

# Graphen: sicher oder toxisch?

Alberto Bianco\*

Graphen · Kohlenstoffmaterialien ·  
Materialwissenschaften · Nanotoxizität

Prof. Maurizio Prato zum  
60. Geburtstag gewidmet

**G**raphen wird als bahnbrechendes Material der Zukunft angesehen. Für seine weitere Entwicklung ist nun die Beurteilung des Sicherheitsprofils und des Einflusses auf die menschliche Gesundheit von größter Bedeutung. Graphen gehört zu einer größeren Familie von Nanomaterialien, die als Graphenfamilie („graphene family nanomaterials“ GFNs) bezeichnet wird. Es sind verschiedene Formen von Graphen bekannt, deren biologische Wirkungen mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften der jeweiligen Strukturen korreliert werden müssen. Einige *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien zeigten keine besonderen Risiken auf, während andere auf mögliche gesundheitsgefährdende Eigenschaften von GFNs hinweisen. Dieser Kurzaufsatz soll die aktuellen Studien über die Toxizität von GFNs kritisch diskutieren, um die möglichen Risiken für ihre zukünftige Entwicklung in den Material- und Biowissenschaften abzuschätzen.

## 1. Einleitung

Das Kohlenstoffallotrop Graphen wird als einzelne Schicht von monokristallinem Graphit definiert, in der die Kohlenstoffatome mit  $sp^2$ -Hybridisierung angeordnet sind. In den bahnbrechenden Arbeiten von Novoselov und Geim<sup>[1]</sup> ist das enorme Anwendungspotenzial des Graphens in den Materialwissenschaften aufgezeigt worden.<sup>[2]</sup> Auch in der Biomedizin findet Graphen großes Interesse, z. B. als Komponente für Biosensoren, im Gewebe-Engineering und im Wirkstofftransport.<sup>[3-6]</sup> Eine Roadmap für Graphen mit zukünftigen Entwicklungsrichtungen auf den Gebieten der Elektronik, Photonik, Verbundmaterialien, Energieerzeugung und -speicherung, Sensoren, Meteorologie und Biomedizin wurde kürzlich vorgeschlagen.<sup>[7]</sup>

Prinzipiell kann die Entwicklung neuer Nanotechnologien nicht von der Erforschung der Nanomaterialsicherheit abgekoppelt werden. Wie alle neuen Nanomaterialien ist auch Graphen nicht frei von möglichen Risiken für die menschliche Gesundheit und die Umwelt. Daher kann Graphen, dessen Herstellung auf größerem Maßstab bereits begonnen hat, im Sinne einer verantwortungsvollen Verwendung nicht von derartigen Untersuchungen ausgeschlossen

werden. Bevor aber vom „Teufel“ gesprochen wird, muss geklärt werden, welchen Grad an Toxizität Graphen überhaupt erreichen könnte und was der Grad an gewünschter Sicherheit ist. Das Klären der Sicherheits- und Toxizitätsfragen ist nicht nur für die Integration in neue Kompositmaterialien, z. B. für die Nanoelektronik, von Bedeutung, sondern auch für mögliche biomedizinische Anwendungen, an denen aktuell geforscht wird. Das biomedizinische Potenzial von Graphen und anderen Graphen-abgeleiteten Materialien wurde bereits in aktuellen Übersichten behandelt.<sup>[8,9]</sup> Über den Einfluss von Graphen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt liegen aber nur beschränkte Informationen in der Literatur vor.<sup>[10-14]</sup>

Dieser Kurzaufsatz behandelt den aktuellen Stand der Toxizitätsstudien über Graphen und verwandte Materialien, einschließlich Graphenoxid (GO), reduziertes Graphenoxid (rGO), Graphen mit wenigen Schichten, Graphen-Nanoblätter und -Flocken, Graphenbänder und -punkte, die gemeinsam als Nanomaterialien der Graphenfamilie (GFNs) bezeichnet werden. Da die Graphenfamilie so verschiedene Mitglieder mit verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften umfasst, ist ihr toxikologisches Profil noch wenig verstanden und muss daher weiter untersucht werden. Aus den verfügbaren Daten entwickelt sich ein Bild mit verschiedenen Wirkungen, die eng mit der speziellen Beschaffenheit des entsprechenden Graphens verknüpft sind. Wir versuchen, diese Wirkungen mit den Merkmalen der untersuchten Graphene zu korrelieren, mit dem Ziel, die verfügbaren Daten zu rationalisieren und das Ergebnis in den Zusammenhang der möglichen zukünftigen Anwendungen, insbesondere auf dem biomedizinischen Gebiet, zu setzen. Es liegt auf der Hand, dass chemische Modifikationen von Graphen dessen toxikologische Wirkungen modulieren, wie

[\*] Prof. A. Bianco

CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire  
Laboratoire d'Immunopathologie et Chimie Thérapeutique  
15 Rue René Descartes, 67084 Strasbourg (Frankreich)  
E-Mail: a.bianco@ibmc-cnrs.unistra.fr

es auch für Kohlenstoff-Nanoröhren gefunden wurde.<sup>[8,9,15]</sup> Dies ist günstig für die Entwicklung solcher Nanomaterialien für die Biomedizin. Die aktuelle Beobachtung einer möglichen biologischen Abbaubarkeit von GO ist ein weiterer günstiger Aspekt, der aber noch genauer zu untersuchen ist.<sup>[16]</sup> Mit der Entwicklung der Graphenproduktion auf dem Großmaßstab, der Zunahme seiner Verwendung und der Verfügbarkeit auf dem Markt wird es auch notwendig, die Exposition unter Realbedingungen abzuschätzen und den gesamten Lebenszyklus des Materials zu erfassen.

## 2. Nanomaterialien der Graphenfamilie

Graphen gehört zu einer größeren Familie, die als GFNs bezeichnet wird. Graphen wird in verschiedenen Formen beobachtet, und für die Zuordnung toxischer Wirkungen zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften jedes Mitglieds müssen auch die Unterschiede zwischen den Mitgliedern der Familie verstanden werden. GFNs umfassen Einzelschicht-Graphen, Graphen mit wenigen Schichten (2–10 Graphenschichten), GO (gewöhnlich eine Einzelschicht), rGO (gewöhnlich eine Einzelschicht), Graphen-Nanoblätter, ultrafeinen Graphit (mehr als 10 Schichten, aber Dicken unter 100 nm), Graphenbänder und Graphenpunkte. Abbildung 1 zeigt die chemische Struktur einiger GFNs.

Innerhalb jeder dieser Formen sind vielfältige Strukturen möglich. Beispielsweise sind bei GO der Typ, der Grad und die Position der oxygenierten Gruppen, die bei dem Vorgang der Graphit-Exfoliation eingeführt werden, außerordentlich schwer auf der molekularen Ebene zu beschreiben.<sup>[17]</sup> Die Vorgänge bei der Umwandlung von GO unter reduzierenden Bedingungen sind noch schwerer zu verstehen.<sup>[18,19]</sup> Können wir die intakte graphitische Ebene wiederherstellen? Werden einfach nur die sauerstoffhaltigen Gruppen eliminiert? Werden diese Funktionen durch die Reduktionsmittel ersetzt? Alle diese Fragen werden gegenwärtig untersucht. Die genaue Beschreibung der verschiedenen Graphenformen ist aber notwendig, um ihre biologischen Wirkungen aufzuklären und mit der Struktur des Materials zu korrelieren.

Zudem kann eine einzelne Graphenschicht verschiedene Flächenabmessungen aufweisen, wobei kleine Graphenflocken ebenso möglich sind wie große Graphenblätter, die 10 bis 100  $\mu\text{m}^2$  erreichen können (Abbildung 2). Die Analyse dieses Parameters ist auch für die Bewertung der Toxizitätsrisiken von GFNs außerordentlich wichtig.



Alberto Bianco promovierte 1995 an der Universität Padua. Er war Gastwissenschaftler an den Universitäten Lausanne (1992), Tübingen (Alexander-von-Humboldt-Stipendiat; 1996–1997) und Padua (1997–1998). Gegenwärtig ist er Forschungsdirektor am CNRS Strasbourg. Seine Forschungen gelten der Funktionalisierung von Kohlenstoff-Nanomaterialien für therapeutische und diagnostische Anwendungen und deren Auswirkungen auf Gesundheit und Umwelt.

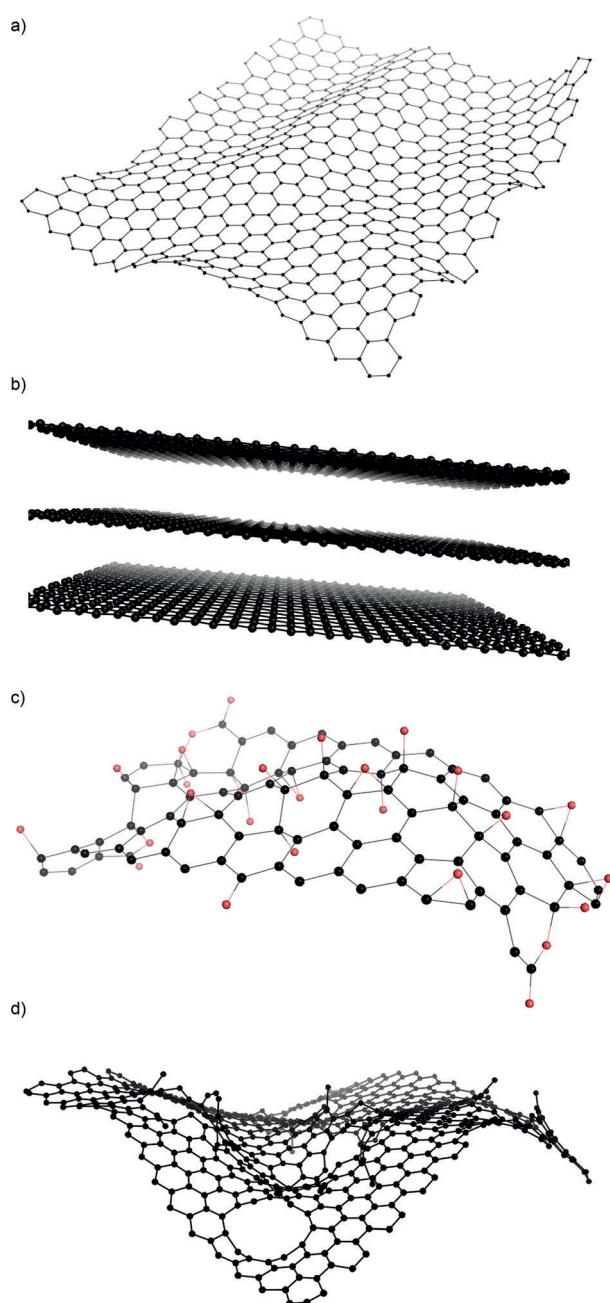
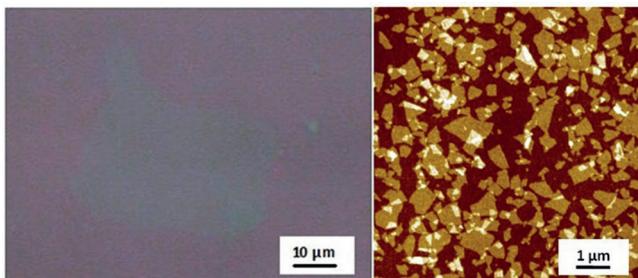
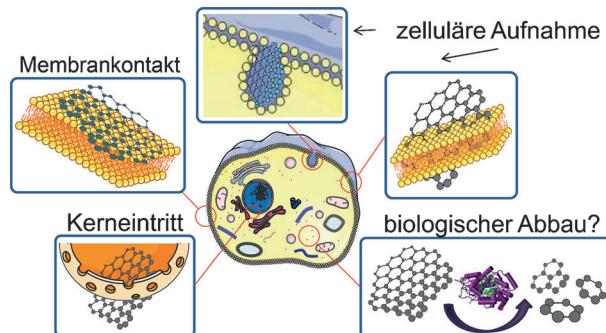


