

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie



Bakalářská práce

Funkcionalizované nanočástice na bázi oxidů železa s navázanými biologicky aktivními komplexy

Vypracoval: Martin Stavárek

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Management v chemii

Typ studia: Prezenční

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Pavel Štarha, Ph.D.

Termín odevzdání bakalářské práce: 12. 5. 2014

Já, Martin Stavárek, prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod odborným dohledem Mgr. Pavla Štarhy, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedl na konci práce.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry anorganické chemie a Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 12. 5. 2014

.....
Martin Stavárek

Velice rád bych poděkoval Mgr. Pavlu Štarhovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, spojené s celou řadou cenných rad a připomínek, pomoc při zpracování a následné interpretaci výsledků a v neposlední řadě také za provedení termických analýz. Velké poděkování patří Mgr. Radce Křikavové, Ph.D. a RNDr. Janě Gálikové, Ph.D. za provedení FTIR spektroskopie, Mgr. Kláře Šafářové, Ph.D., Ing. Ondřeji Tomancovi a Mgr. Janě Stráské za skenovací elektronovou mikroskopii s energiově disperzní spektroskopií (SEM/EDS) a za transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) a doc. RNDr. Jiřímu Tučkovi, Ph.D. za Mössbauerovu spektroskopii. Dále bych rád poděkoval Prof. RNDr. Zdeňku Trávníčkovi, Ph.D. za umožnění sepsání bakalářské práce na Katedře anorganické chemie. Dále bych rád poděkoval své rodině a v neposlední řadě také své přítelkyni Adélce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Martin Stavárek

Název práce: *Funkcionalizované nanočástice na bázi oxidů železa s navázanými biologicky aktivními komplexy*

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Štarha, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2014

Abstrakt: Cílem této bakalářské práce byla příprava a funkcionalizace magnetických nanočásticových systémů s navázanými protinádorově aktivními komplexy na bázi platiny. Byly využity především platnaté analogy cisplatiny, zejména s N-donorovými halogenderiváty 7-azaindolu, které vykazují vyšší *in vitro* protinádorovou aktivitu ve srovnání se zmíněnou cisplatinou. Teoretická část se věnuje již publikovaným informacím o cíleném transportu léčiv, magnetických nanosystémech pro cílený transport léčiv a protinádorových léčiv na bázi platiny. Praktická část seznamuje čtenáře s přípravou nanočásticových systémů a jejich fyzikálně-chemickou charakterizací, která byla provedena kombinací specifických instrumentálních metod jako je termická analýza, FTIR a EDS spektroskopie, skenovací elektronová mikroskopie (SEM), transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a Mössbauerova spektroskopie. Superparamagnetické nanonosiče by potenciálně mohly být využity jako nosiče léčiv při tzv. magnetickém cíleném transportu léčiv při léčbě onkologických pacientů. Část výsledků předložené práce byla publikována v odborném vědeckém článku Štarha et al. *Molecules* 19 (2014) 1622–1634, který je k práci přiložen.

Klíčová slova: nanočástice, maghemit, komplexy platiny, protinádorová aktivita, cílený transport léčiv

Počet stran: 45

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Martin Stavárek

Title: *Functionalized iron oxide-based nanoparticles with biologically active complexes*

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic

Supervisor: Mgr. Pavel Štarha, Ph.D.

The year of presentation: 2014

Abstract: The aim of this Bachelor's thesis was preparation and functionalization of magnetic nanosystems with platinum-based antitumor active complexes, especially with the cisplatin analogues involving N-donor halogeno derivatives of 7-azaindole having higher *in vitro* antitumor activity as compared with the mentioned cisplatin. The theoretical part is focused on the literature research regarding the published information about the targeted drug delivery, magnetic nanosystems for targeted drug delivery and platinum-based antitumor drugs. The Practical part deals with the preparation of nanosystems and their characterization performed by a combination of specific instrumental methods such as thermal analysis, FTIR and EDS spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and Mössbauer spectroscopy. Superparamagnetic nanocarriers could be used as drug carriers in the magnetic targeted drug delivery particularly in the treatment of cancer patients. Part of the presented results was published in the scientific paper Štarha et al. *Molecules* **19** (2014) 1622–1634, which is attached to this work.

Keywords: nanoparticles, maghemite, platinum complexes, antitumor activity, targeted drug delivery

Number of pages: 45

Language: Czech

OBSAH

1.	Úvod a cíl bakalářské práce	7
2.	Teoretická část	8
	2.1. <i>Cílený transport léčiv</i>	8
	2.1.1. <i>Úvod do světa nanomateriálů</i>	9
	2.1.2. <i>Železo a jeho oxidy</i>	9
	2.1.3. <i>Nanočástice na bázi oxidů železa v biomedicíně</i>	11
	2.1.4. <i>Vlastnosti nanočástic na bázi oxidů železa</i>	11
	2.2. <i>Protinádorově aktivní komplexy platiny</i>	17
	2.2.1. <i>Historie</i>	17
	2.2.2. <i>Mechanismus účinku</i>	18
	2.2.3. <i>Další klinicky užívaná léčiva na bázi platiny</i>	19
	2.2.4. <i>Cílený transport</i>	21
3.	Experimentální část	23
	3.1. <i>Chemikálie</i>	23
	3.2. <i>Příprava výchozích nanočásticových systémů</i>	23
	3.3. <i>Příprava funkcionalizovaných nanočásticových systémů</i>	24
	3.4. <i>Metody studia připravených systémů</i>	26
4.	Diskuze	28
	4.1. <i>Syntéza a obecné vlastnosti připravených systémů</i>	28
	4.2. <i>Funkcionalizované AMB@Fe nanočástice</i>	28
	4.3. <i>Funkcionalizované ATA@Fe nanočástice</i>	32
	4.4. <i>Funkcionalizované TA@Fe nanočástice</i>	35
5.	Závěr	38
6.	Použitá literatura	40
7.	Přílohy	45

1. Úvod a cíl bakalářské práce

Nanočástice na bázi oxidů železa, jako je např. $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit), se nabízejí jako potenciální nosiče léčiv, které by mohly být využity při tzv. cíleném transportu léčiv. Systémy by byly schopny sofistikovaným způsobem dopravit léčivo přímo do cílové tkáně (např. nádoru) a tím minimalizovat vznik typických vedlejších účinků způsobených atakem toxického léčiva na zdravou tkáň pacienta. Nanočástice oxidů železa tímto nabízejí široké biomedicínální uplatnění s vysokým potenciálem, který je do těchto systémů obecně vkládán.

Cílem této bakalářské práce byla příprava a následná charakterizace funkcionalizovaných magnetických nanočásticových systémů s navázanými protinádorově aktivními komplexy platiny, zejména *cis*-dichloroplatinatými komplexy s halogen deriváty 7-azaindolu (**1–3**) vykazujícími vyšší protinádorový účinek než klinicky užívaná cisplatina. Maghemitové jádro nanočástic bylo potaženo tenkou vrstvou organické kyseliny (kyselina *p*-aminobenzoová (AMB), kyselina aminotereftalová (ATA) nebo kyselina tereftalová (TA)), za vzniku výchozích systémů (**AMB@Fe**, **ATA@Fe**, **TA@Fe**), které byly dále funkcionalizovány příslušným platnatým komplexem (**1–3**, aktivované formy **1*–3***, cisplatina (CDDP), oxaliplatina(OXA)) za vzniku finálních funkcionalizovaných systémů (**1*@AMB@Fe**, **2*@AMB@Fe**, **3*@AMB@Fe**, **1*@ATA@Fe**, **2@ATA@Fe**, **3@ATA@Fe**, **CDDP@TA@Fe**, **OXA@TA@Fe**, **1*@TA@Fe**, **2*@TA@Fe**). Připravené systémy byly charakterizovány pomocí FTIR a EDS spektroskopie, termické analýzy, skenovací elektronové mikroskopie (SEM), transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a Mössbauerovy spektroskopie. Výsledky uvedených technik poskytly relevantní informace o vlastnostech připravovaných funkcionalizovaných systémů, které představují vhodné systémy pro následné studium jejich biologických vlastností.

