

Jadwiga MIELCAREK
Paulina SKUPIN

Funkcjonalizacja nanorurek węglowych jako potencjalnych nośników leków

Functionalization of carbon nanotubes for multimodal drug delivery

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik: Prof. dr hab. Zenon Kokot

Dodatkowe słowa kluczowe:

nanotechnologia
materiały biomedyczne
wielościenne nanorurki węglowe
jednościenne nanorurki węglowe
modyfikacja chemiczna

Additional key words:

nanotechnology
biomedical materials
multi-wall carbon nanotube
single-wall carbon nanotubes
modification

Nanotechnologia operuje cząsteczkami w skali miliardowej (10^{-9} m) i jest obiecującą technologią, która może zrewolucjonizować przemysł farmaceutyczny. Jedną ze struktur stosowanych w nanotechnologii są nanorurki węglowe, których szczególne możliwości aplikacyjne do celów biologicznych są uwarunkowane rozpuszczalnością. Poprawę rozpuszczalności nanorurek węglowych można uzyskać poprzez modyfikację endo- i egzohedralną. Celem artykułu jest przegląd dotychczas stosowanych podstawowych sposobów funkcjonalizacji umożliwiającej zastosowanie nanorurek węglowych w celach biomedycznych.

Biomedyczne zastosowanie nanorurek węglowych (CNT-carbon nanotubes)

Nanorurki węglowe - zarówno jednościenne (SWCNT - *single walled carbon nanotubes*) oraz wielościenne (MWCNT - *multi walled carbon nanotubes*) znajdują liczne zastosowania w medycynie, gdzie mogą być wykorzystane jako biosensory diagnostyczne oraz jako elementy udoskonalające aparaty słuchowe i rozruszniki serca. Duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem nanorurek jako substratu do regeneracji tkanek w inżynierii tkankowej. Nanorurki węglowe stają się także alternatywnym nośnikiem, posiadającym zdolność transportu dokomórkowego cząstek aktywnych biologicznie o działaniu terapeutycznym i diagnostycznym. Duży wkład w badania poświęcone rozwojowi nanorurek węglowych jako systemów transportujących leki wnieśli Bianco i wsp. Autorzy ci wykazali zdolność przemieszczania się SWCNT i MWCNT połączonych z peptydami, proteinami, kwasami nukleinowymi oraz substancjami o działaniu przeciwnowotworowym i przeciwrzybiczym, do wnętrza komórek [2]. Połączenie z nanorurkami węglowymi umożliwia prowadzenie terapii celowanej, pozwala zmniejszyć toksyczność oraz poprawić stabilność związków biologicznie czynnych. Ze względu na jednowymiarową strukturę (wysoki stosunek długości do średnicy), na powierzchni nanorurek węglowych można związać wiele substancji, uzyskując tym samym wielofunkcyjne systemy transportujące. Nośniki takie mogą uczestniczyć w jednoczesnym prze-

Nanotechnology is a very promising technology with a potential that can revolutionise the pharmaceutical industry. One interesting nanostructure are carbon nanotubes whose application possibilities are restricted by their solubility. Their solubility can be improved by applying endo- and exohedral modifications. The paper offers a review of the hitherto applied methods of functionalisation permitting the use of carbon nanotubes for biomedical purposes.

noszeniu substancji aktywnej odpowiadającej za działanie terapeutyczne lub diagnostyczne lub przeciwciała, poprzez związanie się z określonym receptorem na powierzchni komórki zapewnią docelowy transport [12].

Badania poświęcone wykorzystaniu nanorurek jako nośników leków rozwijają się dynamicznie, wciąż jednak pewne zagadnienia wymagają wyjaśnienia. Dotyczy to przede wszystkim cytotoxyczności, skuteczności terapeutycznej, drogi biodegradacji i eliminacji z organizmu, zarówno nanorurek wolnych, jak też w połączeniu z substancjami aktywnymi. Wyzwaniem dla badaczy, z farmaceutycznego punktu widzenia i klinicznych aplikacji nanomateriałów, pozostaje zapewnienie strukturalnej i chemicznej powtarzalności procesu syntezy oraz wysokiej jakości i czystości otrzymanych CNT [6].

