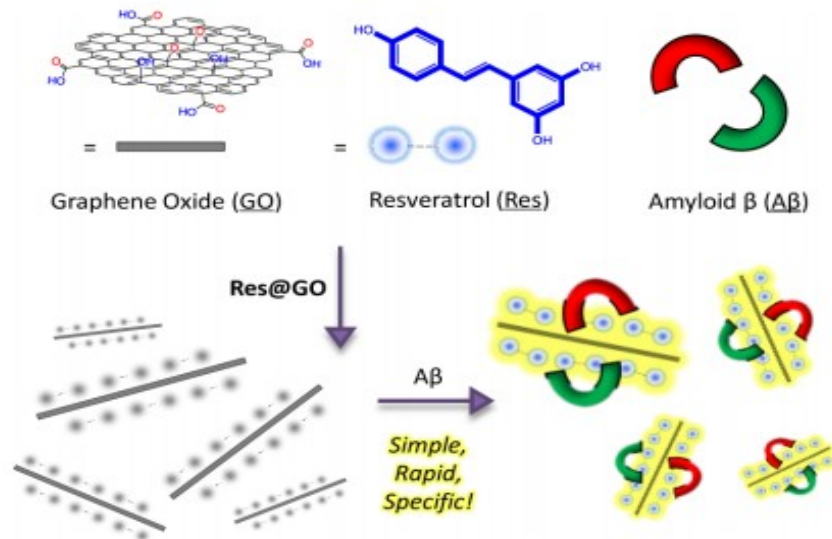
Kyseistä nanobiosensoria on testattu kokeellisesti käyttämällä eristettyä ihmisen seerumia näyteympäristönä, johon lisätään synteettistä miRNA-137:a stimuloimaan Alzheimer-potilaan

seerumia. Valmistettu sähkökemiallinen nanobiosensori lisättiin seerumiin määrittämään miRNA-pitoisuus. Seerumiin lisättiin myös epäspesifistä miRNA:ta, jolla osoitetaan nanobiosensorin selektiivisyys kohde-miRNA-137:aa kohtaan. Selektiivisyys on seurausta Dox:in interkalaatiovuorovaikutuksesta DNA:n kanssa. Nanobiosensori muodostaa siis kaksoisjuosteen ssDNA:n ja kohde-miRNA:n välille. Ei-spesifiset miRNA:t eivät puolestaan kykene muodostamaan täydellistä kaksoisjuostetta ssDNA:n kanssa. Näin voidaan arvioida nanobiosensorin kliininen käyttökelpoisuus.⁸

3.2 Resveratroligrafeenioksidikoetin

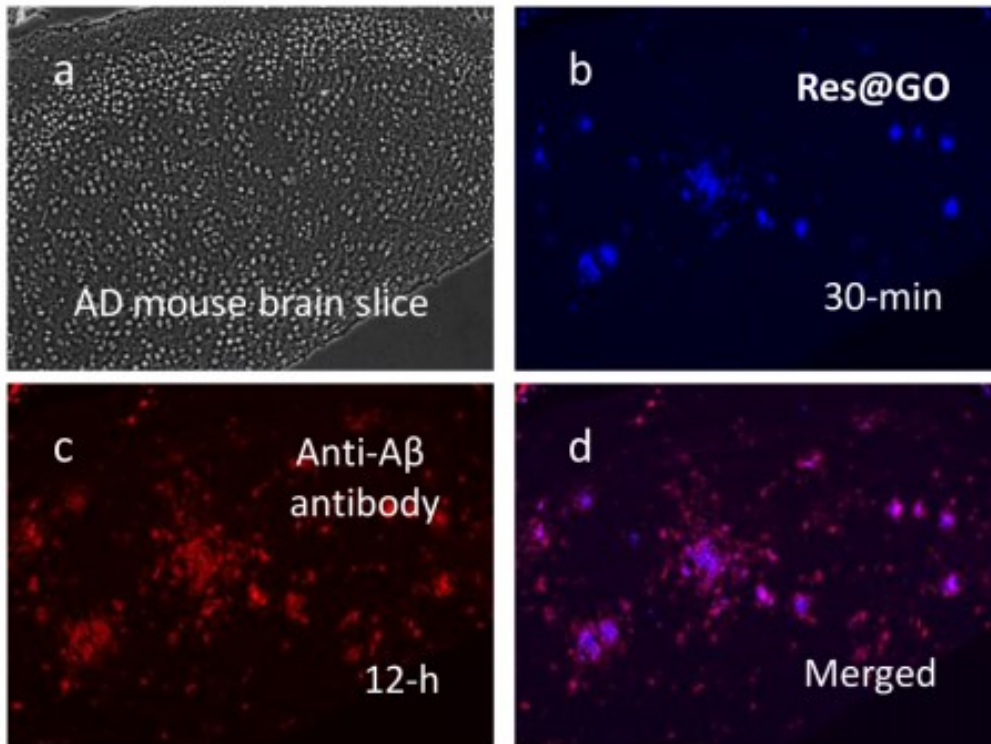
Grafeenioksidista ja resveratrolista (Res) valmistetulla fluorogeenisellä koettimella voidaan tunnistaa yhtä Alzheimerin taudin biomarkkeria, A β :ia. Resveratrolia on luonnollinen fenoliyhdiste, jota esiintyy esimerkiksi punaviinissä. Sillä on todettu olevan muun muassa hermosoluja suojaavia ominaisuuksia ja se kykenee sitoutumaan spesifisesti A β :iin. GO:lla on monia hyödyllisiä ominaisuuksia koettimien valmistukseen, kuten hyvä vesiliukoisuus, optiset ominaisuudet ja kustannustehokkuus. Resveratrolia on fluoresoiva ja GO:lla on luontainen kyky sammuttaa fluoresenssiväriaineiden fluoresenssi fluoresenssiresonanssin aikana.¹⁶