2. Teoretická část

2.1. Cílený transport léčiv

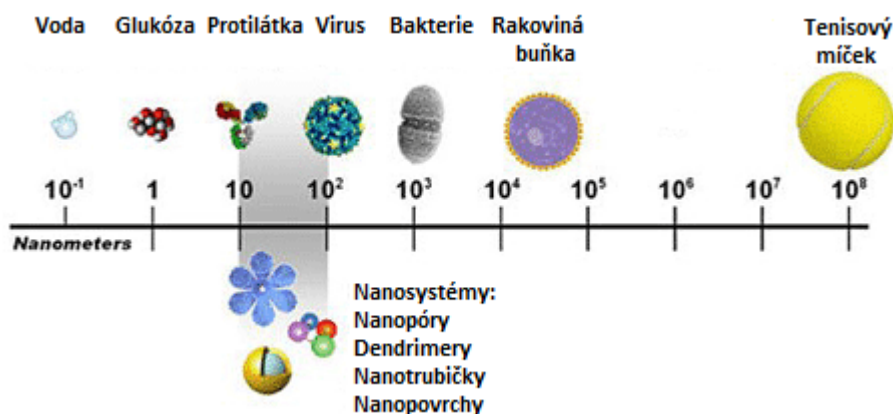
Rakovina je velice komplexní onemocnění, představující abnormální, nekontrolovatelný růst zdravých buněk (1), invazi a následně vznik sekundárních nádorů (tzv. metastází), které v 90% způsobují smrt pacienta (2). Léčba metastazujících nádorů pomocí chirurgického zákroku a následné konvenční chemoterapie a radioterapie je velice obtížná (3). Systémové podávání léků překonává řadu omezení, jakými mohou být špatná rozpustnost léčiva, mnohačetný rozvoj lékové rezistence a v neposlední řadě, vysoce toxické vedlejší účinky (4). I z těchto důvodů je po celá desetiletí snahou vědeckých pracovníků vytvořit specifické transportéry (např. nanočástice), které by byly schopné dopravit toxické léčivo pouze do místa nádoru a zároveň by byly schopné vyhnout se zdravým buňkám. Zásadním parametrem při vývoji takovýchto nosičů byla velikost. Byly vyvinuty částice, které dosahovaly velikosti 1-1000 nm, což jim umožňovalo prostupovat přes biomembrány do orgánů a odtud dokonce až do buněk (5). Paul Ehrlich byl první, který před více než sto lety upozornil na koncept tzv. „magických kuliček“, které nyní představují základ cíleného transportu léčiv. Byly vyvinuty tři základní strategie, jak lze léčivo dopravit a následně uvolnit v cílové oblasti (6). První strategie je založena na přímé aplikaci léčiva do cílového místa (např. injekcí) a následného lokálního uvolnění. Strategie je limitována formou tumoru (solidní) a místem výskytu. Druhá strategie je založena na pasivním cíleném transportu (tzv. passive targeting), kdy je léčivo dopraveno do cílového místa díky svým vlastnostem (velikost částic, lipofilita). Třetí strategie je tzv. cílený transport, kdy je transportér (nanočástice) vybaven směrovací částicí, která navede transportér s léčivem do cílového místa (obr. č. 1). Směrovací částicí mohou být monoklonální protilátky, které jsou specifické vůči určitým typům rakovinných buněk, externí spouštěče využívající magnetické pole, případně inertní spouštěče, které jsou schopny uvolnit léčivo při změně pH (5).



Obr. č. 1. Schéma funkcionalizované nanočástice, převzato a upraveno z (7).

2.1.1. Úvod do světa nanomateriálů

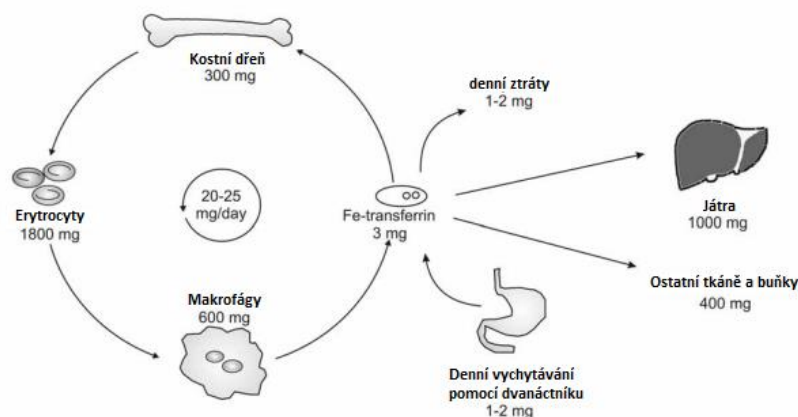
Nanotechnologie je jedinečné multidisciplinární propojení chemie, fyziky a biologie, které se začalo rozvíjet od poloviny 20. let 20. století (8). Pojem „nanotechnologie“ zavedl koncem 50. let 20. století americký fyzik Richard Feynman. Jak už název napovídá, oblast ve které se tato věda pohybuje, je ve škále od 1 do 100 nm (obr. č. 2). Nanotechnologie poskytuje řadu nových látek, které mohou být použity v procesu úpravy vody, zefektivnit produktivitu zemědělství či jednoduše ochránit naše boty před nepříznivým počasím. Nanomateriály jsou označovány jako technologie budoucnosti, jsou všude kolem nás, i když si to mnohdy ani neuvědomujeme. Velký potenciál využití nanotechnologií je spojen s medicínou. Pokrok se očekává v molekulární nanotechnologii, kde by mohli být vytvořeni „nanoroboti“, kteří by v našich tepnách zastávali funkci tzv. „ochranářů“ a pomáhali nám odhalovat vážné choroby, například rakovinu. Ovšem tato „science-fiction“ vzbuzuje spíše obavy z nekontrolovatelné replikace a možnou zkázu celého lidstva. Zato takový cílený transport léčiv zní velice realisticky. Zjednodušeně se jedná o systém, který bude schopen dopravit léčivo do předem stanoveného cíle, aniž by atakoval zdravé části organismu. Výsledkem bude snížení vedlejších účinků a zvýšení efektivity celé léčby. Nanotechnologie má velkou budoucnost, ale opatrnost je namístě (9).



Obr. č. 2. Přehled, převzato a upraveno z (10).

2.1.2. Železo a jeho oxidy

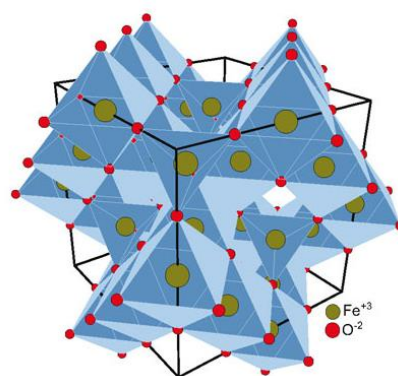
Železo je biogenní stopový prvek, životně důležitý pro mnohé organismy (11). Atom železa je zastoupen ve formě hemu v červených krvinkách, kde je transportérem kyslíku a jiných dýchacích plynů. V lidském metabolismu (obr. č. 3) se setkáváme i s atomem železa



Obr. č. 3. Metabolismus železa v lidském organismu, převzato a upraveno z (12).

navázaným na atomu síry při tzv. akonitáze, což je enzym vystupující v 2. kroku Krebsova cyklu a má tu funkci, že dokáže regulovat transport železa v těle (13). V základním stavu je železo toxické (12). Volný železnatý ion $[\text{Fe}]^{2+}$ se účastní Fentonovy reakce, která dokáže produkovat životu toxický radikálový, hydroxylový ion OH^{\cdot} (14). Produkce možných volných radikálů může vést k poškození organismu. V organismu je velice důležité udržet přirozenou rovnováhu metabolismu železa. Metabolismus probíhá jak na buněčné tak na systémové úrovni.

Magnetické nanočástice na bázi oxidů železa jsou studovány pro své unikátní schopnosti, které by bylo možné uplatnit v biologických oborech, lékařství, či při různých analytických aplikacích. Oxidy železa jsou široce rozšířené sloučeniny, využitelné jako zdroje magnetických materiálů (15). V přírodě se tyto modifikace vyskytují zcela běžně ve specifických minerálech. Oxidy železa se vyskytují v podobě polymorfních krystalů, zejména $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematit), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) a Fe_3O_4 (magnetit) (16). Existují i velice vzácné formy oxidu železitého a to především $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (kubický), $\varepsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (kosočtverečný) a amorfnní Fe_2O_3 , které nevykazují žádné magnetické vlastnosti (17). Největší perspektivu pro nanomedicínu a biotechnologie nese $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) (18).



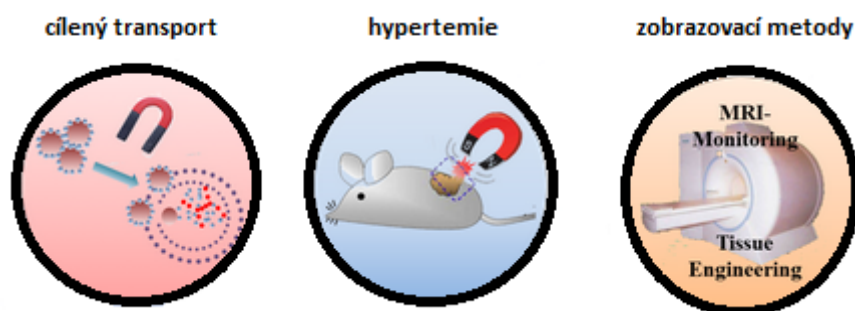
Obr. č. 4. Forma krystalové struktury $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemitu), převzato z (19).

