

Povzetek študije »Prenos iz nosu v možgane in cerebralna biološka razgradnja tankih plasti nanodelcev grafenovega oksida«

Vir: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666386420301879>

Poudarki:

Tanke plasti grafen oksida se lahko prenašajo iz nosne votline v možgane. Prenos je odvisen od velikosti, pri čemer se najbolj prenašajo zelo majhne nanometrijske ploščice. Kinetika kopičenja grafen oksida je odvisna od časa in je specifična za različne možganske regije. V možganih akumulirani grafen oksid se spreminja skladno z biološko razgradnjo.

V tem članku smo raziskali, v kolikšni meri se enoslojne do nekajstojne plošče grafen oksida po intranazalnem vnosu prenašajo iz nosu v možgane. Z različnimi tehnikami raziskujemo lokacijo v tkivu in biorazgradljivost »in vivo« prenesenih materialov. Analize masne spektrometrije in konfokalne ramanske analize kažejo, da se količine grafen oksida v sledovih prenašajo iz nosu v možgane v odvisnosti od velikosti. Najmanjša velikostna kategorija lističev grafen oksida (ultra majhni delci - us-GO, 10-550 nm) ima največji dostop do možganov v smislu količine in pokritosti. Konfokalno Ramanovo kartiranje in kombinacije imunofluorescence kažejo, da se »in vivo us-GO« nahaja v povezavi z mikroglija celicami. Točkovna Ramanova spektroskopija kaže, da se **sledovi količine ultra majhnih delcev grafen oksida (us-GO) ohranijo več kot en mesec**, vendar se spreminjajo zaradi biološke razgradnje. Ta študija prispeva k vse večjemu zavedanju o usodi materialov na osnovi grafena v bioloških sistemih.

Opisani so številni materiali na osnovi grafena, vključno z eno do nekaj plastnimi ploščicami grafenovega oksida (GO) in grafenovimi kvantnimi točkami. Grafen oksid (GO) je glavni oksidirani derivat grafena. Delavci v kemični in predelovalni industriji, ki uporabljajo ali razvijajo izdelke, ki vsebujejo grafen oksid, so lahko izpostavljeni. Večje skupine prebivalstva so lahko izpostavljene tudi, če je grafen oksid vgrajen v materiale, ki se uporabljajo pri čiščenju vode, v medicini ali v gradbeništvu.

Po nosni poti lahko nanomateriali, kot je grafen oksid, pri izpostavljenih osebah pridejo v možgane. Po modelu Mednarodne komisije za radiološko zaščito (ICRP) za frakcijsko odlaganje vdihanih delcev lahko aerodinamični premer vdihanega delca vpliva na njegovo odlaganje v pljučnem traktu. Pričakuje se, da se bodo delci nanometrijske velikosti odlagali predvsem v nosno-žrelnem in žrelnem predelu. Glede na anatomijo vohalnega območja v nosu, ki je neposredno in posredno povezano z možgani, se lahko nanodelci v tem območju odlagajo iz nosu v možgane. To potrjujejo epidemiološke študije, klinična preskušanja in poskusi na živalih, v katerih so raziskovali biološko porazdelitev vdihanih nanodelcev, ki so jih odkrili v zunaj pljučnih organih, vključno z možgani. Več študij je preučilo usodo materialov na osnovi grafena v pljučnem sistemu; vendar nobena doslej ni preučevala usode materialov v možganih po morebitni selitvi iz nosu v možgane.

Občutljivost centralnega živčnega sistema na umetne nanodelce sta najprej dokazala De Lorenzo in Darin; z elektronsko mikroskopijo sta prikazala prenos zlatih delcev iz nosne sluznice v možgane. Prenos iz nosu v možgane je zdaj uveljavljen pojav, o katerem so poročali za različne nanodelce, vključno z nanodelci srebra, nanodelci železovega oksida, ultrafinimi ogljikovimi delci, nanodelci titanovega dioksida, nanodelci manganovega oksida

in eksosomi. Nedavno so v možganih umrlih ljudi, ki so prej živeli na različnih geografskih lokacijah, odkrili eksogene nanodelce železovega oksida, pridobljene z izgorevanjem; ta prisotnost v centralnem živčnem sistemu je bila morda posledica prenosa iz nosu v možgane po vdihavanju onesnaženega zraka.

Razmišljalo se je o več načinih prenosa, s katerimi lahko nanodelci iz nosnih votlin vstopijo v možgane, vključno s prenosom prek aksonov olfaktornih (vohalna živčna pot) in trigeminalnih (trigeminalna pot) nevronov ali prek prostorov med aksoni nevronov (paracelularni prenos). Druge poti vključujejo paracelularni ali transcelularni prenos v povezavi s celicami olfaktornega epitelija. Nanodelci se lahko tudi absorbirajo v sistemskem obtoku in nato prehajajo skozi krvno-možgansko pregrado, da bi dosegli možgane.

V nadaljevanju opisujemo študijo, v kateri so bile miši intranazalno izpostavljene vodno razpršenim ploščicam grafen oksida različnih dimenzij. Naš cilj je bil razumeti (1) vpliv stranskih dimenzij lističev grafen oksida listov na obseg prenosa iz nosu v možgane in (2) biorazgradljivost prenesenih materialov v obdobju enega meseca. Naša hipoteza je bila, da bodo stranske dimenzije ploščic GO predvsem vplivale na obseg prenosa materialov iz nosu v možgane in da bodo premeščene ploščice GO biološko razgradljive s strani lokalnih fagocitnih imunskih celic. Nedavne študije so pokazale, da se lahko nanodelci, vključno z grafen oksidom, biološko razgradijo »in vivo« in »in vitro«. Pokazali smo, da se enoslojne do nekajslojne ploščice grafen oksida po intranazalnem vnosu pri miših prenašajo iz nosu v možgane v odvisnosti od velikosti, pri čemer ultra majhni delci (us-GO) dosežejo največjo količino in pokritost. Ko se ultra majhni delci grafen oksida znajdejo v možganih, doživijo spremembe, ki so skladne z biološko razgradnjo, kar nakazuje, da je njihova prisotnost v možganih verjetno kratkotrajna.

Rezultati

Fizikalno-kemijske lastnosti materialov grafen oksida

Ploščice grafen oksida različnih stranskih dimenzij (l-GO, s-GO in us-GO) so bile pripravljene s spremenjeno Hummersovo metodo. Stranske dimenzije listov l-GO so bile 1-35 μm , stranske dimenzije listov s-GO so bile 29 nm-1,9 μm , listi us-GO pa so imeli ožjo porazdelitev velikosti s stranskimi dimenzijami od 10 do 550 nm. Drugi fizikalno-kemijski parametri, kot sta stopnja oksidacije in debelina, so ostali konstantni in primerljivi med tremi kategorijami listov, kar je omogočilo študijo na podlagi stranskih dimenzij.

Za sledenje in količinsko določanje prisotnosti grafen oksida po vnosu smo ploščice grafen oksida funkcionalizirali s kelatnim sredstvom. Uporabljeno kelatno sredstvo je bilo 1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1,4,7,10-tetraocetna kislina (DOTA), pritrjena na molekulo poli(etilen)4 glikola, ki je imela prosto aminske skupine (NH₂-PEG₄-DOTA). Pri funkcionalizaciji z NH₂-PEG₄-DOTA se je zmanjšala stranska dimenzija lističa, tako da je nastal grafen oksid -GO-DOTA (povezovalc PEG₄ zaradi enostavnosti ni vključen v ime funkcionaliziranega materiala).

Kelacija in stabilnost konjugatov GO-DOTA

Pri materialih GO-DOTA smo preverili njihovo sposobnost kelatiranja kovinskih izotopov radioaktivnega Indijuma ^{111}In in neradioaktivnega ^{115}In . Z radioaktivno tankoplastno kromatografijo (TLC) smo potrdili, da je po reakciji kelatiranja z uporabo ^{111}In , ki sta ji sledili dve stopnji izpiranja, in v primerjavi s kontrolnim DOTA [^{111}In] prišlo do kelatiranja.

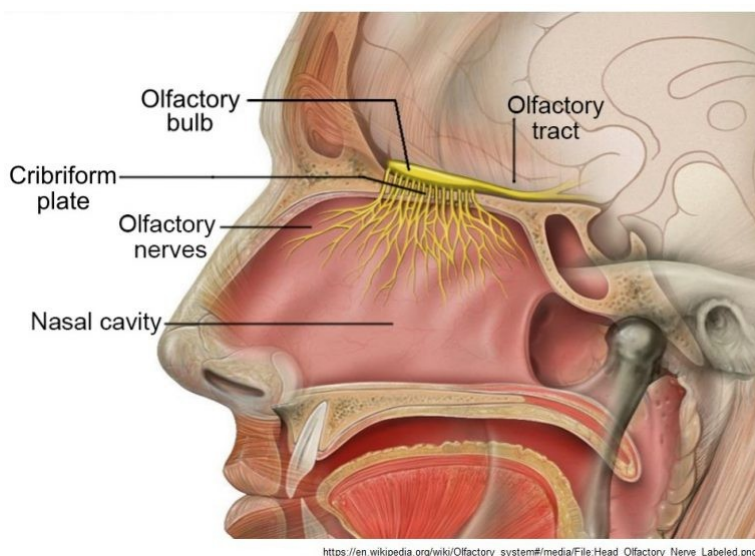
Od velikosti odvisna in za možgane specifična biodistribucija GO po enkratni intranazalni instilaciji

Biodistribucija $30\ \mu\text{g}$ l-GO-DOTA[^{111}In], s-GO-DOTA[^{111}In] ali us-GO-DOTA[^{111}In] po enkratnem intranazalnem vbrizgu, specifična za možgane, je bila določena z enofotonsko emisijsko računalniško tomografijo/računalniško tomografijo (SPECT/CT), avtoradiografijo in γ -scintigrafijo (slika 3).

Po kvalitativnih rezultatih SPECT/CT so se po intranazalnem vnosu trije radioaktivno označeni **materiali grafen oksida delno kopičili v nosnih votlinah. Intenzivnost signala se je v nosnih votlinah zaznavala še 24 ur. Štiriindvajset ur po intranazalnem dajanju je bilo mogoče zaznati šibek sevalni signal v predelu možganov, ki ustreza vohalnemu bulbusu**, pri miših, ki so dobile s-GO-DOTA[^{111}In], us-GO-DOTA[^{111}In] ali DOTA[^{111}In]. Nasprotno pa sevalni signal v možganih ni bil očiten pri miših, ki so jim dajali l-GO-DOTA[^{111}In] (op. prev. večje delce grafen oksida vezanega na DOTA)

Po obdukciji miši so rezultati pokazali, da so se vsi materiali, vključno z l-GO-DOTA[^{111}In], do neke mere prenesli iz nosu v možgane, najbolj pa so se prenašali najmanjši delci grafen oksida.

Rezultati so pokazali, da je bil us-GO (ultra majhni delci grafen oksida) prisoten v vseh možganskih regijah; s-GO (majhni delci grafen oksida) v vohalnem bulbusu, meduli in možganovini; in l-GO (večji delci grafen oksida) v vohalnem bulbusu, ponsu in meduli.



Slika 1: Nosna votlina z vohalnimi nevroni in vohalnim bulbusom (angl. Olfactory bulb)

Razporeditev grafen oksida v možganih po 24 urah po enkratnem intranazalnem vnosu

Zgornji rezultati o biološki porazdelitvi grafen oksida v možganih so neodvisno nakazovali, da so se us-GO (ultra majhni delci grafen oksida) najbolj razširili iz nosu v možgane. Zato smo se pri naslednjih poskusih osredotočili na možgansko specifično lokalizacijo in usodo us-GO v dveh regijah in sicer v vohalnem bulbusu in cerebelumu, 24 ur po intranazalnem vnosu. Pons in medula nista bila izbrana za ta poskus zaradi težav pri ločevanju struktur od hrbtnjače in vratnih bezgavk.

Da bi raziskali celično lokalizacijo us-GO, so možgane zdravljenih miši krio prerezali in jih imunobarvili za identifikacijo treh glavnih tipov možganskih celic: mikroglije, astrocitov in nevronov (z uporabo protiteles antiIBA-1, anti-GFAP in anti-NeuN). **Podatki kažejo, da so bili lističi us-GO (ultra majhnega grafen oksida) večinoma najdeni v tesni povezavi z mikroglija celicami.**

Po 7 dneh je skupna količina us-GO-DOTA[115In] v možganih ostala približno enaka. Po enem dnevu je bilo us-GO mogoče najti v več kot enem možganskem predelu. **Po 7 dneh so bili us-GO (ultra majhni delci grafen oksida) zaznani ne le v vohalnem bulbusu in možganovini, temveč tudi v ponsu in meduli.**

Biodegradacija in vivo nas-GO, prenesenega iz nosu v možgane, po intranazalnem vnosu

Da bi raziskali usodo »in vivo« premeščenega us-GO, smo ocenili biološko razgradnjo. Pri tem poskusu smo se osredotočili na material, prisoten **v vohalnem bulbusu, kjer je po naših podatkih ostala večina grafen oksida** in na možgane, kamor se je nekaj materiala preneslo naprej. Časovno obdobje poskusa smo podaljšali na en mesec, da bi lahko bolj zanesljivo ocenili spektralne spremembe. GO smo zaznali v treh različnih časovnih točkah (1., 7. in 28. dan) tako v vohalnem bulbusu kot v možganovini zdravljenih miši (slika 8A). Intenzivnost signala GO Raman se je s časom zmanjševala, pri 1 mesecu pa je bila intenzivnost signala v obeh možganskih regijah najmanjša. Hitrost zmanjševanja intenzivnosti je bila večja za nas-GO v vohalnem bulbusu kot v možganih. Kar zadeva razmerje I(D):I(G) v vsaki časovni točki, se je razmerje v prvih sedmih dneh v vohalnem bulbusu sprva povečalo, medtem ko je v možganovini ostalo skoraj nespremenjeno. Po enem mesecu pa se je razmerje v obeh regijah statistično značilno zmanjšalo v primerjavi s sedmim dnevom.

Razprava

Mnenje, da so pljuča in druge komponente dihalnega trakta tarče vdihanih nanodelcev, je močno prisotno. Vendar pa so dokazi iz epidemioloških študij, kliničnih preskušanj in poskusov na živalih pokazali, da so lahko prizadeti tudi drugi organi, vključno z možgani. V tem prispevku je bila raziskana možnost, da se ploščice grafen oksida različnih stranskih dimenzij po intranazalnem vnosu prenesejo iz nosu v možgane.

Poročali so o alternativnih strategijah označevanja; te vključujejo označevanje z radioaktivnim jodom,⁶¹ ki ne zahteva pritrditve s kelatnim sredstvom. Pri teh strategijah se pogosto uporabljajo **močno oksidativne vrste, ki lahko poškodujejo grafitno hrbtnico materialov.** (op. prev.: kar pomeni da ozonska terapija - O3 lahko razkroji grafenske strukture). Poleg tega lahko fiziološko kopičenje joda v ščitnici privede do težko razločljivih podatkov.

Po uspešni pripravi označenih grafen oksidnih konstruktov različnih stranskih dimenzij smo raziskali ustrezne profile biološke porazdelitve materialov v možganih po intranazalnem dajanju. Kvalitativni podatki slikanja SPECT/CT so pokazali, da v zgodnjih časovnih točkah (tj. 30 min po vnosu) ni bilo prepričljivih dokazov o prenosu materialov prek strukture, ki ločuje centralni živčni sistem od strehe nosnih votlin. Po 3 urah je bilo mogoče opaziti šibek signal v vohalnem bulbusu miši, ki so jim dajali ultra majhne lističe grafen oksida.