Abbildung 1. Repräsentative chemische Strukturen einiger GFNs:  
a) Graphen, b) Graphen mit wenigen Schichten, c) Graphenoxid (O-Atome rot) und d) reduziertes Graphenoxid.

Einige Untersuchungen widmen sich der Beurteilung der toxischen Wirkungen von GFNs *in vitro* und *in vivo*. Bei einigen der Studien wurden keine besonderen Risiken gefunden, während andere auf gesundheitsgefährdende Eigenschaften der Materialien hinweisen. Einer der Hauptexpositionsweges des Menschen ist die Inhalation. Einige GFNs haben eine aerodynamische Größe, die zu Inhalation und Absetzen in den Atemwegen führen können, mit möglichen Folgen der Entstehung von Granulomen und Lungenfibrose.<sup>[20]</sup> Die biologische Antwort variiert abhängig von der Anzahl der Schichten, der lateralen Größe, der Steifigkeit, der Hydrophobie, der Oberflächenfunktionalisierung, der



**Abbildung 2.** Optische (links) und AFM-Aufnahmen (rechts) von Graphenoxid, das durch Schleuderbeschichtung auf eine Siliciumoxid-Oberfläche aufgetragen wurde (Bildnachweis: Vincenzo Palermo und Emanuele Treossi).



**Abbildung 3.** Mögliche Wechselwirkungen von GFNs: mit der Plasmamembran, während der Zellaufnahme, mit der Kernmembran und im Zytosoma, in dem Abbau erfolgen kann.

verabreichten Dosis und der Reinheit des Materials.<sup>[11–14]</sup> Über die möglichen Unterschiede des biologischen Verhaltens zwischen großen und kleinen Graphenblättern oder zwischen Graphen mit wenigen Lagen und solchem mit vielen Lagen ist nur wenig bekannt. Dies ist ein potenziell interessantes Thema, das eine gründliche Analyse verdient. In den nächsten Abschnitten werden wir die wichtigsten Ergebnisse in Hinblick auf weitere Studien, die im Zusammenhang der Sicherheit von GFNs ins Auge gefasst werden können, vorstellen und kritisch diskutieren. Die aktuellen Arbeiten sind weder umfassend noch decken sie alle Aspekte der Auswirkungen von Graphenen auf die Gesundheit ab. Die meisten der verfügbaren Studien behandeln GO und rGO. Dies liegt wohl an der besseren Löslichkeit/Dispergierbarkeit in Wasser und unter physiologischen Bedingungen gegenüber den anderen GFNs. Die Parameter, die bei diesen Untersuchungen berücksichtigt worden sind, umfassen Typ und Qualität des Materials (das Vorhandensein von Verunreinigungen könnte zu falsch positiven Ergebnissen führen), der Typ von Zellen, die Dosen (der Konzentrationsbereich erstreckt sich von 0.01 bis 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), die Inkubationsdauer und bei Tierversuchen den Verabreichungsweg. In den meisten Fällen sind die Prüfdosen, die mit einer potenziellen Gefahr in Verbindung gebracht werden können, höher als die Konzentrationen von Nanomaterialien, die im Allgemeinen für therapeutische, Bildgebungs- oder diagnostische Zwecke verwendet werden.

### 3. In-vitro-Wirkungen von GFNs

Bei Studien über den Einfluss neuer Materialien auf lebende Systeme wird im Allgemeinen das erste Screening auf der Zellebene durchgeführt, liefert also eine In-vitro-Beurteilung möglicher zytotoxischer Wirkungen. Was geschieht nun, wenn GFNs in Kontakt mit Zellen kommen? Es kann vermutet werden, dass sie, wenn sie die richtige Größe haben, über verschiedene Mechanismen internalisiert werden können (siehe unten). Sobald es sich im Inneren der Zelle befindet, könnte das Material aus subzellulären Kompartimenten austreten, im Zytosoma wandern und in den Kern gelangen. Zudem könnten GFNs oxidativen Abbau erfahren (Abbildung 3). Neben einem mechanistischen Verhalten können GFNs einen gewissen Grad an Zytotoxizität zeigen.

Die folgenden Beispiele erläutern die biologischen Wirkungen von GFNs und die möglichen Mechanismen, die zu unerwünschten Wirkungen führen.

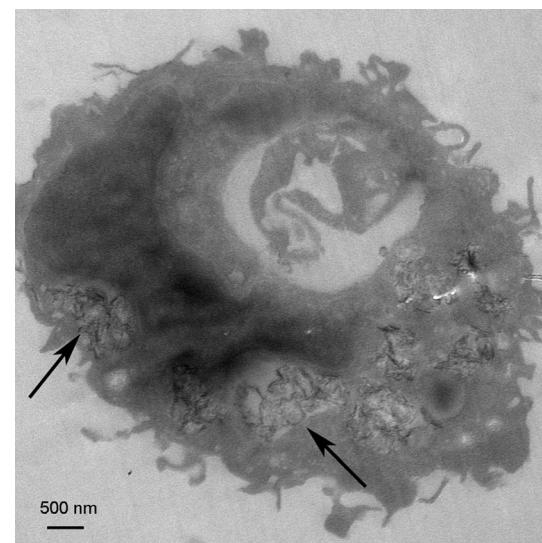
Bei einer ersten Vergleichsstudie wurden Graphen und einwandige Kohlenstoff-Nanoröhren in einem Konzentrationsbereich von 0.1 bis 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  an neuronalen PC12-Zellen der Ratte geprüft (Tabelle 1).<sup>[21]</sup> Beide Materialien zeigten eine dosisabhängige Zytotoxizität. Bei kleinen Konzentrationen ( $< 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) induzierte Graphen eine stärkere metabolische Wirkung als einwandige Nanoröhren. Bei den höheren Konzentrationen war das Verhalten umgekehrt. Ferner wurde bei Graphen ein hoher oxidativer Stress beobachtet, bei dem konzentrations- und zeitabhängig reaktionsfähige Sauerstoffspezies entstanden. Caspase-3-Aktivierung wies auf den Beginn eines apoptotischen Vorgangs hin. Der Vergleich von Graphen mit Kohlenstoff-Nanoröhren zeigte, dass die Morphologie des Materials eine wichtige Rolle spielt. Diese Studie ergab ein Zytotoxizitätsprofil von Graphen mit einem oxidativen Potenzial, das von der Zell-expositions-dosis abhängt. Bei einer weiteren Studie wurden GO (unpassend als unbehandeltes Graphen, „pristine graphene“, bezeichnet) und carboxyliertes GO (GO, das einer milden Säurebehandlung unterzogen wurde, um mehr COOH-Gruppen anzufügen) mit 10 bis 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  an A-fenriennenzellen geprüft.<sup>[22]</sup> Während sich GO hauptsächlich an der Zellmembran akkumulierte und zu einer wesentlichen Destabilisierung der F-Actin-Ausrichtung führte, wurde das stärker hydrophile carboxylierte GO von den Zellen internalisiert und akkumulierte im perinukleären Bereich, bis zu der größten geprüften Dosis (300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ohne die Morphologie des Zytoskeletts zu beeinträchtigen. Für beide Nanomaterialien wurde keine zu Nekrose führende physische Schädigung der Zellmembran beobachtet, eine Erhärtung der Hypothese, dass ein anderer Apoptosemechanismus, vermutlich mit intrazellulärem Stress, der programmierten Zelltod auslöst, zur Zytotoxizität beiträgt. Besondere Aufmerksamkeit ist für die Definition des Materials erforderlich, das in diesen Studien behandelt wurde, da „pristines Graphen“ eigentlich GO entsprach, was zu Unstimmigkeiten beim Vergleichen des zytotoxischen Verhaltens der Materialien führen könnte. Kürzlich wurde auch die Lokalisierung von mit Polyethylenglycolamin modifiziertem GO in F-Ac-

tinfilamenten beschrieben.<sup>[23]</sup> Bei einer Konzentration von  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  wurden Veränderungen des Zellzyklus, Apoptose und oxidativer Stress beobachtet. Bei ähnlichen Studien wurde gezeigt, dass die Zytotoxizität von GO und oxidierten Graphen-Nanobändern (im Bereich  $10\text{--}400 \mu\text{g mL}^{-1}$  geprüft) stark vom Zelltyp und den Zellkulturbedingungen abhängen kann.<sup>[24\text{--}26]</sup>

In Verbindung mit der Entdeckung der antibakteriellen Aktivität von GO (siehe Abschnitt 5) und der Möglichkeit, diese Eigenschaft für die Behandlung von Erkrankungen des Auges zu nutzen, wurden bei einer interessanten Untersuchung Ergebnisse über die intraokuläre Bioverträglichkeit dieses Materials beschrieben.<sup>[27]</sup> Der Einfluss von GO auf Morphologie, Viabilität (Lebensfähigkeit), Membranintegrität und Apoptose wurde an menschlichen Retinapigment-Epithelzellen untersucht. Nur nach Langzeitkultur wurden Veränderungen von Viabilität und Morphologie der Zellen beobachtet.