Temně černý, feromagnetický oxid železitý

(γ -Fe₂O₃), obsahuje jak železnaté [Fe]²⁺ tak i železité ionty [Fe]³⁺. Železnaté ionty se nacházejí v oblasti volných míst a jejich uspořádání hraje významnou roli v magnetické odpovědi celého maghemitu. Železité ionty jsou rozmístěny v 16 oktaedrech a 8 intersticiálních místech (obr. č. 4). Díky tomu, že maghemit obsahuje spinelovou strukturu, která je ještě obohacena dvěma podmřížkami a spiny orientované antiparalelně, je logicky hlavním představitelem ferimagnetických látek.

2.1.3. Nanočástice na bázi oxidů železa v biomedicině

Magnetické nanočástice, díky svým unikátním magnetickým vlastnostem, mohou být potenciálně využity v biomedicině (obr. č. 5), jako je diagnostika onemocnění (tzv. efektivní kontrastní činidla (20)) případně mohou být využity přímo v terapii (14). Značení buněk se jeví jako velice slibné, neboť označené buňky magnetickými nanočásticemi, bude možné sledovat pomocí MRI (magnetická zobrazovací metoda) (21; 22). Nanočástice mohou být využity jak k diagnostice onemocnění, tak k následné léčbě. Názorným příkladem jsou klinicky užívané magnetické kuličky, které jsou schopné oddělit a detekovat cirkulující nádorové buňky v krvi sofistikovanějším způsobem než tradiční zobrazovací metody, zejména v počátečním stádiu metastazujícího karcinomu prsu (14). Léčba rakoviny, která je založena především na zvýšené citlivosti rakovinových buněk vůči vysokým teplotám, se nazývá hypertemie, což je terapie při které po dobu několika minut působí na nemocnou tkáň zvýšená teplota, čímž dochází ke zničení rakovinových buněk (5).

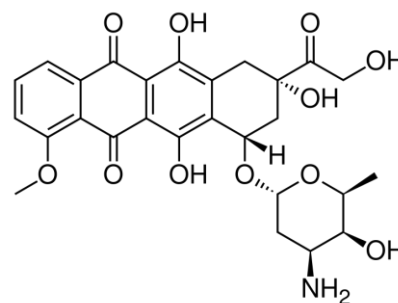


Obr. č. 5. Přehled aplikací magnetických nanočástic, převzato a upraveno z (23).

2.1.4. Vlastnosti nanočástic na bázi oxidů železa

Aplikace

Začátkem 90. let 20. století byly detailně studovány fyzikálně-chemické a biologické interakce mezi nanočásticemi a polyethylenglykolem (PEG). V současné době by se měly objevit v hodnotící klinické fázi. Jedná se o nanočástice, které dokáží dlouhou dobu cirkulovat v krevním řečišti pacienta a lze je využít pro léčbu intravaskulárních onemocnění a solidních tumorů (5). Již do 2. klinické fáze se dostaly magnetito-dextranové nanočástice pro léčbu karcinomu rekta, děložního hrdla a prostaty, využívající kombinaci magnetické hypertemie (ničení nádorových buněk pomocí zvýšené teploty 42-48 °C) s radiační terapií (24). Společnost FeRx.Inc. uskutečnila klinické testy s magnetickými nanočásticemi nesoucí doxorubicin (DDX) (obr. č. 6) u léčby neoperovatelných karcinomů prsu (25).



Obr. č. 6. Strukturální vzorec protinádorového léčiva doxorubicinu (DDX), převzato z (26).

Toxicita

Toxicita je velice diskutované téma. Železo, které se uvolní z nanočástice je dále metabolizováno v retikuloendotelovém systému (RES) a následně poté použito pro tvorbu červených krvinek (erytrocytů), případně dochází k vyloučení nadbytečného železa pomocí ledvin (27). Pokládá se otázka, zdali zvýšení vylučování železa ledvinami nebude mít pro tento orgán fatální následky ve smyslu zánětlivých procesů, případně selhání ledvin. Studie prokázaly, že zvýšená hladina volného železa v těle způsobuje nerovnováhu, je porušena přirozená homeostáza organismu, může docházet k deformacím DNA, oxidativnímu stresu a vzniku zánětlivých ložisek. Mezi nejzranitelnější orgány patří srdce, játra a pankreatické β -buňky (28).

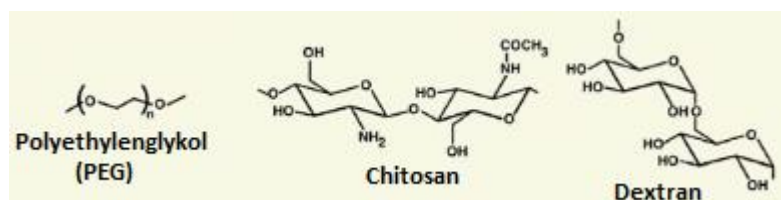
Biokompatibilní vrstva

Hlavní funkcí je schopnost navázat pomocí funkčních skupin (-COOH, -NH₂) léčivo a chránit samotnou nanočástici před chemickými vlivy prostředí. Vrstva je schopna zvýšit krevní poločas rozpadu a zároveň chránit nanočástici před oxidací. Při vývoji nových biokompatibilních vrstev musí být splněno několik hlavních náležitostí. Materiál musí být biodegradovatelný, čímž se stává netoxickým pro organismus pacienta, dále musí být schopen

prostupovat přes fyziologické membrány (játra, slezina) a případně i přes buněčné membrány, aby nanočástice byla schopná maximálně zasáhnout rakovinové buňky a v ní patřičným způsobem uvolnit léčivo (29).

Vrstvy lze rozdělit do několika skupin

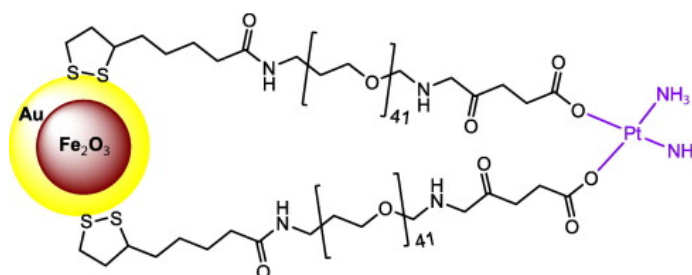
I) **Polymerní vrstva** - velice významná skupina zahrnující hydrofilní polymery (obr. č. 7) jako je škrob, dextran, chitosan, želatina (29). Příkladem mohou být nanočástice obalené chitosanem, které byly studovány pro jejich kovalentní biokonjugaci s urokinasou, čímž se staly horkými adepty na lékové transportéry při léčbě rozpouštění krevních sraženin tzv. trombolýze (30). Želatina je vhodným kandidátem, neboť její řetězec je bohatý na výše zmíněné funkční skupiny, díky nimž lze na její povrch snadno upevnit léčivo (např. Doxorubicin (31)).



Obr. č. 7. Strukturální vzorce nejvýznamnějších polymerních vrstev, upraveno a převzato z (32).

II) **Proteinová vrstva** - příkladem může být značení Amyloidu- β (což je protein obsažený v Alzheimerových vláknech) pomocí fluoreskujícího nebo nefluoreskujícího magnetitu (γ - Fe_2O_3) (33).

III) **Zlato** - sférické jádro nanočástice je pokryto tenkou vrstvou zlata a díky thiolovanému polyethylenglykolu (PEG) je propojena pomocí karboxylátových skupin s aktivní částí léčiva, například cisplatinou (34) (obr. č. 8).



Obr. č. 8. Schéma nanočástice se zlatým povlakem, převzato z (34).

IV) **Organická vrstva** - např. karboxylové kyseliny (např. kyselina glukonová (35)) vytváří na povrchu nanočástice vrstvu, která je schopna vázat funkcionalizující částici. Tohoto přístupu je využito i v předložené práci, kdy byly použity následující karboxylové kyseliny:

- a) tereftalová kyselina (TA) (36)
- b) 4-aminotereftalová kyselina (ATA)
- c) 4-aminobenzoová kyselina (AMB) (37)

Aktivní látka

V současné době jsou nesledovanější aktivní látky, které lze navázat na biokompatibilní vrstvu, zejména chemoterapeutika na bázi platiny (např. cisplatina a její analoga), případně organická chemoterapeutika (např. DDX). Nabízí se možnost využít další léčivé látky, např. protizánětlivá léčiva, antirevmatika případně antitrombotika (5).

Příkladem může být farmaceutická studie zaměřená na magnetické nanočástice s Doxorubicinem, což je léčivo z řady anthracyklinu, které je hojně využíváno k léčbě různých typů rakoviny. Vysoké dávky DDX jsou limitovány z důvodu kardiotoxicity (38). Byly vyvinuty magnetické nanočástice potažené polyethylenglykolem (PEG), na které bylo navázáno léčivo DDX. Bylo zjištěno, že 60% léčiva upevněného na magnetické nanočástici bylo uvolněno během dvou hodin (39).