Resveratrolista ja GO:sta valmistetussa fluorogeenisessä koettimessa (Res-GO) Res toimii signaalint- ja tunnistusmolekyylinä. Fluoresoivaa resveratrolia lisätään GO:n pintaan ja se kiinnittyy siihen π -sidoksilla (Kuva 6). GO saa aikaan resveratrolin fluoresenssin sammumisen, mutta kun koetin (Res) kompleksoituu A β :iin, se alkaa fluoresoida uudelleen. Fluoresoituminen johtuu A β 40/42:n nopeasta ja spesifisestä sitoutumisesta ja kapseloitumisesta koettimen pintaan. Kapseloituminen estää energian siirron resveratrolin ja GO:n välillä. Koettimen spesifisyyttä A β 42:een testattiin käyttämällä muita elimistön fysiologisia proteiineja, kuten ribonukleasi A:ta ja pepsiiniä. Nämä proteiinit eivät kuitenkaan muuttaneet Res-GO -koettimen fluoresenssia, joten sen voidaan päätellä tunnistavan spesifisti A β 42:a.¹⁶



Kuva 6. Grafeenioksidin ja resveratrolin rakenteet sekä niistä valmistetun koettimen (Res-GO) Aβ:n tunnistusperiaate. Res-GO ei kykene fluoresoimaan GO:n vaikutuksesta, mutta sitoutuessaan Aβ:iin koetin fluoresoi.¹⁶ Reprinted with permission from ref. 16. Copyright 2014 American Chemical Society.

Res-GO-koettimen kuvantamismahdollisuutta testattiin myös siirtogeenisten hiirien aivoista kerätyistä alueista, jotka sisälsivät Aβ:ia. Osaan aivojen osiin inkuboitii Res-GO-koettimia ja puolituntia inkuboinnin jälkeen havaittiin kirkas fluoresenssi (kuva 7). Osa aivoleikkeistä värjättiin tavallisella anti-Aβ-vasta-aineimmunofluorivärjyksellä. Kuvattu Res-GO:n fluoresenssialue korreloi myös hyvin anti-Aβ-vasta-ainevärjättyyn fluoresoivaan alueeseen. Anti-Aβ-vasta-ainevärjykseen ja kuvantamiseen meni aikaa noin 12 tuntia, joten kokeen avulla voidaan päätellä, että Res-GO-koettimen käyttö oli nopeampaa ja edullisempää kuin perinteinen immunofluorivärjäys. Tällaisella Res-GO-koettimella voidaan mahdollisesti korvata kliinisten näytteiden vasta-aineisiin perustuva immunofluorivärjäys ja todentaa Aβ:n eri muotoja nopeammin ilman aikaa vieviä vasta-aineleimauksia ja toistuvia pesuja epäpuhtauksien poistamiseksi.¹⁶



Kuva 7. (a) Kuva siirtogeenisen hiiren A β :a sisältävästä aivoleikkeestä, (b) fluoressivärjäys Res-GO -inkuboinnin jälkeen, (c) fluoressivärjäys anti-A β -vasta-ainevärjäyksen jälkeen ja (d) Res-GO ja anti-A β -vasta-aine yhdistetty fluoressivärjäys. Res-GO fluoressivärjäys korreloi nykyään käytetyn anti-A β -vasta-ainevärjäyksen kanssa.¹⁶ Reprinted with permission from ref. 16. Copyright 2014 American Chemical Society.

