

Biomedyczne zastosowania i toksyczność nanorurek węglowych

Jadwiga Mielcarek, Paulina Skupin

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Adres do korespondencji: Jadwiga Mielcarek, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej UM, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, tel. 061 854 66 04, e-mail: jmielcar@ump.edu.pl

Nanorurki węglowe charakteryzują się zróżnicowaną morfologią oraz unikatowymi właściwościami fizykochemicznymi. Czynniki te zadecydowały o gwałtownym rozwoju prac doświadczalnych w ciągu ostatnich dwudziestu lat, dotyczących węglowych nanostruktur i ich perspektywicznych zastosowań. Nanomedycyna jest niezwykle ważną dziedziną, w której nanorurki mogą znaleźć różnorodne zastosowania, zarówno w terapii, jak i diagnostyce. Jednym z kierunków jest rozwój czujników biologicznych (ang. *biosensors*) oraz bioreaktorów w skali nano, gdzie podstawę stanowi unieruchomienie białka lub enzymu na powierzchni nanorurki węglowej lub we wnętrzu grafitowego cylindra [3, 22]. Pojawiają się doniesienia o elektroanalitycznych urządzeniach opartych na nanorurkach, które mogą być skutecznie wykorzystywane do rozpoznania antygenów, a także katalizowania reakcji enzymatycznych [6]. Przyłączając specyficzny ligand na zakończeniu nanorurki węglowej, można uzyskać nanosondy diagnostyczne, przydatne np. w mapowaniu receptorów na powierzchni komórek.

Nanorurki węglowe mogą również stać się przełomem w inżynierii tkankowej. Prowadzone są wstępne badania sugerujące możliwość ich działania jako elektromechanicznego rozrusznika dla sztucznych mięśni oraz prace nad odpowiednią biofunkcjonalizacją nanorurek, które mają stanowić substrat dla wzrostu neuronalnego [14, 16]. Podejmuje się także liczne próby łączenia nanorurek węglowych z cząstkami aktywnymi w celu tworzenia nowoczesnych docelowych transporterów leków, co jest szczególnie istotne z punktu widzenia przemysłu farmaceutycznego [4, 21].

Przemysł farmaceutyczny, szczególnie zaś rozwój nowych leków, zmagają się z pewnymi problemami, u których podłoża leżą dwie istotne przyczyny. Pierwsza, to wygasanie patentów na istotne pod względem farmakologicznym leki oryginalne (ang. *blockbuster drugs*). Drugą stanowi niedostateczna

Biomedical applications and toxicity of carbon nanotubes

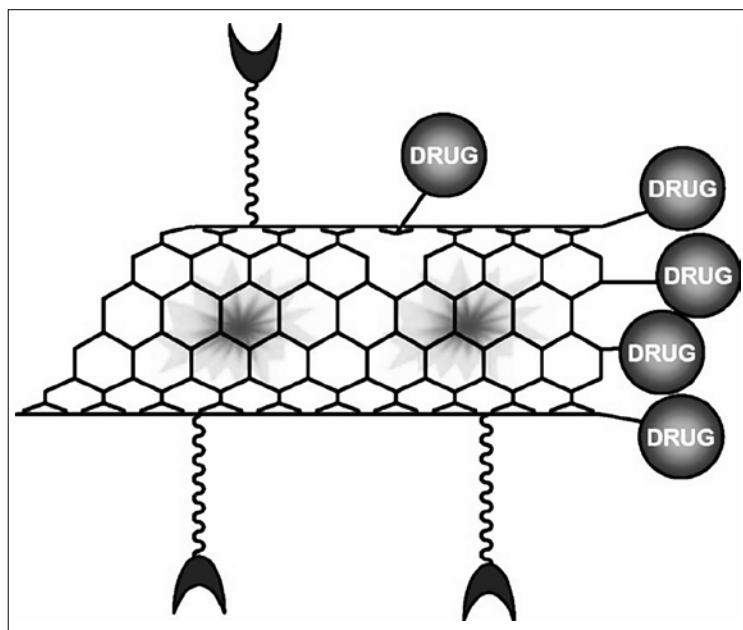
The use of carbon nanotubes, one of the allotropic varieties of carbon, is expected to open new possibilities in many branches of science and technology. Their potential has recently aroused great interest in pharmacy and medicine. Unfortunately, their direct application in biomedicine is restricted by their poor solubility in the organism fluids. The problem is to achieve the material characterized by appropriate biocompatibility as a result of a number of modifications. The paper presents some aspects of the use of carbon nanotubes in pharmacy and medicine and gives a review of the possible modifications altering the solubility of these nanostructures. The threats related to the medical use of carbon nanotubes, are also indicated.