Stabilita systému

Stabilitu nanočástic zajišťují tři síly. Hydrofobně-hydrofilní síly jsou odpovědné za shlukování nanočástic vyvolané hydrofobními interakcemi dílčích nanočástic, neboť poměr povrch nanočástice k jejímu objemu je velký. Magnetická dipól-dipól interakce je způsobena mikro rozměry a způsobuje magnetizaci sousedních klastrů. V přítomnosti externího magnetitu dochází k magnetizaci sousedních klastrů a příslušné agregaci nanočástic (40). Van der Waalovy síly obecně způsobují agregaci vzhledem k tomu, aby se minimalizovala celková plocha, případně mezifázová energie. Při malé povrchové ploše, nelze efektivně upevnit léčivo, proto se povrchy nanočástic vhodně upravují příslušnými, povrchově aktivními látkami, jakými mohou být kyselina olejová nebo kyselina laurová (41).

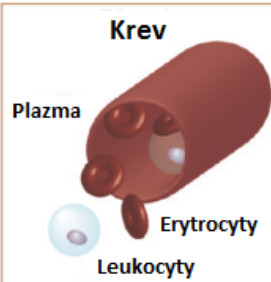


Distribuce

Nanočástice s léčivem budou intravenózně aplikovány pacientům do krevního řečiště za dodržení klíčových parametrů a to velikosti, morfologie a povrchového náboje (42). Jedná se o parametry, které jsou odpovědné za chování v krevním řečišti. Zejména tkáň makrofágů (Kupfferovy buňky v játrech) jsou velice citlivé na invazi cizorodých látek, včetně nanočástic (43). Nanočástice pohybující se ve velikosti nad 200 nm a pod 10 nm nejsou pro organismus vhodné, z důvodů vychytávání pomocí retikuloendotelového systému RES (42). Gupta et al jsou ovšem přesvědčeni, že pokud se velikost nanočástice bude pohybovat v rozmezí od 10 do 100 nm, lze se snadno tomuto systému vyhnout (44).

Omezení transportu

I) fyziologické bariéry

Krev je velice komplexní tekutina, obsahuje tekutou část tzv. plazmu a buněčnou část, kterou představují erytrocyty, leukocyty a trombocyty. Přestože krevní plazma je velice stálá tekutina o konstantní hodnotě pH 7,4 je velice agresivní vůči cizorodým látkám. Strategické je vytvoření ochranné vrstvy, která chrání samotné jádro a přispívá ke koloidní stabilitě.

	Krev	Játra a slezina	Ledviny
Omezení	 <ul style="list-style-type: none">• Vysoce komplexní tekutina• Odpověď imunitního systému	 <ul style="list-style-type: none">• Částice větší než 100 nm jsou odstraněny z krevního oběhu	 <ul style="list-style-type: none">• Částice menší než 10 nm jsou z krve odfiltrovány pomocí glomerul
Strategie	<ul style="list-style-type: none">• Vytvoření PEG-vrstvy• Zapozdření léčiva	<ul style="list-style-type: none">• Hydrodynamická velikost částice musí být menší než 100 nm	<ul style="list-style-type: none">• Hydrodynamická velikost musí být větší než 10 nm

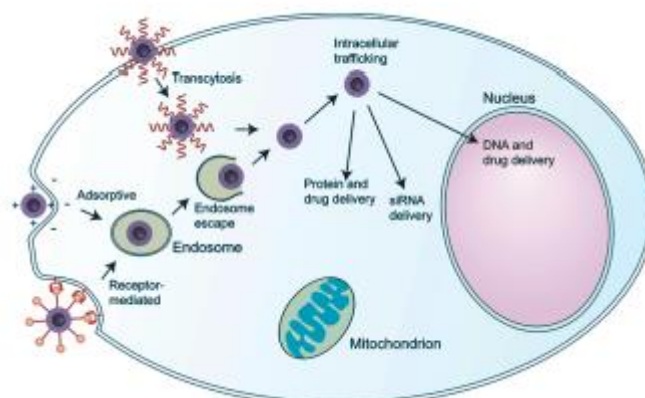
Fyziologické bariéry

Obr. č. 9. Omezení transportu pomocí fyziologických bariér v organismu, převzato a upraveno podle (45).

Nejčastěji užívaným materiálem je polyethylenglykol (PEG). Játra a slezina představují orgány, které náleží cévnímu systému, což znamená, že všechno co je v krvi, projde přes tyto orgány (obr. č. 9). Nanočástice putující v krevním řečišti jsou vychytávány a odstraněny z oběhu. Hydrodynamická nanočástice by neměla překročit hranici 100 nm (viz výše). Ledviny jsou orgány, jimiž se tělo zbavuje odpadních látek. Krev je filtrována póry v glomerulech za tvorby primární moči. Nanočástice menší než 10 nm jsou z krve odfiltrovány. Strategií tedy je vytvářet nanočástice větší než 10 nm. Velikost výsledné nanočástice lze ovlivnit již při samotné syntéze. Nejideálnější velikost nanočástice by se měla pohybovat v rozmezí 10-100 nm, což zajistí minimální vychytávání v játrech, slezině a ledvinách a zlepší tak možnost specificky interagovat s cílovými buňkami (45).

II) buněčné bariéry

Rozhodující faktory při vývoji samotné nanočástice jsou velikost a obal, která kryje samotné jádro nanočástice. U nanočástice, velikosti větší jak 60 nm, dochází k výraznému omezení penetrace do nádorových buněk. Tyto dva faktory mají vliv na distribuci a schopnost být pohlceny nádorovou buňkou (46). Při intracelulární terapii (obr. č. 10), kdy nanočástice vstupuje do buňky, musí překonat tři hlavní překážky: buněčnou membránu, endosomy/lysosomy a intracelulární přenos. Buněčná membrána je složena z fosfolipidů, glykolipidů, cholesterolů a funguje jako fyzická bariéra, která reguluje export a import molekul (47). Nanočástice jsou schopny přes buněčnou membránu prostupovat pomocí transcytózy nebo endocytózy. Transcytóza je mechanismus, kdy nanočástice prochází skrz buněčnou membránu přímo do volného prostoru cytoplasmy, zatímco endocytóza je



Obr. č. 10. Interakce buněčné membránové bariéry a nanočástice, převzato z (45).

specifická interakce mezi nanočásticí a buněčnou membránou, kdy je nanočástice pohlcena do lysosomálního váčku. Látka, která pomůže nanočástici narušit lysosomální membránu a vniknout do volného prostoru cytoplazmy, je např. PEI, neboli polyethylenamin (45). Matematické modelování prokázalo, že nanočástice s kladným povrchovým nábojem mají lepší penetraci do nádorové buňky, než částice s nábojem záporným (48). Jakmile se nanočástice dostane do volného prostoru cytoplazmy, je dále dopravena do příslušné organely, například jádra, kde je schopna uvolnit malou molekulu léčiva (45).

2.2. Protinádorově aktivní komplexy platiny

2.2.1. Historie

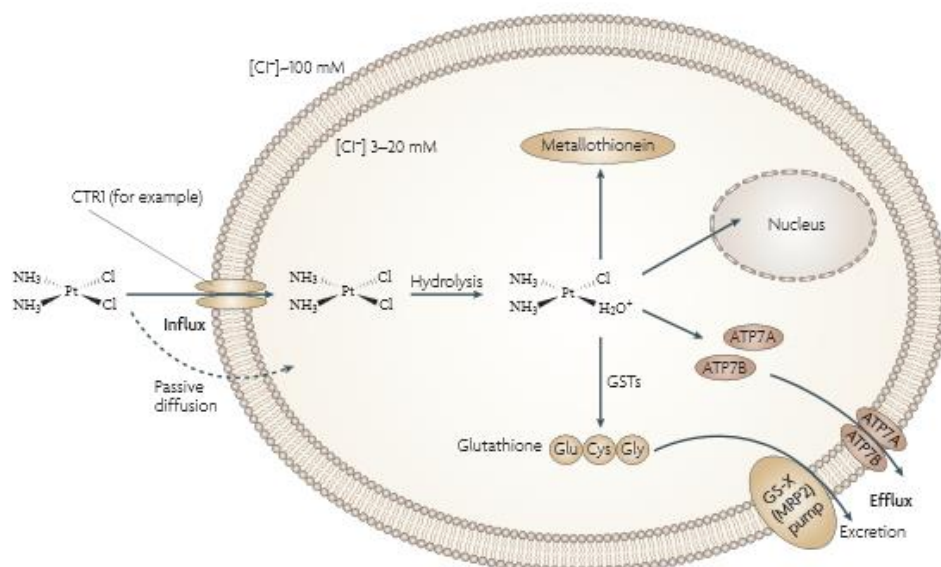
Cisplatina začala poprvé psát svůj příběh již v roce 1845, kdy byla charakterizována jako tzv. Peyronův chlorid resp. Peyronova sůl (49). Ovšem významnější období historie cisplatiny nás zavádí do poloviny 60. let 20. století do Mitchigenské laboratoře biofyzika Barnetta Rosenberga, který studoval použití elektrického proudu na bakteriálních a savčích buňkách a snažil se vyřešit otázku, zdali elektrické pole může být nějakým způsobem zapojeno do procesu buněčného dělení (50). Výsledek experimentu byl překvapující, neboť vlivem redoxní reakce a následného uvolnění platnatých komplexů z použité platinové elektrody, došlo k zastavení buněčného dělení u bakterií (51). Díky detailní chemické analýze byly objeveny různé komplexy platiny, přičemž nejaktivnější z nich byl *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] (*cis*-diammino-dichloroplatnatý komplex; cisplatina) (50). V roce 1968 začaly první testy s cisplatinou na myších, kterým byly standardně transplantovány ložiska tumoru (Sarkoma-180) (52). Výsledkem byl ústup tumoru, čímž byla poprvé demonstrována výjimečná protinádorová aktivita (50). NCI (US National Cancer Institute) podrobil cisplatinu klinickým testům a v roce 1971 se, v rekordně krátkém čase, vyléčil první pacient. O pár let později, roku 1978, byla cisplatina v USA komisí FDA (Food and Drug Administration) schválena ke klinickému užívání (50).