In weiteren Studien zur Wirkung von GO auf Zellviabilität und zelluläre Antworten wurden Schichten mit verschiedenen lateralen Größen (350 nm und 2  $\mu\text{m}$ ) geprüft. Von sechs verschiedenen mit GO kultivierten Zelllinien konnten nur die beiden phagozytischen Zelllinien sowohl nanometergroßes als auch mikrometergroßes GO internalisieren.<sup>[28]</sup> Bezuglich der Zellviabilität wurden bei Dosen bis zu  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  GO (der größten geprüften Dosis) nur kleine Unterschiede beobachtet. Das Vorhandensein von Mangan als Verunreinigung in den Proben durch ungenügende Reinigung während des Oxidationsverfahrens zur Herstellung von GO führte dagegen zu hoher Zellmortalität. Dieses Ergebnis zeigt die Bedeutung der Reinigungsschritte, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, die fälschlicherweise mit einer unerwünschten Wirkung des geprüften Nanomaterials in Verbindung gebracht werden könnten. Die Aufnahme durch Makrophagen wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen 2 und  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$  untersucht. Die Zellinternalisierungskinetik zeigte eine identische intrazelluläre Akkumulation von GO mit 350 nm und GO mit 2  $\mu\text{m}$  nach 24 h. Zur Aufklärung der großenunabhängigen Aufnahme wurden die Mechanismen der Zellpenetration analysiert. Diese Analyse zeigte klar, dass die ersten Zellwechselwirkungen der beiden GOs unterschiedlich sind (das GO mit 350 nm GO wurde von den aktiven Filopoden von Makrophagen umwickelt, während das GO mit 2  $\mu\text{m}$  GO beinahe senkrecht in die Zellmembran eintrat) und dass die intrazelluläre Lokalisierung von der Größe bestimmt wurde, was zu unterschiedlicher Kompartimentalisierung führte. Sobald sich das GO innerhalb der Zelle befand, bildete das größere GO mit 2  $\mu\text{m}$  Falten und neigte zu einem gewissem Maß zur Faltung zu Lysosomen mit Sequestrierung. Nach der Internalisierung wurde beobachtet, dass die größeren GO-Flocken eine viel stärkere entzündliche Antwort mit hoher Freisetzung von Schlüsselzytopen induzierte. Diese Ergebnisse sind außerordentlich interessant, da das unterschiedliche Verhalten der beiden Typen von GOs in anderen biomedizinischen Zusammenhängen genutzt werden kann. Die unerwartete Hochregulierung der Zytokine durch mikrometergroßes GO kann beispielsweise als Hilfswirkung bei Impfstoffsystemen genutzt werden, um schwache Immunantworten zu aktivie-

ren. Das niedrige Entzündungsprofil von nanometergroßem GO kann für Anwendungen bei der Krebstherapie günstig sein, bei der verbesserte Bioverträglichkeit gewünscht wird. Bei einer ähnlichen Untersuchung wurden C2C12-Zellen (mesenchymale Progenitorzellen der Maus) mit Protein-BSA-überzogenem GO unterschiedlicher Größen behandelt, um die Aufnahmemechanismen aufzuklären.<sup>[29]</sup> GO mit lateralen Abmessungen von 500 nm wurde durch Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert, während größere Blätter (etwa 1  $\mu\text{m}$ ) durch Phagozytose aufgenommen wurden. Für beide Typen von Graphen wurde bis  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  nur eine sehr geringe Hemmung der Zellproliferation beobachtet. Abbildung 4 zeigt ein in unserem Labor durchgeführtes Beispiel der GO-Aufnahme durch peritoneale Makrophagen der Maus.



**Abbildung 4.** GO wird von peritonealen Maus-Makrophagen internalisiert. Die Pfeile markieren in Phagosomen vorhandene GO-Blätter.

Die Studie an Makrophagen wurde auch auf pristines Graphen erweitert, das in 1% Pluronic F108 dispergiert war.<sup>[30]</sup> Maus-Makrophagen, die mit Graphenkonzentrationen zwischen 20 und  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  behandelt wurden, durchliefen eine dosisabhängige Apoptose über einen Mechanismus mit einer Abnahme des mitochondrialen Potenzials und einer Zunahme von reaktionsfähigen Sauerstoffspezies (ROS). Das Identifizieren verschiedener Mechanismen, die Makrophagen-Apoptose auslösen, ist außerordentlich nützlich und liefert wichtige Informationen für die Entwicklung möglicher Strategien zum Steuern von programmiertem Zelltod, der von Graphen induziert wird. Mit GO inkubierte Maus-Makrophagen (Maximaldosis  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) konnten auch Autophagie und mit Toll-artigem Rezeptor (TLR) verbundene entzündliche Antworten auslösen.<sup>[31]</sup> Es ist interessant, dass Autophagie von Zellen genutzt wird, um endogene Moleküle zu beseitigen, und weist auf einen möglichen Weg hin, der von Zellen zum Räumen von internalisierten graphenbasierten Materialien eingesetzt wird. Neben Makro-

phagen sind dendritische Zellen (DCs) eine weitere Klasse von wichtigen Immunzellen. DCs sind wichtig, da sie T-Zellen-vermittelte Immunität und Immuntoleranz induzieren und aufrechterhalten. Mit GO behandelte (im Konzentrationsbereich  $1\text{--}25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) DCs waren in ihrer funktionellen Aktivität beeinträchtigt.<sup>[32]</sup> Die DC-Antigen-Präsentation wurde durch GO gehemmt. Diese Veränderung war mit einer Abregulierung der intrazellulären Spiegel einer für die Antigen-Verarbeitung in DCs verantwortlichen Immunproteasom-Einheit verbunden. Diese Untersuchung unterstreicht die Bedeutung einer sorgfältigen Beurteilung der immunmodulierenden Wirkungen neuer Nanomaterialien.

Für die Entwicklung von Graphen und anderen GFNs als Transportssysteme für die systemische Verabreichung therapeutischer Moleküle<sup>[8,9]</sup> muss auch die Blutverträglichkeit bestimmt werden, da das Material mit Blutkomponenten in Berührung kommen wird.<sup>[33,34]</sup> Im Vergleich zwischen Graphen und GO zeigte das erstgenannte eine etwas stärkere zytotoxische Wirkung durch die starke hydrophobe Wechselwirkung mit Zellmembranen. Beide Graphene zeigten aber nur wenig Hämolyse von roten Blutzellen (im Konzentrationsbereich  $10\text{--}75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).<sup>[33]</sup> Graphen zeigte keinen Einfluss auf die Koagulationswege, ein Hinweis auf ein nur geringes Thromboserisiko bei intravenöser Verabreichung. Obwohl die geprüften Materialien nur schwer zu vergleichen sind, stehen die früheren Ergebnisse in klarem Gegensatz zu jenen von zwei Studien, die klar ein Thrombotoxizitätspotenzial von GO belegten.<sup>[34\text{--}36]</sup> Es wurde gezeigt, dass GO eine wesentliche hämolytische Aktivität aufweist und hochgradig thrombogen ist, indem es starke Aggregation von Blutplättchen des Menschen induziert (bei  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Zum Modulieren der Zytotoxizität wurde GO mit Chitosan überzogen,<sup>[34]</sup> oder seine Carbonsäurefunktionen wurden entweder durch Wärmebehandlung reduziert<sup>[34,35]</sup> oder über Curtius-Umlagerung zu Ammoniumgruppen umgewandelt.<sup>[36]</sup> Die zweitgenannte Umwandlung führte zu einem neuen funktionalisierten Material ohne Stimulationswirkung auf Blutplättchen, ohne Lyse von Erythrozyten und ohne Induktion von Thromboembolyse. Es bleibt aber unklar, was während der chemischen Umwandlung der Carbonsäuregruppen zu Aminen wirklich geschieht, da Graphenoxid auch Hydroxygruppen, Epoxide, Ketone und Aldehyde enthält, die keine Curtius-Umlagerung durchlaufen sollten. Diese Untersuchungen zeigen, wie die toxischen Wirkungen von GO auf rote Blutzellen durch chemische Modifikation des Materials gemildert werden können.

Bei komplementären Untersuchungen zur Beurteilung der Auswirkung von Kohlenstoff-Nanomaterialien auf Zellen wurden mögliche Veränderungen des Proteinprofils analysiert.<sup>[37,38]</sup> rGO (erhalten durch Hydrazinbehandlung von GO und unrichtig bezeichnet als Graphen) und einwandige Kohlenstoff-Nanoröhren wurden auf die Expression von Proteinen, die am Stoffwechsel, der Redoxregulation, der Zytoskelettbildung und dem Zellwachstum beteiligt sind, verglichen. Während Kohlenstoff-Nanoröhren die Expression einer Reihe dieser Proteine stark hemmt, wurden bei mit rGO behandelten menschlichen Hepatomzellen nur mäßige Veränderungen der Proteinspiegel beobachtet. Dies weist darauf hin, dass reduziertes Graphenoxid hinsichtlich mögli-

cher Veränderungen von Proteinfunktionen weniger zytotoxisch ist als Kohlenstoff-Nanoröhren. Freies oder mit Tensiden dispergiertes GO wurde auch an menschlichen und Maus-Fibroblasten geprüft.<sup>[39,40]</sup> Es wurde eine dosisabhängige Toxizität an Zellen beobachtet (Konzentration  $3\text{--}100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ein umgekehrtes Ergebnis wurde bei zwei unabhängigen Untersuchungen beschrieben, die zeigten, dass GO im Konzentrationsbereich zwischen  $7.8$  und  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  nur eine leichte Verringerung der Proliferation der A549-Zelllinie ohne Zeichen von Apoptose oder Zelltod induzierte.<sup>[41\text{--}43]</sup> Nach Behandlung mit Hydrazin zur Herstellung von rGO führte das Material dagegen zu hoher Zytotoxizität mit einer erheblichen Verringerung der Viabilität des gleichen Typs von Zellen.<sup>[44]</sup>