4 Grafeeni Alzheimerin taudin hoidossa

Alzheimerin taudin oireisiin kuuluu muun muassa sekavuutta, muistin menetystä ja erilaisten toimintojen heikentymistä. Monet kognitiiviset toimintahäiriöt Alzheimer-potilaille johtuvat asetyylikoliinia (ACh) erittävien tai sen välityksellä stimuloituvien neuronien häviämisestä. Alzheimerin taudissa ACh-taso alenee aiheutuen sen hydrolysoitumisesta asetyylikoliiniesteraasin (AChE) johdosta. ACh on perusta signaalien välitykselle synapsien yli ja näin Alzheimerin taudin eteneminen riippuu sen tuotannosta.¹⁷ Suurentunut AChE-aktiivisuus lisää amyloidiplakkien sytotoksisuutta aiheuttamalla niiden yhdistymisen fibrilleiksi.¹⁸

Nykyiseen Alzheimerin taudin oireiden hoitoon kuuluu kolme erilaista asetyylikoliiniesteraasin estolääkettä: donepetsiiliä, rivastigmiiniä ja galantamiinia.^{1,2} AChE estolääkkeillä saadaan ACh määrä nousemaan ja näin myös parannettua kognitiivisia toimintoja, minkä takia nykyinen Alzheimerin hoito perustuu näihin estolääkkeisiin.¹⁷ Lääkkeet antavat potilaille helpotusta oireisiin ja hidastavat taudin kehittymistä, mutta eivät kuitenkaan paranna itse tautia. Ne vähentävät käytösongelmia, helpottavat päivittäisiä toimia sekä kognitiivisia toimintoja. Lääkityksen aloittaminen riittävän ajoissa on tärkeää.²

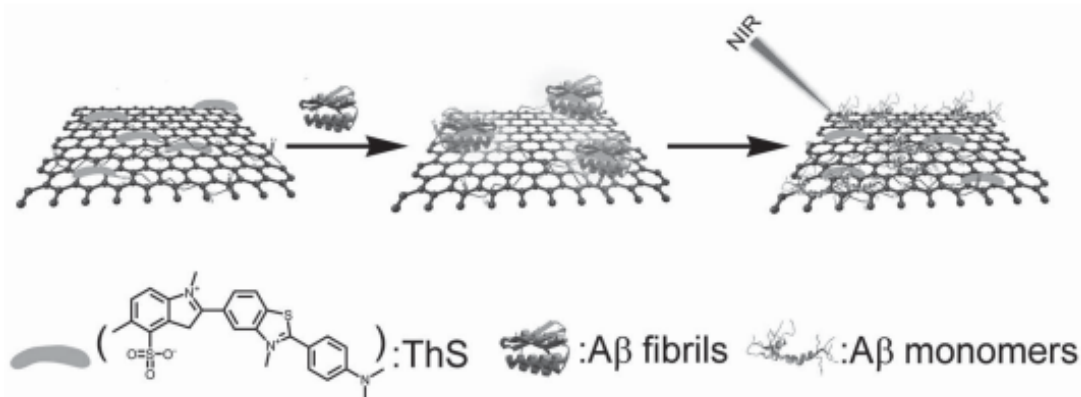
Veriaivoeste rajoittaa lääkkeiden kuljetusta verisuonista keskushermostoon ja aivokudokseen.¹⁸ Veriaivoeste muodostuu endoteelisoluista, joita ympäröi tyvikalvo. Tämän tyvikalvon pinnalla on astrosyyttisiä hermosolun päätelevyjä.³ Veriaivoeste voidaan ohittaa esimerkiksi grafeenikvanttipisteiden (quantum dots, GQD) avulla, sillä nanopartikkelit pystyvät läpäisemään veriaivoesteen. GQD:et voivat toimia esimerkiksi lääkemolekyylien kantajina ja kuljettaa ne aivoihin niiden pienen koon takia.¹⁸

A β :n polymerisaation amyloidifibrilleiksi on todettu olevan kriittisin vaihe Alzheimerin synnyssä ja kehityksessä, joten A β :n keräytymisen estäminen ja jo muodostuneiden fibrillien hajottaminen ovat potentiaalisia hoitomenetelmiä tautiin. Fibrillien muodostumisen estäminen ja niiden hajottaminen voi tapahtua esimerkiksi korkealla hydrostaattisella paineella tai aiheuttamalla hypertermiaa eli liiallista lämpenemistä.¹⁹