Potenciál, který byl do léčiva vkládán, se zanedlouho ukázal ve výsledných číslech. Cisplatina se stala nejrozšířenějším chemoterapeutikem, které v roce 1987 v USA léčilo více jak třicet tisíc a v někdejší Československu, více jak tisícovku pacientů (53). Vynikajících výsledků dosahovala u pacientů s nádory varlat, dále pak při léčbě rakoviny vaječníků a močového měchýře. Postupným výzkumem bylo léčivé spektrum rozšířeno až na léčbu, rakoviny krku a malobuněčného karcinomu plic (54). Cisplatina se nicméně potýkala

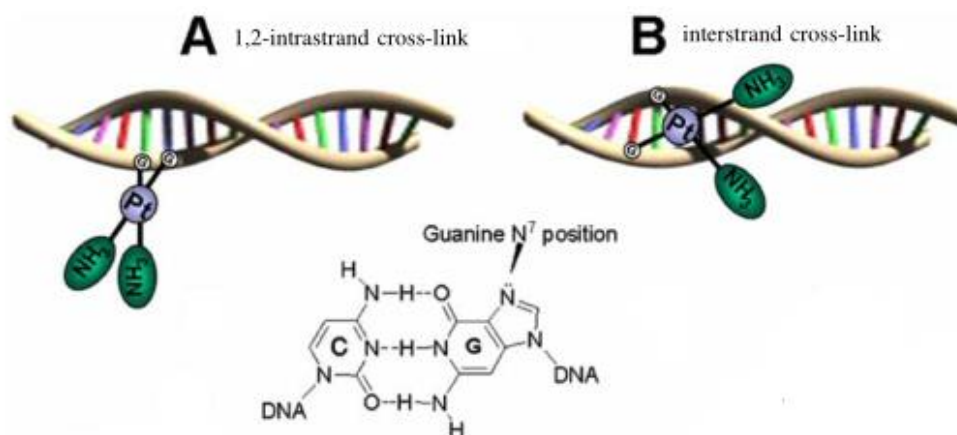
s vysokým počtem vedlejších účinků, které zahrnovaly ototoxicitu, nefrotoxicitu, nauseu a neurotoxicitu (55). Další nevýhodou je limitující počet dávek, které mohou být pacientovi podávány z důvodů vysoké toxicity, případně omezenému použití pro určité typy nádorů z důvodu vrozené nebo vytvořené lékové rezistence (56).

2.2.2. Mechanismus účinku

Cisplatina je aplikována pacientům intravenózně (i.v.), kde dochází k navázání na plazmové proteiny (55). Více jak 90% cisplatiny je navázáno na albumin, což je jeden z nejvýznamnějších proteinů v krevní plazmě (57). Tímto způsobem je cisplatina unášena cévním systémem k cílovým buňkám. Cisplatina vstupuje do buňky (obr. č. 11) dvěma způsoby: může využít protein CTR1 (hlavní transportér mědi) nebo pomocí tzv. pasivní difúze (50). Neutrální cisplatina musí být před tím, než se naváže na DNA, aktivována. Díky nízké hladině chloridových aniontů v cytoplazmě dochází k hydrolyze (výměně chloridových aniontů za molekuly vody) za vzniku vysoce reaktivních, aktivovaných monoqua ($[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}(\text{NH}_3)_2]^+$) a diaqua ($[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$) kationtových forem cisplatiny (55). Aktivovaná forma cisplatiny přednostně reaguje s molekulami obsahující atomy síry (cystein, methionin, glutathion) a řadou dalších aminokyselin. Aktivovaná cisplatina vstupuje do jádra,



Obr. č. 11. Schéma vstupu cisplatiny do buňky, převzato z (50).



Obr. č. 12. Schéma vazby cisplatiny na DNA, převzato a upraveno z (55).

kde se kovalentně váže na DNA za vzniku DNA aduktů (obr. č. 12) (50). Celý proces můžeme rozdělit do dvou fází. V prvním fázi dochází ke koordinačnímu navázání atomu platiny na atom N^7 guaninu a ve druhé fázi ke vzniku koordinačního můstku mezi atomem platiny a sousedícím zbytkem guaninu nebo adeninu. Výsledkem těchto dvou kroků je inhibice DNA a RNA polymerázy v následujících sekvencích guanin-guanin případně adenin-guanin, což v konečném důsledku znemožní následný růst tumoru (53). Obecně tyto adukty způsobí distorzi molekuly DNA (50). Platnatý DNA-adukt může bránit dalším buněčným procesům jako je replikace a transkripce (58). V určitých případech dochází k zastavení G2-prolongační fáze buněčného cyklu. Finálním výsledkem je buněčná smrt zvaná apoptóza. Cisplatina je exportována z buňky pomocí transportérů ATP7A a ATP7B a glutathionu skrze GS-X(MRP2) pumpu (50).

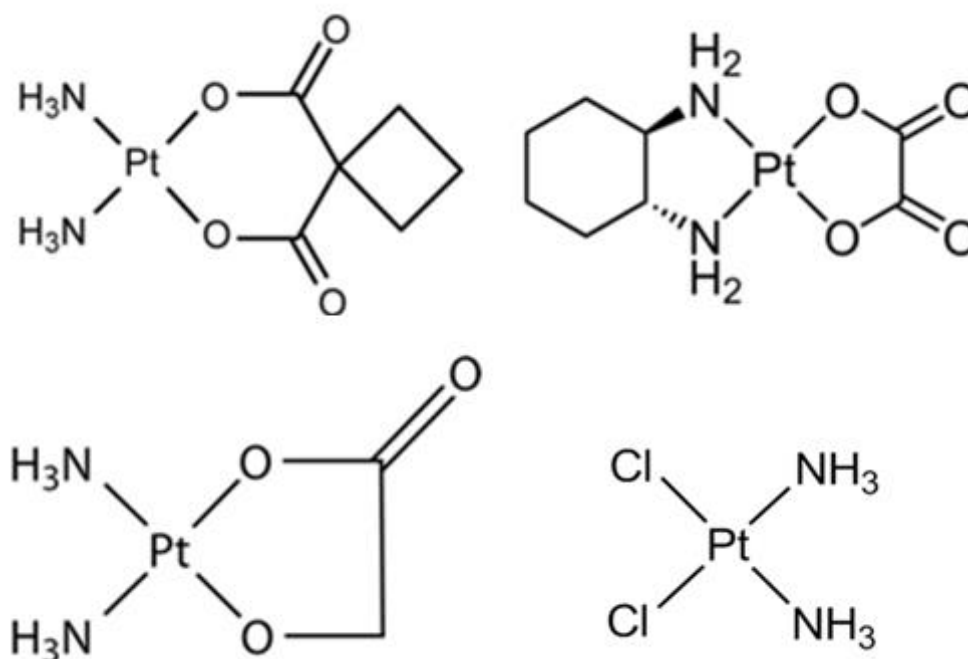
2.2.3. Další klinicky užívaná léčiva na bázi platiny

Ačkoliv se zdálo, že cisplatina je bezesporu nejpozoruhodnější a nejefektivnější způsob jak léčit určité typy nádorů, potýkala se s několika zásadními nevýhodami (viz výše). Tyto aspekty vedly vědecké pracovníky k vývoji nových tzv. sekundárních cytostatik, které byly schopny vykazovat nižší toxicitu, avšak byly schopné si zachovat protinádorovou aktivitu, jakou měla cisplatina. Byly syntetizovány tisíčky platnatých komplexů, které byly vytvářeny metodou obměny nosných (molekuly NH_3) a odstupujících ligandů (chloridových aniontů) za vhodnější substituenty. Pouze některé prošly přísným klinickým testováním. Mezi nejvýznamnější patřily karboplatina, oxaliplatina nebo nedaplatina (50) (obr. č. 13).