Začetno zaznavanje materialov v vohalnem bulbusu 3 ure po enkratnem vnosu kaže, da je malo verjetno, da bi do prenosa prišlo le z aksonalnim prenosom (op. prev.: preko vohalnih nevronov). Po tej poti snovi v nosnih votlinah prevzamejo nevroni in jih aktivno prenašajo proti vohalnemu bulbusu. Aksonalni transport je običajno razmeroma počasen; študije so pokazale, da je običajno potrebnih ~24 ur, preden material doseže centralni živčni sistem.

Aksonalni transport (op. prev.: preko nevronov) je lahko deloma odgovoren za nekaj prenosa materiala v možgane, zlasti po 24 urah, vendar ne pojasnjuje začetnega hitrega (v 3 urah) prenosa, ugotovljenega za ultra majhne delce grafen oksida (us-GO). Druga možnost je prenos snovi z različnih lokacij (npr. nosne votline, dihalnih poti, želodca, črevesja) po njihovem prenosu iz nosne votline v sistemski krvni obtok. Od tu bi lahko snovi prešle možgansko krvno pregrado in se preselile v možgane; ta mehanizem verjetno ne pojasnjuje naših rezultatov, saj je bilo začetno in glavno kopičenje opaženo v vohalnem bulbusu. Takega vzorca kopičenja ne bi pričakovali, če bi snovi v možgane vstopile s krvno žilnim sistemom (s prečkanjem možganske krvne pregrade).

Poleg tega so prejšnje biodistribucijske študije, v katerih so bili uporabljeni večji odmerki grafen oksida, pokazale, da se je ob sistemski uporabi večina snovi obsežno izločala z urinom, preostali del pa so prevzele komponente mononuklearnega fagocitnega sistema, kot je vranica, brez očitnega vnosa v možgane.

Študije, ki so preučevale prenos intravensko apliciranega grafen oksida iz sistema krvnega obtoka v možgane, so pokazale, da je bil celo pri velikih odmerkih prodor skozi možgansko krvno pregrado zanemarljiv. (op. prev.: razen pri osebah, ki imajo propustno možgansko krvno pregrado).

Drugi mehanizmi prenosa iz nosu v možgane vključujejo transcelularni prenos snovi skozi celične celice vohalnega epitela ali paracelularni prenos skozi ozke tesne povezave med temi celicami vohalnega epitela. Ti mehanizmi prenosa lahko potekajo neprekinjeno v kratkih časovnih okvirih in bolj verjetno pojasnjujejo hiter pojav snovi v vohalnem bulbusu. Poročali so tudi, da se molekule zdravil, fluorescenčni molekularni sledilci, eksosomi in kvantne pike ob intranazalnem dajanju v kratkem času prenesejo v vohalni bulbus.

Po 24 urah so bile poleg prisotnosti v vohalnem bulbusu, ultra majhne grafen oksidne strukture us-GO premeščene v bolj oddaljene strukture, kot so možganska skorja, striatum, hipokampus, srednji možgani, cerebellum ter pons in medula.

Ekstraneuronalne transportne poti (tj. med celicami) lahko prenesejo nanodelce neposredno iz nosnega epitela in vohalnega bulbusa v cerebrospinalno tekočino v prostoru, ki obdaja možgane. Nano delci se lahko nato s konvektivnim tokom, ki ga poganja arterijsko pulziranje, premikajo proti globljim mestom v možganih skozi

perivaskularne prostore, ki obdajajo površinske in možgane penetrirajoče arterije, preden se sprostijo v možganske intersticijske prostore.

Skupna količina grafen oksida, ki je dosegla možgane v tej študiji, je bila zelo majhna - povprečno ~0,012 % začetnega odmerka. Če bi bili izpostavljeni večji sesalci, bi bil prenos us-GO iz nosu v možgane predvidoma večji zaradi večje absolutne površine izpostavljenega nosnega epitelija in količine vdihanega zraka.

Raziskali smo lokacijo lističev us-GO v vohalnem bulbusu in cerebelumu glede na tri glavne vrste celic v možganih. Vohalni bulbus in male možgane smo izbrali zaradi njune medsebojne oddaljenosti. V obeh možganskih regijah je bila večina prenesenega materiala povezana z mikroglija celicami, manjši del z astrociti in nevroni.

Mikroglija celice so rezidenčni makrofagi centralnega živčnega sistema in bi morale biti sposobne prepoznati lističe us-GO kot tuje snovi. O sekvestraciji us-GO s strani mikroglijskih celic po intranazalni uporabi in prenosu iz nosu v možgane so že poročali za druge nanomaterialne, kot so eksosomi, srebrovi nanodelci in kvantne pike. **Pod določenimi pogoji je internalizacija nanomaterialov v makrofagih povezana s citotoksičnimi in vnetnimi odzivi. Zato so potrebne nadaljnje raziskave za oceno vpliva kopičenja us-GO v mikrogliji ter na fiziologijo in delovanje možganov, zlasti po večkratni izpostavljenosti, in za preučitev možnih zapoznelih reakcij.** Pomembno vprašanje je bilo, ali se lahko ta količina prenesenih in v možganih zadržanih lističev us-GO biološko razgradi. To je bil zanimiv koncept, saj **se je izkazalo, da je večina grafen oksida povezana z mikroglijskimi celicami, za katere je znano, da odstranjujejo in razgrajujejo neželene materiale. V prejšnji študiji smo pokazali, da je razgradnja grafen oksida »in vivo« verjetna, kadar grafen oksidni materiali sodelujejo s celicami z razgradnimi sposobnostmi. V tisti študiji so vranični makrofagi sekvestrirali grafen oksidne liste in posredovali njihovo strukturno razgradnjo v obdobju 9 mesecev. V preteklosti smo »in vivo« in »in vitro« dokazali tudi, da lahko mikroglija celice biološko razgradijo sp²-hibidizirane nano delce. Te prejšnje rezultate podpirajo številne študije razgradnje, ki dokazujejo sposobnost encimov sesalcev v zvezi s tem.**

S časom je prišlo do povečanja števila defektov in prisotnost amorfnosti v grafitni hrbtenici možgansko vezanih ultra majhnih lističev grafen oksida (us-GO). Ti rezultati kažejo, da so se lističi us-GO, za katere se je prej izkazalo, da so večinoma povezani z mikroglija celicami, v možganih spremenili zaradi biorazgradnje, kar je v skladu z drugimi študijami o biorazgradnji nano delcev. Natančni mehanizmi, s katerimi mikroglija celice razgrajujejo nanodelce, zahtevajo nadaljnje raziskave, vendar **lahko vključujejo encime družine peroksidaze, NADPH oksidazo (membranski encim levkocitov, ki se aktivira pri fagocitozi) ali druge celične komponente, kot so poročali za makrofage in nevtrofilce.** Rezultati iz cerebeluma kažejo, da so se delci grafen oksida preoblikovali podobno, čeprav počasneje.

Prejšnje študije so pokazale, da encimi, ki sodelujejo v procesu biološke razgradnje, prednostno sodelujejo z okvarjenimi mesti v nano delcih in tako katalizirajo njihovo razgradnjo. Zato bi bilo treba dodatno raziskati morebitno dolgoročno obstojnost in vpliv grafenovih nanodelcev, ki vstopijo v možgane. Ta študija prispeva k vse večji ozaveščenosti glede morebitne interakcije materialov na osnovi grafena z biološkimi sistemi, kar je ključnega pomena glede na napovedano povečanje uporabe teh materialov.

PRILOGA 2: Povzetek meta študije (240 študij o učinkih grafena) »Toksičnost nanodelcev iz družine grafena: splošen pregled izvora in mehanizmov«

Vir: <https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-016-0168-y>

Na splošno lahko delci grafen oksida pri živalih ali celičnih modelih povzročajo različne stopnje toksičnosti. Po različnih načinih dajanja prodirajo skozi fiziološke ovire, nato se razporedijo v tkivih ali se nahajajo v celicah, na koncu pa se izločijo iz telesa.

Poudarjamo tudi, da strupenost grafen oksida določajo različni dejavniki, vključno s velikostjo, površinsko strukturo, funkcionalizacijo, nabojem, nečistočami, agregacijami in učinkom korone itd. Poleg tega je bilo razkritih več značilnih mehanizmov, ki so podlaga za toksičnost nano delcev na osnovi grafen oksida, na primer **fizično uničenje, oksidativni stres, poškodbe DNK, vnetni odziv, apoptoza, avtofagija in nekroza**.

Pri teh mehanizmih so v mrežo signalnih poti vključene **poti, odvisne od receptorjev TLR, transformacijskega rastnega faktorja β - (TGF- β -) in faktorja tumorske nekroze alfa (TNF- α), ključno vlogo pri teh poteh pa ima oksidativni stres**.

Grafen, ki je izoliran iz kristalnega grafita, je ravna enoslojna plast, sestavljena iz enoatomskih dvodimenzionalnih listov šestkotno razporejene mreže v obliki satovja. Odkrit je bila leta 2004. Grafen in njegovi derivati vključujejo enoslojni grafen, nekajslojni grafen (FLG), grafenov oksid (GO), reducirani grafenov oksid (rGO), grafenove nanooblike (GNS), grafenove nanožice itd. Grafen oksid je eden najpomembnejših kemičnih derivatov grafena iz družine grafenskih nanomaterialov (GFN), ki priteguje vse več pozornosti zaradi svojih potencialnih biomedicinskih aplikacij. Materiali na osnovi grafena imajo običajno velikost od nekaj do nekaj sto nanometrov in debelino 1-10 nm, kar je tudi opredelitev "nanodelcev" ali "nanomaterialov". Zaradi svojih izjemnih fizikalnih in kemijskih lastnosti se materiali iz grafena pogosto uporabljajo na različnih področjih, vključno s shranjevanjem energije, nanoelektronskimi napravami, baterijami in biomedicinskimi aplikacijami, kot so antibakterijska sredstva, biosenzorji, slikanje celic, prenos zdravil in tkivno inženirstvo.

S povečevanjem uporabe in proizvodnje grafenskih nanomaterialov (GFN) narašča tudi tveganje nenamerne izpostavljenosti GFN pri delu ali v okolju. V zadnjem času je bilo opravljenih nekaj raziskav o izpostavljenosti GFN v delovnem okolju, objavljeni podatki pa so pokazali, da je poklicna izpostavljenost GFN potencialno toksična za delavce in raziskovalce. GFN se lahko v telo prenesejo z intratrahealno instilacijo, peroralno uporabo, intravensko injekcijo, intraperitonealno injekcijo in subkutano injekcijo. **Grafenski nanomateriali lahko povzročijo akutne in kronične poškodbe v tkivih, tako da prodrejo skozi krvno-zračno pregrado, krvno-telesno pregrado, krvno-možgansko pregrado, krvno-placentarno pregrado itd. in se kopičijo v pljučih, jetrih, vranici itd.**

Nekatere aerosole grafenskih nanomaterialov je na primer mogoče vdihniti in se v veliki meri odložijo v dihalnih poteh, zlahka prodrejo skozi traheobronhialne dihalne poti in nato preidejo v spodnje pljučne dihalne poti, kar povzroči nastanek granulomov, pljučno fibrozo in škodljive učinke na zdravje izpostavljenih oseb. V več pregledih so bile opisane edinstvene lastnosti in povzete najnovejše možne biološke uporabe GFN za prenos zdravil, genov, biosenzorjev, tkivnega inženirstva in nevrokirurgije;

ocenjena je bila biokompatibilnost GFN v celicah (bakterijskih, sesalskih in rastlinskih) in živalih (miših in zebra ribicah); zbrane so bile informacije o vplivu GFN v okolju tal in vode. Čeprav so ti pregledi obravnavali povezane varnostne profile in nanotoksikologijo GFN, so bile posebne ugotovitve in podrobni mehanizmi toksičnosti nezadostni, mehanizmi toksičnosti pa niso bili v celoti povzeti.

Toksikološki mehanizmi nanografenskih materialov, dokazani v nedavnih študijah, vključujejo predvsem vnetni odziv, poškodbe DNK, apoptozo, avtofagijo in nekrozo itd., ti mehanizmi pa se lahko zberejo za nadaljnje raziskovanje kompleksne mreže signalnih poti, ki uravnavajo toksičnost GFN. Poudariti je treba, da obstaja več dejavnikov, ki v veliki meri vplivajo na strupenost nanografenskih materialov (GFN), kot so koncentracija, stranska dimenzija, površinska struktura in funkcionalizacija itd. V tem pregledu je predstavljen celovit povzetek razpoložljivih informacij o mehanizmi in dejavnikih, ki uravnavajo toksičnost GFN in vitro in in vivo z različnimi eksperimentalnimi metodami, s ciljem, da se podajo predlogi za nadaljnje študije GFN in dopolnijo toksikološki mehanizmi za izboljšanje biološke varnosti GFN in omogoči njihova široka uporaba.

Čeprav metoda inhalacije zagotavlja najbolj realistično simulacijo izpostavljenosti v resničnem življenju, je bilo ugotovljeno, da GFN z instilacijo (intratrahealna instilacija, intrapleuralna namestitvev in aspiracija skozi žrelo) povzroča daljše obdobje vnetja kot z inhalacijo. **Raziskano je bilo, da se nanodelci na osnovi grafena (GFN) odlagajo v pljučih in se kopičijo do visoke ravni, ki se v pljučih zadržijo več kot 3 mesece, po intratrahealni instilaciji (vnos preko sapnika) pa se počasi odstranijo.** Intravensko vbrzganje se pogosto uporablja tudi za ocenjevanje toksičnosti nanomaterialov grafena, pri čemer grafen v 30 minutah kroži po telesu miši in **se kopiči v jetrih in mehurju.** Vendar so imeli derivati grafen oksida precej omejeno črevesno adsorpcijo in so se pri odraslih miših ob peroralnem dajanju (skozi usta) hitro izločili. Grafen oksid nano velikosti (350 nm) je po podkožnem vbrzganju v predel vratu povzročil manjšo infiltracijo mononuklearnih celic v podkožno maščobno tkivo v primerjavi z grafen oksidom mikronske velikosti (2 µm). Po intraperitonealnem vbrzganju se je grafen oksid aglomeriral v bližini mesta vbrzganja, številni manjši agregati pa so se naselili v bližini **jeter in vranice.** V pregledanih člankih ni bilo mogoče najti poskusov o stiku s kožo ali prodiranju GFN skozi kožo, zato ni na voljo dovolj dokazov za sklepanje, da lahko grafen prodre skozi nepoškodovano kožo ali kožne poškodbe. Način uporabe kapljic v nos, ki se pogosto uporablja za testiranje nevrotoksičnosti ali možnosti poškodb možganov drugih nanomaterialov, v pregledanih dokumentih ni bil omenjen.