4.1 Fototerminen hoito

Alzheimerin taudin fototermisessä hoidossa voidaan käyttää hyväksi lasersäteilyn lähi-infrapuna (NIR) taajuuksia, sillä nämä taajuudet pystyvät tunkeutumaan kudoksiin ja niillä on hyvä tarkkuus aiheuttaa paikallista hypertermiaa. Näin pystytään välttämään ympäröivien kudosten ei-spesifinen lämmitys. GO:lla on grafeenin lailla korkea optinen NIR-absorbanssi ja se kykenee ylittämään veriaivoesteen muiden nanomateriaalin tavoin. GO on myös stabiili ja liukenee hyvin bionesteisiin, erityisesti aivo-selkäydinnesteeseen. Käyttämällä tioflaviini-S (ThS)-muunneltua GO:ta ja NIR-lasersäteilyä pystytään lämmittämään ja hajottamaan amyloidiplakkeja paikallisesti.¹⁹

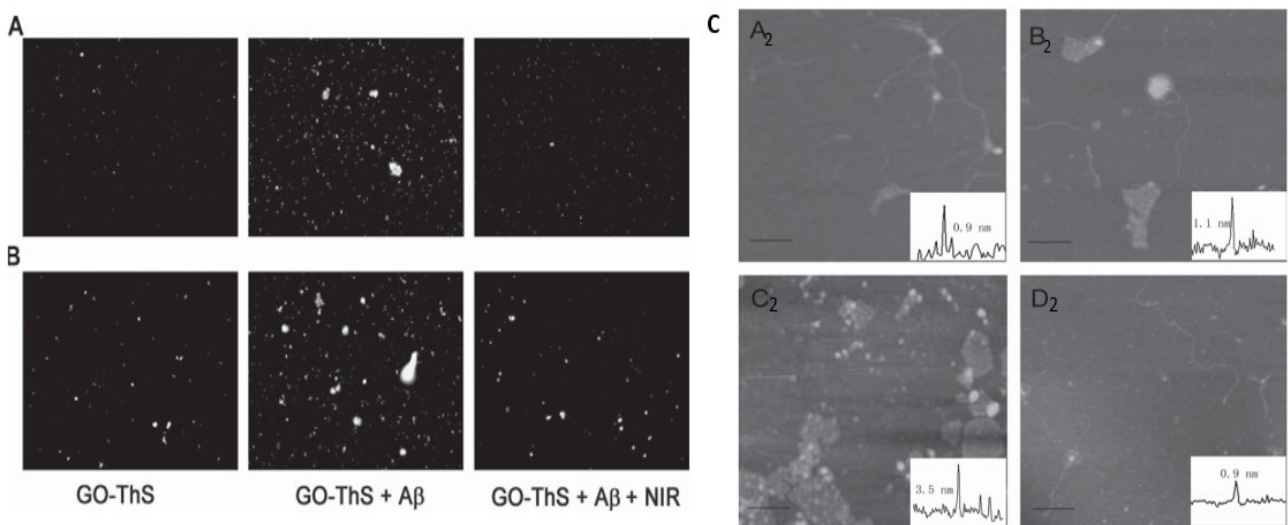
GO liitetään kovalenttisesti ThS:ään, joka kykenee kiinnittymään selektiivisesti A β -fibrilleihin monomeerien sijasta (kuva 8). Aluksi karboksimuunnellusta GO:sta valmistettiin aminofunktionalisoitua GO:a liittämällä materiaaliin kovalenttisesti diaminotrietyylyglykolia. Tämän jälkeen ThS aktivoitiin tionyylikloridilla (SOCl₂) ja kiinnitettiin aminofunktionalisoituun GO:iin. Aktivoidun materiaalin käsittely NIR-lasersäteilyllä aiheuttaa paikallisen lämpötilan nousun, joka hajottaa A β -fibrillejä. ThS on tioflaviiniväriaine, joten käyttämällä ThS-muunneltua GO:a (GO-ThS) voidaan seurata reaaliajassa A β -fibrillien morfologian muutosta NIR-lasersäteilykäsittelyn aikana. ThS:n sitoutuminen amyloidifibrilleihin parantaa sen fluoresenssia. GO puolestaan on hyvä proteiinkuljetin, joten A β -fibrillit sitoutuvat hyvin GO-ThS:ään.¹⁹