Nanorurki węglowe po zsyntetyzowaniu zawierają duże ilości zanieczyszczeń, wykazują znaczną toksyczność oraz są nierozpuszczalne w rozpuszczalnikach kompatybilnych ze środowiskiem żywych komórek. Stanowi to podstawową przeszkodę w wykorzystaniu ich w chemii biomedycznej. Z tego względu konieczne jest wstępne oczyszczenie nanorurek węglowych oraz poddanie ich odpowiedniej modyfikacji kowalencyjnej lub niekowalencyjnej, z udziałem różnorodnych związków chemicznych i biomolekuł. W wyniku tego otrzymać można produkt rozpuszczalny w wodzie oraz, jak wykazują badania, o zmniejszonej toksyczności [8].

Adres do korespondencji:

Jadwiga Mielcarek
Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Tel.: (061) 8546604
e-mail: jmielcar@ump.edu.pl

Struktura nanorurek węglowych

Średnica SWCNT wynosi od ułamka do kilku nanometrów. Natomiast w przypadku MWCNT, wymiary średnicy zależą od liczby warstw grafenowych. Średnica rdzenia wewnętrznego zwykle mieści się w granicach od kilku do kilkunastu nanometrów, zaś zewnętrzna wynosi nawet kilkadziesiąt nanometrów - rycina 1. Długość nanorurek węglowych może osiągać nawet kilkanaście mikrometrów. Ze względu na wysoki stosunek długości do średnicy, nanorurki węglowe traktuje się jako struktury jednowymiarowe. Badania mikroskopowe wykazują, że większość nanorurek posiada zamknięte końce. Zamknięcie cylindra zbudowanego z heksagonalnej sieci wymaga załamania krzywizny, co uzyskuje się dzięki wprowadzeniu pierścieni pentagonalnych. Zakończenia te mają zróżnicowaną morfologię, najczęściej stanowią sferyczne struktury stanowiące połowę przeciętego wzdłuż osi fullereny [1].

SWCNT występują w wiązkach i są dość silnie poskręcane, podczas gdy MWCNT są zazwyczaj proste. SWCNT - w porównaniu ze strukturami MWCNT, są materiałem bardziej homogenicznym i odznaczają się wyższą doskonałością struktury. Wynika to głównie z faktu, iż zawierają zwykle mniej defektów sieciowych oraz charakteryzuje je mniejsza rozpiętość średnic [18].

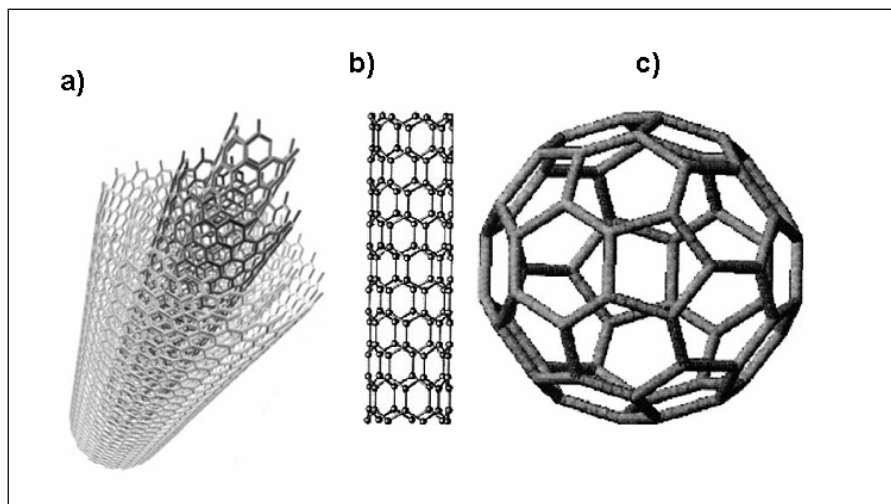
Badania, zwłaszcza z zastosowaniem techniki mikroskopii elektronowej - ujawniają, że powierzchnia nanorurek węglowych nie jest wolna od różnego rodzaju defektów. Przyjmując za doskonały model nanorurki węglowej, cylindrycznie zwiniętą warstwę grafenową z niezbędną liczbą pierścieni pięciocłonowych na obydwu końcach, można wyróżnić trzy klasy defektów sieciowych:

- defekty topologiczne, wynikające z obecności pierścieni pięcio- i siedmiocłonowych w heksagonalnej sieci przestrzennej;
- defekty hybrydazyjne, polegające na tworzeniu wiązań o pośrednim stopniu hybrydacji;
- niekompletne wiązania, brak atomów węgla.

