

*Biomedical use of mesoporous silica modified with aptamers***Biomedyczne zastosowania mezoporowatej krzemionki modyfikowanej aptamerami**

DOI: 10.15199/62.2024.10.15

*A review, with 20 refs., of the use of aptamer-modified mesoporous silica as drug carriers and chem. probes elements. The role of aptamers as the elements enabling targeted drug delivery was described. The aptamers were also shown to be the factors linking different ligands. The usage of as-prepared aptamers enabled to obtain anal. tests to be used for selective detection and detn. of various analytes (pesticides, biological agents).*

**Keywords:** mesoporous silica, drug delivery system, nucleotides, biological agents

Przegląd literaturowy dotyczący zastosowania mezoporowatych krzemionek modyfikowanych aptamerami jako nośników leków oraz elementów czujników chemicznych. Przedstawiono rolę aptamerów jako czynników umożliwiających celowane dostarczanie substancji leczniczych do miejsca ich działania. Aptamery stosowane były również jako czynniki wiążące różne ligandy, co umożliwiło otrzymanie testów analitycznych służących do selektywnego wykrywania i oznaczania różnych analitów (środki ochrony roślin, markery nowotworowe).

**Słowa kluczowe:** mezoporowata krzemionka, układ dostarczania leków, nukleotydy, czynniki biologiczne

Mezoporowate krzemionki to struktury porowate o dobrze rozwiniętej powierzchni właściwej (rzędu 1000 m<sup>2</sup>/g) oraz objętości porów sięgającej 2 cm<sup>3</sup>/g. Spośród wielu dobrze poznanych mezoporowatych krzemionek wyróżnić można te o uporządkowanej strukturze porów (MCM-41, SBA-15, SBA-16), strukturze zbliżonej do gąbki (MCF) i o nieuporządkowanym rozmieszczeniu porów<sup>1-3</sup>. Poza podziałem uwzględniającym rozmieszczenie porów wyróżnić można jeszcze formy morfologiczne poszczególnych struktur. Mogą one mieć postać kul, tworzyć łańcuskowe agregaty, występować w postaci warstw (filmu)<sup>3</sup> lub nanocząstek<sup>4</sup>. Mezoporowate krzemionki z uwagi na swoje doskonałe właściwości adsorpcyjne stosowane są jako katalizatory<sup>5</sup>, adsorbenty enzymów<sup>6</sup>, elementy strukturalne

elektrod<sup>7</sup>, adsorbenty substancji biologicznie czynnych<sup>8</sup> oraz jako nośniki leków<sup>9, 10</sup>. Słabo kwasowy charakter powierzchni krzemionek za sprawą obecności wolnych grup silanolowych<sup>11</sup> można dowolnie modyfikować, stosując różne czynniki chemiczne umożliwiające zmianę charakteru powierzchni np. na zasadowy, hydrofobowy lub silnie kwasowy<sup>2</sup>. Jednym ze sposobów chemicznego „urozmaicenia” powierzchni mezoporowatych adsorbentów jest przyłączenie do nich cząsteczek aptamerów.

Aptamery to jednoniciowe cząsteczki kwasów nukleinowych (dezoksyrybonukleinowego, DNA, lub rybonukleinowego, RNA) złożone z 20–80 nukleotydów, których otrzymywanie i stosowanie są datowane na początek lat 90. ubiegłego wieku. Substancje te odznaczają się właści-



Dr hab. n. farm. Małgorzata GESZKE-MORITZ (ORCID: 0000-0001-5643-0040) w roku 2008 ukończyła studia farmaceutyczne na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. W 2011 r. uzyskała stopień doktora nauk farmaceutycznych, a w 2019 r. stopień doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych na tym samym wydziale. Obecnie jest kierownikiem Zakładu Farmakognozji i Naturalnych Środków Leczniczych na Wydziale Farmacji, Biotechnologii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Specjalność – synteza i właściwości kropek kwantowych, biomedyczne zastosowania nanomateriałów, zastosowania materiałów mezoporowatych w systemach dostarczania substancji leczniczych, adsorpcja związków biologicznie czynnych pochodzenia roślinnego.