Vstopne poti grafenskih nano delcev (GFN)

GFN po vstopu v telo prek krvnega obtoka ali bioloških pregrad dosežejo različne lokacije, kar povzroči različno stopnjo zadrževanja v različnih organih. **Zaradi svoje nanometrskve velikosti lahko grafenski nanodelci dosežejo globlje organe s prehodom skozi običajne fiziološke ovire, kot so krvno-zračna pregrada, krvno-telesna pregrada, krvno-možganska pregrada in krvno-placentarna pregrada.**

Pregrada kri-zrak

Pljuča so potencialni vstop za grafenske nanodelce v človeško telo skozi dihalne poti. Vdihani nanodelci grafen oksida lahko uničijo ultrastrukturo in biofizikalne

lastnosti pljučnega surfaktantnega filma, ki je prva obrambna linija gostitelja, in povzročijo njihovo potencialno toksičnost. Aglomerirani ali razpršeni delci se odlagajo na notranji alveolarni površini v alveolah, nato pa jih absorbirajo alveolarni makrofagi. Odstranjevanje v pljučih olajšajo mukociliarni eskalator, alveolarni makrofagi ali epiteljska plast. Vendar nekateri majhni vdihani nanodelci prodrejo skozi nepoškodovano pljučno epiteljsko pregrado in lahko nato prehodno vstopijo v alveolarni epitelij ali intersticij (medcelično tkivo).

Intratrahealno (v sapnik) vbrizgan grafen se lahko s preходом skozi pregrado med zrakom in krvjo prerazporedi v jetra in vranico. Raziskavi pregrade kri-zrak se lahko nameni intenzivna pozornost, saj so raziskovalci in delavci poklicno izpostavljeni GFN običajno z vdihavanjem. Razjasniti, kakšno vlogo ima krvno-zračna pregrada pri toksičnosti GFN, lahko postane vroča raziskovalna tema.

Krvno-možganska pregrada

Zapletena ureditev krvno-možganske pregrade, ki jo sestavljajo številni membranski receptorji in zelo selektivni prenašalci, ima v primerjavi s perifernim žilnim endotelijem le neznamenit vpliv na krvni obtok in možgansko mikrocirkulacijo. Raziskave mehanizma krvno-možganske pregrade so nekoliko napredovale, kar zadeva boleznin in nanotoksičnost. Pri slikanju z masno spektrometrijo (MSI) z lasersko desorpcijo/ionizacijo (MALDI) z matriksom je bilo ugotovljeno, da **reduciran grafen oksid (rGO) s povprečnim premerom $\pm 23,5$ nm prehaja po paracelularni poti v medendotelijsko razpoko v odvisnosti od časa, tako da zmanjša paracelularno tesnost krvno-možganske pregrade. Poleg tega lahko grafenove kvantne pike (GQD) z majhno velikostjo, manjšo od 100 nm, prehajajo skozi krvno-možgansko pregrado.** Študije o tem, kako grafenski materiali prehajajo skozi krvno-možgansko pregrado in povzročajo nevrotoksičnost, so zelo redke, zato je za sklepne ugotovitve potrebnih več podatkov.

Krvno-telesna pregrada

Pregrade kri-testis in kri-epididimis sta znani po tem, da sta eni od najtesnejših krvno-celičnih pregrad v telesu sesalcev [65]. Delci grafen oksida s premerom $54,9 \pm 23,1$ nm so po intraabdominalnem vbrizgavanju težko prodrli skozi pregrade kri-testis in kri-epididimis, kakovost sperme miši pa ni bila očitno prizadeta niti pri odmerku 300 mg/kg.

Pregrada kri-placenta

Placentarna pregrada je nepogrešljiva pri ohranjanju nosečnosti, saj posreduje pri izmenjavi hranil in presnovnih odpadkov, opravlja pomembne presnovne funkcije in izloča hormone. **Nedavni pregled je pokazal, da placenta ne zagotavlja tesne pregrade pred prenosom nanodelcev na plod, zlasti pred distribucijo grafenskih nanodelcev v plod in v njem.** Predlagano je bilo, da so delci reducirane grafen oksida (rGO) in zlata (premer 13 nm) v pozni nosečnosti po intravenoznem vbrizgavanju komaj prisotni ali odsotni v placenti in plodu. Vendar pa so druga poročila pokazala, da do transplacentarnega prenosa pride v poznih fazah nosečnosti. Veliko pozornosti je bilo namenjeno razvojni toksičnosti nanomaterialov, **poročila pa so pokazala, da številni nanodelci prehajajo placentarno pregrado in močno vplivajo na razvoj zarodkov.** Vendar so študije o izpostavljenosti grafenovim materialom prek placentarne pregrade

pomanjkljive, zato bi bilo treba v prihodnosti podrobno oceniti, kako se ti delci prenašajo na zarodke.

Te štiri ovire so bile najpogosteje omenjene ovire v literaturi, druge ovire pa v nedavnih študijah niso bile ocenjene, na primer kožne ovire, ki niso bile omenjene v nobeni od več sto pregledanih študij o toksičnosti GFN. Poleg tega mehanizem, s katerim GFN prehajajo skozi te ovire, ni dobro poznan, zato so nujno potrebne bolj sistematične raziskave.

Porazdelitev in izločanje GFN v tkivih

Na absorpcijo, porazdelitev in izločanje nanodelcev grafena lahko vplivajo različni dejavniki, vključno z načini dajanja, fizikalno-kemijskimi lastnostmi, aglomeracijo delcev in površinsko prevleko GFN.

Različne poti vnosa vplivajo na porazdelitev grafenskih nanodelcev (GFN), na primer intratrahealno vbrizgan nekaj slojni grafen (FLG), ki je prešel skozi pregrado med zrakom in krvjo, se je večinoma kopičil in zadržal v pljučih, po 4 tednih pa ga je ostalo 47 %. Intravensko apliciran grafen oksid je vstopil v telo skozi krvni obtok in se v veliki meri zadržal v pljučih, jetrih, vranici in kostnem mozgu, v pljučih miši pa so po intravenski injekciji 10 mg/kg telesno maso grafen oksida opazili infiltracijo vnetnih celic, nastanek granuloma in pljučni edem. Podobno so po intraperitonealni injekciji opazili veliko kopičenje PEG-iliranih derivatov grafen oksida v retikuloendotelijskem sistemu, vključno z jetri in vranico. Nasprotno pa pri pegiliranem grafen oksidu (GO-PEG) in nekaj slojnem grafenu (FLG) ni bilo zaznati absorpcije v prebavilih ali absorpcije v tkivih pri peroralnem dajanju.

Različne lastnosti GFN, kot so njihova velikost, odmerki in funkcionalne skupine, vedno privedejo do neenotnih rezultatov v porazdelitvenih profilih grafena. Zhang in sod. so na primer ugotovili, da se **grafen oksid zadržuje predvsem v pljučih miši** [49]; Li in sod. pa so opazili, da se **grafen oksid kopiči v jetrih miši. Predvsem so bile majhne ploščice grafen oksida s premerom 10-30 nm razporejene predvsem v jetrih in vranici, medtem ko so se večje ploščice grafen oksida (10-800 nm) kopičile predvsem v pljučih. Če je velikost grafen oksida večja od velikosti žil, se grafen oksid običajno zatakne v arterijah in kapilarah v bližini mesta injiciranja.** Pokazalo se je, da se kopičenje grafen oksida v pljučih povečuje z večanjem vbrizganega odmerka in velikosti, kopičenje v jetrih pa se znatno zmanjša. Prevleka biokompatibilnih polimerov na grafen oksidu vpliva tudi na biološko porazdelitev, na primer intravenska injekcija pegiliranega grafen oksida (GO-PEG) in grafen oksid-dekstrana (GO-DEX) se kopiči v retikuloendotelijskem sistemu (RES), vključno z jetri in vranico, brez kratkoročne toksičnosti. Poleg tega na biorazporeditev vpliva tudi naboj plazemskih beljakovin in adsorpcija grafen oksida s plazemskimi beljakovinami.

Izločanje in očiščenje od grafenskih nanodelcev se v različnih organih razlikujeta. V pljučih so opazovanja pokazala, da se grafenski nanodelci pritegnejo v makrofage v alveolah in se očistijo z njimi, iz mukoznega tkiva v pljučih (sputuma) pa se lahko izločijo z mukociliarnim očiščkom ali na druge načine. 46,2 % v sapnik (intratrahealno) vbrizganega grafen oksida pa se je 28 dni po izpostavljenosti izločilo z blatom. V jetrih se lahko nanodelci izločijo po hepatobiliarni poti po žolčevodu v dvanajstnik. Poleg tega se lahko PEG-ilirane grafenove nano oblike, ki se večinoma kopičijo v jetrih in vranici, postopoma odstranijo, verjetno z izločanjem

z ledvicami in blatom. Kot je bilo nedavno pregledano, se lističi grafen oksida, večji od 200 nm, ujamejo pri fizikalni filtraciji v vranici, vendar lahko lističi majhnih velikosti (približno 8 nm) prodrejo skozi ledvične kanalčke v urin in se hitro odstranijo brez očitne toksičnosti. Poti izločanja grafen oksida še niso jasno pojasnjene, vendar se zdi, da sta ledvična in fekalna pot glavni poti izločanja grafena.

V zadnjem času je strategija porazdelitve in izločanja/strupenosti postala pomemben del nanotoksikoloških študij. Doslej je bilo v več člankih objavljenih več spornih rezultatov glede porazdelitve in izločanja grafena »in vivo«, zato je še vedno potrebna sistematična ocena toksikokinetike grafenskih nanodelcev. **Metabolizem in izločanje nanomaterialov na osnovi grafena (GFN) sta dolgotrajna procesa, nedavne študije GFN so bile omejene na kratkoročne toksikološke ocene, dolgoročno kopičenje in toksičnost GFN v različnih tkivih pa še vedno nista znana. Zato je treba opraviti dolgoročne študije o odlaganju in izločanju GFN z uporabo različnih celic in živali, da se zagotovi biološka varnost materialov pred uporabo v biomedicinskih aplikacijah za ljudi.**

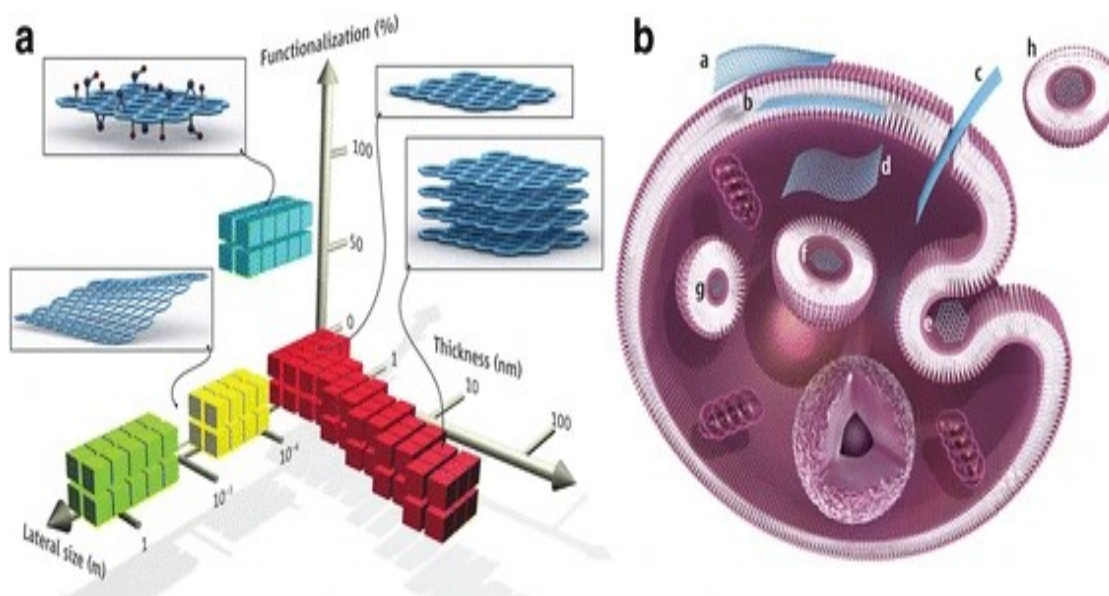
Sprejem in lokacija nanomaterialov na osnovi grafena (GFN) v celicah

Ugotovljeno je bilo tudi, da imajo sprejem in lokacija GFN različne učinke v različnih celičnih linijah. **Grafen se v celice absorbira po različnih poteh. V osnovi so pomembni fizikalno-kemijski parametri, kot so velikost, oblika, prevleka, naboj, hidrodinamični premer, izoelektrična točka in pH gradient, ki omogočajo prehod grafen oksida skozi celično membrano. Kot je bilo že navedeno, lahko nanodelci s premerom < 100 nm vstopijo v celice, tisti s premerom < 40 nm pa v jedro celice. Na primer, grafenske kvantne pike (GQD) lahko prodrejo skozi celične membrane neposredno in ne po energijsko odvisnih poteh. Večji nanodelci grafenovega oksida (PCGO), prevlečeni s proteini (~1 µm), vstopajo v celice predvsem s fagocitozo, manjši nanodelci PCGO (~500 nm) pa predvsem s klatrinsko posredovano endocitozo. Ploščice grafen oksida se lahko prilepijo in ovijejo okoli celične membrane, vstavijo v lipidni dvosloj ali pa se internalizirajo v celico kot posledica interakcij s celicami. Podobno se je pokazalo, da se PEG-ilirani reducirani grafen oksid (PrGO) in reduciran grafen oksid (rGO) zaradi interakcije hidrofobnih, nemodificiranih grafitnih domen s celično membrano opazno prilepita na celično membrano (ki ima lipidni dvojni sloj). Posledično so domnevali, da dolgotrajna izpostavljenost ali visoka koncentracija grafena povzroči fizične ali biološke poškodbe celične membrane skupaj z destabilizacijo aktinskih filamentov in citoskeleta.**

Trenutni podatki kažejo, da ploščice grafen oksida sodelujejo s plazemsko membrano in da jih makrofagi fagocitirajo. **Pri fagocitozi grafen oksida sodelujejo trije glavni receptorji na makrofagih: receptor Fcg (FcgR), receptor za manozo (MR) in receptor za komplement (CR). Poleg tega je FcgR ključni receptor v posredovani fagocitni poti. Beljakovinska korona grafen oksida spodbuja prepoznavanje s strani makrofagnih receptorjev, zlasti IgG, ki ga vsebuje beljakovinska korona. Opazili so, da se makrofagi ob stiku z grafen oksidom močno morfološko spremenijo. Po vstopu v makrofag se je grafen kopičil v celični citoplazmi, perinuklearnem prostoru in jedru, kar je povzročilo citotoksičnost pri mišjih makrofagih s povečanjem škodljivih**

znotrajceličnih prostih kisikovih radikalov (ROS) z izčrpanjem mitohondrijskega membranskega potenciala in sprožitvijo apoptoze z aktivacijo mitohondrijske poti.

Možne interakcije in mesta kopičenja grafenskih nanodelcev (GFN) so povzete na sliki 1.