Występowanie defektów sieciowych w nanorurkach węglowych wywiera wpływ na ich właściwości fizykochemiczne, między innymi zmianę właściwości elektrycznych i magnetycznych. Ponadto duża liczba defektów zwiększa reaktywność chemiczną nanorurek [16].

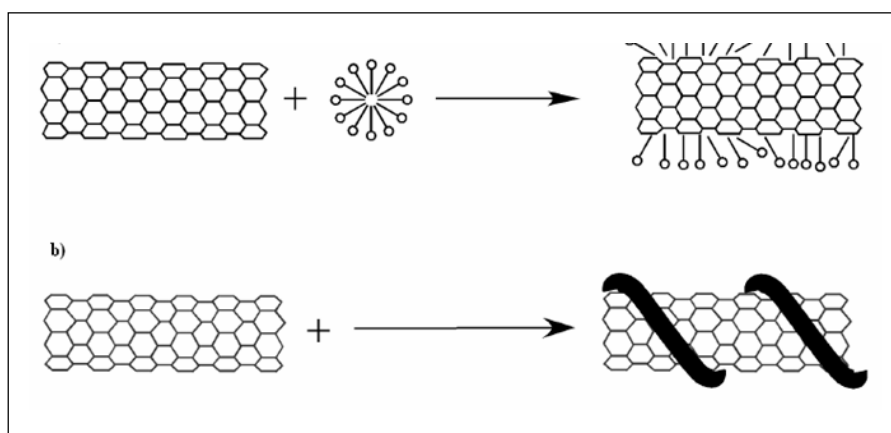
Właściwości chemiczne nanorurek węglowych

Nanorurki węglowe mają silnie hydrofobowy charakter, wykazują niewielką reaktywność, nie rozpuszczają się w rozpuszczalnikach polarnych i niepolarnych. Pod względem aktywności chemicznej w strukturze nanorurek wyodrębnić można dwa obszary. Zamknięte końce, stanowiące połowę fullereny, są dość reaktywne, podczas gdy zwinięta płaszczyzna grafitowa jest znacznie mniej podatna na działanie czynników chemicznych. Z tego względu większość reakcji przebiega na zakończeniach nanorurek oraz na zdeformowanych powierzchniach bocznych, które są specyficz-



Rycina 1

Schemat: a) wielowarstwowej nanorurki węglowej b) jednowarstwowej nanorurki węglowej c) fullereny [19].
Scheme: a) multi walled carbon nanotubes b) single walled carbon nanotubes c) fullerene [19].



Rycina 2

Schematy niekonwalencyjnej funkcjonalizacji nanorurek węglowych [13]: a) micela utworzona w wyniku dyspersji nanorurki z detergentem; b) nanorurka opleciona łańcuchem polimeru.

Schemes of uncovalent functionalization of carbon nanotubes [13]: a) micella formed due to nanotube dispersion using detergent; b) nanotube braided with a polymer chain.

nymi centrami aktywnymi. Modyfikacja chemiczna i tworzenie grup funkcyjnych umożliwia łączenie nanorurek z innymi związkami chemicznymi oraz prowadzi do wzrostu ich rozpuszczalności, czego konsekwencją jest poszerzenie obszarów praktycznego zastosowania nanorurek węglowych, także jako materiałów biomedycznych [2,3].