Dr hab. n. farm. Michał MORITZ (ORCID: 0000-0003-1784-4325) w roku 2007 ukończył studia biotechnologiczne na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, a w 2008 r. studia farmaceutyczne na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. W 2011 r. uzyskał stopień doktora nauk chemicznych na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, a w 2018 r. stopień doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku. Obecnie jest kierownikiem Zakładu Chemii Farmaceutycznej na Wydziale Farmacji, Biotechnologii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Specjalność – synteza i właściwości materiałów mezoporowatych, modelowanie procesów adsorpcji, systemy dostarczania substancji leczniczych, biomedyczne zastosowania nanomateriałów, adsorpcja substancji biologicznie czynnych.

**\*Adres do korespondencji:**

Zakład Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmacji, Biotechnologii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, pl. Polskiego Czerwonego Krzyża 1, 71-251 Szczecin, tel.: (91) 815-10-12, e-mail: michal.moritz@pum.edu.pl

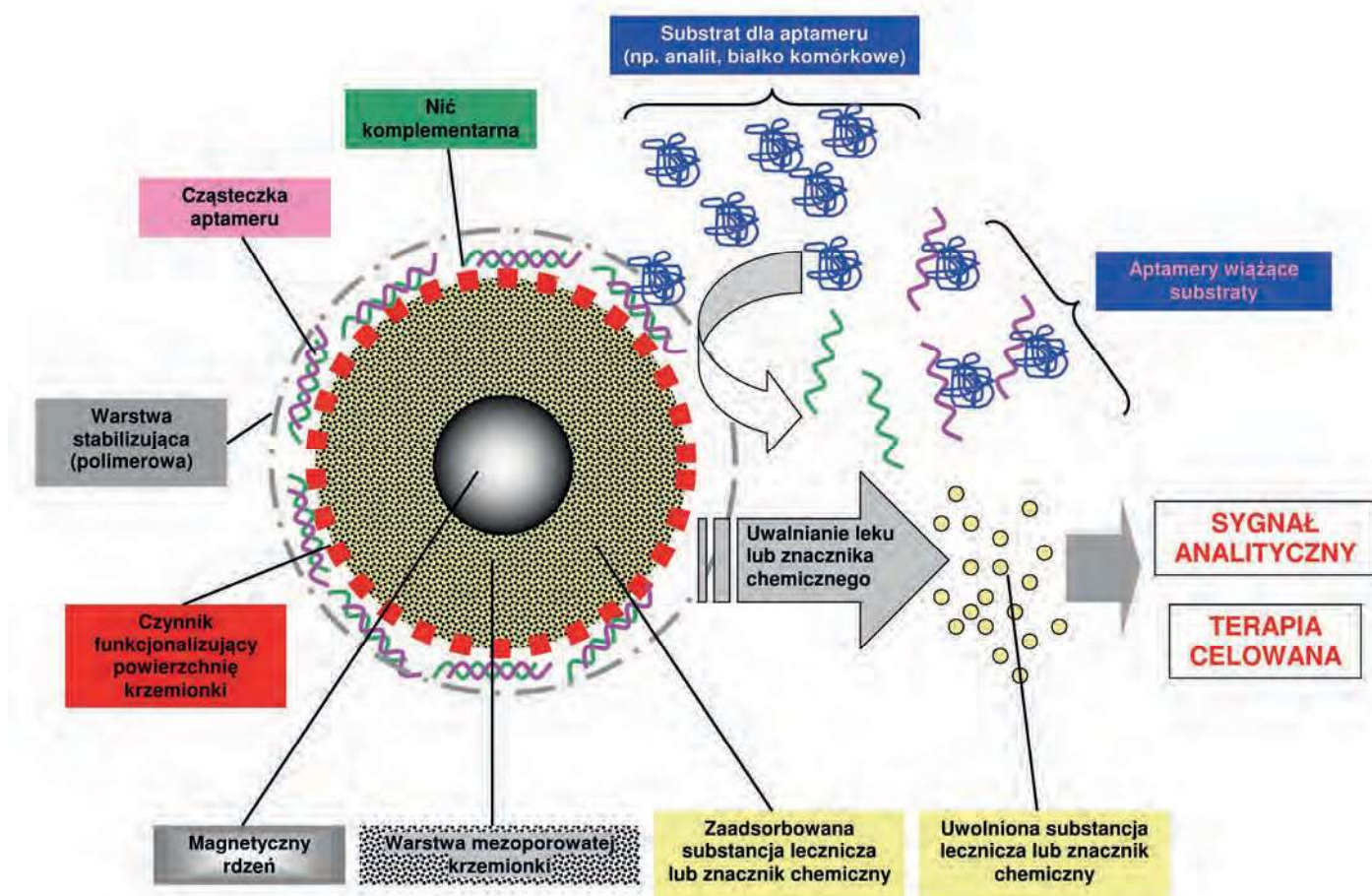


Figure. Structure and functioning of nanocomposite based on mesoporous silica for drug delivery or analyte determination

Rysunek. Budowa i zasada działania modelowego nanokompozytu opartego na mezoporowatej krzemionce stosowanego w celu dostarczenia leków lub oznaczania analitu

wościami wiązania (kompleksowania) różnych substancji, takich jak jony metali, związki o małej masie cząsteczkowej, białka, geny, a nawet całe komórki. Jest to możliwe dzięki unikatowej trójwymiarowej strukturze aptamerów, która zapewnia powstawanie specyficznych regionów wiążących ligandy. Z tego względu aptamery nazywane są również „chemicznymi przeciwciałami”. Obecnie stosowane metody otrzymywania aptamerów umożliwiają syntezę oligonukleotydów wiążących w sposób selektywny określone białka. Możliwa jest także chemiczna modyfikacja tych substancji<sup>12, 13</sup>.