Slika 1: Grafenski materiali in njihove biološke interakcije. (A) Prostor parametrov za najpogosteje uporabljene grafenske materiale je mogoče opisati z dimenzijami in funkcionalizacijo površine materiala, pri čemer je slednja opredeljena kot odstotek ogljikovih atomov v sp^3 hibridizaciji. Zeleni kvadrati predstavljajo epitaksijsko vzgojeni grafen; rumeni mehansko odluščeni grafen; rdeči kemično odluščeni grafen; modri grafen oksid. Upoštevajte, da se v poskusih uporabljajo tudi številni drugi z grafenom povezani materiali (kot so grafenove kvantne pike in grafenove nanožice). (B) Možne interakcije med materiali, povezanimi z grafenom, in celicami (grafenovi kosmiči niso v merilu). (a) Lepljenje na zunanjo površino celične membrane. (b) Vgradnja med monosloje lipidnega dvosloja plazemske membrane. (c) Premikanje membrane. (d) Citoplazemska internalizacija. (e) endocitoza, ki jo posreduje klatrin. (f) Endosomalna ali fagosomalna internalizacija. (g) Lizosomska ali druga perinuklearna lokalizacija. (h) Eksosomalna lokalizacija. Biološki rezultati takšnih interakcij so lahko škodljivi ali koristni, odvisno od konteksta posamezne biomedicinske uporabe. Različni materiali, povezani z grafenom, bodo imeli različne prednostne mehanizme interakcije s celicami in tkivi, ki v veliki meri čakajo na odkritje. Avtorske pravice (2014), z dovoljenjem Ameriškega združenja za napredek znanosti

Toksičnost grafenskih nanodelcev (GFN) v organih

Toksičnost in biokompatibilnost GFN je bila ugotovljena in ocenjena s teoretičnimi študijami in študijami na živalskih modelih. Trenutno obstaja veliko podatkov, ki dokazujejo toksičnost GFN v različnih organih ali sistemih pri živalih, zato je v tem pregledu težko navesti vse podatke. Zato smo povzeli določeno število literature in izbrali nekaj toksikoloških študij »in vivo« GFN, navedenih v preglednici 1.

Graphene family nanomaterials	Physicochemical properties and functionalization	Animals	Dose and time incubation	Effects	Reference
Nanoscale graphene oxide (NGO)	No information	C57BL/6 mice	0, 1, 5, 10 mg/kg, intratracheal instillation 0 h, 24 h, 48 h, 72 h and 1 week	Result in acute lung injury (ALI) and chronic pulmonary fibrosis	[30]
Few layer graphene (FLG)	No information	ICR mice	0.1, or 1 mg/mL, oral gavage or intratracheal instillation 3 or 28 days	Intratracheally instilled FLG resulted in acute lung injury and pulmonary edema, FLG didn't show detectable absorption through the gastrointestinal tract by oral gavage.	[61]
Graphene platelets (GPs)	No information	Mice	inhalation exposure, 1 day-6 weeks	GP caused acute inflammation in lung at 1 day, and alleviated inflammation in lung after 6 weeks	[48]
Graphene nanoplatelets (GPs)	Thickness of 10 nm Size of 5–30 µm	Female C57BL/6 strain mice	50 µg per mouse, pharyngeal aspiration or intrapleural installation, 24 h- 7 days	Large GP were inflammogenic in both the lung and the pleural space	[24]
GO	Thickness of 0.93 nm Size of 150–250 nm	Sprague-Dawley rats	0.5 or 4 mg/m ³ , inhalation exposure, single 6 h	The single inhalation exposure to GO induce minimal toxic responses in rat lungs	[235]
GO	Thickness of 0.9 nm size of l-GO: 1–5 µm size of s-GO:100–500 nm	Male ICR mice	1.0 mg/kg, intravenous injected, 24 h	Accumulated mainly in the liver and lungs	[78]
GO	Thickness of < 4 nm size of l-GO:237.9 ± 79.3 nm; size of s-GO: 54.9 ± 23.1 nm	Male and female ICR-strain mice	24 mg/kg, tail vein injected, 5 days	Didn't effect pup numbers, sex ratio, weights, pup survival rates or pup growth, low toxicity for male reproduction	[66]
GO	Thickness of ~1.0 nm sizes of 10–800 nm	Kun Ming mice	1,10 mg/ kg, intravenous injection 14 days	Led to high accumulation, long-time retention, pulmonary edema and granuloma formation	[49]
NGO-PEG	Thickness of 1 nm size of 10–800 nm	Male Kunming mice	5 mg/kg, tail intravenous injection 10 min-24 h	NGO-PEG alleviated acute tissue injuries, decreased the early weight loss	[81]
GO GO-PEG RGO-PEG nRGO-PEG	Thickness of 0.94,1.22, 4.43 and 5.66 nm, size of 450, 25, 50 and 27 nm	Balb/c mice	4 mg/kg, intraperitoneal injection 1, 7 and 30 days	Accumulated in the reticuloendothelial (RES) system including liver and spleen over a long time	[31]
GO Graphene quantum dots (GQD)	Thickness of GO, GQD: 0.5–1 nm sizes of GO, GQD: 3–5 nm	Balb/c mice	20 mg/kg intravenous injection or intraperitoneal injection 14 days	GO appeared toxic and caused death GQD revealed no accumulation in organs and caused low cytotoxicity	[176]
Purified graphene oxide (pGO)	Thickness of 1–2 nm, lateral dimension of 100–500 nm	Female C57BL/6 mice	50 µg/animal, intraperitoneal injection 24 h, 7 days,	Induced moderate inflammation and granuloma formation following	[99]
GO	Thickness of 3.9 and 4.05 nm, size of 350 nm and 2 µm	C57BL/6 male mice	Series concentrations, subcutaneous injection 21 days	The micro-size of GO induced much stronger inflammation responses than the nanosized GO	[34]
GO	Size of 1110 to 16 200 nm	C57BL/6 J mice	2 or 20 mg/kg, subcutaneous and intraperitoneal injection	Both GO and a reduction of GO result in immune cell infiltration, uptake, and clearance.	[84]
RGO-iron oxide nanoparticles (rGO-IONP)	Thickness of <10 nm Size of 15.0 ± 2.0 nm	Female Balb/c mice	400 µg, subcutaneous injection,	RGO-IONP can effectively inactivate multiple-drug-resistant bacteria in subcutaneous abscesses	[236]
GO GO-PEG	Thickness of 0.94, 1.22, 4.43 and 5.66 nm, size of 450, 25, 50 and 27 nm	Female balb/c mice	100 mg/kg, Oral administration; 50 mg/kg, intraperitoneal injection, 1, 7 and 30 days	No obvious tissue uptake via oral administration, indicating the rather limited intestinal adsorption of those nanomaterials	[237]
RGO	sizes of small rGO: 87.97 ± 30.83, sizes of large rGO:472.08 ± 249.17 nm	Male C57black/6 mice	60 mg/kg, oral gavage, 5 days	RGO affected general locomotor activity, balance, and neuromuscular coordination, but showed little change in exploratory, anxiety-like, or learning and memory behaviors.	[31]

Toksičnost za notranje organe

Grafen oksid (GO) lahko povzroči akutni vnetni odziv in kronične poškodbe, saj moti normalne fiziološke funkcije pomembnih organov. Poskusi z oralnim dajanjem niso pokazali zaznavne absorpcije GO skozi gastrointestinalni trakt. Zanimivo je, da je **majhen odmerek GO povzročil resne poškodbe prebavil, ko so matere miši pile suspenzijo grafen oksida (GO)**, in ne velik odmerek GO, ker se majhen odmerek GO brez aglomeracije zlahka pritrdi na površino prebavil in povzroči uničenje zaradi obilice ostrih robov. **Grafenski nano delci (GFN) so po enkratni intratrahealni instilaciji (vnosu v sapnik) povzročili vnetje in ostali v pljučih na 90. dan ter se z vdihavanjem samo skozi nos celo prenesle v pljučne bezgavke. Velik odmerek grafen oksida (GO), ki tvori agregate, lahko blokira pljučne krvne žile in povzroči dispnejo, pri visokih koncentracijah 1 in 2 mg/kg telesne teže z intravensko injekcijo pa so opazili trombocite. Grafen oksid naj bi porušil alveolarno-kapilarno pregrado, kar je omogočilo infiltracijo vnetnih celic v pljuča in spodbudilo sproščanje provnetnih citokinov. Fibrozo in vnetje je bilo mogoče preveriti s povečano ravnijo beljakovinskih označevalcev kolagena1, Gr1, CD68 in CD11b v pljučih.**

Uporaba Tweena 80 za dispergiranje nekaj slojnega grafena (FLG) ali pluronske površinsko aktivne snovi za dispergiranje grafena naj bi zmanjšala verjetnost nastanka

pljučne fibroze pri celicah ali miših, medtem ko je bila pljučna fibroza opažena pri suspenziji grafena z govejim serumskim albuminom (BSA). Poleg tega se lahko radioaktivni izotopi dostavijo v pljuča, kar spremlja globinska porazdelitev ^{125}I -NGO v pljučih, izotopi pa se lahko tam odlagajo in povzročijo mutacije in raka. Vendar pa nedavne objave trdijo, da ni očitnih patoloških sprememb pri miših, izpostavljenih majhnim odmerkom grafen oksida in funkcionaliziranega grafena z intravensko injekcijo, vključno z aminiranim grafen oksidom (GO-NH₂), poli(akrilamidom) funkcionaliziranim GO (GO-PAM), poli(akrilno kislino) funkcionaliziranim GO (GO-PAA) in GO-PEG; le GO-PEG in GO-PAA sta povzročila manj toksičnosti kot prvotni grafen oksid »in vivo«. Tako funkcionalne skupine grafenskih nanodelcev (GFN) in delovna koncentracija ali agregatno stanje v veliki meri vplivajo na toksičnost GFN. V zadnjem času se za zmanjšanje toksičnosti GFN običajno uporabljajo načini spreminjanja funkcionalne skupine GFN, zmanjšanja delovne koncentracije ali spremembe agregatnega stanja.

Toksičnost za centralni živčni sistem

Grafen je v veliki meri koristil nevrokirurgiji z uporabo prenosa zdravil/genov za zdravljenje možganskih tumorjev, intrakranialnih in hrbteničnih biokompatibilnih naprav, biosenzorjev in tehnik biološkega slikanja. **Pojavile so se študije o možnostih ali tveganjih zaradi grafena v možganih. Na modelu piščančjega zarodka so grafenski kosmiči zmanjšali raven ribonukleinske kisline (RNA) in hitrost sinteze deoksiribonukleinske kisline (DNK), kar je povzročilo škodljive učinke na razvoj možganskega tkiva, v možganih pa so opazili netipično ultrastrukturo.** Nedavne raziskave grafenskih nanodelcev (GFN) v osrednjem živčevju se večinoma ukvarjajo z uporabo in ne s toksičnostjo. Podatki o študiji toksičnosti GFN so v teku.

Toksičnost za razmnoževalni in razvojni sistem

Grafen je zmanjšal vaskularizacijo srca (število žil, ki oskrbujejo srce) in gostoto razvejanih žil po injiciranju v oplojena kokošja jajca, ki mu je sledila 19-dnevna inkubacija. Grafen oksid in reduciran grafen oksid (rGO) poškodujeta zarodke zebrafinih rib, saj vplivata na hitrost izleganja zarodkov in dolžino telesa v odvisnosti od koncentracije. Čeprav pri izpostavljenih zarodkih zebrafinih rib niso opazili očitnih malformacij ali smrtnosti [102], se je grafen oksid prilepil na horion (mreno, ki obdaja embrio) zarodkov zebrafinih rib in se v njem ovil, kar je povzročilo izrazito hipoksijo (pomanjkanje kisika) in zamudo pri izvalitvi. Agregati grafen oksida so se zadržali v številnih organelih, kot so oči, srce, rumenjaka vrečica in rep zarodkov, na teh območjih pa so opazili apoptozo (programirano celično smrt) in nastajanje reaktivnih kisikovih vrst (ROS).

Grafenski nanodelci (GFN) imajo različne toksikološke učinke na moški ali ženski reproduktivni sistem. Podatki so pokazali, da ima grafen oksid zelo majhne ali skoraj nikakršne toksične učinke na moško razmnoževanje tudi pri velikem odmerku z intraabdominalno injekcijo [66]. Poleg tega reduciran grafen oksid (rGO) ni spremenil ravni estrogena v serumu bregjih samic miši. Pri mišjih samicah je stanje drugačno: mišje matere so lahko po injiciranju rGO pred parjenjem ali med zgodnjo brejostjo rodile zdrave potomce, med legli mater, ki so prejele rGO, pa je bilo le nekaj nenormalnih zarodkov. **Vendar so breje miši imele splave pri vseh odmerkih, večina bregjih miši pa je poginila ob injiciranju visokega odmerka reduciranega grafen oksida (rGO) med pozno brejostjo. Pomembno je, da je bil razvoj potomcev v skupini z visokim**

odmerkom v obdobju laktacije upočasnen. Visok odmerek grafen oksida je z oralno izpostavljenostjo zmanjšal porabo vode pri matičnih miših, kar je zmanjšalo proizvodnjo mleka in tako odložilo razvoj potomcev. Čeprav ugotovitve kažejo, da so GFN potencialno škodljive za razvoj, pa so podatki o strupenosti za razmnoževanje in razvoj še vedno pomanjkljivi. Še vedno so potrebne študije o vplivu GFN na razmnoževanje in razvoj samcev in samic, da bi pojasnili osnovni mehanizem strupenosti.

Vpliv hemokompatibilnosti

sproščanje grafen oksida v kri je neizogibno. Ugotovljeno je bilo, da je hemokompatibilnost grafen oksida odvisna od funkcionalnega premaza in pogojev izpostavljenosti. Grafen oksid s submikronsko velikostjo je povzročil največjo hemolitično aktivnost, medtem ko je agregirani grafen povzročil najnižjo hemolitično reakcijo. Grafen in grafen oksid sta imela hemolitični učinek do 75 µg/mL. Grafen oksid-polietilenimin (GO-PEI) je pokazal izrazito toksičnost z vezavo na HSA že pri 1,6 µg/mL. Karboksilirani grafenov oksid (GO-COOH) je pokazal znatno citotoksičnost do limfocitov T pri koncentracijah nad 50 µg/mL in imel dobro biokompatibilnost pod 25 µg/mL, medtem ko je GO-kitozan skoraj zaviral hemolitično aktivnost [106]. Ustrezno tveganje hemokompatibilnosti je do zdaj ostalo večinoma neznano.

Skratka, poškodbe pljuč, ki jih povzročajo grafenski nanodelci (GFN), so preučevali v več študijah, katerih rezultati so pokazali infiltracijo vnetnih celic, pljučni edem in nastanek granuloma v pljučih. Vendar je bilo le nekaj študij, ki so ocenjevale druge organe, kot so jetra, vranica in ledvice. Simptomi poškodbe, indeks poškodbe in stopnja poškodbe teh notranjih organov pa niso bili v celoti raziskani. Poleg tega so študije o nevrotoksičnosti GFN precej redke; noben podatek ni razkril, na katerih živcih ali možganskih območjih pride do poškodb, prav tako niso bile preučene s tem povezane vedenjske manifestacije. **Toksičnost grafenskih nanodelcev (GFN) za razvoj lahko povzroči strukturne nepravilnosti, zaostanek v rasti, vedenjske in funkcionalne nepravilnosti ter celo smrt.** Študija o strupenosti GFN za razmnoževanje in razvoj bo izredno pomembna in bo v prihodnosti deležna velike pozornosti. Skoraj vse študije toksičnosti GFN so bile kratkotrajni poskusi, **nobena študija pa ni preučevala dolgoročnih kroničnih toksičnih poškodb.** Vendar je na podlagi študij o toksičnosti drugih nanomaterialov dolgoročna izpostavljenost grafenskim nanodelcem (GFN) lahko pomemben dejavnik, ki škoduje zdravju. Zato je potrebna dolgoročna študija GFN.