Funkcjonalizacja nanorurek węglowych

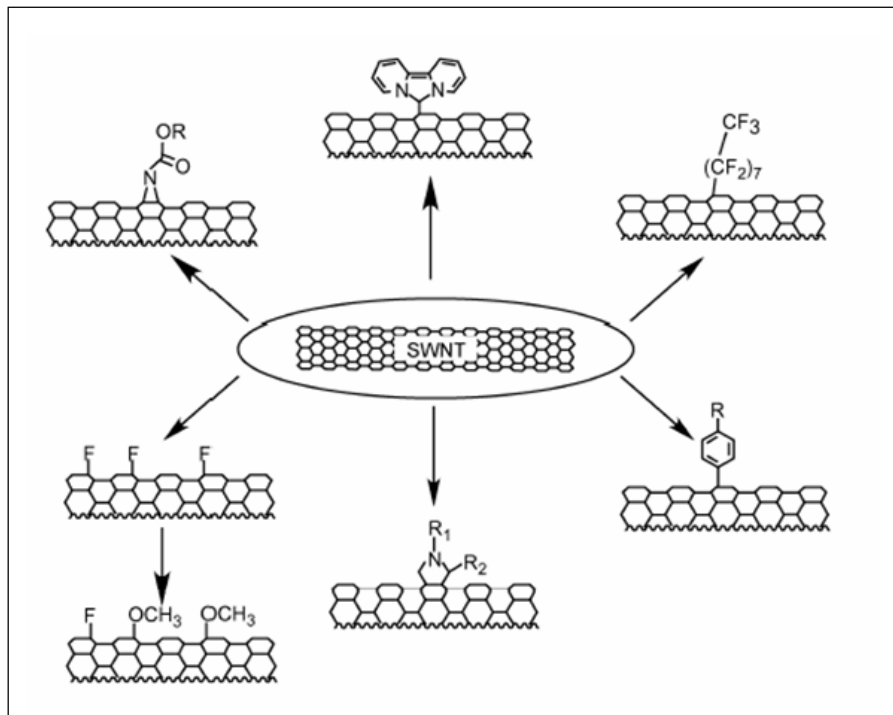
Nanorurki węglowe można funkcjonalizować endohedralnie przez wypełnienie wolnych rdzeni lub egzohedralnie, łącząc ligandy z zewnętrznymi ścianami nanorurek dzięki wiązaniom kowalencyjnym lub oddziaływaniom van der Waalsa [18].

Nanorurki endohedralne

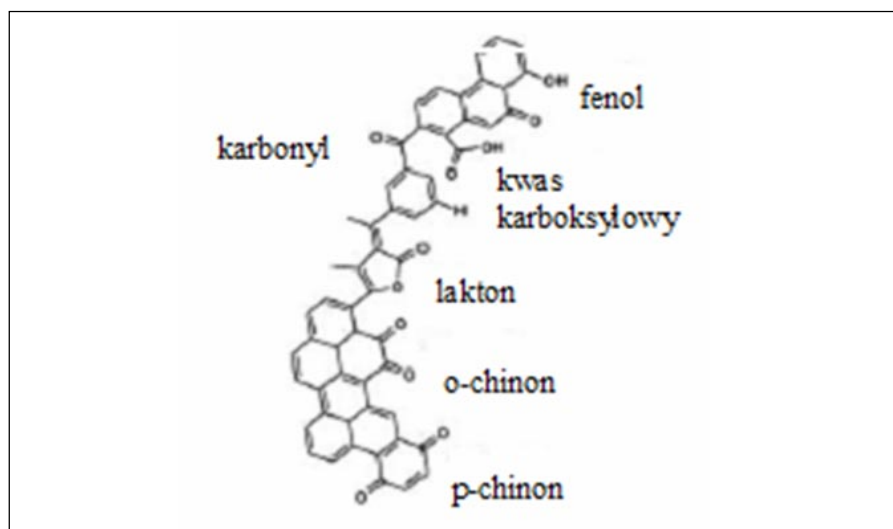
Wewnętrzne przestrzenie nanorurek można wypełnić różnymi związkami chemicznymi. Trwałość takich struktur jest zapewniana przez oddziaływania van der Waalsa, wiązania hydrofobowe i w niektórych przypadkach oddziaływania elektrostatyczne [14]. Pierwszymi cząstkami, które wprowadzono do SWCNT były cząstki fullereny C60. Od tego momentu rozpoczęto bada-

nia zdolności nanorurek do enkapsulacji fullerenów zawierających różną liczbę atomów węgla oraz innych związków organicznych i nieorganicznych [15]. Wyróżnia się trzy metody otrzymywania nanorurek wypełnionych. Jedną - jest napełnianie nanorurek in situ, czyli na etapie powstawania i wzrostu nanorurki, w wyniku współodparowywania węgla oraz materiału napełniającego. Wydajność tej metody jest jednak niewielka. Nieco większą efektywnością odznacza się metoda kapilarna. W tym przypadku wypełnienie nanorurki następuje w momencie oczyszczania, kiedy dochodzi do otwarcia końców nanorurek węglowych. W warunkach ciśnienia atmosferycznego, każda ciecz wykazująca napięcie powierzchniowe poniżej $\sim 180 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, zwilża wewnętrzną powierzchnię MWCNT, napełniając ją spontanicznie w wyniku działania efektu kapilarnego.