Połączenie unikatowych właściwości powierzchniowych mezoporowatych krzemionek z aptamerami wykazującymi selektywną zdolność wiązania ligandów sprawia, że układy takie znajdują zastosowanie przede wszystkim w terapii celowanej<sup>14</sup> (*targeted delivery*), czyli kierowaniu substancji leczniczej do właściwego miejsca działania, oraz w diagnostyce laboratoryjnej<sup>15</sup>. Na rysunku przedstawiono przykładowy schemat budowy i działania modelowego nanokompozytu często opisywanego w aktualnym piśmiennictwie, złożonego z warstwy mezoporowatej krzemionki naniesionej na warstwę innego nośnika (np. magnetyczne nanokuleczki), modyfikowanego ostatecznie cząstecz-

kami aptamerów. Niejednokrotnie związanie aptamerów z powierzchnią krzemionki wymaga jej wstępnej chemicznej modyfikacji (np. 3-aminopropylotrietoksysilanem) lub zastosowania aptamerów w formie zhybrydowanej z komplementarną nicią DNA lub związanych z polimerem, co stwarza przestrzenną barierę blokującą dostęp do kanałów znajdujących się w warstwie mezoporowatej krzemionki. Obecność w środowisku reakcji ligandu (analit, białko, receptor komórkowy) specyficznego dla danego aptameru powoduje jego oddysocjowanie z warstwy stabilizującej kompozytu i wiązanie go z cząsteczką ligandu. Odsłonięcie kanałów mezoporowatej krzemionki powoduje z kolei uwolnienie z nich uprzednio zaadsorbowanej zawartości (np. leku lub znacznika analitycznego), w wyniku czego osiągnięty jest efekt terapeutyczny lub pojawienie się bodźca chemicznego wywołującego sygnał analityczny.