Toksičnost GFN na celičnih modelih

Citotoksičnost grafenskih nanodelcev (GFN) »in vitro« je bila preverjena v različnih celicah, saj spreminja viabilnost (preživetje) in morfologijo celic, uničuje integriteto membrane in povzroča poškodbe DNK. Grafen oksid ali reducirani grafen oksid (rGO) zmanjšata adhezijo celic, povzročita apoptozo celic (programirano celično smrt) ter vstopita v lizosome, mitohondrije, celična jedra in endoplazmo. Grafenske kvantne pike (GQD) so vstopile v celice in povzročile poškodbe DNK s povečanim izražanjem beljakovin p53, Rad 51 in OGG1 v celicah NIH-3 T3. Vendar pa GQD niso povzročile večje toksičnosti za celične linije človeškega raka dojke (pri odmerku 50 µg/ml) ali človeške nevrnske matične celice (pri odmerku 250 µg/ml). **Derivati grafen oksida so dramatično zmanjšali izražanje diferencialnih genov, ki so odgovorni za strukturo in delovanje celične membrane, kot so regulacija aktinskega citoskeleta, fokalne**

adhezije in endocitoze. V celicah podganjega feokromocitoma (PC12) sta grafen in reduciran grafen oksid (rGO) povzročila citotoksične učinke in poškodbe mitohondrijev, kot so sproščanje laktatne dehidrogenaze (LDH), povečanje aktivacije kaspaze-3 in nastajanje reaktivnih kisikovih vrst (ROS).

Grafen lahko poveča vitalnost celic ali povzroči njihovo smrt, odvisno od celične linije, vrste materiala grafena in odmerka. Citotoksičnost grafen oksida je bila opažena pri človeških fibroblastih in pljučnih epitelijskih celicah pri koncentracijah nad 20 µg/ml po 24 urah, pri koncentracijah nad 50 µg/ml pa je bila pri celicah A549 ugotovljena minimalna toksičnost. V celicah HeLa so se biološki odzivi, ki jih povzroča grafen oksid, kot so reaktivne kisikove vrste (ROS), malondialdehid (MDA) in LDH, povečali, medtem ko se je superoksidna dismutaza (SOD) zmanjšala v odvisnosti od odmerka. Vendar je grafen oksidni-molekularni svetilnik (GO-MB) pokazal nizko citotoksičnost tudi pri 20 µg/mL v celicah HeLa [121]. **Grafen oksid je zmanjšal sposobnost preživetja celic A549, medtem ko sta enaka koncentracija in čas izpostavljenosti povečala sposobnost preživetja celic CaCo2 kolorektalnega karcinoma.** V drugi študiji so poročali, da je GO dramatično povečal diferenciacijo celic SH-SY5Y, kar sta spremljala povečanje dolžine nevrinov in izražanje nevronskega označevalca MAP2 pri nizkih koncentracijah, vendar je GO pri visokih odmerkih (≥ 80 mg/ml) zaviral viabilnost (preživetje) celic SH-SY5Y [123]. Funkcionalizirane prevleke na grafen oksidu, kot sta GO-PEG [124] in GO-chitozan [125], lahko močno zmanjšajo citotoksičnost delcev z zaviranjem interakcij med celicami.

Toksičnost GFN in vitro je povzeta v preglednici 2. Podatki o citotoksičnosti grafenskih nanomaterialov (GFN) so nasprotujoči, na rezultate pa vplivajo različne značilnosti. Podrobno je treba pojasniti mehanizme in dejavnike, ki vplivajo na toksičnost.

Graphene family nanomaterials	Physiochemical properties and Functionalization	Cells	Dose and time incubation	Effects	Reference
Pristine graphene	Thickness of 2–3 nm, size of 500–1000 nm	Murine RAW 264.7 macrophages	5, 10, 20, 40, 80 and 100 µg/mL, 48 h	Depleted of the mitochondrial membrane potential, increased ROS, triggered apoptosis	[83]
Pristine graphene	Thickness of 3–5 nm, size of 100–110 nm	Rat pheochromocytoma cells PC12 cells	10–100 µg/mL 1–48 h	Increased LDH release, ROS levels and caspase3 activation, induced apoptosis	[82]
Graphene oxide(GO)	Four different diameters (342–765 nm)	Human Erythrocytes Human skin fibroblasts CRL-2522	3.125-200 µg/mL 24 h	Hemolytic activity, ROS generation, LDH release, decreased cell viability	[106]
GO	Thickness of 0.9 nm lateral size: s-GO, 160 ± 90 nm; m-GO, 430 ± 300 nm; l-GO, 780 ± 410 nm	Human lung epithelial A549 cells	10, 25, 50, 100 and 200 µg/mL 24 h	Dose-dependent oxidative stress, cell viability decreased at high concentration	[119]
GO	Thickness of 1 nm, lateral dimension of 200–500 nm	Human lung fibroblast cells HLF cells	10–500 µg/mL 2–24 h	Oxidative stress induced, concentration-dependent cytotoxicity and genotoxicity	[148]
GO	Size distribution: 592 ± 10.9 nm in PBS, 1272 ± 56.2 nm in FBS	HeLa cells	0–80 µg/mL 24 h	Released LDH, increased MDA and ROS generation, decreased SOD, reduction of cell viability,	[120]
GO	smaller-sized GO: 50–350 nm intermediate-sized GO: 350–750 nm larger-sized GO: 750–1,300 nm	Macrophage cell J774A.1 THP-1 cells HEK293 cells MEL cells HUT102 cells	20 µg/mL 1-24 h	Size-dependent M1 induction of macrophages, pro-inflammatory responses	[94]
GO	thickness: < 2 nm, lateral size: 450 nm	Mouse CT26 colon carcinoma cell	50–100 µg/mL 18 h	Triggered autophagy, enhances cell death	[206]
Reduced graphene oxide (rGO)	Thickness of 11 ± 4 nm lateral size of 3.8 ± 0.4 µm	Human mesenchymal stem cells (hMSCs)	0.01–100 µg/mL 1–24 h	Induced DNA fragmentations and chromosomal aberrations	[118]

RGO	Thickness of 7 nm lateral size of 40 nm	human liver carcinoma cells (HepG2 cells)	1–200 µg/L 4–72 h	Dose-dependent DNA damage, oxidative stress, cytotoxicity	[31]
RGO	Lateral size of 100–1500 nm	U87 and U118 glioma cell lines	0–100 µg/mL 24 h	Reduction of cell proliferation and cell viability, induced apoptosis	[238]
Bacterially reduced graphene oxide (B-rGO)	Thickness of 4.23 nm average size of 3833 nm	MCF-7 cells	20–100 µg/mL 24–72 h	Increased ROS generation, released LDH, dose-dependent toxicity	[181]
Reduced graphene oxide Nanoribbons (rGONR)	Thickness of 1 nm, length of 10 µm, width of 50–200 nm,	hMSCs	0.01, 0.1, 1.0, 10, 100 µg/mL 96 h	Caused DNA fragmentations and chromosomal aberrations	[239]
Reduced graphene oxide sheets (rGOs)	Thicknesses of ~1.2 nm, lateral sizes of ~2 µm	hMSCs	0.01, 0.1, 1.0, 10, 100 µg/mL 96 h	Caused slight cell membrane damage and cytotoxicity	[239]
Graphene-dextran (GO-DEX)	Thickness of 2.8 nm size of 50–100 nm	HeLa cells	10, 50, 200 µg/L 24, 48, 72 h	GO-DEX remarkably reduced cell toxicity	[91]
GNP-COOH GNP-NH ₂	Thickness of GNP-COOH: 735.9 nm thickness of GNP-NH ₂ : 945.5 nm	Human bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells)	10, 50 mg/L 24 h	Caused single stranded DNA damage, genotoxicity and hypomethylation	[240]
PEG-DSPE (O-GNR-PEG-DSPE)	Width of 125–220 nm, lengths between of 500–2500 nm	HeLa cells NIH-3 T3 cells SKBR3 cells MCF7 cells	10–400 µg/mL 24–48 h	Dose-dependent and time-dependent decrease in cell viability	[138]
PEI-GO, PEG-GO, LA-PEG-GO	Thickness of 1–2 nm lateral width of 100–500 nm	Human lung fibroblast cells	1, 10, 50, 100 µg/ml 24 h	Caused concentration-dependent cytotoxicity and genotoxicity	[15]
PEG-GQD	Sizes of 3–5 nm	HeLa cells and A549 cells	10–160 µg/mL 24 h	No noticeable cytotoxicity	[176]
FBS-GO	Thickness of 4.0–18.0 nm	A549 cells	0–200 µg/mL 24 h	Cytotoxicity of GO was greatly mitigated at 10 % FRC	[166]

Izvor toksičnosti nanomaterialov na osnovi grafena (GFN)

Značilnosti grafena, vključno z njegovo koncentracijo, stransko dimenzijo, površinsko strukturo, funkcionalnimi skupinami, čistostjo in beljakovinsko korono, močno vplivajo na njegovo strupenost v bioloških sistemih [2, 7, 104, 126-129].

Koncentracija

Številni rezultati so pokazali, da grafenski materiali pri živalih in celicah povzročajo toksičnost, odvisno od odmerka, kot so poškodbe jeter in ledvic, nastanek pljučnega granuloma, zmanjšana vitalnost celic in apoptoza celic (programirana smrt). V študijah »in vivo« grafen oksid ni pokazal očitne strupenosti pri miših, ki so bile izpostavljene majhnemu odmerku (0,1 mg) in srednjemu odmerku (0,25 mg), vendar je pri **velikem odmerku (0,4 mg) povzročil kronično strupenost. Visoka vsebnost grafen oksida se je večinoma odlagala v pljučih, jetrih, vranici in ledvicah, ledvice pa so jo z enkratnim vbrzganjem v repno žilo težko očistile.** Zanimivo je, da je povečanje odmerka povzročilo dramatično zmanjšanje jetrnega privzema ter vendar povečanje pljučnega privzema grafen oksida (s-GO) z intravensko injekcijo, ker je visok odmerek GO potencialno presešel nasičenost privzema ali izčrpal maso plazemskih opsoninov, ki so posledično zavirali jetrni privzem. Poleg tega je študija in vitro pokazala, da 20 µg/ml grafen oksidnih nanodelcev ni pokazalo citotoksičnosti pri A549 v 2 urah inkubacije, vendar **je višja koncentracija (85 µg/ml) v 24 urah zmanjšala vitalnost celic na 50 %.** Tudi Lü in sod. so dokazali, da grafen oksid pri nizkih koncentracijah 96 ur ni imel očitne citotoksičnosti v celični liniji človeškega nevroblastoma SH-SY5Y, **vendar se je vitalnost celic po tretiranju s 100 mg/mL GO v 96 urah inkubacije močno zmanjšala na 20 %.** Rezultati pri celicah HeLa, NIH-3 T3 in celicah raka dojke (SKBR3, MCF7), obdelanih z grafenovimi nanooblogami, so prav tako pokazali od odmerka (10–400 mg/ml) in časa (12–48 h) odvisno zmanjšanje viabilnosti (preživetja) celic. **Vse večje koncentracije grafen oksida vstopajo v lizosome, mitohondrije, endoplazmo in celično jedro. Več podatkov je pokazalo, da je reduciran grafen oksid (rGO) pri manjšem odmerku in zgodnji časovni točki povzročil celično smrt, posredovano z apoptozo, vendar je z večanjem časa/doziranja prevladovala nekroza.**

Nanodelci z velikostjo < 100 nm lahko vstopijo v celico, < 40 nm lahko vstopijo v jedro, manjši od < 35 nm pa lahko prečkajo krvno-možgansko pregrado. Ena od študij je pokazala, da grafen oksid (588, 556, 148 nm) ni vstopil v celice A549 in ni imel očitne citotoksičnosti. **Kadar je premer grafena med 100 ~ 500 nm, lahko najmanjša velikost povzroči najhujšo toksičnost, kadar pa je premer pod 40 nm, so najmanjše velikosti lahko najvarnejše.** Na primer, reduciran grafen oksid (rGO) s premerom 11 ± 4 nm lahko vstopi v jedro hMSC in povzroči kromosomske aberacije in fragmentacijo DNK pri zelo nizkih koncentracijah 0,1 in 1,0 mg/ml v 1 h. Vendar lističi rGO s premerom $3,8 \pm 0,4$ nm po 24 h niso pokazali opazne genotoksičnosti v hMSC tudi pri visokem odmerku 100 mg/ml [118].

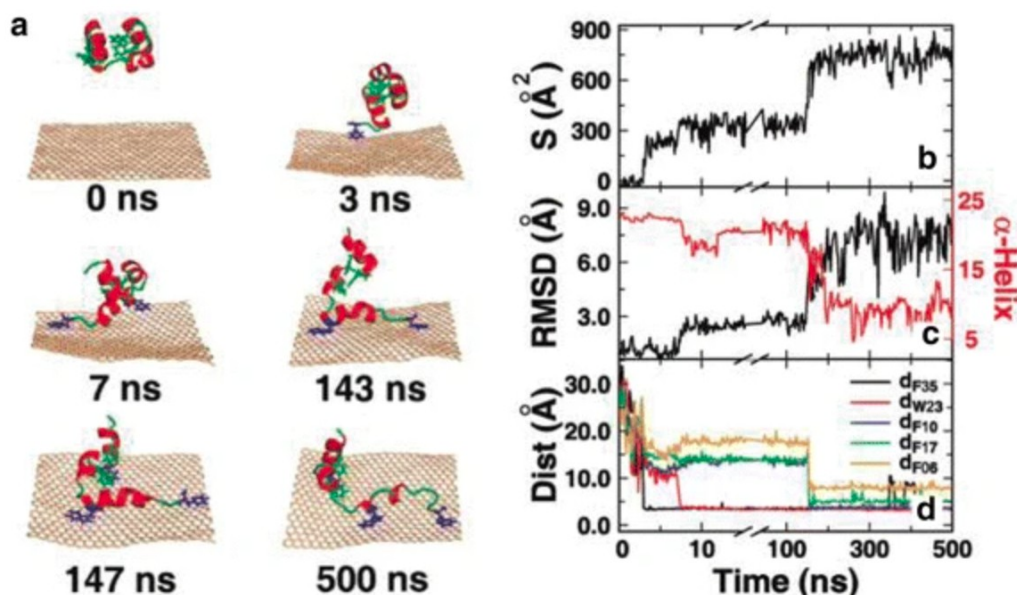
V študiji »in vivo« se je s-GO (100-500 nm) prednostno kopičil v jetrih, medtem ko se je l-GO (1-5 μ m) nahajal predvsem v pljučih, ker je l-GO tvoril večje GO-proteinske komplekse, ki so jih po intravenozni injekciji filtrirale pljučne kapilare [31]. Glede na relativno stransko velikost (205,8 nm, 146,8 nm in 33,78 nm) treh nanodelcev GO pri enaki koncentraciji je pri manjših delcih grafen oksida absorpcija v celicah Hela veliko večja kot pri večjih delcih grafen oksida. **Zaradi velikega privzema s-GO se je spremenilo mikrookolje celic in posledično povzročilo največjo izgubo sposobnosti preživetja in najhujši oksidativni stres med tremi velikostmi vzorcev grafen oksida.** Posledično je ena od študij opredelila, da grafen oksid glede na velikost povzroča M1 polarizacijo makrofagov in pro-vnetne odzive »in vitro« in »in vivo«. Večji delci grafen oksida so imeli močnejšo adsorpcijo na plazemsko membrano z manjšo fagocitozo, kar je povzročilo močne interakcije s TLR in aktiviralo poti NF- κ B (nekrozo) v primerjavi z manjšimi grafen oksidnimi lističi, ki so jih celice bolj verjetno sprejele. Za nadaljnje odkrivanje podrobnega mehanizma, na katerem temeljijo ti učinki, je potrebnih več študij, ki bodo ponazorile ključni mehanizem stranske velikosti grafenovih materialov.