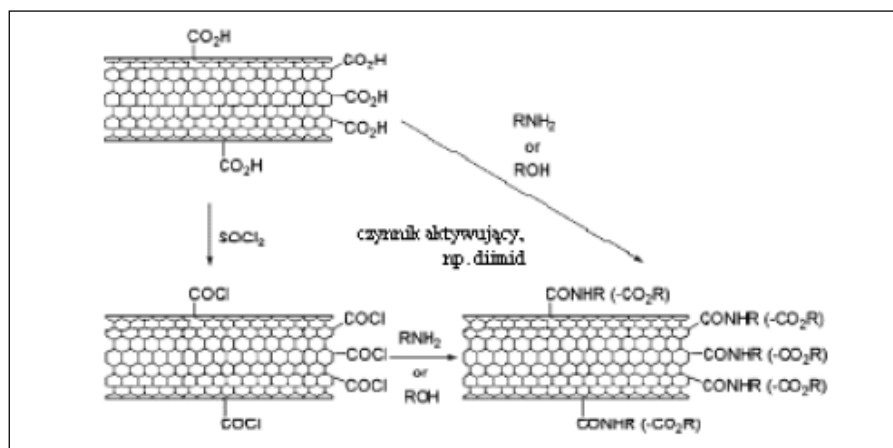
Podjęto także próby wypełniania MWCNT biomolekułami o odpowiedniej wielkości cząstek. Tang i wsp. umieścili w wewnętrznych przestrzeniach MWCNT laktozę, enzym bakteryjny o stosunkowo małej masie cząsteczkowej. Następnie porównywali aktywność katalityczną immobilizo-



Rycina 3
Metody kowalencyjnej funkcjonalizacji nanorurek węglowych [8].
Covalent method of functionalization of carbon nanotubes.



Rycina 4
Schemat występowania tlenowych grup funkcyjnych w defektach sieciowych nanorurek węglowych [11].
The scheme of the existing functional oxygen group in walls defects of carbon nanotubes [11].



Rycina 5
Schemat otrzymywania pochodnych utlenionych nanorurek węglowych [18].
The attained scheme of carbon nanotubes that underwent peroxidation [18].

wanego enzymu, z enzymem wolnym w reakcji hydrolizy penicyliny. Pomimo unieruchomienia, laktamaza wykazywała aktywność, co wskazuje, że nie doszło do wytworzenia znacznych zmian konformacyjnych w strukturze związku. W nanorurkach węglowych można umieścić również fragmenty kwasów nukleinowych [17].

Metody funkcjonalizacji egzohedralnej

Funkcjonalizacja niekowalencyjna

Ze względu na występowanie nanorurek węglowych w dużych, silnie powiązanych wiązkach, pewną trudność sprawia homogenne zdyspergowanie tych struktur. Wyodrębnienie pojedynczej nanorurki węglowej, jest możliwe dzięki owinięciu cylindrycznej struktury przez różnorodne związki, takie jak: polimery, policykliczne związki aromatyczne, surfaktanty i biocząsteczki. Zaletą modyfikacji niekowalencyjnej jest brak negatywnego wpływu na strukturę elektronową oraz przewodnictwo nanorurek. Niekowalencyjne kompleksy są uzyskiwane metodami fizycznymi poprzez mieszanie lub działanie ultradźwiękami, w wyniku polimerizacji monomerów in situ w obecności nanorurek węglowych oraz przez homogenne dyspergowanie przy udziale surfaktantu.

Materiałami najczęściej wykorzystywanymi do funkcjonalizacji nanorurek są: poli-metakrylany, polimery węglowodorowe, poli(fenyleneWINYLEN), poli(etylenoglikol) i wiele innych [17] - rycina 2.

Tang i wsp. otrzymali pierwsze takie połączenie w wyniku polimerizacji in situ fenyleneoacetyleny. Uzyskano CNT oplecione łańcuchem polimeru, o zwiększonej zdolności dyspersji w rozpuszczalnikach organicznych. Ponadto stwierdzono, że poli(fenyleneoacetylen) wykazuje w połączeniu z CNT większą fotostabilność [17].

Trwają badania nad wykorzystaniem nglowych jako nowoczesnych materiałów biokatalitycznych. Rege i wsp. wykazali większą aktywność chymotrypsyny dodanej do zawiesiny CNT-polimetakrylan metylu (PMMA), niż w postaci filmu chymotrypsyna-PMMA. Autorzy stwierdzili, że obecność nanorurek prowadzi do zwiększenia powierzchni, która może zaadsorbować enzym [15].