## Układy dostarczania substancji leczniczych

Zhang i współpr.<sup>16</sup> opracowali układ dostarczania substancji leczniczych w celu uwalniania remdesiviru (lek przeciwwirusowy) w obecności jednego z białek koronawirusa. Do otrzymania układu terapeutycznego wykorzystano

mezoporowate nanocząstki, których kanały zablokowano (*gating*) aptamerami wiążącymi białko N koronawirusa (2019-nCoV). Początkowo przeprowadzono proces adsorpcji substancji leczniczej na powierzchni porów mezoporowatego adsorbentu, po czym dokonano procesu modyfikacji nanocząstek za pomocą 3-aminopropylotrietoksylanu. Następnie pory mezoporowatych nanocząstek zablokowano nanocząstkami złota z przyłączonymi do ich powierzchni aptamerami dla białka N koronawirusa. W celu zapewnienia stabilności powstałego układu, uniemożliwiającej przedwczesne uwolnienie remdesiwiru, do aptameru przyłączono komplementarną nić DNA zawierającą terminalną grupę karboksylową, która oddziaływała z powierzchnią nanocząstek modyfikowanych grupami 3-aminopropylowymi, blokując skutecznie pory nośnika. W obecności białka N koronawirusa cząsteczki aptamerów uległy związaniu z tym ligandem, co doprowadziło do odsłonięcia porów krzemionki i ostatecznie przyczyniło się do uwolnienia substancji czynnej z porów nanocząstek krzemionki<sup>16</sup>. Nieco bardziej złożony układ dostarczania leków zaproponowali Al-Mosawi i współpracownicy<sup>17</sup>, wykorzystując magnetyczne właściwości nanocząstek tlenków żelaza (*superparamagnetic iron oxide nanoparticle*, SPION), których powierzchnię pokryto warstwą mezoporowatej krzemionki modyfikowanej aptamerami w celu dostarczania 5-fluorouracylu (lek przeciwnowotworowy) do komórek nowotworu okrężnicy. W tym przypadku płaszcz mezoporowatej krzemionki zmodyfikowano grupami o charakterze zasadowym (3-aminopropylotrietoksylan), a następnie prowadzono proces współadsorpcji 5-fluorouracylu oraz rodaminę B. W celu zablokowania porów krzemionki do powierzchni płaszcza przyłączono nanocząstki złota. Otrzymany układ ostatecznie powleczono warstwą bifunkcyjnego glikolu polioksyetylenowego, zawierającego terminalne grupy tiolowe i karboksylanowe, w celu przyłączenia aptamerów skierowanych przeciw cząsteczkom adhezyjnym komórek epitelialnych. Czynnikiem adhezyjnym był glikoproteina wytwarzana przez komórki nowotworowe, która bierze udział w procesach migracji, namnażania i różnicowania komórek. Obecność rodaminę B w tak sporządzonym nanokompozycie umożliwiła przyżyciowe obrazowanie tkanek z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej, a magnetyczny rdzeń zapewniał obrazowanie za pomocą rezonansu magnetycznego. Autorzy prac potwierdzili celowane dostarczanie 5-fluorouracylu do komórek nowotworowych za sprawą modyfikacji opracowanego układu terapeutycznego aptamerami wiążącymi glikoproteinę adhezyjną<sup>17</sup>. Podobny układ terapeutyczny opisali także Torabi i współpracownicy<sup>14</sup>, którego przeznaczeniem było celowane dostarczanie leku przeciwnowotworowego (sunitinib) stosowanego w terapii nowotworów jajnika. W tym przypadku jako nośnik zastosowano mezoporowatą krzemionkę modyfikowaną powierzchniowo cząsteczkami aptamerów wiążących glikoproteinę MUC-1. Glikoproteina MUC-1 jest znacznikiem nowotworowym wytwarzanym obficie przez komórki nowotworu jajnika. W warunkach ekspe-

rymentalnych (linia komórkowa OVCAR-3) wykazano, że zastosowanie nanocząstek krzemionki modyfikowanej aptamerami pozwoliło na zwiększone ich wchłanianie przez komórki nowotworowe wykazującej nadekspresję glikoproteiny MUC-1 w porównaniu z linią komórkową pozbawioną możliwości ekspresji tego białka, przyczyniając się do zmniejszenia rozwoju komórek nowotworowych<sup>14</sup>.