Površinska struktura

Grafenski nanodelci (GFN) imajo imajo zelo različne kemijske lastnosti površine. Na primer, prvotna površina grafena je hidrofobna, površina grafen oksida je delno hidrofobna s karboksilatnimi skupinami, reduciran grafen oksid (rGO) pa ima vmesno hidrofilnost. **Opazili so, da grafenski nanodelci (GFN) motijo delovanje in strukturo celičnih membran in proteinov verjetno zaradi izjemno močnih molekularnih interakcij s celicami.** Reduciran grafen oksid (rGO) se je na primer vezal na celične membrane, stimuliral receptorje in aktiviral mitohondrijske poti ter povzročil apoptozo (programirano celično smrt). Omejeni dokazi so pokazali, da je grafen oksid manj strupen od reduciranega grafen oksida (rGO) zaradi visoke vsebnosti kisika, bolj gladkih robov in hidrofilnih lastnosti prve vrste. Zaradi različnih površinskih oksidacijskih stanj grafen oksida in reduciranega grafen oksida (rGO) bi lahko grafen oksid z različno hidrofilnostjo celice HepG2 zlahka internalizirale in sprejele. Nasprotno pa bi se rGO z očitno hidrofobnostjo lahko adsorbiral in združeval na celičnih površinah brez (ali z manjšim) privzemom. Zaradi močnih interakcij π - π zlaganja je grafen zelo sposoben razbiti številne ostanke proteina, zlasti aromatske, kot so vilinska glavnica (HP), F10, W23 in F35. **Sekundarne in terciarne strukture proteina v veliki meri ležijo na površini grafena, kar moti strukturo in delovanje proteina (slika 2).** Poleg tega se lahko grafen oksid vstavi med bazne pare dvoverižne DNK in moti pretok genetskih

informacij na molekularni ravni, kar je lahko eden glavnih vzrokov za mutageni učinek grafen oksida.

Fig. 2



Slika 2

Reprezentativna trajektorija adsorpcije beljakovine HP35 na grafen. (a) Reprezentativni posnetki v različnih časovnih točkah. Beljakovine so prikazane v karikaturah z rdečo vijačnico in zeleno zanko, grafen pa je prikazan kot mreža. Aromatski ostanki, ki tvorijo interakcije π - π zlaganja, so prikazani z modro, drugi so prikazani z zeleno. (b) Površina stika beljakovine HP35 z grafenom. (c) RMSD HP35 od njegove nativne strukture in število ostankov v strukturi vijačnice α . Tu so sekundarne strukture določene s programom DSSP. (d) Razdalja med grafenom in aromatskimi ostanki, vključno s F35, W23, F10, F17 in F06. Za jasnejši prikaz procesa adsorpcije je bila os x skrajšana in premerjena. [41] Avtorske pravice (2011), z dovoljenjem Journal of Physical of Chemistry

Električni naboj grafen oksida

Številne študije so poudarile pomen površinskega naboja grafen oksida, saj lahko vpliva na mehanizem internalizacije in privzema celic. **Internalizacija grafen oksida je bila v nefagocitnih celicah zanemarljiva, kar je verjetno posledica močnega elektrostatskega odrivanja med negativno nabitim grafen oksidom in celično površino. Vendar so drugi predlagali, da se negativno nabiti nanodelci lahko internalizirajo v nefagocitne celice z vezavo na razpoložljiva kationska mesta na celični površini in da jih prevzamejo čistilni receptorji. Delci grafen oksida naj bi povzročili morfološke spremembe in znatno lizo, kar vodi do visoke hemolize v rdečih krvničkah (RBC). Razdejanje membrane rdečih krvnih celic je verjetno posledica močnih elektrostatskih interakcij med negativno nabitimi kisikovimi**

skupinami na površini grafen oksida in pozitivno nabitimi fosfatidilholinskimi lipidi na zunanji membrani rdečih krvnih celic.

Funkcionalizacija

Študije so potrdile, da funkcionalizacija s skupinami PEG (poli-etilen glikola), s PEG-olizinom (PLL), poli(ϵ -kaprolaktonom), polivinilalkoholom, pluronom, aminom, karboksilom in dekstranom močno zmanjša toksičnost in izboljša biokompatibilnost grafena. Rezultati »in vivo« so pokazali, da se je po podkožnem vbrziganju hidrogela GO-Pluronic pojavilo le blago kronično vnetje, po intravenskem vbrziganju GO-DEX pa ni bilo opazne kratkoročne toksičnosti. PEG-ilirani GS pri miših, ki so bile 3 mesece izpostavljene 20 mg/kg, ni povzročil opazne toksičnosti, kar so ocenili z biokemičnimi in histološkimi preiskavami krvi, pokazal pa je tudi razmeroma nizko zadrževanje v RES. Prevlaka grafen oksida s hitozanom je skoraj odpravila hemolitično aktivnost v krvi. Poleg tega je prevleka PEG učinkovito ublažila akutne poškodbe tkiva, ki jih je povzročil grafen oksid, zmanjšala agregacijo in zadrževanje grafen oksida v jetrih, pljučih in vranici ter pospešila odstranjevanje grafen oksida, GO-DEX in fluoriranega grafenskega oksida (FGO).

Op. prev.: Polietilen glikol PEG je močan alergen in 50% vseh alergij v ZDA imajo ljudje, ki imajo alergijo na PEG, ki lahko povzroči smrt zaradi anafilaktičnega šoka. Konec opombe

»In vitro« je več testov delovanja celic pokazalo jasne dokaze, da je površinska funkcionalizacija prvotnega grafena ali grafen oksida odločilna za zmanjšanje močnih toksičnih učinkov. PEG-GO, PEI-GO in LA-PEG-GO so poškodovali celice človeških pljučnih fibroblastov manj kot grafen oksid. PEG-GO pri koncentracijah do 100 $\mu\text{g/ml}$ ni pokazal citotoksičnosti za več celičnih kultur, kot so celice glioblastoma (U87MG), celice raka dojke (MCF-7), celice človeškega raka jajčnikov (OVCAR-3), celice raka debelega črevesa (HCT-116) in limfoblastoidne celice (RAJI). Pegilirane grafenske kvantne pike (GQDs-PEG) so pokazale zelo majhno toksičnost ali je sploh niso pokazale proti celicam pljučnega raka in raka materničnega vratu tudi pri zelo visokih koncentracijah (200 $\mu\text{g/ml}$). Ker pa gre za biološko nerazgradljiv material z velikim potencialom za celično internalizacijo, so potrebne nadaljnje raziskave za oceno morebitnih dolgoročnih škodljivih učinkov funkcionaliziranega grafena.

Agregacije in sedimentacija

Po poročilih so nanomateriali nagnjeni k oblikovanju agregatov in ne posameznih enot, zlasti pod fiziološkimi pogoji. Površine GS so v primerjavi z grafen oksidom omogočale pritrnitev manjšega števila krvnih telesc, GS pa je imel manjšo hemolitično aktivnost za tvorbo več vodnih agregatov. Nasprotno pa sta hitra sedimentacija in tvorba agregatov GS močno ovirala dostopnost hranil celicam človeških kožnih fibroblastov, ki so rasle na dnu vdolbinic. Agregacije in sedimentacija delcev grafena imajo torej različne učinke na različne celice.

Nečistoče

Čistost nanomaterialov je pomemben dejavnik, saj so lahko preostale, onesnažujoče kovine odgovorne za opaženo toksičnost in ne sam nanomaterial, zaradi česar so si podatki o citotoksičnosti grafenskih nanodelcev (GFN) nasprotujoči. Tradicionalno

pripravljen grafen oksid pogosto vsebuje visoke vsebnosti Mn^{2+} (pozitiven ion mangana) in Fe^{2+} (pozitiven ion železa), ki sta zelo mutageni za celice. Nespecifično sproščanje teh ionov iz tradicionalno pripravljene grafen oksida lahko povzroči nenavadno visoke ravni citotoksičnosti in lomljenje DNK. Zlasti Peng in drugi so izdelali grafen oksid visoke čistosti, ki vsebuje le 0,025 ppm Mn^{2+} in 0,13 ppm Fe^{2+} , Hanene in drugi [162] pa so iznašli novo metodo za pripravo enoslojnih grafen oksidnih lističev visoke čistosti z dobro vodno disperzijo in koloidno stabilnostjo. Grafen oksid, proizveden s temi novimi metodami, ni povzročil pomembnih citotoksičnih odzivov (pri izpostavljenosti odmerkom do 100 $\mu g/ml$) in vitro, prav tako ni bilo opaziti očitnega vnetnega odziva ali nastanka granuloma (pri izpostavljenosti odmerkom do 50 $\mu g/\text{žival}$) »in vivo«. Zato si čistost grafenskih nanodelcev (GFN) zasluži pozornost in je pomemben korak k določitvi GFN, ki se uporabljajo v bioloških aplikacijah.

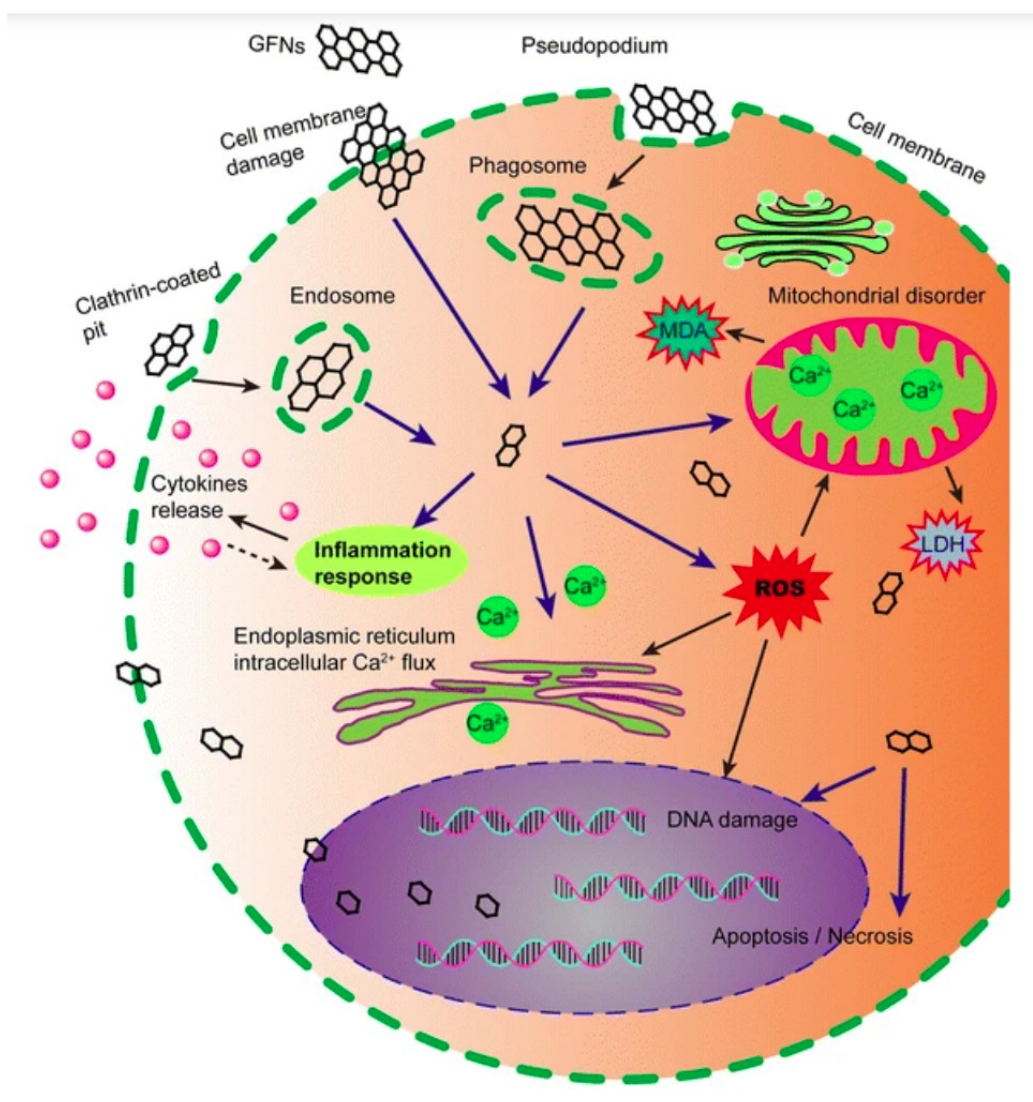
Učinek beljakovinske korone grafen oksida

Zaradi velikega prostega površinskega naboja lahko nanomateriali zlahka tvorijo "korone" z beljakovinami v bioloških sistemih. Proteinska korona naj bi vplivala na kroženje, porazdelitev, izločanje in toksičnost nanodelcev. V več člankih so poročali, da grafen oksid tvori GO-proteinske korone z adsorbiranimi plazemskimi proteini v serumu in da imajo te GO-proteinske korone pomembno vlogo pri odločanju o usodi biokinetičnega obnašanja grafen oksida in vivo. Take grafen oksidne-GO-proteinske korone lahko uravnavajo adhezijo grafen oksida na endotelijske in imunske celice s specifičnimi in nespecifičnimi interakcijami. V osnovi imunoglobulin G (IgG) in proteini komplemента v beljakovinski koroni pomagajo reorganizirati nanodelce v imunskih celicah, kar povzroči, da delce absorbirajo RES, grafen oksid, prevlečen z IgG, pa je bil prevzet s specifičnimi ali nespecifičnimi interakcijami z receptorji celične membrane. Vendar je bilo v neki drugi študiji ugotovljeno, da se **grafen oksid ni mogel neposredno prilepiti na epitelne celice sluznice v črevesnem traktu, potem ko so miši z mladiči popile vodno raztopino grafen oksida, ker so se obilne beljakovine v mleku adsorbirale na površino grafen oksida in tako zavirale njihovo neposredno interakcijo z epitelnimi celicami sluznice.** Beljakovinska korona je ublažila citotoksičnost grafen oksida z omejevanjem njegove fizične interakcije s celično membrano in zmanjšanjem morfoloških poškodb celic v celicah HeLa, THP-1 in A549. Citotoksični učinek se je močno zmanjšal, če je bil grafen oksid predhodno prevlečen s FBS in inkubiran s celicami; skoraj ~ 90 % preživetje je bilo opaženo pri 100 $\mu g/ml$ GO, prevlečenega s FBS, in 100 % preživetje pri 20 $\mu g/ml$ GO, prevlečenega s FBS. Podobni trendi so bili opaženi pri grafen oksidu, prevlečenem z BSA. Skladno s tem lahko dodaten serum nevtralizira toksičnost čistega grafen oksida v celicah J774.A1 v odmerku 4 $\mu g/ml$, kar je povzročilo 52,5-odstotno zmanjšanje števila celic v primerjavi z neobdelanimi celicami.

Po pregledu številnih študij lahko sklepamo, da na toksičnost grafena vpliva več dejavnikov. Ti dejavniki so se združili in v mnogih primerih močno spremenili toksičnost grafenskih nanodelcev (GFN). Znanstvene študije pogosto zahtevajo jasno opredelitev vzroka in posledice, pri čemer mora biti vedno različen le en dejavnik, tako da je mogoče določiti učinek tega posameznega dejavnika. Vendar je bilo v nekaterih dokumentih hkrati proučenih več dejavnikov, ki vplivajo na toksičnost GFN, kar je privedlo do zmedenih rezultatov.