Kuva 8. Kaaviokuva ThS muunnellun GO:n ja NIR-lasersäteilyn toiminnasta. ThS liitetään kovalenttisesti GO-levvyyn ja A β -fibrillit sitoutuvat tähän GO-ThS rakenteeseen. NIR-säteily aiheuttaman paikallisen lämpötilan nousun avulla A β -fibrillit hajotetaan monomeereiksi.¹⁹

[Advanced Materials, 2012, 24(13), 1722–1728] - © WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Fluoresenssimikroskopian avulla havaitaan, että A β -fibrillien sitoutuessa GO-ThS:ään sen emittoima keltainen fluoresenssi kasvaa, mutta kun niihin kohdistetaan NIR-säteilyä, ThS-fluoresoivien sakkaumien osuus vähenee (kuva 9 a ja b). Myös atomivoimamikroskopian avulla nähdään, kuinka A β -fibrillien morfologia muuttuu, kun ne sitoutuvat GO-ThS:ään ja niihin kohdistetaan NIR-säteilyä (kuva 9c). A β -fibrillien morfologia ei juurikaan muuttunut, kun ne olivat sitoutuneena ainoastaan GO-ThS:ään, mutta NIR-säteilytyksen jälkeen havaittiin A β -fibrillien hajonneen epämääräisiksi kertymiksi. Pelkkä NIR-säteily ilman GO-ThS:ää ei myöskään muuttanut fibrillien rakennetta. Tämä osoittaa sen, että yhdessä GO-ThS:n ja NIR-säteilyn avulla voidaan hajottaa amyloidiplakkeja.¹⁹



Kuva 9. Fluoresenssimikroskooppikuvat A β -fibrilleistä GO-ThS:iin sitoutuneena puskuriliuoksessa (A) ja hiiren aivoselkäydinnesteessä (B), joista nähdään NIR-säteilyn vähentävän fluoresoivia fibrillejä. Atomivoimamikroskopiakuvat (C) A₂: A β -fibrillit, B₂: A β -fibrillit, kun läsnä on GO-ThS, C₂: A β -fibrillit NIR-säteilytyksen aikana, kun läsnä on GO-ThS ja D₂: A β -fibrillit NIR-säteilytyksen aikana ilman GO-ThS.¹⁹ [Advanced Materials, 2012, 24(13), 1722–1728] - © WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Menetelmää on testattu tähän mennessä hiirten aivoselkäydinnesteessä sekä kokeellisissa puskuriliuoksissa. GO:n kyky ylittää veriaivoeste on osoittautunut hyväksi verrattuna muihin lääkehoitoihin, jotka perustuvat epästabiileihin pieniin kemiallisiin yhdisteisiin tai peptideihin. Fototerminen hoito on osoittautunut huomattavasti paremmaksi vaihtoehdoksi kuin perinteiset

sädehoidot, sillä siinä on vähemmän sivuvaikutuksia ja sen selektiivisyys on parempi. Vain valolle altistuneet vaurioituneet kohdat hoidetaan ja muihin kudoksiin hoito ei vaikuta.¹⁹

4.2 Grafeenikvanttipisteet

Grafeenikvanttipisteitä voidaan käyttää Alzheimerin taudin hoidossa, sillä ne kykenevät läpäisemään veriaivoesteen niiden pienen koon ja lipofiilisyyden ansiosta. GQD:tä voidaan valmistaa siniherneen (*Clitoria ternatea*) kukista yksivaiheisen mikroaaltomenetelmän avulla. Menetelmä on vihreä synteesimenetelmä (green synthesis), jolla on monia etuja verrattuna tavallisiin synteesimenetelmiin, kuten vähäinen liuottimien määrä ja myrkyttömät lähtöaineet. Kasvimateriaalit soveltuvat hyvin hiilinanomateriaalien valmistukseen, koska ne sisältävät orgaanista hiiltä.¹⁸

Tässä tutkimuksessa GQD:et valmistettiin siniherneen kukkien etanoliuutteen avulla. Siniherneen kukkien palat liotettiin absoluuttiseen etanoliin, jonka jälkeen uute sentrifugoitiin, suodatettiin ja haihdutettiin. Muodostuneeseen lietteeseen sekoitettiin hieman HPLC-laatuista vettä ja seos lämmitettiin mikroaaltouunissa. Saatu jäännös jakautui absoluuttisessa etanolissa muodostaen GQD-dispersion. Dispersio suodatettiin ja kvanttipisteet kuivattiin kuumailmauunissa jauhemaisen GQD-materiaalin saamiseksi.¹⁸