Karboplatina (diammin-cyklobutan-1,1'-dikarboxylatoplatnatý komplex) je přímým derivátem cisplatiny, kde odstupujícími ligandy nejsou chloridové anionty, ale CBDC (cyklobutan-1,1'-dikarboxylát) (59).

Oxaliplatina [(1R,2R-diaminocyklohexan)oxalatoplatnatý komplex] patří mezi relativně mladé a bezesporu významné deriváty cisplatiny. Velice účinná je v kombinaci s 5-fluorouracilem a leucovorinem při léčbě kolorektálního karcinomu, kdy cisplatina nebo karboplatina nevykazují významnou léčebnou aktivitu. Typickým vedlejším účinkem je neurotoxicita a nausea, ovšem v menší míře než u cisplatiny (59).

Nedaplatina (*cis*-diammin-glykolatoplatnatý komplex) je dalším derivátem cisplatiny, který získal registraci v Japonsku. Využívá se v léčbě rakoviny v krční oblasti nebo při léčbě rakoviny hlavy. Nedaplatina je velice podobný analog cisplatiny s tím, že toxicita je znatelně menší než u cisplatiny (59).



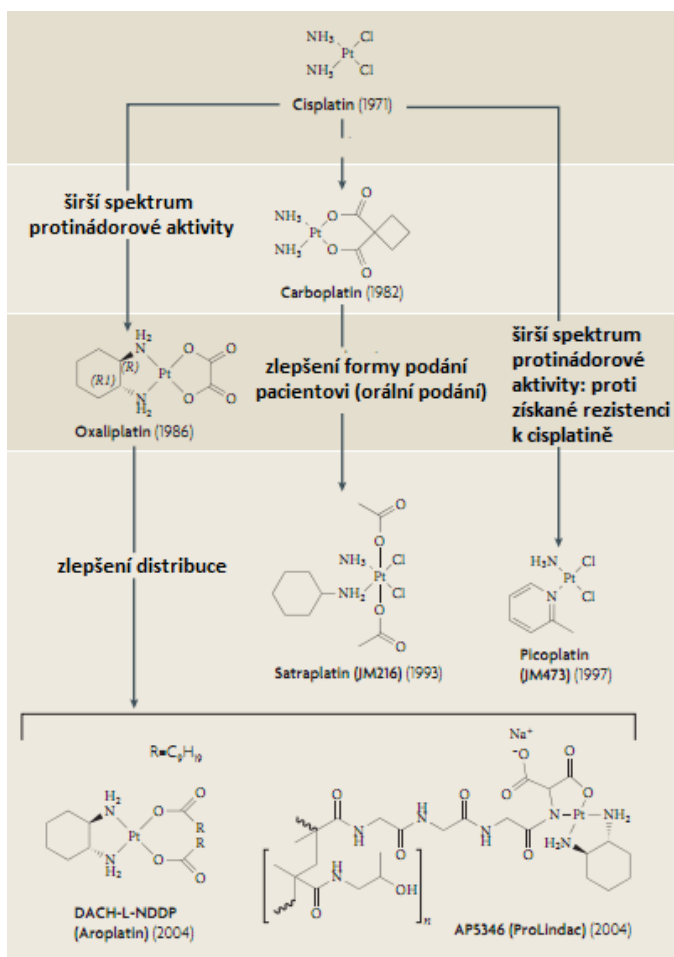
Obr. č. 13. Strukturální vzorec karboplatiny, oxaliplatiny, nedaplatiny a cisplatiny.

V 90. létech došlo na poli vývoje platnatých léčiv k lehké stagnaci. Současný vývoj nových platnatých komplexů se vyvíjí skrze čtyři základní strategie ve snaze obejít rezistenci vyvolanou u pacientů s nádorovým onemocněním (50).

1. vývoj nových, vylepšených platnatých léčiv
2. vývoj za účelem zlepšení distribuce léčiva do místa nádoru

3. současné podání léků s farmakologickými modulátory rezistentních mechanismů
4. na základě kombinace platnatých léčiv a molekulárně cílených léčiv

Současný vývoj platnatých léčiv reprezentuje (obr. č. 14). Uvedená data v závorkách, reprezentují roky, kdy byla léčiva poprvé podána pacientům. Chybí pouze Laboplatina, která je schválena pro užívání v Číně a Nedaplatina, která je schválena pouze pro užívání v Japonsko. Vzhledem k tomuto omezení nebyla léčiva zahrnuta do tohoto schématu (50).



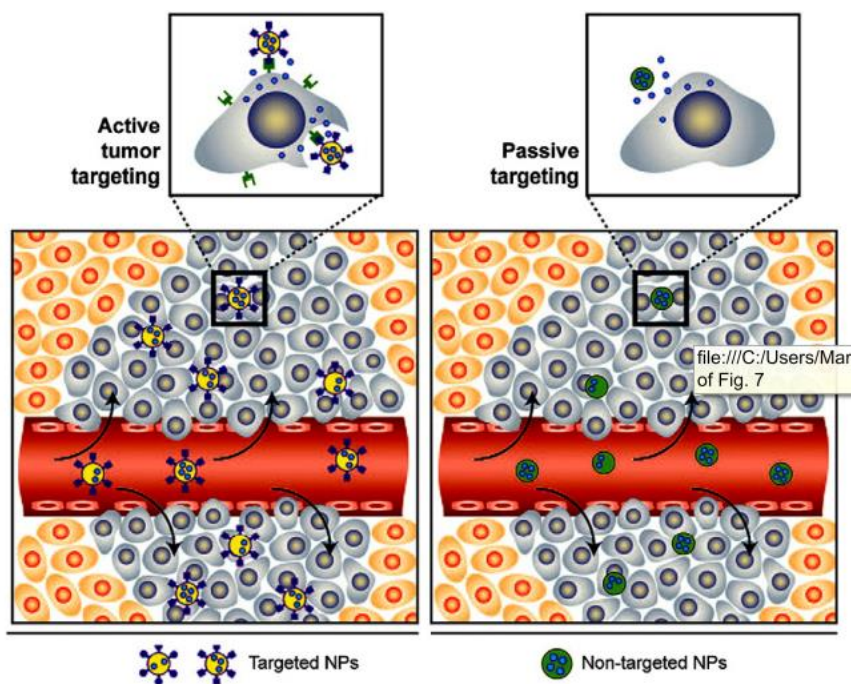
Obr. č. 14. Přehled vývoje platnatých cytostatik, převzato a upraveno z (50).

2.2.4. Cílený transport

Cílený transport se strategicky může rozdělit do několika základních strategií, se kterými jsme se seznámili v samotném začátku této bakalářské práce. Pevné formy (solidní) nádorů se vyznačují neorganizovaným uskupením cévního systému a zejména nepřítomností lymfatických drenáží, což umožní nanočásticím unikát přímo z cévního systému a to zejména díky tzv. EPR efektu (z anglického „Enhanced Permeability and Retention“, neboli zvýšená propustnost a zadrž), čímž dochází ke kumulaci léčiva přímo v místě nádoru (60). Tento

způsob cílení je označován jako pasivní (obr. č. 15), tzv. „passive targeting.“ Tím, že se léčivo nachází v celém cévním systému a je založeno pouze na EPR efektu, více jak 95% léčivého obsahu je situováno mimo cílovou oblast, zejména v játrech, slezině a plicích (61). Nabízí se otázka, jestli pasivní cílení je možno považovat jako selektivní cílení, když většina léčivé látky končí mimo cílové místo. Zatímco aktivní cílení (obr. č. 15) „active targeting“ je specifická interakce mezi směrovacím ligandem, který je umístěn na povrchu nanočástice a samotným receptorem, který se nachází na povrchu rakovinné buňky (45). V podstatě se jedná o specifickou interakci.

Magnetické nanočástice nabízí možnost spojení jak pasivního cílení, pomocí EPR efektu, tak aktivního cílení. U magnetických nanočástic je díky jejich superparamagnetickým vlastnostem možné, pomocí silného externího magnetu, řídit jejich distribuci v organismu (34).



Obr. č. 15. Schéma aktivního cílení (vlevo), založeného na specifické interakci a pasivního cílení (vpravo), založeného na EPR efektu, převzato z (42).