Alternativ zu der Reduktion mit Hydrazin können auch andere chemische Ansätze zum Modifizieren von GO eingesetzt werden. Die kovalente PEGylierung oder Funktionalisierung mit bioverträglichen Polymeren (beispielsweise Dextran) moduliert die zytotoxische Wirkung für eine Reihe von Zelllinien und ergibt bis zu einer Dosis von  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  eine erhöhte Zellviabilität.<sup>[6,44,45]</sup> PEG-GO mit weniger als  $50 \text{ nm}$  Seitenlänge war unter physiologischen Bedingungen stabil, drang vermutlich über einen Endozytosemechanismus in die Zellen ein und zeigte bei verschiedenen Konzentrationen keine erkennbare Toxizität.<sup>[6]</sup>

Die aktuellen Ergebnisse stellen wichtige erste Daten über die In-vitro-Toxizität von GFNs dar. Um eine ähnliche Situation wie bei Kohlenstoff-Nanoröhren zu vermeiden ist es aber wichtig, nicht zu verallgemeinern, sondern die große Variabilität des Materials zu betrachten. Die verschiedenen Typen von GFNs müssen miteinander verglichen und ihr Einfluss auf Zellen muss mit ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften und gegebenenfalls eingeführten chemischen Modifizierungen korreliert werden. Dies vermeidet eine Verallgemeinerung und Beschreibung aller Typen von Graphenen als letztlich gefährlich für die menschliche Gesundheit, wenn dies für einige von ihnen nicht zutrifft.

#### 4. In-vivo-Wirkungen von GFNs

Parallel zu der Untersuchung des Einflusses auf zellulärer Ebene wurden auch die toxischen Wirkungen in Tiermodellen geprüft, wenn auch zu einem geringeren Ausmaß (Tabelle 2). Für GO und rGO wurde die Wirkung auf Blutplättchen analysiert, die Zellen, die für das Aufrechterhalten von Hämostase und Thrombusbildung verantwortlich sind.<sup>[35,36]</sup> GO löste eine starke Plättchenaggregation aus, und intravenöse Verabreichung an Mäuse induzierte ausgedehnte Lungenthromboembolie. Dieses Verhalten stand mit der Ladungsverteilung an der Oberfläche von GO in Beziehung, da das Aggregationsverhalten bei Material, das zur Erzeugung von rGO chemisch behandelt wurde, wesentlich verringert war. Die In-vivo-Toxizität von GO wurde an Mäusen und Ratten nach intravenöser Verabreichung bestimmt.<sup>[39,46]</sup> Bei einer Dosis von  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  Körperegewicht wurden wesentliche pathologische Veränderungen gefunden, einschließlich entzündlicher Zellinfiltration, Lungenödem und Entstehung von Granulomen. Andererseits zeigte GO bei

**Tabelle 1:** In vitro untersuchte GFNs und ihre biologischen Wirkungen.

Material	In-vitro-Modell	Geprüfte Dosis	Biologische Wirkungen	Lit.
Graphen	neuronale PC12-Zellen	0.01–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	erhöhte Aktivierung von Caspase-3; geringe Freisetzung von LDH; starke Freisetzung von ROS	[21]
pristines Graphen (GO)	Affen-Nierenzellen (Vero)	10–300 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Zellmembran-Akkumulation; F-Actin-Destabilisierung; dosisabhängiger oxidativer Stress; Zelltod bei 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[22]
carboxyliertes GO	Affen-Nierenzellen (Vero)	10–300 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Zellaufnahme; kein Austreten von LDH; keine Apoptose bis 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[22]
GO dekoriert mit Polyethylenglycolamin	Saos-2-Osteoblasten; MC3T3-E1 Präosteoblasten; Maus-Makrophagen RAW 264.7	75 $\mu\text{g mL}^{-1}$	F-Actin-Lokalisierung; Veränderung des Zellzyklus; Apoptose; oxidativer Stress	[23]
GO	Neuroblastom-SH-SY5Y-Zellen	10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	dosis- und zeitabhängige Wirkung auf die Zellviabilität bei über 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; erhöhte Retinolsäure-induzierte Differenzierung	[24]
GO	normale menschliche Lungenzellen (BEAS-2B)	10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	konzentrations- und zeitabhängige Apoptose	[25]
oxidierte Graphen-Nanobänder, überzogen mit PEG-DSPE	HeLa-Zellen; NIH-3T3-Zellen; SKBR3-Zellen; MCF-7-Zellen	10–400 $\mu\text{g mL}^{-1}$	dosisabhängige und zeitabhängige Abnahme der Viabilität; zellspezifische Zytotoxizität; wesentlich höhere Zytotoxizität für HeLa-Zellen (mit 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) als Folge einer höheren Aufnahme durch diese Zellen im Vergleich zu den anderen Zellen	[26]
GO	menschliche Retinalpigment-Epithelzellen	5–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	wenig Einfluss auf die Morphologie; keine wesentliche Apoptose; geringe Freisetzung von LDH	[27]
GO (350 nm und 2 $\mu\text{m}$ laterale Größe)	menschliche Hepatokarzinom-Zellen (HepG2); menschliche Brustkrebs-Zellen MCF-7; menschliche Umbilikalen-Endothelzellen (HUVEC); Lewis-Lungenkarzinom-Zellen (LLC); Maus-Makrophagen J774A.1; Peritoneal-Makrophagen PMØ	1–20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	keine Zellaufnahme durch nicht-phagozytische Zellen; keine größenabhängige Internalisierung in Makrophagen; keine Unterschiede der Zellviabilität bis 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; starke entzündliche Antwort auf 2 $\mu\text{m}$ GO; hohe Freisetzung von Zytokinen bei 2 $\mu\text{m}$ GO	[28]
BSA-überzogenes GO (420 nm und 860 nm laterale Größe)	C2C12 (mesenchymale Progenitor-Zellen der Maus)	10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	verschiedene Aufnahmemechanismen; keine Veränderung der metabolischen Aktivität	[29]
pristines Graphen in 1% Pluronic F108	Maus-Makrophagen RAW 264.7	20–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Apoptose durch Abnahme des mitochondrialen Potenzials und Zunahme von ROS; verschiedene Signalwege aktiviert; Freisetzung proapoptotischer Zytokine	[30]
GO	Maus-Makrophagen RAW 264.7	5 und 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Induktion von Autophagie; Aktivierung von TLR4 und TLR9; Zytokinsekretion (IL2, IL10, INF $\gamma$ und TNF $\alpha$ )	[31]
GO	dendritische Zellen aus Knochenmark (DCs)	1–25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	keine Veränderung des Antigen-Einschlusses; keine Wirkung auf die MHC-I/Peptid-TCR-Wechselwirkung; Herunterregulierung des Spiegels der Untereinheit LMP7 von Immunproteasom	[32]
Graphen und GO	rote Blutzellen (RBCs)	10–75 $\mu\text{g mL}^{-1}$	keine Hämolyse bis 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; keine Plättchenaktivierung oder -aggregation; kein Thromboserisiko	[33]
GO	menschliche Erythrozyten (RBCs)	3.125–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	hohe hämolytische Aktivität	[34]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

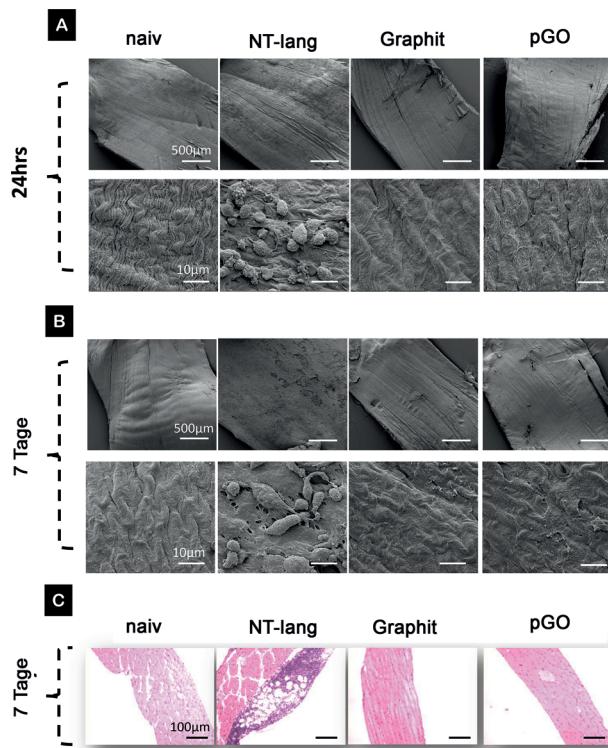
Material	In-vitro-Modell	Geprüfte Dosis	Biologische Wirkungen	Lit.
Chitosan-überzogenes GO	menschliche Erythrozyten (RBCs)	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	keine hämolytische Aktivität	[34]
GO	Erythrozyten (RBCs)	5–25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Thrombotoxizität; Aggregation von menschlichen Blutplättchen	[35]
rGO	Erythrozyten (RBCs)	2–20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	verringerte Plättchenaggregation	[35, 36]
Amino-GO	Erythrozyten (RBCs)	2–20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Keine Thrombohämolyse; keine Plättchenanrengung; keine Zellyse	[36]
rGO	menschliche Hepatokarzinom-Zellen (HepG2)	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	mäßige Variation von Proteinspiegeln	[37, 38]
GO	menschliche Fibroblasten (HDF)	5–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Toxizität bei Dosen von > 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; Abnahme der Zelladhäsion; Zellapoptose	[39]
GO mit PEG dispergiert	L929-Fibroblasten	3.125–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	leichte Toxizität bis 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[40]
GO	A549-Zellen	20 und 85 $\mu\text{g mL}^{-1}$	leichte Abnahme der Zellproliferation; keine Apoptose oder Zelltod bis 85 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[41]
rGO	A549-Zellen	20 und 85 $\mu\text{g mL}^{-1}$	erhebliche Verringerung der Zellviabilität	[41]
GO	A549-Zellen	10–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	keine Zellaufnahme; dosisabhängiger oxidativer Stress; leichter Verlust an Zellviabilität bei 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[42]
gereinigtes GO	A549-Zellen	7.8–125 $\mu\text{g mL}^{-1}$	dosisabhängige Zytotoxizität; 80% Zellviabilität bei 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[43]
PEG-GO	RAJI-Zellen; HCT-116-Zellen; OVCAR-3-Zellen; U87MG-Zellen; MDA-MB-435-Zellen; MCF-7-Zellen	0.5–150 $\mu\text{g mL}^{-1}$	keine Wirkung auf die Zellviabilität bis 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; verringerte Toxizität	[6, 44]
Dextran-GO	HeLa-Zellen	10, 50, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	erhöhte Zellviabilität; normale Zellproliferation	[45]
GO	NIH-3T3-Zellen	1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	keine Wirkung auf die Zellviabilität	[58a]

sehr niedrigen Dosen eine gute Bioverträglichkeit mit roten Blutzellen, während bei 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Hämolyse induziert wurde.