Siniherneessä on histidiini- ja treoniiniainesosia, joilla on muistia parantavia vaikutuksia. Siniherneen ilma- ja juuriuute lisäävät myös asetyylikoliinipitoisuutta hippokampuksessa, mikä parantaa muistia ja oppimista. GQD:den muistikapasiteettia parantavaa vaikutusta testattiin rotilla *in vivo* -kokeella radiaalisen poikkivarsisokkelon (radial arm maze) sekä Morrisin vesisokkelon (water Morris maze) avulla. Kokeen avulla huomattiin, että GQD:et estivät enemmän AchE:n toimintaa verrattuna donepetsiiliin. Donepetsiili on AchE:n estolääke, joka lisää asetyylikoliinin toimintaa ja lieventää Alzheimerin käytösoireita. GQD:et ylläpitivät myös pieniä pyramidimaisia neuroneita sekä paransivat niiden häiriöiden hoitoa.¹⁸ Pienet pyramidimaiset neuronit ovat moninapaisia hermosoluja, joita löytyy pääasiassa aivojen muistamiseen liittyvistä rakenteista kuten hippokampuksesta, aivokuoresta ja mantelitumakkeista.²⁰ Näiden tulosten perusteella GQD:et läpäisevät veriaivoesteen sekä vähentävät Alzheimerin oireita rotilla.¹⁸

4.3 Lääkkeiden vaikutusten seuranta

Pelkistetystä grafeenioksidista valmistetun entsyymimuunnellun kenttätransistorin avulla pystytään seuraamaan AchE:n ja ACh:n välistä entsyymaattista kinetiikkaa Alzheimerin taudin lääkityksen aikana. Kenttätransistorissa käytetään rGO:a, sillä rGO soveltuu hyvin orgaanisten materiaalien tunnistamiseen sen ainutlaatuisen rakenteen ja hyvän biologisen yhteensopivuuden vuoksi. FET-biosensori päällystettiin entsyymimuunnellulla 10 nm paksuisella rGO-kalvoilla, jotka toimivat sekä biologisena liittymäpintana että sähköisesti aktiivisena kerroksena. Kalvojen paksuus määrittää biosensorin herkkyyden, sillä ohuemmillä kalvoilla on todettu olevan suurempi vaikutus varattuihin hiukkasiin kuin paksummilla kalvoilla. rGO-kalvot passivoidaan bioyhteensopivalla valoherkällä materiaalilla ja altistetaan osittain analyyttiliuokselle.¹⁷

Entsyymaattiset reaktiot todennetaan muutoksilla rGO-pinnan sähköisissä ominaisuuksissa. rGO-FET biosensorilla on ambipolaarinen siirtokyky sekä dirac-piste vesiympäristössä. Biologisten reaktioiden aiheuttamat sähköstaattiset muutokset neste-rGO-rajapinnassa voidaan siis havaita dirac-pisteen muutoksella (ΔV_{dirac}). ACh:n hydrolysoituessa AchE:n vaikutuksesta etikkahapoksi ja koliiniksi syntyy H^+ -ioneja, jotka laskevat pH:ta. ΔV_{dirac} on pienempi matalammassa pH:ssa ja suurempi korkeammassa pH:ssa, joten entsyymimuunnellun rGO-FET:n avulla voidaan määrittää ACh:n ja AchE:n välistä vuorovaikutusta. Näin ACh voidaan tunnistaa liuoksen lisääntyneellä happamuudella, kun biosensorin rGO-pinta funktionalisoidaan kemiallisesti AchE:lla, joka reagoi ACh:n kanssa. Menetelmällä voidaan tutkia myös AchE-estäjien, donepetsiilin ja rivastigmiinin, vaikutuksia AchE:n aktiivisuuteen ja edelleen Alzheimerin taudin hoitoon.¹⁷

Biosensorin pH:n tunnistus perustuu rGO-pintojen protonointiin ja deprotonointiin riippuen erilaisista H^+ -pitoisuuksista. ACh:n ja AchE:n välisessä reaktiossa syntyneet H^+ -ionit protonoivat rGO-pinnat. Tämä alentaa biosensorin sähköisen kerroksen pH:ta. Matalammassa pH:ssa mitattavassa liuoksessa on siis enemmän AchE:a ja korkeammassa pH:ssa on enemmän ACh:a. Biosensorin on todettu tunnistavan ACh:n myös alhaisissa konsentraatioissa.¹⁷

5 Yhteenveto

Grafeenin tutkimus ja nanotiede ja -teknologia kehittyvät jatkuvasti. Nanoteknologian ja nanomateriaalien avulla voidaan viedä lääketiedettä sekä muita aloja, kuten bioteknologiaa eteenpäin. Etenkin grafeenilla on todettu olevan ainutlaatuisia ominaisuuksia neurogeneratiivisten sairauksien, kuten Alzheimerin taudin hoidossa ja diagnosoinnissa.