Nanorurki węglowe mogą tworzyć niekowalencyjne połączenia również z molekułami biologicznymi. Szczególnie silne powinowactwo względem nanorurek węglowych posiadają proteiny. Ich adsorpcję na zewnętrznych ścianach nanorurek węglowych można wykazać metodami mikroskopii elektronowej [18]. Transmisyjna mikroskopia elektronowa została wykorzystana przez grupę badawczą Tanga, do zobrazowania zaadsorbowanej na powierzchni MWCNT metalotioneiny [17]. Struktury utworzone z CNT i białek, w przyszłości mogą być powszechnie wykorzystywane jako rutynowe testy laboratoryjne. Azamian i wsp. poddawali intensywnym badaniom biosensor składający się z CNT, na powierzchni których zaadsorbowano enzym oksydazę glukozy. Połączenie to zintegrowane z elektrodą węglową służy do voltamperometrycznego wykrywania glukozy i wykazuje 10-krotnie wy-

zszą odpowiedź katalityczną [1].

Trwają badania, w których do niekowalencyjnej funkcjonalizacji wykorzystuje się m. in. kwasy nukleinowe, związki cukrowe (skrobia, cyklodekstryny), lipidy, ftalocyjany i porfirazyny. Istnieje również możliwość kowalencyjnego połączenia tych związków z grupami karboksylowymi i aminowymi utworzonymi na powierzchni CNT [18].

Funkcjonalizacja kowalencyjna

Opublikowano wiele wyników badań, w których nanorurki węglowe poddawane były różnorodnym reakcjom chemicznym, prowadzącym do modyfikacji chemicznej ich struktury - rycina 3.

Najważniejsze z pośród tych procesów to: fluorowcowanie, cykloadycja, addycja rodnikowa i kowalencyjne przyłączenie polimerów [16,18].

Utlennianie

Zsyntetyzowanym nanorurkom węglowym towarzyszy wiele zanieczyszczeń, m. in. resztki katalizatora oraz węgiel amorficzny [20]. Pozostałości te można usunąć działając na nanorurki węglowe kwasami nieorganicznymi. Proces ten prowadzi jednocześnie do otwarcia zamkniętych końców i powstawania defektów w sieci krystalicznej nanorurek, które "udekorowane" są tlenowymi grupami funkcyjnymi [18]. Wg wielu badaczy, podczas utleniania następuje pękanie wiązań C-C w zakończeniach, ponieważ załamanie krzywizny, warunkuje występowanie większych naprężeń. W wyniku utleniania najczęściej powstają grupy karboksylowe, fenolowe, ale także karbonylowe, laktonowe oraz struktury orto i para chinonu - rycina 4 [6,11].

Utlennianie jest jedną z najprostszych i najczęściej wykorzystywanych metod chemicznej modyfikacji CNT. Efektywność tego procesu zależy jednak od właściwego doboru reagentów, gdyż zbyt intensywne utlenianie może prowadzić do skracania nanorurek węglowych, gromadzenia węglowych zanieczyszczeń, a także zaniku nanorurek o bardzo małych średnicach i nawet całkowitej utraty materiału [21].

Utlennianie nanorurek węglowych przebiega najczęściej z udziałem kwasu azotowego(V) o różnych stężeniach, często w obecności ultradźwięków [11]. Ponadto w

badaniach stosuje się inne czynniki utleniające jak: perhydrol [18], ozon, nadtlenek wodoru, KMnO_4 [19].

Utworzone w procesie utleniania grupy funkcyjne mogą służyć do dalszej funkcjonalizacji nanorurek poprzez estryfikację lub tworzenie wiązań amidowych. Reaktywność grup karboksylowych można zwiększyć przez utworzenie chlorków kwasowych [18]. *Chen* i wsp. poddali utlenione nanorurki węglowe reakcji acylacji z alkilaminą, dzięki czemu po raz pierwszy uzyskano próbkę nanorurek rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych [4,5]. Tworzenie amidów i estrów CNT (rycina 5) jest obecnie jedną z najczęściej wykorzystywanych metod, pozwalających uzyskać materiał rozpuszczalny w wodzie i innych polarnych rozpuszczalnikach.

Wpływ funkcjonalizacji na właściwości nanorurek

Słaba rozpuszczalność jest podstawowym czynnikiem utrudniającym wykorzystanie nanorurek węglowych w celach medycznych. Funkcjonalizacja chemiczna umożliwia rozpuszczenie lub zdyspergowanie nanorurek węglowych w rozpuszczalnikach polarnych i niepolarnych.