Lungentoxizität ist ein Hauptproblem bei der industriellen Herstellung von Nanomaterialien, da ihre Atembarkeit Schädigung und schließlich chronische Erkrankungen bei Personen verursachen könnte, die mit derartigen Materialien in Kontakt kommen. Es wurde gezeigt, dass GO und aggregiertes Graphen nach direkter Injektion in die Organe von Mäusen (50  $\mu\text{g}$  pro Tier) zu schwerer und anhaltender Verletzung der Lunge führen.<sup>[47]</sup> Bei in Pluronic-Tensid dispergiertem, pristinem Graphen waren die toxischen Wirkungen deutlich geringer. Anscheinend ist die Oxidation des Graphens die wahrscheinliche Ursache der Lungentoxizität. Bei einer anderen aktuellen Untersuchung wurde auch für pristin Graphen-Nanoplättchen aus nur wenigen Graphenschichten, die eine Größe bis zu 25  $\mu\text{m}$  aufwiesen und in 0.5 %

Rinderserumalbumin dispergiert waren, ein Risiko für die Atemwege belegt.<sup>[20]</sup> Es zeigte sich, dass sich Graphen-Nanoplättchen nach Inhalation (50  $\mu\text{g}$  Nanoplättchen pro Tier) hinter den ziliarisierten Atemwegen ablagnern. Es wurden akute entzündliche Antworten in Mäusen, Zelltzündung und beeinträchtigte Makrophagen-Phagozytose beobachtet. Die Entzündungswirkung in vitro und in vivo wurde dem atembaren aerodynamischen Durchmesser zugeschrieben, der Kenngröße, die die Atembarkeit eines Teilchens und den Ort der Ablagerung bestimmt. Schließlich könnte die Ablagerung in der Lunge auf lange Sicht zu Mesotheliom und anderen Pleura-pathologischen Zuständen führen. Es ist schwer zu verstehen, wo die Unterschiede dieser beiden Studien liegen, die zu dem entgegengesetzten Verhalten von pristinem Graphen führen. Vermutlich gehören die Morphologie der geprüften Materialien, die Anzahl der Schichten, die Oberfläche und das Dispergierungsverfahren zu den

Parametern, die zu den unterschiedlichen Toxizitätseigenschaften führen können. Es überrascht nicht, dass Materialien mit Mikrometergröße einen besorgniserregenden Grad an Toxizität zeigen.<sup>[48,49]</sup> Andererseits könnte auch das Vorhandensein von Begleitstoffen wie nichtumgesetztem Graphitoxid oder graphitischen Fraktionen für Entzündungen verantwortlich sein. Durch mehrere Waschvorgänge und Zentrifugationsschritte gründlich gereinigtes GO zeigte tatsächlich keine Erhöhung der Proteinspiegel und polymorphonukleären Leukozyten an den Tagen 1 und 7 nach peritonealer Verabreichung (injizierte Dosis 50 µg pro Tier).<sup>[43]</sup> Im Vergleich zu langen pristinen mehrwandigen Kohlenstoff-Nanoröhren wurde keine Ansammlung von Riesenzellen, entzündliche Antwort und Entstehung von Granulom beobachtet (Abbildung 5). Das Modell, das für die Beurteilung des karzinogenen Potenzials nach Exposition gegenüber GO verwendet wurde, war für faserförmige Materialien ausgelegt,<sup>[49]</sup> und es ist noch nicht klar, ob das Modell auch für Nanomaterialien mit anderer Gestalt geeignet ist.



**Abbildung 5.** Granulombildung an der Diaphragma-Membran nach 7 Tagen. Weiblichen C57BL/6-Mäusen wurden 50 µg Trägerkontrolle (0.5% Rinderserumalbumin/Kochsalzlösung), pristine mehrwandige Kohlenstoff-Nanoröhren (NT-lang, pristin), Graphit und reines GO (pGO) intraperitoneal injiziert; die Mäuse wurden nach 1 Tag oder nach 7 Tagen getötet, und die Diaphragmen wurden entnommen, fixiert und für die Visualisierung vorbereitet. SEM-Aufnahmen der Diaphragma-Oberfläche (A, B) und histologische Aufnahmen (C) unter Verwendung von Hämatoxylin- und Eosin-Färbung zeigen die Ansammlung von Riesenzellen und verdeutlichen das Vorhandensein von granulomatöser Entzündung mit NT-lang, nicht aber mit Graphit und pGO. Die SEM-Aufnahmen sind in niedriger und hoher Auflösung gezeigt. Abdruck aus Lit. [43].

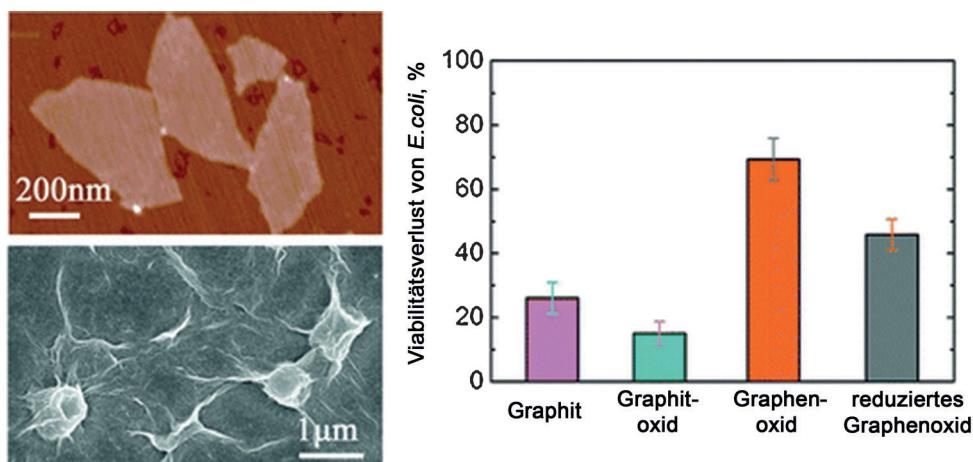
Durch chemische Funktionalisierung kann eine Modulation der Toxizität in vivo erzielt werden.<sup>[50]</sup> Beispielsweise verringert PEGylierung von GO die toxische Wirkung in Mäusen. Bei der Verwendung von GO als Komponente injizierbarer Hydrogеле zum Gewebe-Engineering wurde keine schwere Toxizität in vivo gemessen.<sup>[51]</sup> In dieser Studie blieb die Rolle von Graphen unklar, abgesehen von der Herabsetzung der zur Bildung eines wärmeempfindlichen Hydrogels erforderlichen Tensidkonzentration. Das Vermögen von GO zur Absorption im Nahinfrarotbereich ist einer der Vorteile der Verwendung von GO in Kompositmaterialien für die regenerative Medizin, da es so durch kontrollierte Bestrahlung die Freisetzung eines im Hydrogel eingebetteten Wirkstoffs erhöhen kann.

Die In-vivo-Studien wurden auch auf andere Tiermodelle als Nager erweitert.<sup>[52]</sup> *Caenorhabditis elegans* ist ein frei lebender Fadenwurm mit Vorteilen wie der Möglichkeit zur Laborkultur. *C. elegans* (mit einer Lösung von 250 µg mL<sup>-1</sup> behandelt) wurde als Wirt verwendet, um die Wirksamkeit von Graphit-Nanoplättchen, die aus 3 bis 60 Graphenschichten mit lateralen Größen von 1 bis 10 µm zusammengesetzt waren, als antimikrobielles Mittel nach Exposition gegenüber dem Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* zu bestimmen. Das Vorhandensein dieses Materials im Inneren der Fadenwürmer verringerte die Anzahl der infektiösen Zellen eindeutig, vermutlich durch mechanische Schädigung der Bakterienmembran, während es die Lebensdauer und die Reproduktionskapazität des Organismus nicht veränderte (d.h. keine Genotoxizität). *C. elegans* wurde auch bei aktuellen Versuchen zur Aufklärung der chemischen Vorgänge neben der Toxizität von GO in vivo verwendet.<sup>[53]</sup> GO wurde mit PEGyliertem Poly-L-lysin überzogen oder nichtüberzogen verwendet. Bei der Behandlung des Organismus mit GO im Konzentrationsbereich zwischen 5 und 20 µg mL<sup>-1</sup> wurde keine Veränderung der Lebensdauer, Schädigung auf der Ebene der Zellwand, Beeinträchtigung der Beweglichkeit und Verringerung der Reproduktionsfähigkeit des Fadenwurms beobachtet. Stattdessen verringerte das Polymerüberzogene GO die Widerstandsfähigkeit des Fadenwurms, insbesondere unter oxidativem oder thermischem Stress, beträchtlich und führte zum Tod. Übermäßiges Vorhandensein von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beeinträchtigte das inhärente antioxidative Abwehrsystem und führte zu einer drastischen toxischen Wirkung auf *C. elegans* unter pathophysiologischen Bedingungen.

Wie bei der In-vitro-Wirkung sind viele Parameter zu berücksichtigen, wenn GFNs auf Toxizität in vivo geprüft werden. Tatsächlich ist die Variabilität der Proben außerordentlich hoch. Diese Situation ist jener ähnlich, die bei Kohlenstoff-Nanoröhren beobachtet worden ist. Erneut ist es grundsätzlich wichtig, die morphologischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften für jeden Typ von Probe zu betrachten und zu beschreiben, ohne Verallgemeinerungen zu treffen, die mit dem Risiko von Fehlern bei der Verwendung oder Betonung von Begriffen wie „Sicherheit“ oder „Toxizität“ von GFNs verbunden sind. Die Toxizität von GFNs kann eng mit ihrer Oberflächenfunktionalisierung in Beziehung stehen. Die Größe ist der zweite wichtige Parameter, der sorgfältig zu berücksichtigen ist.