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie

Hexahydrát chloridu železitého ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), tetrahydrát chloridu železnatého ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 25% vodný roztok amoniaku, *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{L}_1)_2]$ (komplex **1**; $\text{L}_1 = 3\text{-chlor-7-azaindol}$), *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{L}_2)_2]$ (komplex **2**; $\text{L}_2 = 5\text{-brom-7-azaindol}$), *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{L}_3)_2]$ (komplex **3**; $\text{L}_3 = 7\text{-azaindol}$), *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ (cisplatina, CDDP), $[\text{Pt}(\text{dach})_2(\text{ox})]$ (oxaliplatina, OXA; dach = 1,2-diaminocyklohexan, ox = oxalátový dianion), dusičnan stříbrný (AgNO_3), *p*-aminobenzoová kyselina (AMB), aminotereftalová kyselina (ATA) a tereftalová kyselina (TA) byly pořízeny od společností Sigma-Aldrich Co. (Praha, Česká Republika) a AcrosOrganics Co. (Pardubice, Česká Republika).

3.2. Příprava výchozích nanočásticových systémů

Nanočástice byly připraveny srážecí metodou za použití míchání směsi železitých a železnatých solí v bazickém prostředí (62). Organické kyseliny (AMB, ATA, TA) byly rozpuštěny při teplotě 80 °C v minimálním množství převařené (10 min) deionizované vody a míchány v reakční baňce s 1,168 g (4,3 mmol) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ po dobu 30 min při konstantní teplotě 80 °C a rychlosti 750 otáček za minutu. Následně bylo přidáno 0,8647 g (4,3 mmol) $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ rozpuštěného v minimálním množství vody. Po 30 min míchání bylo do reakční směsi přidáno 10 ml 25% vodného roztoku NH_3 a rychlost míchání byla zvýšena na 1000 otáček za minutu. Po 30 min byl proces syntézy ukončen. Výsledné maghemitové nanosystémy pokryté *p*-aminobenzoovou kyselinou (**AMB@Fe**), aminotereftalovou kyselinou (**ATA@Fe**) a tereftalovou kyselinou (**TA@Fe**) byly promyty 3 × 20 ml deionizované vody a 3 × 20 ml acetonu. Část produktu byla ponechána v suspenzi pod acetonem, část byla magneticky vyizolována, vyfoukána dusíkem a uchována v lednici. Připravené systémy byly charakterizovány infračervenou spektroskopií, TG/DTA analýzou a SEM/EDS. **AMB@Fe**: FTIR (ATR, cm^{-1}): 552vs; 1179m; 1298m; 1395vs; 1493m; 1552m; 1603s; 1625m; 3219s; 3334s. **ATA@Fe**: FTIR (ATR, cm^{-1}): 554s; 767m; 1150w; 1254s; 1331s; 1427s; 1489m; 1622m; 3361s. **TA@Fe**: FTIR (ATR, cm^{-1}): 445m; 572m; 741m; 1360vs; 1500m; 1568vs; 1650w; 3036m; 3597w.

3.3. Příprava funkcionalizovaných nanočásticových systémů

Pro funkcionalizaci výchozích **AMB@Fe** a **ATA@Fe** nanočástic byly použity Pt(II) komplexy **1**, **2** a **3**, systém **TA@Fe** byl funkcionalizován komplexy **1**, **2**, **CDDP** a **OXA** (viz Tabulka č.1).

Tabulka č. 1. Přehled připravených nanosystémů

Kód látky	Organická kyselina	Funkcionalizující částice
1*@AMB@Fe	p-aminobenzoová	<i>cis</i> -[Pt(H ₂ O) ₂ (L ₁) ₂] ²⁺
2*@AMB@Fe	p-aminobenzoová	<i>cis</i> -[Pt(H ₂ O) ₂ (L ₂) ₂] ²⁺
3*@AMB@Fe	p-aminobenzoová	<i>cis</i> -[Pt(H ₂ O) ₂ (L ₃) ₂] ²⁺
1*@ATA@Fe	aminotereftalová	<i>cis</i> -[Pt(H ₂ O) ₂ (L ₁) ₂] ²⁺
2@ATA@Fe	aminotereftalová	<i>cis</i> -[PtCl ₂ (L ₂) ₂]
3@ATA@Fe	aminotereftalová	<i>cis</i> -[PtCl ₂ (L ₃) ₂]
CDDP@TA@Fe	tereftalová	<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]
OXA@TA@Fe	tereftalová	[Pt(dach)(ox)]
1*@TA@Fe	tereftalová	<i>cis</i> -[Pt(H ₂ O) ₂ (L ₁) ₂] ²⁺
2*@TA@Fe	tereftalová	<i>cis</i> -[Pt(H ₂ O) ₂ (L ₂) ₂] ²⁺

L₁ = 3-chlor-7-azaindol

L₂ = 5-brom-7-azaindol

L₃ = 7-azaindol

cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂] (*cisplatina*, **CDDP**)

[Pt(dach)₂(ox)] (*oxaliplatina*, **OXA**)

Příprava výsledných nanočásticových systémů vycházela buď přímo z výše uvedených platnatých komplexů (**2@ATA@Fe**, **3@ATA@Fe**, **CDDP@TA@Fe** a **OXA@TA@Fe**), nebo bylo v případě systémů **1*@AMB@Fe**, **2*@AMB@Fe**, **3*@AMB@Fe**, **1*@ATA@Fe**, **1*@TA@Fe**, **2*@TA@Fe** použito aktivovaných komplexů. Aktivace byla prováděna interakcí výchozích dichloroplatnatých komplexů (0,2 mmol) rozpuštěných v minimálním množství DMF nebo acetonu se dvěma molárními ekvivalenty dusičnanu stříbrného, probíhající po dobu 24 h ve tmě. Reakcí vznikl chlorid stříbrný, který byl odfiltrován, a příslušný diaquaplatnatý komplex, konkrétně *cis*-[Pt(H₂O)₂(L₁)₂]²⁺ (L₁ = 3-chlor-7-azaindol), *cis*-[Pt(H₂O)₂(L₂)₂]²⁺ (L₂ = 5-brom-7-azaindol) a *cis*-[Pt(H₂O)₂(L₃)₂]²⁺ (L₃ = 7-azaindol). K filtrátům bylo přidáno 100 mg výchozího nanosystému (**AMB@Fe**,

ATA@Fe nebo **TA@Fe**) a se směsí bylo dále intenzivně mícháno po dobu 48 h ve tmě. V konečné fázi byly finální systémy magneticky izolovány za pomoci externího magnetu a promyty 3×20 ml deionizované vody a 3×20 ml acetonu. Vyizolované systémy byly vysušeny pomocí N_2 a uloženy do lednice.

1*@AMB@Fe: FTIR (ATR, cm^{-1}): 571vs; 1099w; 1018m; 1179m; 1208m; 1273m; 1340s; 1409vs; 1498m; 1514m; 1550m; 1603s; 3097s; 3208s; 3355s.

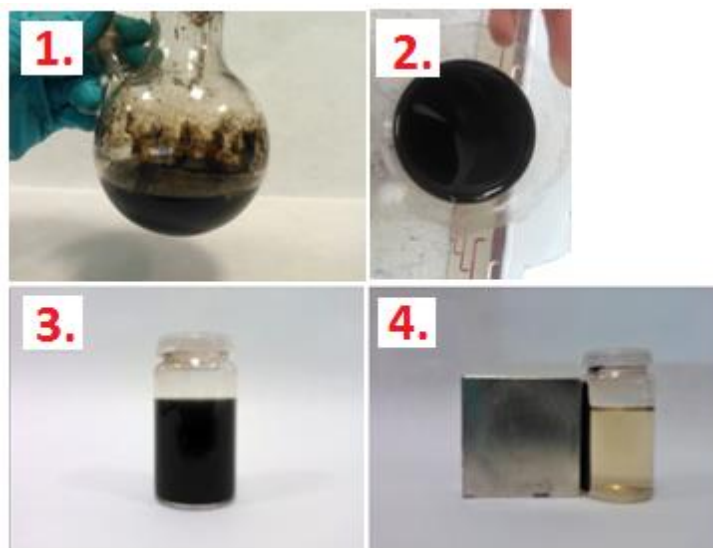
2*@AMB@Fe: FTIR (ATR, cm^{-1}): 547vs; 1267vs; 1341s; 1400vs; 1473s; 1504s; 1603s; 1646s; 3082s.

3*@AMB@Fe: FTIR (ATR, cm^{-1}): 500s; 552m; 621m; 1150vs; 1204vs; 1321; 1402w; 1599w; 2853m; 2920m; 2980w; 3211m.

1*@ATA@Fe: FTIR (ATR, cm^{-1}): 550vs; 1255s; 1340vs; 1373vs; 1424s; 1549vs; 3140s; 3357s.

2@ATA@Fe: FTIR (ATR, cm^{-1}): 553vs; 1373vs; 1251s; 1340s; 1429s; 1549s; 1647s; 3140s; 3359s.