Možni mehanizmi toksičnosti grafenskih nanodelcev (GFN)

Čeprav so nekatere fizikalno-kemijske lastnosti in strupenost grafenovih nanodelcev (GFN) dobro preučili številni znanstveniki, ostajajo natančni mehanizmi strupenosti GFN nejasni. Shematski prikaz glavnih mehanizmov citotoksičnosti GFN je prikazan na sliki 3.



Slika 3

Shematski diagram na sliki 3 je prikazal možne mehanizme citotoksičnosti grafenskih nanodelcev (GFN). **Grafenski nanodelci vstopajo v celice po različnih poteh, kar povzroča nastajanje reaktivnih kisikovih vrst (škodljivih prostih radikalov ROS), povečanje mitohondrijske laktat-dehidrogenaze (LDH) in malat-dehidrogenaze (MDA) ter sproščanje kalcijevih kationov (Ca^{2+}).** Nato grafenski nanodelci povzročijo različne poškodbe celic, na primer poškodbe celične membrane, vnetje, poškodbe DNK, mitohondrijske motnje, apoptozo (programirano celično smrt) ali nekrozo (odmiranje tkiva).

Fizično uničenje

Grafen je v primerjavi z drugimi sferičnimi ali enodimenzionalnimi nanodelci edinstven nanomaterial zaradi svoje dvodimenzionalne strukture s sp^2 -ogljikovi. Fizikalna interakcija

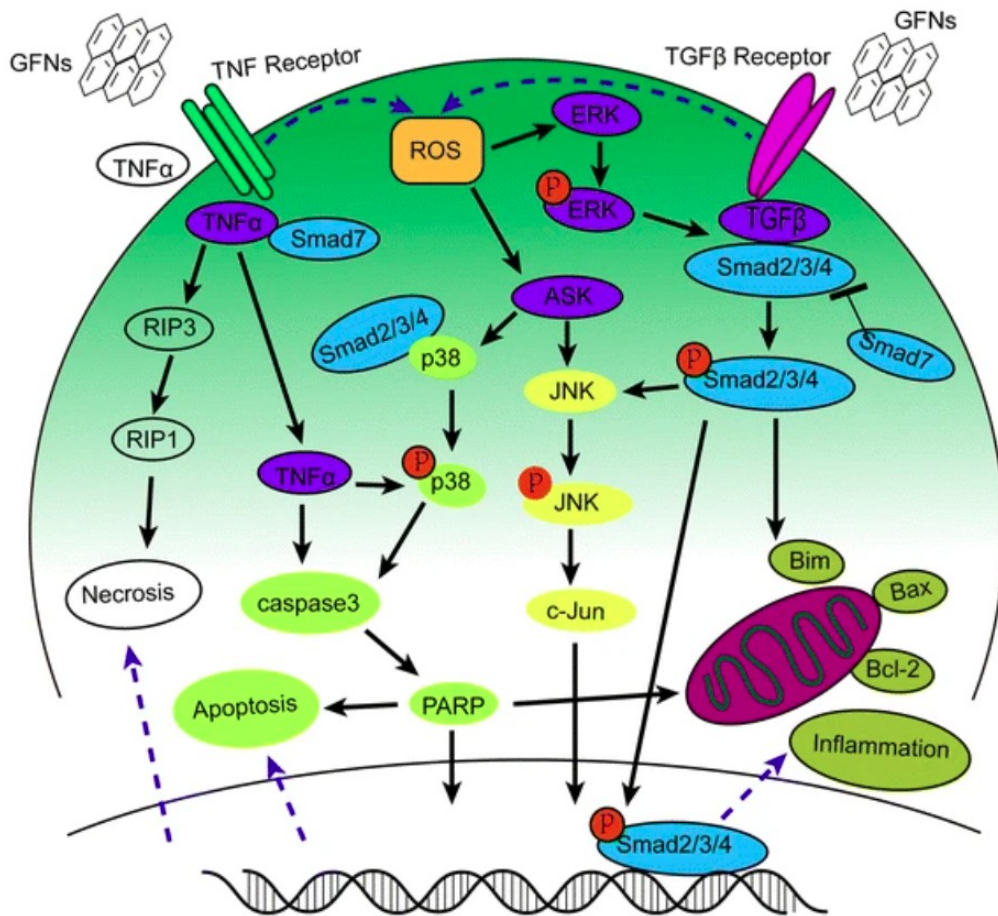
nanodelcev grafena s celičnimi membranami je eden glavnih vzrokov citotoksičnosti grafena [7, 170, 171]. Grafen ima zaradi ugodne ukrivljenosti površine veliko sposobnost vezave z α -helikalnimi strukturami peptidov [172]. Pri koncentraciji nad 75 $\mu\text{g/mL}$ se je neokrnjen grafen v veliki meri oprijel površin celic RAW 264.7 in povzročil nenormalno raztezanje celične membrane [104]. Močne hidrofobne interakcije GFN s celično membrano vodijo do morfološke razširitve F-aktinovitih filopodij in motenj v delovanju citoskeleta. Poleg tega lahko ostri robovi GNS delujejo kot "rezila", ki vstavljajo in režejo bakterijske celične membrane [173]. Poleg tega je GO neposredno poškodoval tudi zunanjo membrano bakterij *E. coli*, kar je povzročilo sproščanje znotrajceličnih sestavin [173]. Vendar pa je slikanje TEM pokazalo, da predhodno prekrivanje GO s FBS odpravi uničevanje celičnih membran [166].

Proizvodnja reaktivnih kisikovih vrst (ROS), ki povzroča oksidativni stres

Do oksidativnega stresa pride, ko naraščajoče ravni reaktivnih kisikovih vrst (ROS) presežejo aktivnost antioksidativnih encimov, vključno s katalazo, SOD ali glutation peroksidazo (GSH-PX). ROS delujejo kot drugi glasniki v številnih znotrajceličnih signalnih kaskadah in povzročajo celične makromolekularne poškodbe, kot so razpad membranskih lipidov, fragmentacija DNK, denaturacija beljakovin in motnje v delovanju mitohondrijev, ki močno vplivajo na celični metabolizem in signalizacijo. Interakcije grafen oksida s celicami lahko privedejo do prekomernega nastajanja ROS, kar je prvi korak v mehanizmih kancerogeneze, staranja in mutogeneze.

Oksidativni stres je imel pomembno vlogo pri akutni poškodbi pljuč zaradi grafen oksida, vnetni odzivi, ki jih povzroča oksidativni stres, pa so se pogosto pojavili ob izpostavljenosti grafenskimi nanodelcem. Aktivnost SOD in GSH-PX se je po izpostavljenosti grafen oksida zmanjšala v odvisnosti od časa in odmerka. **Podobno je bil oksidativni stres ključni vzrok apoptoze in poškodb DNK po izpostavljenosti celic HLF grafen oksidu.** V celicah, obdelanih z neokrnjenim grafenom, se je zaradi nastajanja ROS sprožila tako mitogensko aktivirana proteinska kinaza (MAPK) (JNK, ERK in p38) kot tudi signalne poti, povezane s TGF- β , kar je spremljala aktivacija Bim in Bax, ki sta proapoptotična člana družine beljakovin Bcl-2. Posledično so se aktivirali kaspaza-3 in njeni nadaljnji efektorski proteini, kot je PARP, ter sprožili **apoptozo** (programirano celično smrt). Podrobne informacije o signalnih poteh, povezanih z MAPK-, TGF- β - in TNF- α , ki povzročajo **vnetje, apoptozo in nekrozo**, so povzete na sliki 4.

Fig. 4



Slika 4

Shematski prikaz MAPK, TGF-beta in TNF- α odvisnih poti, ki so vključene v toksičnost GFN. ROS je bil glavni dejavnik, ki je aktiviral signalne poti MAPKs in TGF-beta, kar je povzročilo aktivacijo Bim in Bax ter sprožilo kaskado kaspaz in pot JNK. Aktivacija kaspaze 3 in RIP1 je povzročila **apoptozo in nekrozo**.

Poškodbe mitohondrijev

Mitohondriji so centri za proizvodnjo energije, vključeni v različne signalne poti v celicah in so tudi ključna točka regulacije apoptoze [83]. Po izpostavljenosti GO in karboksil grafenu (GXYG) se je mitohondrijska membrana depolarizirala, količina mitohondrijev v celicah HepG2 pa se je zmanjšala [180]. Izpostavljenost GFN je povzročila znatno povečano vezano in nevezano mitohondrijsko porabo kisika, razkroj mitohondrijskega membranskega potenciala in končno sprožitev apoptoze z aktivacijo mitohondrijske poti [181]. GO je na primer povečal aktivnost mitohondrijskih elektronskih transportnih kompleksov I/III in dovajanje elektronov na mesto I/II elektronske transportne verige, kar je pospešilo nastajanje ROS med mitohondrijskim dihanjem v celicah MHS [99]. Nastajanje -OH, ki ga posredujeta GO in sistem prenosa elektronov citokrom-c/H₂O₂, lahko okrepi oksidativni in toplotni stres, ki poslabša sistem mitohondrijskega dihanja in na koncu povzroči dramatično toksičnost [151]. Poleg tega bi lahko kisikovi deli na GO sprejemali elektrone iz celičnih redoks proteinov, kar bi podpiralo redoks cikel citokroma c in proteinov

za prenos elektronov, citokromi MtrA, MtrB in MtrC/OmcA pa bi lahko sodelovali pri prenosu elektronov na GO [182]. Zato lahko GFN poleg poškodb plazemske membrane in indukcije oksidativnega stresa povzročijo apoptozo in/ali celično nekrozo z neposrednim vplivom na mitohondrijsko aktivnost celic [183, 184].

Poškodbe DNK

Zaradi svoje majhne velikosti, velike površine in površinskega naboja ima lahko grafen oksid pomembne genotoksične lastnosti in povzroča hude poškodbe DNK, na primer kromosomsko fragmentacijo, prekinitve verig DNK, točkovne mutacije ter oksidativne adukte in spremembe DNK.

Pri miših so opazili mutagenozo po intravenski injekciji grafen oksida v odmerku 20 mg/kg v primerjavi s ciklofosamidom (50 mg/kg), klasičnim mutagenom. Čeprav grafen oksid ne more vstopiti v jedro celice, lahko še vedno sodeluje z DNK med mitozo, ko jedrska membrana razpade, kar poveča možnost za aberacije DNK. Zaradi interakcije π -stacking med ogljikovimi obroči grafena in hidrofobnimi baznimi pari DNK lahko segment DNK "stoji" ali "leži" na površini grafena s pravokotno oziroma vzporedno osjo vijačnice. Medmolekulske sile močno deformirajo končne bazne pare DNK, kar lahko poveča genotoksičnost. GO lahko povzroči tudi kromosomsko fragmentacijo, adukte DNA in točkovne mutacije s spodbujanjem oksidativnega stresa ali sprožitvijo vnetja z aktivacijo znotrajceličnih signalnih poti, kot so MAPK, TGF- β in NF- κ B. Grafen in reduciran grafen oksid (rGO) lahko tudi povečata izražanje p53, Rad51 in MOGG1-1, ki odražajo kromosomske poškodbe, ter zmanjšata izražanje CDK2 in CDK4 z zaustavitvijo prehoda celičnega cikla iz faze G1 v fazo S v različnih celičnih linijah. **Poškodbe DNK lahko ne le sprožijo razvoj raka, temveč tudi morda ogrozijo zdravje naslednje generacije, če se mutageni potencial grafen oksida pojavi v reproduktivnih celicah, kar vpliva na plodnost in zdravje potomcev.**

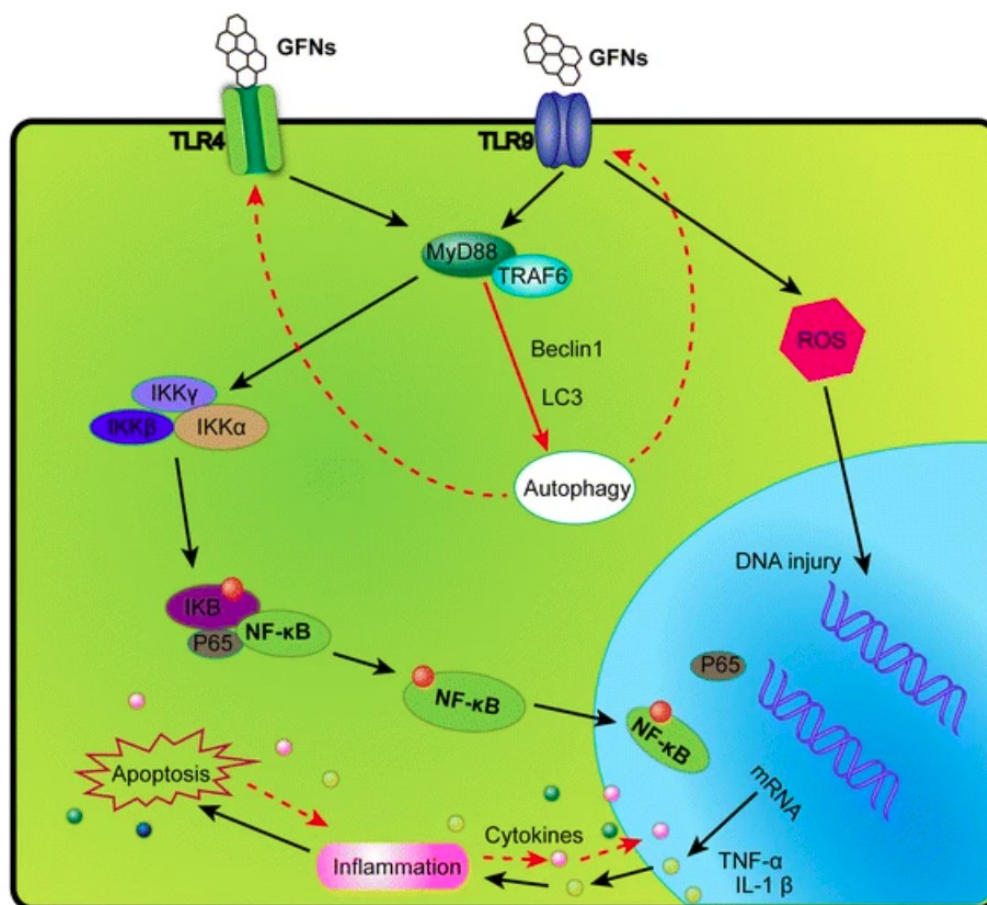
Vnetni odziv

Grafen oksidovi nanodelci lahko z intratrahealno instilacijo (vnos v sapnik) ali intravenskim dajanjem v velikih odmerkih povzročijo pomemben vnetni odziv, vključno z infiltracijo vnetnih celic, pljučnim edemom in nastankom granuloma. Trombociti so pomembne sestavine pri nastajanju strdkov, ki med vnetnim odzivom napadajo patogene in trdne delce, grafen oksid pa lahko po intravenskem injiciranju neposredno aktivira nastajanje trombov, bogatih s trombociti, ki zaprejo pljučne žile.