Keywords: nanotechnology, nanomaterials, carbon nanotubes, drug, toxicity

© Farm Pol, 2009, 65(6): 407-410

biodostępność bądź wysoka toksyczność nowo odkrywanych substancji aktywnych. Wymusza to podjęcie przez firmy farmaceutyczne kreatywnych działań zmierzających do „odświeżenia” programów poszukiwania i rozwoju nowych leków [5]. Jedną ze strategii staje się wdrożenie nanotechnologii na wczesnym etapie tych procesów.

Na rynku farmaceutycznym znajdują się preparaty wykorzystujące jako nośniki leków m.in. liposomy, surfaktanty czy struktury polimerowe [15, 21]. W badaniach klinicznych wykazano wzrost skuteczności przy jednoczesnym zmniejszeniu toksyczności doksorubicyny związanej z nośnikiem liposomalnym oraz polietylenoglikolem. Systemy transportujące substancję leczniczą mogą także wpływać na inne właściwości leku, jak rozpuszczalność w wodzie, pozwalając uzyskać spowolnione uwalnianie lub kontrolować uwalnianie substancji czynnej [8]. Ponadto mogą chronić substancję leczniczą przed degradacją chemiczną



Rycina. Wielofunkcyjny system transportujący lek – nanorurka węglowa z różnymi ligandami [21]

(hydroliza i rozkład enzymatyczny), fotorozkładem a także poprawić jej biodostępność.

Wykorzystanie nanorurek węglowych jako nośników jest możliwe dzięki postępowi badań nad ich chemiczną modyfikacją endo- i egzohedralną [2]. Nanorurki węglowe mogą być poddawane funkcjonalizacji z różnymi cząstkami aktywnymi odpowiedzialnymi za rozpoznanie celu (terapia celowana), obrazowanie oraz terapię (**rycina**). Powstaje w ten sposób wielofunkcyjny system transportujący lek, który może znacznie poprawić jego profil farmakologiczny [20, 21].

Nanorurki węglowe jako nanokontenery

Nanorurki wypełnione różnymi indywidualnymi chemicznymi mogą być zastosowane w terapii nowotworów, diagnostyce oraz jako środki kontrastowe [21].

Trwają badania nad „czystą”, efektywną i powtarzalną syntezą nanorurek węglowych wypełnionych żelazem, przeznaczonych do leczenia nowotworów, tzw. metodą przegrzania płynem ferromagnetycznym [7, 10]. W fazie badań klinicznych znajdują się analogiczne nanocząstki otaczające metal lub tlenek metalu i jednocześnie posiadające na powierzchni ligandy (kwas foliowy lub odpowiednią glikoproteinę), zapewniające transport nanocząstek do komórek rakowych. Cząstki takie po podaniu dożylnym i osiągnięciu celu, są poddawane działaniu zewnętrznego pola magnetycznego, co prowadzi do kontrolowanego ogrzania cząstek metalu i w konsekwencji do zniszczenia zmienionych komórek. Wyniki wskazują, że metoda ta jest bardziej precyzyjna niż chemioterapia, niesie także mniejsze ryzyko wystąpienia działań niepożądanych i generuje niższe koszty [5].