Zhang i wsp. oceniali wpływ utleniania na zdolność dyspersji oraz strukturę i wymiary SWCNT. Autorzy ci, badając skutki utleniania SWCNT wykazali, że im dłuższy czas trwania procesu oksydacji, tym lepsza rozpuszczalność CNT. Ponadto stwierdzili, że na rozpuszczalność wpływa również sposób utleniania - lepszą rozpuszczalnością w polarnych rozpuszczalnikach charakteryzowały się nanorurki utleniane w wyższych temperaturach [20].

Dotychczas stabilne zawiesiny uzyskano w wyniku kowalencyjnego połączenia utlenionych MWCNT z lipazą [16], lizyną [10] lub też przez utworzenie połączeń SWCNT z fosfolipidami [9] oraz cyklodekstrynami [13].

Podsumowanie

Intensywnie prowadzone badania powinny już w niedalekiej przyszłości zaowocować uzyskaniem produktów nanotechnologicznych spełniających wymagania, jakie nośnikom substancji leczniczych stawia współczesna farmakologia i być bodźcem do rozwoju nanofarmakologii.

Piśmiennictwo

1. **Azamian B.R., Davis J.J., Coleman K.S., et al.:** Bioelectrochemical single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 12664.
2. **Bianco A., Kostarelos K., Partidos C. et al.:** Bio-medical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chem. Commun.* 2005, 5, 571.
3. **Bianco A., Kostarelos K., Prato M.:** Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005, 9, 674.
4. **Chen J., Hamon M.A., Hu H. et al.:** Solution properties of single-walled carbon nanotubes. *Science* 1998, 282, 95.
5. **Chen S., Shen W., Wu G. et al.:** A new approach to the functionalization of single-walled carbon nanotubes with both alkyl and carboxyl groups. *Chem. Phys. Lett.* 2005, 402, 312.
6. **Dresselhaus M., Dresselhaus G., Saito R.:** Physics of carbon nanotubes. *Carbon* 1995, 33, 883.
7. **Feazell R.P., Nakayama-Ratchford N., Dai H. et al.:** Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinum(IV) anticancer drug design. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 8438.
8. **Georgakilas V., Kordatos K., Prato M. et al.:** Organic functionalization of carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 760.
9. **He P., Urban M.W.:** Controlled phospholipid functionalization of single-walled carbon nanotubes. *Biomacromolecules* 2005, 6, 2455.
10. **Hu N., Dang G., Zhou H. et al.:** Efficient direct water dispersion of multi-walled carbon nanotubes by functionalization with lysine. *Mater. Lett.* 2007, 61, 5285.
11. **Jung A., Graupner R., Ley L. et al.:** Quantitative determination of oxidative defects on single walled carbon nanotubes. *Phys. Stat Sol.* 2006, 243, 3217.
12. **Khlobystov A.N., Britz D.A., Briggs A.D.:** Molecules in carbon nanotubes. *Acc. Chem. Res.* 2005, 38, 901.
13. **Nakashima N.:** Soluble carbon nanotubes: fundamentals and applications. *Int. J. Nanosci.* 2005, 4, 119.
14. **Prato M., Kostarelos K., Bianco A.:** Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Acc. Chem. Res.* 2008, 1, 60.
15. **Rege K., Raravikar N.R., Kim D.Y. et al.:** Enzyme-polymer-single walled carbon nanotubes composites as biocatalytic films. *Nano Lett.* 2003, 3, 829.
16. **Shi Q., Yang D., Su Y. et al.:** Covalent functionalization of multi-walled carbon nanotubes by lipase. *J. Nanopart. Res.* 2007, 9, 1205.
17. **Tang B.Z., Xu H.:** Preparation, alignment, and optical properties of soluble poly(phenylacetylene)-wrapped carbon nanotubes. *Macromolecules.* 1999, 32, 2569.
18. **Tasis D., Tagmatarchis N., Bianco A., Prato M.:** Chemistry of carbon nanotubes. *Chem. Rev.* 2006, 106, 1105.
19. www.ls.nanosilver.cz/what-is-nanotechnology
20. **Zhang J., Zou H., Qing Q. et al.:** Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 3712.
21. **Ziegler K.J., Gu Z., Peng H. et al.:** Controlled oxidative cutting of single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 1541.