**Tabelle 2:** In vivo untersuchte GFNs und ihre biologischen Wirkungen.

Material	In-vivo-Modell	Geprüfte Dosis	Biologische Wirkungen	Lit.
GO	Kaninchen	100–300 µg/Auge	keine Augenveränderungen; normaler Augeninnendruck; normales Sehen	[27]
GO	Maus	250 µg kg <sup>-1</sup>	Thrombotoxizität; ausgedehnte Lungen-Thromboembolie; Blutplättchenaggregation beim Menschen	[35]
rGO	Maus	250 µg kg <sup>-1</sup>	weniger wirkungsvoll bei der Plättchenaggregation	[35, 36]
Amino-GO	Maus	250 µg kg <sup>-1</sup>	keine Thrombotoxizität; Gefäße erscheinen normal mit keinem Zeichen von okklusiver Pathologie	[36]
GO	Maus	100, 250, 400 µg/Tier	chronische Toxizität und Tod der Tiere bei der höchsten Dosis; Lungen-, Milz- und Lebergranulom; keine Clearance über die Niere	[39]
gereinigtes GO	Maus	50 µg/Tier	keine akute und chronische Entzündung nach intraperitonealer Verabreichung	[43]
Dextran-GO	Maus	20 mg kg <sup>-1</sup>	Akkumulation in Leber und Milz; allmähliche Beseitigung binnen einer Woche; keine Kurzzeit-Toxizität	[45]
GO	Maus/Ratte	1 und 10 mg kg <sup>-1</sup> (Tiere) 10 und 80 µg mL <sup>-1</sup> (Zellen)	dosisabhängige Lungentoxizität; granulomatöse Läsionen bei 10 mg kg <sup>-1</sup> ; Lungenödem-Fibrose bei 10 mg kg <sup>-1</sup> ; entzündliche Zell-infiltration bei 10 mg kg <sup>-1</sup> ; RBC-Hämolyse bei 80 µg mL <sup>-1</sup>	[46]
GO und aggregiertes Graphen	Maus	50 µg/Tier	Erzeugung von ROS; Entzündung; Apoptose; Zunahme der mitochondrialen Respirationsrate; Lungentoxizität-Entzündung	[47]
Graphen in 2% Pluroneric F108	Maus	50 µg/Tier	verringerte toxische Wirkungen	[47]
Graphen-Nanoplättchen (25 µm) in 0.5% BSA	Ratte	50 µg/Tier (pharyngeale Aspiration) 5 µg/Tier (intrapleurale Injektion)	entzündliche Zytokinfreisetzung (IL1β); akute entzündliche Lungenantwort	[20]
PEG-GO	Maus	20 mg kg <sup>-1</sup>	hohe Tumorakkumulation; geringe Aufnahme durch RES; kein Zeichen von Anomalie in Niere, Milz, Herz, Leber und Lunge; allmähliche Clearance	[50]
GO-Pluronic-Hydrogele	Maus	Gel-Zusammensetzung: 0.4% GO/0.25–1% Pluronic	keine schwere Toxizität	[51]
Graphit-Nanoplättchen (1–100 µm)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	50–250 µg mL <sup>-1</sup>	keine Veränderung der Lebensdauer des Fadenwurms; keine Veränderung der Reproduktionskapazität	[52]
GO und PEG-(Poly-L-lysin)-überzogenes GO	<i>Caenorhabditis elegans</i>	5–20 µg mL <sup>-1</sup>	keine Veränderung der Lebensdauer des Fadenwurms; keine Schädigung auf der Ebene der Zellwände; keine Veränderung der Reproduktionskapazität; keine Verringerung der Beweglichkeit	[53]
PEG-(Poly-L-lysin)-überzogenes GO	<i>Caenorhabditis elegans</i>	5–20 µg mL <sup>-1</sup>	Zellen werden unter oxidativem oder thermischem Stress kultiviert: verringerte Beständigkeit, die zum Tod führt; intrazelluläre ROS-Bildung; beeinträchtigter Elektronentransfer	[53]
PEG-GO	Maus	20 mg kg <sup>-1</sup>	RES-Akkumulation; Nieren- und Fäzes-Beseitigung; keine Veränderung von biochemischen Blutparametern	[61]
GO (groß 1–5 µm und klein 110–500 nm)	Maus	1–10 mg kg <sup>-1</sup>	schnelle Clearance aus dem Blut; Akkumulation hauptsächlich in Lunge und Leber	[62]



**Abbildung 6.** Oben links: AFM-Bild von GO-Blättern, getrocknet auf einer Glimmer-Oberfläche. Unten links: *E. coli*-Zellen nach 2 h Inkubation mit GO-Dispersion ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); die meisten Bakterien werden nach Exposition gegenüber GO-Dispersionen abgeflacht und verlieren ihre zelluläre Integrität. Rechts: Messungen der Zellviabilität nach Inkubation mit Graphit-, Graphitoxid-, GO- und rGO-Dispersionen. Eine 5-mL-Portion von graphenbasierten Materialien ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) wurde 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  mit *E. coli* inkubiert. Der Verlust von Zellviabilität wurde durch Koloniezählung bestimmt. Als Kontrolle wurde eine isotonische Kochsalzlösung ohne graphenbasierte Materialien verwendet. Abdruck aus Lit. [55], Copyright 2011, American Chemical Society.

## 5. Bakterientoxizität von GFNs

Zu den toxischen Wirkungen von GFNs auf Mikroorganismen gibt es eine Reihe aktueller Untersuchungen an verschiedenen Typen von Bakterien und Pilzen. Die erkennbare antibakterielle Aktivität könnte interessante zukünftige Anwendungen von Graphen in antimikrobiellen Produkten finden (Abbildung 6). Abscheidungen von GO und rGO auf Edelstahlsubstrat zeigten antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative *E. coli* und Gram-positive *S. Aureus*.<sup>[54]</sup> rGO war in beiden Fällen wirksamer. Eine Wirkung auf die metabolische Aktivität war mit einer Schädigung der Zellmembran der Mikroorganismen kombiniert.<sup>[41]</sup> Zur Erweiterung dieser Untersuchungen wurde der antimikrobielle Mechanismus auch durch Vergleich verschiedener Typen von Graphenmaterialien, einschließlich Graphit, Graphitoxid, GO mit verschiedenen lateralen Größen und rGO (Konzentration 5–80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), analysiert (Abbildung 6).<sup>[55]</sup> Auch hier wurde unter den verschiedenen Typen von Graphenderivaten die höchste antibakterielle Aktivität für GO mit der kleinsten Größe gefunden.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Graphenmaterialien scheinen eine wichtige Rolle für die Wirksamkeit der Bakterienabtötung zu spielen und können entsprechend angepasst werden, um die schädliche Wirkung auf Gesundheit und Umwelt zu minimieren. Die Ergebnisse wurden aber von einer weiteren Studie in Frage gestellt,<sup>[56]</sup> bei der GO zu *E. coli* zugegeben wurde und die Bakterien schneller wuchsen, indem sie dichte Biofilme um das suspendierte Nanomaterial bildeten. Nur die Kombination mit Silber-Nanopartikeln führte zum Zelltod.<sup>[56,57]</sup> In Anbetracht dieser Befunde stellt die Untersuchung der bakteriostatischen Eigenschaften von GO eine Herausforderung dar und wird zweifellos weitere Studien anregen.

Graphit-Nanoplättchen und andere Typen von GFNs zeigten bakterizide Eigenschaften *in vitro* auf isolierten

*P. aeruginosa* und *in vivo* an einem gegenüber diesem Pathogen exponierten Wirt-Fadenwurm.<sup>[52]</sup> Die antibakterielle Aktivität von GO blieb erhalten oder war sogar verbessert, wenn es in Poly-N-vinylcarbazol dispergiert und auf einem Substrat elektrodeponiert wurde, ohne zytotoxische Wirkungen auf Säugerzellen zu zeigen, die gegenüber einer Dosis von  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  exponiert wurden.<sup>[58]</sup> Es ist interessant, dass die Wechselwirkung von GO mit *E. coli* zu einer „grünen“ Reduktion von Graphenblättern führte (Verlust von 60% der Sauerstoff-enthaltenden funktionellen Gruppen), die mittels Tropfenbeschichtung auf  $\text{Si}_2\text{O}/\text{Si}(100)$ -Substrat aufgetragen wurden.<sup>[59]</sup> Während dieses Vorgangs zeigten die Bakterien Proliferationshemmung und Ablösen von der Oberfläche durch die antibakterielle Aktivität von rGO, das durch die bakterielle metabolische Wirkung entstanden ist. Ferner zeigte rGO (zwischen 1 und  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  geprüft) fungizide Aktivität gegen nichtpathogenen *Aspergillus oryzae* und pathogene *Aspergillus niger* und *Fusarium oxysporum*.<sup>[60]</sup> Während diese Eigenschaft bei pathogenen Pilzen von Nutzen sein kann, muss hinsichtlich nichtpathogener nützlicher Mikroorganismen eine gewisse Besorgnis gelten.

Ein Vergleich der verfügbaren Daten zur antibakteriellen und fungiziden Wirksamkeit von GFNs ist schwierig, da die Zellkulturbedingungen und der Typ der Ausgangsmaterialien in den beschriebenen Experimenten variierten. Andererseits könnten manche der widersprüchlichen Daten weitere Forschungen zur Beurteilung der antimikrobiellen Rolle von GFNs als Funktion ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften anregen.