## Nanokompozytowe czujniki oparte na aptamerach

Climent i Rurack<sup>18</sup>) skonstruowali test analityczny oparty na mezoporowatych nanocząstkach, służący do wykrywania penicyliny zawartej w próbkach rzeczywistych (mleko). W tym przypadku początkowo kanały mezoporowatej krzemionki wypełnione zostały chlorkiem tris(2,2'-bipyridyno)rutenu(II) jako znacznikiem elektrochemiluminescencyjnym. Następnie krzemionkę zawierającą zaadsorbowany znacznik poddano kolejno modyfikacji z zastosowaniem 3-aminopropylotrietoksylanu oraz aptamerami złożonymi z 39 nukleotydów. Ten etap modyfikacji był kluczowy dla tzw. bramkowania (*gating*) kanałów mezoporowatej krzemionki, zapobiegając niekontrolowanemu uwalnianiu znacznika chemicznego, ponieważ grupy 3-aminopropylowe oddziałują elektrostatycznie z cząsteczkami aptamerów, uniemożliwiając ich oddysocjowanie z powierzchni mezoporowatych nanocząstek. W obecności penicyliny cząsteczki aptameru ulegają związaniu z analitem, co przyczynia się do otwarcia mezoporowatych kanałów i uwolnienia znacznika elektrochemiluminescencyjnego. Układ mezoporowate nanocząstki-znacznik-aptamer naniesiony został na stosowny papier zawierający modyfikowane włókna szklane, zaś detekcja chemiluminescencji prowadzona była z zastosowaniem urządzenia typu *smartphone* wyposażonego w kamerę. Granica wykrywalności penicyliny za pomocą testu opracowanego przez autorów wyniosła 0,18 µg/L<sup>18</sup>). Dong i współpracownicy<sup>19</sup>) zastosowali z kolei mezoporowate nanocząstki krzemionki modyfikowane cząsteczkami aptamerów w celu oznaczania chlorpyrifosu (środek owadobójczy) metodą spektroskopii ramanowskiej ze wzmocnieniem powierzchniowym SERS (*surface-enhanced Raman spectroscopy*). Podczas opracowanej metody analitycznej autorzy zastosowali dwa rodzaje nanocząstek krzemionki. Pierwsze z nich to nanocząstki modyfikowane 3-aminopropylotrietoksylanem, na powierzchni których prowadzono adsorpcję 4-aminotiofenolu (4-ATP), jako tzw. cząsteczki sygnałowej, a następnie przyłączono cząsteczki aptameru wiążącego chlorpyrifos. Przyłączenie aptameru zablokowało pory krzemionki, co uniemożliwiło uwalnianie cząsteczek sygnałowych. Drugi typ nośnika zawierający jony srebra otrzymano poprzez funkcjonalizację grupami tiolowymi (3-merkaptopropylotrimetoksylan) uprzednio modyfikowanej grupami 3-aminopropylowymi krzemionki. Modyfikacja nanocząstek krzemionki grupami tiolowymi umożliwiła wiązanie jonów srebra. Obecność środka owadobójczego w oznaczanej próbce powodowała związanie

go z aptamerem i uwolnienie cząsteczki sygnałnej (4-ATP) z porów pierwszego typu krzemionki. Uwolniony czynnik sygnałny reagował z kolei z nanocząstkami krzemionki zawierającymi jony srebra, powodując wzmocnienie sygnału analitycznego SERS. Granica wykrywalności chlorpyrifosu w opracowanej metodzie analitycznej wyniosła 19,9 ng/mL, zaś zakres liniowości metody mieścił się w granicach 25–250 ng/mL<sup>19</sup>).