Grafeenipohjaisista materiaaleista valmistetut biosensorit ja koettimet kykenevät tunnistamaan nopeasti ja tehokkaasti Alzheimerin taudin biomarkkereita, A β :a sekä t-Tau:a, ihmisen aivoselkäydinnesteestä sekä veren plasmasta.¹⁴ Myös muita Alzheimerin biomarkkereita, kuten miRNA-137:a voidaan tunnistaa erilaisilla grafeenibiosensoreilla.⁸ Grafeenipohjaisia biosensoreita on kuitenkin testattu vasta laboratorio-olosuhteissa ihmisestä eristetyistä nesteissä, plasmassa sekä aivoselkäydinnesteessä.^{8,14} A β :a tunnistavaa fluorogeenistä resveratrolikoetinta on testattu kokeellisesti myös hiiristä eristetyissä aivoleikkeissä.¹⁶ Grafeenimateriaaleista valmistetuilla biosensoreilla ja koettimilla on todettu olevan monia etuja verrattuna perinteisiin Alzheimerin taudin diagnosointimenetelmiin, sillä niiden valmistaminen on nopeaa ja edullista, ja ne kykenevät tunnistamaan taudin biomarkerit herkästi ja selektiivisesti.^{2,14}

Grafeenia on tutkittu myös Alzheimerin taudin hoidossa ja sillä on todettu olevan monia hyödyllisiä ominaisuuksia, kuten kyky ohittaa veriaivoeste. Esimerkiksi grafeenista valmistetut kvanttipisteet kykenevät ohittamaan veriaivoesteen ja niillä on kokeiden perusteella todettu olevan Alzheimerin taudin oireita parantavia vaikutuksia.¹⁸ Alzheimerin taudin oireita voidaan helpottaa myös kohdennetulla lämpöhoidolla, GO:n erityisen NIR-absorbanssin avulla. Lämpöhoidolla voidaan hajottaa A β -fibrillejä, jotka ovat sytotoksisia ja yksi merkittävimmistä syistä taudin etenemisessä. NIR-hoidolla on todettu olevan monia etuja muihin sädehoitoihin verrattuna, sillä se kohdistuu vain tarkasti valittuun kohtaan eikä vaikuta ympärillä oleviin kudoksiin.¹⁹

Yksi merkittävimmistä Alzheimerin taudin syistä on asetyylikoliinin väheneminen asetyylikoliiniesteraasin pitoisuuden nousun johdosta, mikä johtaa signaalintehäiriöihin synapseissa. ACh:n ja AchE:n välistä kinetiikkaa voidaan seurata grafeenipohjaisen kenttätransistorin avulla, mitä puolestaan voidaan hyödyntää Alzheimerin taudin hoidossa käytettävien lääkkeiden vaikutusten seurannassa.¹⁷ Seuraavaksi voitaisiin tutkia, miten ACh-välittäjäaineen toimintaa saataisiin tehostettua grafeenin avulla neuronien synapseissa ja näin mahdollisesti jopa kumota synapsien signaalintehäiriöt.

Nykyisissä tutkimuksissa grafeenia on tutkittu ainoastaan ihmisestä eristetyyn nesteeseen, kuten veren plasman avulla, sekä hiirillä. Seuraava askel tutkimuksissa olisi siirtyminen kliiniseen vaiheeseen, johon tutkimuksissa ei ole löytynyt esteitä. Kohdennettua lämpöhoitoa NIR-säteilyllä voitaisiin mahdollisesti tulevaisuudessa kohdistaa suoraan Alzheimer-potilaan aivoihin ja grafeenikvanttipisteitä voitaisiin injektoida potilaaseen ja näin parantaa taudin oireita. Tutkimusten kliinisiin vaiheisiin on kuitenkin vielä pitkä matka, sillä tietoa grafeenimateriaalien haitoista elimistössä ei ole vielä riittävästi.