Nanorurki węglowe jako nośniki genów

Terapia genowa jest obiecującą metodą leczenia nowotworów i zaburzeń genetycznych. Do transportu genów służą specjalne wirusowe i niewirusowe nośniki (liposomy, polimery, mikro- i nanocząstki). Pierwsze, niosą ryzyko wystąpienia działań niepożądanych, takich jak odpowiedź immunologiczna, stany zapalne czy onkogeneza. Natomiast transportery niewirusowe, choć bardziej bezpieczne, nie zawsze zapewniają odpowiedni poziom ekspresji genu. Dlatego naukowcy podejmują wysiłki w celu poszukiwania nowych, bardziej efektywnych nośników [4]. Wielkocząsteczkowy i kationowy charakter sfunkcjonalizowanych nanorurek węglowych (f-CNT) umożliwia elektrostatyczne oddziaływanie z plazmidowym DNA. W celu zbadania zdolności f-CNT do tworzenia kompleksów z kwasami nukleinowymi i ich translokacji. Pantarotto i wsp. łączyli w różnych stosunkach f-CNT oraz plazmidowe DNA, zawierające gen markerowy β -galaktozydazy. Obrazy uzyskane dzięki TEM wykazały obecność kompleksów CNT-DNA. Nanorurki f-SWCNT były obecne w postaci wiązek, między którymi występowały plazmidy w formie pierścieniowych skupisk lub superzwiniętych struktur. Badania stopnia ekspresji genu β -galaktozydazy, wykazały zdolność przenikania tych kompleksów do komórek. Ponadto stwierdzono 5–10 razy większy poziom ekspresji genu dla kompleksów f-SWCNT i DNA niż dla samej helisy DNA [19].

Transportowanie genów przy pomocy nanorurek węglowych, może być skutecznie wykorzystane w terapii polegającej na wyciszaniu genów. Zhang i wsp. przygotowali odpowiednie kompleksy f-SWCNT i siRNA genu telomerazy. Stwierdzono szybkie wnikanie tych kompleksów do linii mysich komórek nowotworowych, uwalnianie siRNA oraz skuteczną supresję genu telomerazy [25].

Nanorurki węglowe jako nośniki antygenów

Połączenie zewnętrznych ścian nanorurek z syntetycznie otrzymanymi peptydami, np. epitopami antygenów, tworzy układ, który w żywym organizmie może wywołać odpowiedź immunologiczną [21].

Pantarotto i wsp. przeprowadzili chemoselektywną reakcję przebiegającą między grupami maleimidowymi f-CNT oraz grupami tiolowymi cysteiny, prowadzącą do powstania trwałych wiązań. Dzięki temu połączono f-CNT z fragmentem białkowej otoczki wirusa pryszczycy (FMDV), rozpoznawanym przez limfocyty typu B. Utworzono dwa typy ligandów, z pojedynczym i podwójnym łańcuchem peptydowym. Następnie badano właściwości antygenowe i immunologiczne f-CNT z różnymi ligandami. Stwierdzono, że przeciwiata w porównywalny sposób rozpoznają wolny antygen oraz w połączeniu z f-CNT, natomiast nie rozpoznają f-CNT. Sam nośnik nie wywoływał

również odpowiedzi immunologicznej. Wykazano także zdolność przeciwciał do neutralizacji wirusów. Powyższe wyniki wskazują, że nanorurki mogą być w przyszłości skutecznym transporterem szczepionek otrzymywanych drogą syntezy [4, 18, 21].

Nanorurki węglowe jako nośniki leków

Poprawa parametrów farmakokinetycznych jest szczególnie istotna dla leków o znacznej toksyczności oraz niskiej biodostępności. Stąd duże zainteresowanie naukowców potencjalnym zastosowaniem nanorurek węglowych w terapii nowotworów. Wysoki stosunek długości do średnicy nanorurek umożliwia przyłączenie wielu cząstek aktywnych, które mogą pełnić różne funkcje w transporcie leków. Uzyskuje się dzięki temu wielofunkcyjne nośniki, które udoskonalają transport leku. Niestety problemem pozostaje optymalizacja otrzymywania takich połączeń oraz efektywne wewnątrzkomórkowe uwalnianie z nich substancji czynnej [4].

Pastorin i wsp., przeprowadzili reakcję cykloaddykcji z udziałem MWCNT i azydru alkiloksykarbonylowego. Uzyskane f-MWCNT mają dwie zablokowane grupy aminowe, do których przyłączano kolejno cząsteczki fluoresceiny oraz metotreksatu. Nie wykazano istotnego wzrostu aktywności leku, co może być spowodowane zbyt powolnym uwalnianiem metotreksatu, na skutek obecności dość stabilnych chemicznie wiązań amidowych [20, 21].