Mezoporowate nakanompozyty mogą służyć także w oznaczaniu czynników biologicznych, takich jak receptory wirusów i antygeny. Tabrizi i Acedo<sup>15</sup>) opracowali czujnik elektrochemiczny do wykrywania domeny wiążącej receptora wirusa SARS-CoV-2 w próbkach śliny. W tym przypadku autorzy nanieśli film mezoporowatej krzemionki na powierzchnię elektrody grafenowej. Warstwę mezoporowatego adsorbentu zmodyfikowano podstawnikami 3-aminopropylowymi, a następnie przeprowadzono proces adsorpcji błękitu metylenowego jako znacznika chemicznego. Ostatecznie do dodatnio naładowanej powierzchni krzemionki przyłączono cząsteczki aptamerów wiążące domenę receptora wirusowego, co skutecznie blokowało (elektrostatyczne oddziaływanie aptameru z grupami 3-aminopropylowymi) możliwość wydostawania się błękitu metylenowego. W obecności domeny wiążącej receptora SARS-CoV-2 następowało związanie aptameru, powodujące odblokowanie porów krzemionki, z których uwolnił się błękit metylenowy. Uwolnienie tego ostatecznego powodowało zmianę potencjału elektrody pomiarowej (sygnał elektrochemiczny). Opracowany układ analityczny charakteryzował się granicą wykrywalności białka wirusa rzędu 0,36 ng/mL oraz liniowością odpowiedzi czujnika w zakresie 0,5–250 ng/mL<sup>15</sup>).

Innym przykładem zastosowania aptamerów do celów diagnostycznych jest ich wykorzystanie w procesie oznaczania antygeny karcynoembrionalnego. Antygen ten jest czynnikiem biorącym udział w procesie adhezji komórkowej i jest wytwarzany przez niektóre komórki nowotworowe. W tym celu Zhang i Tang<sup>20</sup>) powlekli magnetyczne kuleczki o średnicy 100 nm złożone z tlenków żelaza warstwą mezoporowatej krzemionki modyfikowanej 3-aminopropylotrietoksyloksylanem. Do powierzchni krzemionki przyłączone zostały następnie jednoniciowe odcinki kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) zawierającego terminalne grupy karboksylowe. Następnie na powierzchni krzemionki zaadsorbowano 4-nitrofenol, który pełnił funkcję znacznika chemicznego. Kolejnym etapem było przyłączenie do zakotwiczonych już fragmentów DNA cząsteczek aptamerów (komplementarność par zasad azotowych). Zasada działania tak otrzymanego testu analitycznego polegała na tym, że w obecności antygeny nastąpiło wiązanie przez niego aptameru, czemu towarzyszyło uwolnienie z porów krzemionki proporcjonalnej ilości znacznika chemicznego (4-nitrofenolu). Autorzy wykazali liniową zależność uwalnianego 4-nitrofenolu w zakresie stężeń antygeny karcynoembrionalnego 0,1–100 ng/mL, zaś granica wykrywalności

analitu wyniosła 46 pg/mL. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że opracowany sposób oznaczania antygeny nie wymagał stosowania kosztownej aparatury, ponieważ pomiar stężenia 4-nitrofenolu przeprowadzono metodą spektrofotometryczną, zaś magnetyczny rdzeń nanostruktury umożliwiał ich łatwe oddzielanie od składników roztworu<sup>20</sup>).