Kirjallisuusu luettelo

1. Tiwari, S.; Atluri, V.; Kaushik, A.; Yndart, A. ja Nair, M., Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics, *Int. J. Nanomed.*, **2019**, *14*, 5541–5554.
2. Bilal, M.; Barani, M.; Sabir, F.; Rahdar, A. ja Kyzas, G. Z., Nanomaterials for the treatment and diagnosis of Alzheimer's disease: An overview, *NanoImpact*, **2020**, *20*, 100251.
3. Mao, H. Y.; Laurent, S.; Chen, W.; Akhavan, O.; Imani, M.; Ashkarran, A. A. ja Mahmoudi, M., Graphene: Promises, facts, opportunities, and challenges in nanomedicine, *Chem. Rev.*, **2013**, *113*(5), 3407–3424.
4. McCallion, 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.
5. Jiang, H., Chemical preparation of graphene-based nanomaterials and their applications in chemical and biological sensors, *Small*, **2011**, *7*(17), 2413–2427.
6. Dasari Shareena, T.; McShan, D.; Dasmahapatra, A. ja Tchounwou, P., A review on graphene-based nanomaterials in biomedical applications and risks in environment and health, *Nano-Micro Lett*, **2018**, *10*(3), 1–34.
7. Geim, A. K., Graphene: Status and prospects, *Science*, **2009**, *324*(5934), 1530–1534.
8. Azimzadeh, M.; Nasirizadeh, N.; Rahaie, M. ja Naderi-Manesh, H., Early detection of Alzheimer's disease using a biosensor based on electrochemically-reduced graphene oxide and gold nanowires for the quantification of serum microRNA-137, *RSC Adv.*, **2017**, *7*(88), 55709–55719.
9. R. Dreyer, D.; Park, S.; W. Bielawski, C. ja S. Ruoff, R., The chemistry of graphene oxide, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*(1), 228–240.
10. Chng, E. L. K. ja Pumera, M., The toxicity of graphene oxides: Dependence on the oxidative methods used, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*(25), 8227–8235.
11. Hummers, W. S. ja Offeman, R. E., Preparation of graphitic oxide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*(6), 1339.
12. Blennow, K. ja Zetterberg, H., Biomarkers for Alzheimer's disease: Current status and prospects for the future, *J. Intern. Med.*, **2018**, *284*(6), 643–663.
13. Wu, H. Z. Y.; Ong, K. L.; Seeher, K.; Armstrong, N. J.; Thalamuthu, A.; Brodaty, H.; Sachdev, P. ja Mather, K., Circulating microRNAs as biomarkers of Alzheimer's disease: A systematic review, *J. Alzheimer's Dis.*, **2016**, *49*(3), 755–766.
14. Park, D.; Kim, J. H.; Kim, H. J.; Lee, D.; Lee, D. S.; Yoon, D. S. ja Hwang, K. S., Multiplexed femtomolar detection of Alzheimer's disease biomarkers in biofluids using a reduced graphene oxide field-effect transistor, *Biosens. Bioelectron.*, **2020**, *167*, 112505.

15. Gustafsson, H.; Kvarnström, C. ja Ivaska, A., Comparative study of n-doping and p-doping of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) electrosynthesised on aluminium, *Thin Solid Films*, **2008**, *517*(2), 474–478.
16. He, X.; Deng, Q.; Cai, L.; Wang, C.; Zang, Y.; Li, J.; Chen, G. ja Tian, H., Fluorogenic resveratrol-confined graphene oxide for economic and rapid detection of Alzheimer's disease, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2014**, *6*(8), 5379–5382.
17. Chae, M.; Yoo, Y. K.; Kim, J.; Kim, T. G. ja Hwang, K. S., Graphene-based enzyme-modified field-effect transistor biosensor for monitoring drug effects in Alzheimer's disease treatment, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**, *272*, 448–458.
18. Tak, K.; Sharma, R.; Dave, V.; Jain, S. ja Sharma, S., Clitoria ternatea mediated synthesis of graphene quantum dots for the treatment of Alzheimer's disease, *ACS Chem. Neurosci.*, **2020**, *11*(22), 3741–3748.
19. Li, M.; Yang, X.; Ren, J.; Qu, K. ja Qu, X., Using graphene oxide high near-infrared absorbance for photothermal treatment of Alzheimer's disease, *Adv. Mater.*, **2012**, *24*(13), 1722–1728.
20. Mann, D. M. A., Pyramidal nerve cell loss in Alzheimer's disease, *Neurodegeneration (London, England)*, **1996**, *5*(4), 423–427.