Nanorurki mogą pośrednio prowadzić do wzrostu toksyczności leków przeciwnowotworowych wobec komórek guza, przez zwiększenie ich zdolności do przenikania do cytoplazmy, co zostało wykazane w badaniach Feazell i wsp. Powierzchnię nanorurek poddano chemicznej niekowalencyjnej modyfikacji z PEG oraz fosfolipidami. Następnie, kompleksy platyny(IV) łączono z aktywowanymi grupami aminowymi fosfolipidów. Stwierdzono we wnętrzu komórek sześciokrotnie wyższe stężenie kompleksu platyny, transportowanego w połączeniu z SWCNT na drodze endocytozy, w porównaniu do kompleksów transportowanych bez udziału nośnika [9].

Nasilone właściwości cytotoksyczne mają również niekowalencyjne kompleksy dokсорubicyny otoczone polimerem MWCNT [1].

Toksyczność nanorurek węglowych

Gwałtowny rozwój nanotechnologii w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat rodzi pytania o wpływ, jaki nanomateriały mogą wywierać na zdrowe tkanki. Potencjalna toksyczność nanorurek węglowych może wynikać z wysokiego stosunku długości do średnicy oraz z toksyczności materiału, jakim jest grafit. W przeciwieństwie do cząstek o średnicy powyżej 100 nm, nanorurki (zwłaszcza dość długie) wykazują potencjalnie wyższą toksyczność wobec układu

oddechowego. Łatwo ulegają redystrybucji z miejsca magazynowania, mogą uniknąć fagocytozy oraz zmieniać strukturę protein. Działania te prowadzą do aktywacji czynników zapalnych oraz odpowiedzi immunologicznej i zaburzenia czynności komórek. Nanorurki węglowe, w aspekcie toksykologicznym, można zaklasyfikować do „nanocząstek”, które mogą uczestniczyć w nieznanym i nieprzewidywalnym interakcjach z układami biologicznymi [12].

Wewnętrzną toksyczność nanorurek węglowych można ograniczyć dzięki poddaniu odpowiedniej funkcjonalizacji. Badania *in vitro* prowadzone przez Sayes i wsp. wskazują, że SWCNT sfunkcjonalizowane kowalencyjnie przez ugrupowania sulfofenylove i karboksyfenylove wywołują słabsze działanie cytotoksyczne niż wodna zawiesina oczyszczonych SWCNT stabilizowana 1% roztworem surfaktantu (Pluronic F108). Ponadto w tym samym badaniu udowodniono, że wzrost stopnia kowalencyjnej modyfikacji ścian bocznych nanorurek może prowadzić do dalszego zmniejszenia cytotoksyczności SWCNT [23].

Ze względu na niezwykle wymiary, nanorurki węglowe można zaliczyć do materiałów włóknistych, charakteryzujących się zwykle wysoką toksycznością wobec płuc.

Lam i wsp. oceniali toksyczność SWCNT u myszy, mając na względzie możliwość zawodowego narażenia ludzi na oddziaływanie zarówno oczyszczonych, jak i nieoczyszczonych CNT. W tym celu, po upływie 7 i 90 dni od wprowadzenia SWCNT (zawiesina w surowicy) do tchawicy, przeprowadzono badanie histopatologiczne tkanki płucnej. Wykazano, że zależnie od dawki oraz zawartości katalizatora, zastosowanie SWCNT prowadziło do powstania ziarniaków i wywoływało śródmiąższowe stany zapalne, a w wyniku dalszego rozwoju zmian patologicznych w ciągu 90 dni dochodziło do odoskrzelowego zapalenia płuc [13].

Pojawiają się również doniesienia o możliwości inicjowania przez CNT procesu włóknienia płuc. Shvedowa i wsp. podawali różne dawki SWCNT do gardła myszy w taki sposób, aby uzyskać aerozol. W wyniku tego powstały dwie frakcje SWCNT różniące się wielkością cząstek oraz działaniem szkodliwym. Uznano, że pierwsza część, pod względem morfologicznym stanowiąca agregaty nanorurek, była odpowiedzialna za wywołanie ostrego stanu zapalnego oraz powstanie ziarniaków w miejscu ich nagromadzenia. Drugi rodzaj cząstek to cienkie, delikatne nanorurki węglowe o średnicy poniżej 50 nm, którym przypisano zapoczątkowanie włóknienia i zwiększenia grubości ścian pęcherzyków płucnych w obszarach, do których nie docierały agregaty CNT [24].