## Podsumowanie

Mezoporowate krzemionki ze względu na swoją porowatość, a tym samym dobrze rozwiniętą powierzchnię właściwą stanowiącą element budowy nanokompozytów znajdującego zastosowanie w naukach biomedycznych. Połączenie warstwy mezoporowatego adsorbentu z nukleotydowymi aptamerami nadaje adsorbentowi nowe właściwości biologiczne. Selektywne powinowactwo otrzymywanych aptamerów do ściśle określonych substancji (białka komórkowe, substancje o małej masie cząsteczkowej) sprawia, że możliwe jest wybiórcze wiązanie różnych substancji z powierzchnią mezoporowatej krzemionki. Ta ostatnia może być nanoszona w formie warstwy na powierzchnię elektrod lub nanocząstek tlenków żelaza, tworząc odpowiednio nanoczujniki lub układy dostarczające substancje lecznicze do określonych miejsc ich działania (np. komórki nowotworowe).

*Publikację sfinansowano ze środków MEiN (w 2024 r.) w ramach projektu nr WFB-405/S/2024 realizowanego na Wydziale Farmacji, Biotechnologii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie.*

Otrzymano: 09-09-2024

Zrecenzowano: 18-09-2024

Zaakceptowano: 24-09-2024

Opublikowano: 21-10-2024

## LITERATURA

- [1] M. Moritz, *Przem. Chem.* 2013, **92**, nr 12, 2300.
- [2] M. Moritz, M. Geszke-Moritz, *Mater. Sci. Eng., C* 2015, **49**, 114.
- [3] V. Meynen, P. Cool, E.F. Vansant, *Micropor. Mesopor. Mater.* 2009, **125**, 170.
- [4] B. Gu, Q. Zhao, Y. Ao, *Biomolecules* 2024, **14**, 1057.
- [5] B.A. Oni, O.S. Tomomewo, S.E. Sanni, A.J. Ibegbu, R. Joseph, *Molecular Catalysis* 2024, **553**, 113774.
- [6] S. Zhang, J. Bai, W. Kong, H. Song, Y. Liu, G. Liu, L. Ma, L. Zhou, Y. Jiang, *Green Chem. Eng.* 2024, **5**, 173.
- [7] S.G. Fogang, G. Deffo, L.S. Guenang, R.C.T. Temgoua, E. Njanja, I.K. Tonle, A. Bhaumik, E. Ngameni, *Anal. Lett.* 2024, **57**, 1241.
- [8] M. Moritz, M. Geszke-Moritz, *Materials* 2019, **12**, 3671.
- [9] M. Moritz, M. Geszke-Moritz, *Materials* 2020, **13**, 2913.
- [10] M. Moritz, M. Geszke-Moritz, *Pharmaceutics* 2022, **14**, 1542.
- [11] D. Liu, G. Ma, H.C. Allen, *Environ. Sci. Technol.* 2005, **39**, 2025.
- [12] D. Park, S.J. Lee, J.-W. Park, *Biomedicines* 2024, **12**, 187.
- [13] M. Liu, L. Wang, Y. Lo, S.C.-C. Shiu, A.B. Kinghorn, J.A. Tanner, *Cells* 2022, **11**, 159.
- [14] M. Torabi, A. Aghanejad, P. Savadi, A. Barzegari, Y. Omid, J. Barar, *Molecules* 2023, **28**, 411.
- [15] M.A. Tabrizi, P. Acedo, *Biosens. Bioelectronics* 2022, **215**, 114556.
- [16] X. Zhang, X. Zhang, A. Xu, M. Yu, Y. Xu, Y. Xu, C. Wang, G. Yang, C. Song, Z. Wu, Y. Lu, *Biosensors* 2022, **12**, 950.
- [17] A.K.M. Al-Mosawi, A.R. Bahrami, S. Nekooei, A.S. Saljooghi, M.M. Matin, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022, **10**, 1095837, doi: 10.3389/fbioe.2022.1095837.
- [18] E. Climent, K. Rurack, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, **60**, 26287.
- [19] S. Dong, Q. Shi, K. He, J. Wu, Z. Zhu, J. Feng, *Foods* 2022, **11**, 3331.
- [20] J. Zhang, D. Tang, *Micromachines* 2021, **12**, 1138.