Močan vnetni odziv je povzročila podkožna injekcija grafen oksida za 21 dni, skupaj z izločanjem ključnih citokinov, vključno z IL-6, IL-12, TNF- α , MCP-1 in IFN-g. Grafen oksidni nanodelci lahko sprožijo vnetni odziv in poškodbo tkiva s sproščanjem citokinov in kemokinov, ki vodijo v rekrutiranje krožečih monocitov in spodbujajo izločanje citokinov Th1/Th2 in kemokinov. Poleg tega neokrnjen grafen in reduciran grafen kisik (rGO) povzročita vnetni odziv z vezavo na receptorje TLR in aktivirata signalno pot NF- κ B v celicah. Signalno kaskado NF- κ B sprožijo receptorji TLR in pro-vnetni citokini, kot sta IL-1 in TNF- α . Po aktivaciji se NF- κ B premakne iz citoplazme v jedro, olajša vezavo razgradljivega I κ B in deluje kot transkripcijski faktor za sintezo številnih pro-vnetnih

citokinov [194]. Na sliki 5 je prikazana shema signalne poti TLR4 in TLR9, ki jo aktivirajo grafenski nanodelci.

Fig. 5



Slika 5: Shematski diagram, ki pojasnjuje signalno pot TLR4 in TLR9, odgovorno za citotoksičnost, ki jo povzročajo grafenski nanodelci (GFN). GFN lahko prepoznajo receptorje TLR in s tem aktivirajo IKK in IκB z mehanizmom, odvisnim od MyD88, kar povzroči sproščanje podenot NF-κB in sproži premestitev v jedro. Tako se pro-vnetni dejavniki prepisujejo in izločijo iz jedra ter modulirajo imunske odzive, ki sprožijo programirano **avtofagijo, apoptozo in nekrozo**

Apoptoza

Apoptoza je opredeljena kot samouničenje celice, ki ga uravnavajo geni z zapletenimi programi. Grafen oksid in reducirani grafen oksid (rGO) sta po vdihavanju povzročila apoptozo in vnetje v pljučih miši, grafenski nano delci pa so imeli tudi proapoptotične učinke na celice. Poleg tega sta grafen in grafen oksid fizično poškodovala celične membrane, povečala permeabilizacijo zunanje mitohondrijske membrane in spremenila mitohondrijski membranski potencial; povečane reaktivne kisikove vrste (ROS) so sprožile signalne poti MAPK in TGF-β ter aktivirale kaspazo-3 prek mitohondrijsko odvisnih apoptotičnih kaskad in spodbudil izvedbo apoptoze. Podobno je reducirani grafen oksid (rGO) povzročil apoptozo pri majhnem odmerku in v zgodnjem časovnem obdobju, ki sta jo sprožila receptor smrti in kanonična mitohondrijska pot [110]. Druga študija je pokazala tri različne poti apoptoze z grafenskimi nanodelci: grafen oksid je povzročil apoptozo, odvisno od reaktivnih

kisikovih vrst (ROS), z neposredno interakcijo z receptorji za beljakovine in poznejšo aktivacijo poti limfoma-2 (Bcl-2); GO-COOH je prenesel pasivni signal apoptoze na jedrno DNK z vezavo na receptorje za beljakovine in aktivacijo poti, neodvisne od ROS; GO-PEI pa je močno poškodoval membrane limfocitov T in sprožil apoptozo [105, 197].

Avtofagija

Avtofagija je proces samouničenja celičnih sestavin in je v zadnjem času prepoznana kot neapoptotična celična smrt. Za aktivacijo avtofagije je potrebna tvorba avtofagosomov, ki vsebujejo Beclin 1, številne beljakovine, povezane z avtofagijo (ATG), z mikrotubuli povezano beljakovino lahka veriga 3 (LC3) in p62. Kopičenje avtofagosomov je povezano z izpostavljenostjo različnim nanodelcem, avtofagija pa lahko odstrani zunajcelične organizme in uniči organizme v citosolu. Pokazalo se je, da grafen oksid in grafenske kvantne pike (GQD) povzročajo kopičenje avtofagosomov in pretvorbo LC3-I v LC3-II; zavirajo razgradnjo avtofagičnega substrata proteina p62. Poleg tega lahko grafen oksid hkrati sproži odzive TLR4 in TLR9 v makrofagih in celicah raka debelega črevesa CT26. Pot avtofagije je povezana s fagocitozo prek signalizacije TLR v makrofagih.

Nekroza

Nekroza je alternativna oblika celične smrti, ki jo povzročijo vnetni odzivi ali celične poškodbe. Izpostavljenost celic neokrnjenemu grafenu povzroči apoptozo in nekrozo pri velikih odmerkih (50 mg/ml). Poroča se, da uhajanje laktat dehidrogenaze (LDH) in odpiranje mitohondrijske prehodne permeabilnostne pore, ki ju povzroči povišana raven citoplazemskega Ca²⁺, povzročita apoptozo/nekrozo. Ugotovljeno je bilo, da zdravljenje z grafen oksid povzroči nekrozo makrofagov z aktiviranjem signalizacije TLR4 in nato delno sproži avtokrino proizvodnjo TNF- α . Grafen oksid v kombinaciji s CDDP (GO/CDDP) sproži nekrozo z zmanjšanjem beljakovin RIP1 in povečanjem RIP3, kar spremlja sproščanje visoko gibljive skupine B1 (HMGB1) v citosol iz jedra in iz celic CT26.

Epigenetske spremembe

Epigenetika vključuje metilacijo DNK, genomski imprinting, materinske učinke, utišanje genov in urejanje RNK. Metilacija DNK, ki je ena najboljše raziskanih epigenetskih modifikacij, vključuje fosforilacijo, ubikvitinacijo in ATP-ribozilacijo ter lahko vodi do preoblikovanja kromatina. V nedavnem članku so poročali, da je izpostavljenost SL-GO/FL-GO povzročila globalno hipermetilacijo DNK z regulacijo genov DNMT3B in MBD1; zdravljenje z grafenskimi nanodelci je povzročilo hipometilacijo z zmanjšanjem izražanja genov DNMT3B in MBD1. Grafen oksid lahko aktivira pot regulacije miRNA-360 za zaviranje signalne kaskade poškodb DNK-apoptoze z vplivom na komponento CEP-1 [218]. **Ti podatki skupaj kažejo, da bi lahko grafenski nanodelci (GFN) z modulacijo epigenetskih sprememb povzročili subtilne spremembe v programiranju izražanja genov.** Vendar je študij o epigenetskih spremembah, ki jih povzročajo GFN, malo, epigenetski mehanizem, ki ga povzroča izpostavljenost GFN, pa ni povsem razumljen.

Za zaključek naj povemo, da so številne študije obravnavale reprezentativne mehanizme toksičnosti grafenski nanodelcev, ki vključujejo štiri signalne poti: TLR, TGF- β , TNF- α in MAPK. Te štiri signalne poti so korelativne in navzkrižno modulacijske, zaradi česar so vnetni odziv, avtofagija, apoptoza in drugi mehanizmi

neodvisni, a hkrati povezani med seboj. Poleg tega se zdi, da ima oksidativni stres najpomembnejšo vlogo pri aktiviranju teh signalnih poti. V študijah toksičnosti drugih nanomaterialov je bilo ugotovljeno, da se apoptoza, avtofagija in nekroza prepletajo, v nekaterih pogojih se medsebojno zavirajo ali spodbujajo. Vendar so signalne poti toksičnosti GFN, raziskane v dosedanjih člankih, le majhen del zapletene mreže, zato je treba mrežo signalnih poti v prihodnosti podrobno raziskati.

Vrzeli v podatkih in prihodnje študije

Literatura trenutno ne zadošča za sklepanje o morebitnih nevarnostih grafenskih nanodelcev. Začeli sta se pojavljati dve nasprotujoči si mnenji: nekateri raziskovalci so v številnih študijah, osredotočenih na biomedicinske aplikacije, predlagali, da so grafenski materiali biokompatibilni [119, 154, 162, 219], druge študije pa so poročale o škodljivih bioloških odzivih in citotoksičnosti [32, 118, 135, 138, 192]. Ti nedosledni rezultati so lahko posledica več dejavnikov, vključno z različnimi raziskovalnimi skupinami, različnimi celičnimi ali živalskimi modeli in različnimi fizikalno-kemijskimi značilnostmi grafenskih nanodelcev (GFN). Pri raziskovanju uporabe GFN v človeškem telesu in vivo ali drugih biomedicinskih aplikacijah je treba upoštevati biokompatibilnost, zato so potrebne podrobnejše in natančnejše študije toksičnosti GFN.

Prvič, podrobna fizikalno-kemijska opredelitev je nujna v vseh prihodnjih študijah toksičnosti grafenski nanodelcev. V poskusih morajo opisi lastnosti GFN vključevati njihovo velikost, morfologijo, površino, naboj, površinske modifikacije, čistost in aglomeracijo. Ker ti fizikalno-kemijski dejavniki v veliki meri vplivajo na toksičnost in biokompatibilnost GFN, je treba upoštevati enofaktorske eksperimentalne načrte in izključiti druge moteče dejavnike. Navesti bi bilo treba tudi podrobnosti o postopku izdelave, saj lahko nastali oksidativni ostanki med funkcionalizacijo v veliki meri spremenijo površinsko strukturo grafena in grafen oksida. Pomembno je, da je treba na področju tehnologije grafena vzpostaviti enotno, univerzalno metodo, ki bo omogočila boljšo primerjavo podatkov iz različnih študij ali različnih laboratorijev.

Drugič, različna merila opazovanja, parametri in izbira eksperimentalnih metod lahko povzročijo velika medlaboratorijska odstopanja. Na primer, test MTT vedno ne uspe natančno napovedati toksičnosti grafena, ker spontana redukcija povzroči lažno pozitiven signal. Zato je treba uporabiti ustrezne alternativne ocene, kot so vodotopen reagent tetrazolijeve soli (WST-8), test reaktivnih kisikovih vrst (ROS) in izključitveni test s tripan modrim. Poleg tega kometni test pogosto pokaže višje ravni poškodb DNK kot mikronukleusni test, ker prvi meri popravljivo poškodbo, drugi pa gensko poškodbo, ki ostane po delitvi celice. Zato je potrebna previdnost pri izbiri najprimernejšega testa za ocenjevanje toksičnosti grafenovih materialov, da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom.

Tretjič, izbira celičnih linij je bistvenega pomena, saj so rakave celične linije običajno občutljive ali odporne glede na njihovo genetsko ozadje. Isti nanodelci grafena lahko povzročijo različne reakcije glede na različno poreklo celic. Uporabiti je treba ustrezne celične linije z dobro stabilnostjo, da bi se izognili lažno pozitivnim ali negativnim rezultatom. Primarne celice, pridobljene iz ljudi ali živali, lahko bolje simulirajo zdravstvene pogoje ljudi. Za testiranje toksičnosti drugih nanomaterialov je bilo uporabljenih veliko primarnih celic, vendar je gojenje primarnih celic v dosedanjih poskusih z grafenskimi nanodelci (GFN) izjemno redko. Za celovito oceno fizikalno-kemijskih lastnosti in

toksičnosti GFN je treba izvesti različne celične poskuse v kombinaciji s primarnimi celicami.

Četrta, način dajanja GFN ima zelo pomembno vlogo pri študijah toksičnosti, različne metode dajanja pa povzročijo različne toksikološke reakcije. Zato je treba način in obdobje izpostavljenosti skrbno izbrati glede na cilj študije. Za preučevanje nevrotoksičnosti nanomaterialov se pogosto uporablja nosna dostava zdravil, vendar je bila ta metoda vnosa redko uporabljena pri preskušanju toksičnosti GFN. Toksikološke študije GFN v živčnem sistemu so redke, mehanizem pa je nejasen in ga je treba v prihodnosti še dodatno preučiti. Nedavne toksikokinetične študije, ki vključujejo absorpcijo, porazdelitev, presnovo, kopičenje in izločanje GFN po različnih poteh izpostavljenosti, so prinesle nekaj rezultatov, vendar še zdaleč ne zadostujejo za razjasnitev notranjih zapletenih mehanizmov. Potrebne so na primer nadaljnje študije za razumevanje posebnih molekularnih mehanizmov prehajanja GFN skozi fiziološke ovire in količine kopičenja ali obdobja izločanja GFN v tkivih. Poleg tega je zaradi večje izpostavljenosti ljudi GFN v prihodnjih študijah nujna ocena sistemske toksičnosti v človeškem telesu.

Peta, drugo pomembno vprašanje, ki zahteva pozornost, je dolgoročna usoda GFN, potem ko vstopijo v telo ali jih sprejmejo celice. **Večina nedavnih študij je obsegala ocene kratkoročne toksičnosti, dolgoročnim toksičnim poškodbam pa od široke uporabe grafenskim nanodelcem (GFN) leta 2008 ni bilo posvečeno veliko pozornosti.** Poleg tega lahko funkcionalizirana površina grafena izboljša njegovo biokompatibilnost, vendar je treba upoštevati dolgoročno stabilnost površinskih prevlek. Če površinske prevleke sčasoma razpadejo, se lahko njihova toksičnost bistveno razlikuje od rezultatov kratkoročne izpostavljenosti. Potrebne so razširjene študije, da se ugotovi, ali daljši čas obdelave vpliva na nanotoksični potencial GFN.

Šesta, odkriti in pojasniti je treba bolj specifične signalne poti v mehanizmu toksičnosti GFN. Trenutno je bilo prikazanih in splošno sprejetih več tipičnih mehanizmov toksičnosti GFN, kot so oksidativni stres, apoptoza in avtofagija. Vendar so bili ti mehanizmi opisani le na splošno, posebne signalne poti znotraj teh mehanizmov pa je treba podrobno raziskati. Signalne poti, ki so vključene v toksičnost drugih nanomaterialov, so lahko pomembne tudi za preučevanje GFN. Zato je treba v prihodnjih raziskavah odkriti več signalnih poti. V številnih študijah nanomaterialov je bila na primer upoštevana nanoepigenetika, ki je prav tako koristna pri ocenjevanju omejene toksičnosti in stranskih učinkov GFN. **Nedavne študije so pokazale, da lahko grafenski nanodelci (GFN) povzročijo epigenetske in genomske spremembe, ki lahko spodbudijo fizikalno toksičnost in rakotvornost.** GFN imajo veliko površino, gladke neprekinjene površine in biološko obstojnost, kar je podobno lastnostim tumorigenih polprevodniških vsadkov. Ni znano, ali imajo GFN potencial za povzročanje sarkomov tujih teles, zato je treba čim prej izvesti dokončne študije o tumorskih potencialih ali tveganjih grafena.

Zaključki

V zadnjih nekaj letih se grafenski nanodelci (GFN) pogosto uporabljajo na številnih tehnoloških in biomedicinskih področjih. Trenutno se večina poskusov osredotoča na toksičnost GFN v pljučih in jetrih. Zato si študije poškodb možganov ali nevrotoksičnosti v prihodnosti zaslužijo več pozornosti. Številni poskusi so pokazali, da imajo GFN toksične stranske učinke v številnih bioloških aplikacijah, vendar je nujno potrebna poglobljena študija mehanizmov toksičnosti. Poleg tega je treba z učinkovitimi eksperimentalnimi

metodami in sistematičnimi študijami obravnavati nasprotujoče si rezultate glede toksičnosti GFN. Ta pregled vsebuje pregled toksičnosti GFN s povzetkom toksikokinetike, mehanizmov toksičnosti in vplivnih dejavnikov ter je namenjen zagotavljanju informacij, ki bodo v prihodnosti olajšale temeljite raziskave o hemokinetiki in biokompatibilnosti GFN »in vitro« ter »in vivo«. Ta pregled bo pripomogel k reševanju varnostnih vprašanj pred klinično in terapevtsko uporabo GFN, kar bo pomembno za nadaljnji razvoj GFN v bioloških aplikacijah.