Zarówno dotchawicze podanie materiału, jak też aspiracja gardłowa prowadzi do aglomeracji CNT

Nanorurki wypełnione różnymi indywidualnymi chemicznymi mogą znaleźć zastosowanie w terapii nowotworowej, diagnostyce i jako środki kontrastowe.

Wielkocząsteczkowy i kationowy charakter sfunkcjonalizowanych nanorurek węglowych (f-CNT) umożliwia elektrostatyczne oddziaływanie z plazmidowym DNA.

w górnej części oskrzeli oraz do formowania pierwszych zmian włóknistych. Jednak te metody inhalacji nie w pełni oddają fizjologiczny mechanizm wdechu i nie uwzględniają na przykład zatrzymania części cząstek w górnych drogach oddechowych. Ponadto badania wykazały, że wzbudzenie i uwolnienie drobnych cząstek CNT w powietrzu wymaga pewnego nakładu energii oraz że podczas procesów produkcyjnych nie dochodzi do wytworzenia znacznych ilości CNT w powietrzu.

Kolejną drogą narażenia na CNT jest droga dermalna. Pierwsze badania poświęcone tej problematyce zostały opublikowane przez Huczko i Lange. Test dermatologiczny z udziałem 40 ochotników oraz test Draize'a, nie wykazały drażniącego działania CNT na skórę [11]. Jednak badania wykorzystujące linie ludzkich keratynocytów nieco podważają te wyniki.

W 2005 roku Shvedova i wsp., badając wpływ nieoczyszczonych SWCNT na linię komórek nieśmiertelnych ludzkich keratocytów (HaCaT), uzyskali wyniki świadczące o znacznym wzroście stresu oksydacyjnego z wyczerpaniem rezerw przeciwutleniaczy, utracie żywotności oraz morfologicznych zmianach w strukturze tych komórek. Wystąpienie tych działań było w pewnym stopniu uwarunkowane dość dużym zanieczyszczeniem materiału resztkami katalizatora (ok. 30%) [24]. Z tego względu autorzy zwracali uwagę na konieczność unikania bezpośredniego kontaktu skóry z nanorurkami podczas pracy z materiałem. Podobne badania, przeprowadzone na żywych keratynocytach (HEK) przez Monteiro-Riviere i wsp., wykazały wystąpienie odpowiedzi w postaci zwiększenia produkcji prozapalnych cytokin oraz zmniejszenia żywotności komórek. Wystąpienie reakcji było zależne zarówno od dawki, jak i od czasu narażenia komórek na działanie oczyszczonych MWCNT.

W niektórych badaniach, które dotyczyły limfocytów T oraz linii zarodkowych komórek nerki wykazano zdolność CNT do indukcji apoptozy. Monteiro-Riviere i wsp. nie zaobserwowali takiej reakcji dla keratynocytów. Różnice te mogą wynikać ze sposobu przygotowania materiału oraz z wyższej wrażliwości niektórych komórek na działanie CNT [17].

Powyższe przykłady świadczą, że ocena toksyczności CNT nie jest zadaniem łatwym. Dotąd przeprowadzono niewiele badań poświęconych tej tematyce, a ich wyniki są często nieprzekonujące, a nawet sprzeczne. Podsumowując, można stwierdzić, że nieoczyszczone nanorurki wykazują dość duży stopień toksyczności (*in vitro* i *in vivo*), jednak za te właściwości odpowiada głównie obecność katalizatorów (Fe, Ni, Co, Zn). Ekspozycja na oczyszczone CNT, zwłaszcza ich wysokie stężenia, powoduje wystąpienie znacznie mniejszych działań toksycznych. Najmniejszą szkodliwością charakteryzują się nanorurki

sfunkcjonalizowane, przeznaczone między innymi do aplikacji biomedycznych. Badania toksyczności i cytotoxyczności CNT powinny być kontynuowane, a wyniki poddawane szczegółowej analizie, aby zapewnić bezpieczeństwo osobom pracującym przy produkcji CNT oraz aby umożliwić wykorzystywanie nanorurek węglowych na szerszą skalę w przyszłości [23].