## 6. Bioverteilung und Pharmakokinetik von GFNs

Die *In-vivo*-Untersuchung von Bioverteilung, Akkumulation und Beseitigung von Graphen-Nanomaterialien ist ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Risiken, die mit ihrer

Verwendung verbunden sind. Untersuchungen der Bioverteilung (injizierte Dosen von 1 oder 10 mg kg<sup>-1</sup>) zeigten, dass intravenös injiziertes GO vornehmlich in der Lunge akkumuliert, während eine nur geringe Aufnahme durch das retikuloendotheliale System (RES) beobachtet wurde (Tabelle 2).<sup>[46]</sup> GO zeigte lange Zirkulationszeiten im Vergleich zu anderen Formen von Kohlenstoff. Nach Injektion von 1 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht wurden keine pathologischen Veränderungen in verschiedenen Organen beobachtet, während bei einer Dosis von 10 mg kg<sup>-1</sup> wesentliche Veränderungen in der Lunge auftraten. Es ist interessant, dass PEG-PO hauptsächlich im Tumor von xenotransplantierten Tieren akkumuliert, mit geringerer Aufnahme durch das RES und ohne wesentliche toxische Wirkungen.<sup>[50]</sup> Nach einer anfänglichen Akkumulation in RES-Organen wurde zwischen den Tagen 3 und 15 eine allmähliche Beseitigung beobachtet. Nach drei Monaten waren die Graphenblätter ohne Zeichen von Anomalie in Hauptorganen (d.h. Nieren, Leber, Milz, Herz und Lunge) vollständig beseitigt. Dieser Typ von modifiziertem, mit <sup>125</sup>I radiomarkiertem Graphen wurde auch verwendet, um die Pharmakokinetik, die Langzeit-Bioverteilung und die toxischen Wirkungen eingehender zu untersuchen.<sup>[61]</sup> Die intravenös verabreichten Graphenblätter wurden durch Clearance über Niere und Fäzes allmählich beseitigt. Die geprüfte Dosis von 20 mg kg<sup>-1</sup> führte über einen Zeitraum von 3 Monaten zu keiner ersichtlichen Toxizität, wie durch Messung der biochemischen Parameter im Blut und der hämatologischen Marker (weiße und rote Blutzellen, Hämoglobin, Blutplättchen usw.) gezeigt wurde. Die histologische Untersuchung der verschiedenen Organe zeigte keine Schädigung oder Läsionen, mit der Ausnahme einer Zunahme der Färbung von Milz und Leber durch Akkumulation von braunem GO. Die Auswirkung der lateralen Größe von GO-Blättern auf Organverteilung und Akkumulation wurde ebenfalls mit iodiertem Material untersucht.<sup>[62]</sup> Großes GO (1–5 µm) und kleines GO (110–500 nm) wurde jeweils mit Na<sup>125</sup>I markiert. Unabhängig von der Größe wurde GO schnell aus dem Blut beseitigt und akkumulierte hauptsächlich in Lunge und Leber. Während kleines GO in der Leber gefunden wurde, akkumulierte großes GO in der Lunge. Mit Ansteigen der injizierten Dosen des kleinen GO von 1 auf 10 mg kg<sup>-1</sup> änderte sich dessen Verteilung und zeigte eine höhere Lokalisierung in der Lunge als Folge der bei hohen Dosen erfolgenden Aggregation. Ein Vergleich des pharmakologischen Profils der beiden Typen von GO weist darauf hin, dass das Material mit der kleineren lateralen Größe für mögliche biomedizinische Anwendungen besser geeignet ist.<sup>[43]</sup>

Die Daten aus diesen Untersuchungen sind außerordentlich interessant und werden weitere Untersuchungen anstoßen. Tatsächlich muss das Verhalten anderer Graphen-Nanomaterialien, anderer Tiermodelle, höherer Dosen und anderer Verabreichungswege gegenübergestellt werden. Diese Untersuchungen werden das Verständnis der Wirkungen von GFNs bei gezielter Verabreichung oder bei Kontakt durch unbeabsichtigte Exposition verbessern.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Dieser Kurzaufsatz fasst verschiedene Fallstudien über die In-vitro- und In-vivo-Wirkung von GFNs zusammen. Sind GFNs also sicher oder toxisch? Die verfügbaren Ergebnisse zeigen, dass dieses neue Nanomaterial zu einer Gefahr für die menschliche Gesundheit werden könnte, dass aber chemische Manipulation ein Weg ist, die möglichen Risiken in Verbindung mit der zukünftigen Entwicklung von GFNs auf den verschiedenen Anwendungsbereichen (beispielsweise Kompositmaterialien, elektronisch gesteuerte biomedizinische Werkzeuge usw.) zu mildern. In dieser Hinsicht ist kürzlich eine Gegenüberstellung von GFNs und Kohlenstoff-Nanoröhren erschienen, die einige Leitlinien zum Modulieren der toxischen Wirkungen von Graphen gibt.<sup>[13]</sup> Wenn wir solche „Regeln“ beachten, könnten wir eine Verzögerung der Problembetrachtung, wie sie bei Kohlenstoff-Nanoröhren aufgetreten ist, vermeiden, indem wir die zehnjährige Erfahrung bei deren Entwicklung nutzen. In diesem Zusammenhang kann der Kurzaufsatz auch als vorgreifend angesehen werden, da er die Aufmerksamkeit der Forscher bei der Entwicklung neuer Nanomaterialien gewinnen will. Auf die Anfangsfrage kann keine klare Antwort gegeben werden, es gibt aber starke Hinweise darauf, dass die toxischen Wirkungen modular sind. Ferner sollte die Verallgemeinerung der Toxizität von GFNs vermieden werden, da die mit ihnen verbundenen Risiken von den spezifischen Anwendungen und Entwicklungen abhängen.

Es ist allerdings noch Forschungsarbeit notwendig, um die biologischen Antworten und die Sicherheitsfragen von Nanomaterialien der Graphenfamilie genauer zu untersuchen, wobei die verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften zu berücksichtigen sind. Die am häufigsten untersuchten GO und rGO sind hydrophiler als ein- und mehrschichtiges Graphen. Die Schwierigkeit, stabile kolloidale Dispersionen von hydrophoben Graphenoberflächen aufrechtzuerhalten, ist eine der Beschränkungen bei der Bestimmung des Sicherheitsprofils dieses Nanomaterials. In jedem Fall sollten die Analysen auf all die Mitglieder der Graphenfamilie ausgedehnt werden, die bisher weniger genauer geprüft wurden (beispielsweise Graphenpunkte).<sup>[63]</sup>

Es gibt mehrere wichtige Faktoren, die mit der Toxizität neuer Nanomaterialien verbunden sind. So müssen die Erzeugung reaktionsfähiger Sauerstoffspezies, die indirekte Toxizität durch GFN-Adsorption wichtiger Biomoleküle und die physikalische Toxizität in Verbindung mit der Wechselwirkung mit den Lipiden in Zellmembranen, Geweben und Organen sorgfältig untersucht und analysiert werden. Ferner muss die Aufnahme als Funktion der Größe untersucht werden. Die laterale Größe von Graphen könnte die verschiedenen Rezeptoren, die bei den Eindringmechanismen beteiligt sind, auf energieabhängige Weise beeinflussen (d.h. Endozytose/Phagozytose-aktive Mechanismen). Wenn passive Mechanismen ablaufen, wie es bei Kohlenstoff-Nanoröhren der Fall ist,<sup>[64]</sup> wäre es interessant zu verstehen, wie sich die flache Form des Materials auf die Organisation der Membran auswirkt (d.h. Unterbrechen der Membran oder einfach Gleiten zwischen den Lipid-Doppelschichten).<sup>[65]</sup> Alle diese Untersuchungen werden für die sicherere Entwicklung und

Herstellung von GFNs von Nutzen sein, um die Risiken für die menschliche Gesundheit und die Umwelt zu minimieren.

*Der Autor dankt dem Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) und der Agence Nationale de la Recherche (DECANO, Projekt Nr. ANR-2011-CESA-007-01) sowie Fanny Bonachera für ihre Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen und Hélène Dumortier und Cécilia Ménard-Moyon für kritisches Lesen des Manuskripts.*

Eingegangen am 13. November 2012,  
veränderte Fassung am 13. Dezember 2012  
Online veröffentlicht am 11. April 2013

Übersetzt von Dr. Thomas Steiner, Neu-Ulm

- [1] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov, *Science* **2004**, *306*, 666–669.
- [2] a) X. Huang, Z. Yin, S. Wu, X. Qi, Q. He, Q. Zhang, Q. Yan, F. Boey, H. Zhang, *Small* **2011**, *7*, 1876–1902; b) X. Huang, X. Qi, F. Boey, H. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 666–686.
- [3] K. P. Loh, Q. Bao, G. Eda, M. Chhowalla, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 1015–1024.
- [4] Y. Cui, S. N. Kim, R. R. Naik, M. C. McAlpine, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 696–704.
- [5] C. Li, J. Adamcik, R. Mezzenga, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 421–427.
- [6] Z. Liu, J. T. Robinson, X. M. Sun, H. J. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10876–10877.
- [7] K. S. Novoselov, V. I. Fal'ko, L. Colombo, P. R. Gellert, M. G. Schwab, K. Kim, *Nature* **2012**, *490*, 192–200.
- [8] Y. Zhang, T. R. Nayak, H. Hong, W. Cai, *Nanoscale* **2012**, *4*, 3833–3842.
- [9] a) H. Shen, L. Zhang, M. Liu, Z. Zhang, *Theranostics* **2012**, *2*, 283–294; b) K. Yang, Y. Li, X. Tan, R. Peng, Z. Liu, *Small* **2013**, DOI: 10.1002/smll.201201417; c) K. Yang, L. Feng, X. Shi, Z. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 530–547.
- [10] L. Feng, Z. Liu, *Nanomedicine* **2011**, *6*, 317–324.
- [11] V. C. Sanchez, A. Jachak, R. H. Hurt, A. B. Kane, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 15–34.
- [12] L. Yan, F. Zhao, S. Li, Z. Hu, Y. Zhao, *Nanoscale* **2011**, *3*, 362–382.
- [13] C. Bussy, H. Ali-Boucetta, K. Kostarelos, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 692–701.
- [14] A. M. Jastrzębska, P. Kurtycz, A. R. Olszyna, *J. Nanopart. Res.* **2012**, *14*, 1320–1328.
- [15] K. Kostarelos, A. Bianco, M. Prato, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 627–633.
- [16] G. P. Kotchey, B. L. Allen, H. Vedala, N. Yanamala, A. A. Kapralov, Y. Y. Tyurina, J. Klein-Seetharaman, V. E. Kagan, A. Star, *ACS Nano* **2011**, *5*, 2098–2108.
- [17] a) W. S. Hummers Jr., R. E. Offeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1339–1339; b) L. J. Cote, R. Cruz-Silva, J. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11027–11032.
- [18] A. Dimiev, D. V. Kosynkin, L. B. Alemany, P. Chaguine, J. M. Tour, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2815–2822.
- [19] K. P. Loh, Q. Bao, P. K. Ang, J. Yang, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 2277–2289.
- [20] A. Schinwald, F. A. Murphy, A. Jones, W. MacNee, K. Donaldson, *ACS Nano* **2012**, *6*, 736–746.
- [21] Y. Zhang, S. F. Ali, E. Dervishi, Y. Xu, Z. Li, D. Casciano, A. S. Biris, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3181–3186.
- [22] A. Sasidharan, L. S. Panchakarla, P. Chandran, D. Menon, S. Nair, C. N. Rao, M. Koyakutty, *Nanoscale* **2011**, *3*, 2461–2464.
- [23] M.-C. Matesanz, M. Vila, M.-J. Feito, J. Linares, G. Gonçalves, M. Vallet-Regi, P.-A. A. P. Marques, M.-T. Portolés, *Biomaterials* **2013**, *34*, 1562–1569.
- [24] M. Lv, Y. Zhang, L. Liang, M. Wei, W. Hu, X. Li, Q. Huang, *Nanoscale* **2012**, *4*, 3861–3866.
- [25] N. V. Vallabani, S. Mittal, R. K. Shukla, A. K. Pandey, S. R. Dhakate, R. Pasricha, A. Dhawan, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2011**, *7*, 106–107.
- [26] S. M. Chowdhury, G. Lalwani, K. Zhang, J. Y. Yang, K. Neville, B. Sitharaman, *Biomaterials* **2013**, *34*, 283–293.
- [27] L. Yan, Y. Wang, X. Xu, C. Zeng, J. Hou, M. Lin, J. Xu, F. Sun, X. Huang, L. Dai, F. Lu, Y. Liu, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1265–1270.
- [28] H. Yue, W. Wei, Z. Yue, B. Wang, N. Luo, Y. Gao, D. Ma, G. Ma, Z. Su, *Biomaterials* **2012**, *33*, 4013–4021.
- [29] Q. Mu, G. Su, L. Li, B. O. Gilbertson, L. H. Yu, Q. Zhang, Y.-P. Sun, B. Yan, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 2259–2266.
- [30] Y. Li, Y. Liu, Y. Fu, T. Wei, L. Le Guyader, G. Gao, R.-S. Liu, Y.-Z. Chang, C. Chen, *Biomaterials* **2012**, *33*, 402–411.
- [31] G.-Y. Chen, H.-J. Yang, C.-H. Lu, Y.-C. Chao, S.-M. Hwang, C.-L. Chen, K.-W. Lo, L.-Y. Sung, W.-Y. Luo, H.-Y. Tuan, Y.-C. Hu, *Biomaterials* **2012**, *33*, 6559–6569.
- [32] A. V. Tkach, N. Yanamala, S. Stanley, M. R. Shurin, G. V. Shurin, E. R. Kisin, A. R. Murray, S. Pareso, T. Khaliullin, G. P. Kotchey, V. Castranova, S. Mathur, B. Fadeel, A. Star, V. E. Kagan, A. A. Shvedova, *Small* **2013**, DOI: 10.1002/smll.201201546.
- [33] A. Sasidharan, L. S. Panchakarla, A. R. Sadanandan, A. Ashokan, P. Chandran, C. M. Girish, D. Menon, S. V. Nair, C. N. Rao, M. Koyakutty, *Small* **2012**, *8*, 1251–1263.
- [34] K. H. Liao, Y. S. Lin, C. W. Macosko, C. L. Haynes, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 2607–2615.
- [35] S. K. Singh, M. K. Singh, M. K. Nayak, S. Kumari, S. Shrivastava, J. J. A. Grácio, D. Dash, *ACS Nano* **2011**, *5*, 4987–4996.
- [36] S. K. Singh, M. K. Singh, P. P. Kulkarni, V. K. Sonkar, J. J. Grácio, D. Dash, *ACS Nano* **2012**, *6*, 2731–2740.
- [37] J. Yuan, H. Gao, C. B. Ching, *Toxicol. Lett.* **2011**, *207*, 213–221.
- [38] J. Yuan, H. Gao, J. Sui, H. Duan, W. N. Chen, C. B. Ching, *Toxicol. Sci.* **2012**, *126*, 149–161.
- [39] K. Wang, J. Ruan, H. Song, J. Zhang, Y. Wo, S. Guo, D. Cui, *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, *6*, 1–8.
- [40] M. Wojtoniszak, X. Chen, R. J. Kalenczuk, A. Wajda, J. Łapczuk, M. Kurzewski, M. Drozdzik, P. K. Chu, E. Borowiak-Palen, *Colloids Surf. B* **2012**, *89*, 79–85.
- [41] W. Hu, C. Peng, W. Luo, M. Lv, X. Li, D. Li, Q. Huang, C. Fan, *ACS Nano* **2010**, *4*, 4317–4323.
- [42] Y. Chang, S. T. Yang, J. H. Liu, E. Dong, Y. Wang, A. Cao, Y. Liu, H. Wang, *Toxicol. Lett.* **2011**, *200*, 201–210.
- [43] H. Ali-Boucetta, D. Bitounis, R. Raveendran-Nair, A. Servant, J. Van den Bossche, K. Kostarelos, *Adv. Healthcare Mater.* **2013**, *2*, 443–441.
- [44] X. Sun, Z. Liu, K. Welsher, J. T. Robinson, A. Goodwin, S. Zaric, H. Dai, *Nano Res.* **2008**, *1*, 203–212.
- [45] S. Zhang, K. Yang, L. Feng, Z. Liu, *Carbon* **2011**, *49*, 4040–4049.
- [46] X. Zhang, J. Yin, C. Peng, W. Hu, Z. Zhu, W. Li, C. Fan, Q. Huang, *Carbon* **2011**, *49*, 986–995.
- [47] M. C. Duch, G. R. Budinger, Y. T. Liang, S. Soberanes, D. Urich, S. E. Chiarella, L. A. Campochiaro, A. Gonzalez, N. S. Chandel, M. C. Hersam, G. M. Muthu, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 5201–5207.
- [48] F. A. Murphy, C. A. Poland, R. Duffin, K. T. Al-Jamal, H. Ali-Boucetta, A. Nunes, F. Byrne, A. Prina-Mello, Y. Volkov, S. Li, S. J. Mather, A. Bianco, M. Prato, W. MacNee, K. Kostarelos, K. Donaldson, *Am. J. Pathol.* **2011**, *178*, 2587–2600.
- [49] a) K. Kostarelos, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 774–776; b) C. A. Poland, R. Duffin, I. Kinloch, A. Maynard, W. A. Wallace, A. Seaton, V. Stone, S. Brown, W. MacNee, K. Donaldson, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 423–428.

- [50] K. Yang, S. Zhang, G. Zhang, X. Sun, S. T. Lee, Z. Liu, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3318–3323.
- [51] A. Sahu, W. I. Choi, G. Tae, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5820–5822.
- [52] E. Zanni, G. De Bellis, M. P. Bracciale, A. Broggi, M. L. Santarelli, M. S. Sarto, C. Palleschi, D. Uccelletti, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 2740–2744.
- [53] W. Zhang, C. Wang, Z. Li, Z. Lu, Y. Li, J. J. Yin, Y. T. Zhou, X. Gao, Y. Fang, G. Nie, Y. Zhao, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 5391–5397.
- [54] O. Akhavan, E. Ghaderi, *ACS Nano* **2010**, *4*, 5731–5736.
- [55] a) S. Liu, T. H. Zeng, M. Hofmann, E. Burcombe, J. Wei, R. Jiang, J. Kong, Y. Chen, *ACS Nano* **2011**, *5*, 6971–6980; b) S. Liu, M. Hu, T. H. Zeng, R. Wu, R. Jiang, J. Wei, L. Wang, J. Kong, Y. Chen, *Langmuir* **2012**, *28*, 12364–12372.
- [56] O. N. Ruiz, K. A. Fernando, B. Wang, N. A. Brown, P. G. Luo, N. D. McNamara, M. Vangness, Y. P. Sun, C. E. Bunker, *ACS Nano* **2011**, *5*, 8100–8107.
- [57] X. Cai, M. Lin, S. Tan, W. Mai, Y. Zhang, Z. Liang, Z. Lin, X. Zhang, *Carbon* **2012**, *50*, 3407–3415.
- [58] a) I. E. M. Carpio, C. M. Santos, X. Wei, D. F. Rodrigues, *Nanoscale* **2012**, *4*, 4746–4756; b) C. M. Santos, J. Mangadlao, F. Ahmed, A. Leon, R. C. Advincula, D. F. Rodrigues, *Nanotechnology* **2012**, *23*, 395101.
- [59] O. Akhavan, E. Ghaderi, *Carbon* **2012**, *50*, 1853–1860.
- [60] M. Sawangphruk, P. Srimuk, P. Chiochan, T. Sangsri, P. Siwayaprahm, *Carbon* **2012**, *50*, 5156–5161.
- [61] K. Yang, J. Wan, S. Zhang, Y. Zhang, S.-T. Lee, Z. Liu, *ACS Nano* **2011**, *5*, 516–522.
- [62] J.-H. Liu, S.-T. Yang, H. Wang, Y. Chang, A. Cao, Y. Liu, *Nanomedicine* **2012**, *7*, 1801–1812.
- [63] Z. M. Markovic, B. Z. Ristic, K. M. Arsikin, D. G. Klisic, L. M. Harhaji-Trajkovic, B. M. Todorovic-Markovic, D. P. Kepic, T. K. Kravic-Stevovic, S. P. Jovanovic, M. M. Milenkovic, D. D. Milićevic, V. Z. Bumbasirevic, M. D. Dramicanin, V. S. Trajkovic, *Biomaterials* **2012**, *33*, 7084–7092.
- [64] L. Lacerda, J. Russier, G. Pastorin, M. A. Herrero, E. Venturelli, H. Dumortier, K. T. Al-Jamal, M. Prato, K. Kostarelos, A. Bianco, *Biomaterials* **2012**, *33*, 3334–3343.
- [65] A. V. Titov, P. Král, R. Pearson, *ACS Nano* **2010**, *4*, 229–334.