Otrzymano: 2009.02.16 · Zaakceptowano: 2009.03.05

Piśmiennictwo

1. Ali-Boucetta H., Al-Jamal K.T., McCarthy D. i wsp.: Multiwalled carbon nanotube-doxorubicin supramolecular complexes for cancer therapeutics. *Chem. Comm.* 2008, 8, 459-461.
2. Bandow S., Rao A.M., Williams K.A. i wsp.: Purification of single-wall carbon nanotubes by microfiltration. *J. Phys. Chem. B* 1997, 101, 88398-842.
3. Baughman R.H., Cui C., Zakhidov A.A. i wsp.: Carbon nanotubes actuators. *Science* 1999, 284, 1340-1344.
4. Bianco A., Kostarelos K., Prato M.: Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* 2005, 9, 674-679.
5. Burger M.: Strategies for developing and commercializing nanobio drugs, diagnostics and devices. *Nanomedicine* 2007, 2, 137-141.
6. Chen R.J., Bangsaruntip S., Drouvalakis K.A. i wsp.: Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 4984-4989.
7. Costa S., Borowiak-Paleń E., Bachmatiuk A. i wsp.: Filling of carbon nanotubes for bio-applications. *Phys. Stat. Sol.* 2007, 244, 4315-4318.
8. Cui D., Tian F., Ozkan C.S. i wsp.: Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol. Lett.* 2005, 155, 73-85.
9. Feazell R.P., Nakayama-Ratchford N., Dai H. i wsp.: Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinum(IV) anticancer drug design. *Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 8438-8439.
10. Gooding J.J., Wibowo R., Liu J. i wsp.: Protein electrochemistry using aligned carbon nanotube arrays. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 125, 9006-9007.
11. Huczko A., Lange H.: Carbon nanotubes: Experimental evidence for a null risk of skin irritation and allergy. *Fullerene Sci. Tech.* 2001, 9, 247-250.
12. Lacerda L., Bianco A., Prato M. i wsp.: Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006, 58, 1460-1470.
13. Lam C.W., James J.T., McCluskey R. i wsp.: Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 2004, 77, 126-134.
14. Lin Y., Taylor S., Li H. i wsp.: Advances toward bioapplications of carbon nanotubes. *J. Mater. Chem.* 2004, 14, 527-541.
15. Malmsten M.: Soft drug delivery systems. *Soft Matt.* 2006, 2, 760-769.
16. Mattsson M.P., Haddon R.C., Apparao M.R.: Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. *J. Mol. Neuroscience* 2000, 14, 175-182.
17. Monteiro-Riviere N.A., Nemanich R.J., Inman A.O. i wsp.: Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 2005, 155, 377-384.
18. Lacerda L., Bianco A., Prato M. i wsp.: Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006, 58, 1460-1470.
19. Pantarotto D., Singh R., McCarthy D. i wsp.: Functionalised carbon nanotubes for plasmid gene delivery. *Angew. Chem. (Int. Ed.)* 2004, 43, 5242-5246.
20. Pastorin G., Wu W., Wieckowski S. i wsp.: Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery. *Chem. Commun.* 2006, 11, 1182-1184.
21. Prato M., Kostarelos K., Bianco A.: Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Acc. Chem. Res.* 2008, 1, 60-68.
22. Rege K., Ravavikar N.R., Kim D.-Y. i wsp.: Enzyme-polymer-single walled carbon nanotubes composites as biocatalytic films. *Nano Lett.* 2003, 3, 829-832.
23. Sayes C.M., Liang F., Hudson J.L. i wsp.: Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity *in vitro*. *Toxicol. Lett.* 2006, 161, 135-142.
24. Shvedova A.A., Kisin E.R., Mercer R. i wsp.: Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol-Lung Cell Mol. Physiol.* 2005, 289, 698-708.
25. Zhang Z., Yang X., Zhang Y. i wsp.: Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with positively charged single-walled carbon nanotubes suppresses tumor growth. *Clin. Cancer Res.* 2006, 12, 4933-4939.