3@ATA@Fe: FTIR (ATR, cm^{-1}): 545s; 1269vs; 1343vs; 1370vs; 1419s; 1491s; 1542s;



Obr. č. 16. Obrazová příloha syntézy nanočásticových systémů s příslušnou legendou:

1. 2. připravený maghemit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$; 3. rozdispergovaná vodná suspenze magnetitových nanočástic; 4. vodná suspenze magnetitových nanočástic migrujících za externím magnetem;

3086s; 1104m; 1595m; 2164m; 2206m; 2323m.

CDDP@TA@Fe: FTIR (ATR, cm^{-1}): 541vs; 742m; 810w; 1070w; 1150w; 1384vs; 1505s; 1553s; 1696w; 3274s.

OXA@TA@Fe: FTIR (ATR, cm^{-1}): 436s; 544s; 746m; 822w; 1017w; 1064w; 1101w; 1148w; 1362vs; 1385vs; 1502m; 1568vs; 1650s; 1963w; 1985w; 2016w; 2040w; 2118w; 2168w; 2224w; 2323w; 2866m; 2939m; 3208m; 3371m; 3596m; 3848w.

1*@TA@Fe: FTIR (ATR, cm^{-1}): 539s; 745m; 822m; 1014w; 1102w; 1146w; 1358vs; 1499m; 1566vs; 1649s; 3076m; 3597m.

2*@TA@Fe: FTIR (ATR, cm^{-1}): 545s; 748m; 822w; 881w; 1016w; 1104w; 1146w; 1360vs; 1500m; 1567vs; 1649m; 3184m; 3597m.

3.4. Metody studia připravených systémů

Infračervená spektroskopie (mid-FTIR v oblasti $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ a far-FTIR v oblasti $150\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) byla provedena ATR technikou na přístroji Nexus 670 FT-IR (ThermoNicolet, Waltham, MA, USA) (obr. č. 17). Simultánní termogravimetrie a diferenční termická analýza (TG/DTA) byla provedena pomocí termického analyzátoru Exstar TG/DTA 6200 (Seiko Instruments Inc., Chiba, Japonsko) (obr. č. 17) v teplotním rozsahu od laboratorní teploty do $650\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($5,0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) v dynamické atmosféře vzduchu (50 ml min^{-1}). Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) byla prováděna pomocí mikroskopu JEOL 2010 (200 kV , $1,9\text{ \AA}$ rozlišení). Za použití vysoce čisté, neionizované kapky vody a ultrazvuku, byly vzorky umístěny na perforovaný uhlíkový film s využitím měďnaté mřížky transmisního elektronového mikroskopu a byly vysoušeny při pokojové teplotě. Dále byla využita metoda skenovací elektronové mikroskopie (SEM) zároveň s energiově disperzní rentgenovou



Obr. č. 17. Ukázka přístrojového vybavení Nexus 670 FT-IR, Exstar TG/DTA, převzato a upraveno z rcptm.com

spektroskopií (EDS) za pomoci mikroskopu Hitachi 6600 FEG (s urychlovacím napětím 5-15 keV). Vzorke pro SEM/EDS byly vloženy do hliníkového držáku, jenž byl vybaven lepící oboustrannou uhlíkovou páskou. Za použití Mössbauerovy spektroskopie provedené v režimu konstantního zrychlení byly při pokojové teplotě a za pomoci zdroje 50 mCi $^{57}\text{Co}(\text{Rh})$ získány ^{57}Fe Mössbauerovy spektra.

4. Diskuze

4.1 Syntéza a obecné vlastnosti připravených systémů

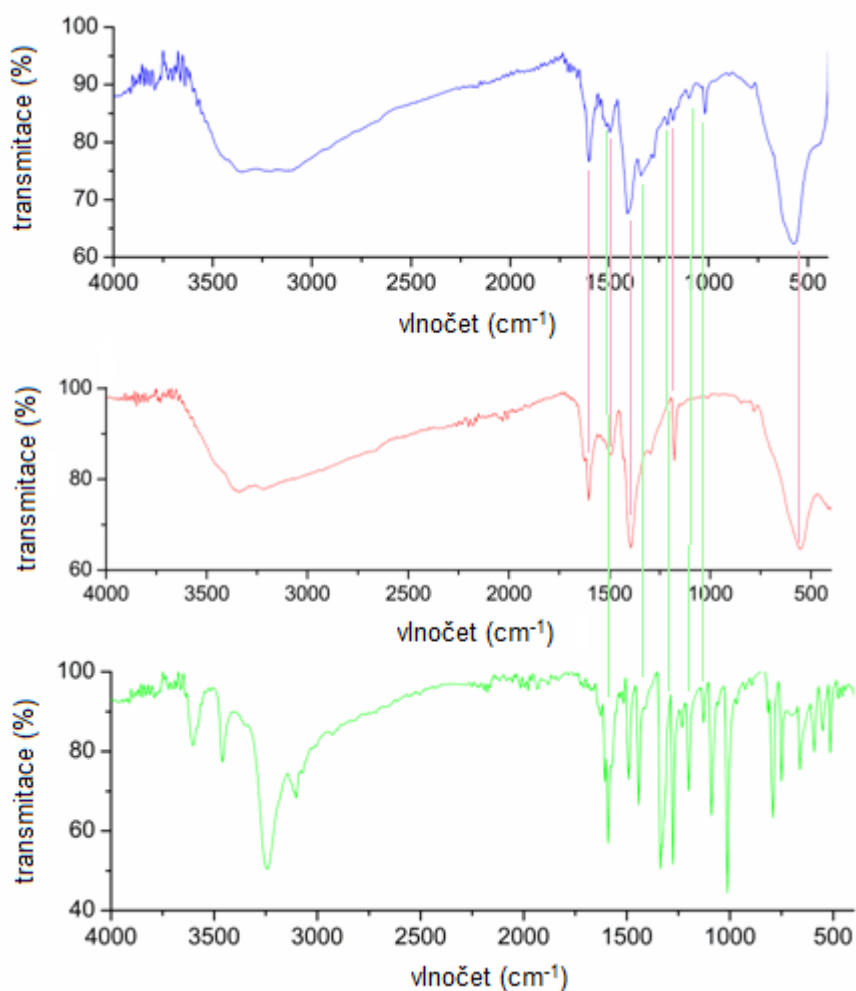
Příprava magnetických nanočásticových systémů byla založena na srážecí metodě železitých a železnatých solí v alkalickém prostředí (34). Příprava probíhala podle výše uvedeného postupu, kdy byly smíchány předem definované množství výchozích reaktantů (Fe(III) soli a příslušných organických kyselin), ke kterým byly následně přidány Fe(II) sůl a vodný roztok NH₃, za vzniku výchozích systémů, kterými jsou maghemitové nanočástice pokryté vrstvou příslušné organické kyseliny (**AMB@Fe**, **ATA@Fe**, **TA@Fe**; viz. obr. č. 18). Všechny kyseliny (AMB, ATA, TA) se špatně rozpouštěly ve studené deionizované vodě, ovšem po zahřátí na teplotu 80 °C se rozpustily dobře - proto bylo nutné provádět syntézy za uvedené teploty, čímž se předcházelo znečištění produktu částicemi nezreagované kyseliny. Reakce byly prováděny na vzduchu, ne v atmosféře dusíku, jelikož cílem nebylo získat magnetitové, ale stabilnější maghemitové nanočástice. Magnetit tímto podléhal oxidaci vzdušným kyslíkem. Poslední věcí, kterou bylo při přípravě systémů nutné optimalizovat, bylo množství 25% vodného roztoku amoniaku. Literatura uváděla pro použité množství solí použít 5 ml vodného roztoku amoniaku (63), v našem případě bylo zjištěno, že s ohledem na barevné změny reakční směsi a její magnetické vlastnosti je nutné použít objem 10 ml. Tímto způsobem byly připraveny a charakterizovány tři výchozí nanočásticové systémy, každý s jinou organickou kyselinou (**AMB@Fe**, **ATA@Fe**, **TA@Fe**). Tyto systémy izolované v pevném skupenství archivované v lednici byly stabilní v horizontu tří měsíců, kdy je bylo možné použít pro další syntézy. V případě nanosystémů uchovaných pod acetonem je jejich stabilita výrazně nižší (dva týdny), což se makroskopicky projevilo změnou barvy i magnetických vlastností. Všechny tři výchozí systémy byly charakterizovány FTIR spektroskopii, simultánní TG/DTA termickou analýzou a skenovací elektronovou mikroskopií s energiově disperzní spektroskopii (SEM/EDS), jejichž výsledky prokázaly přítomnost příslušné organické kyseliny na povrchu nanočásticového systému.

4.2 Funkcionalizované AMB@Fe nanočástice

První série připravovaných nanočásticových systémů vycházela z maghemitových nanočástic potažených *p*-aminobenzoovou kyselinou (**AMB@Fe**), které byly funkcionalizovány platnatými komplexy **1** (**1*@AMB@Fe**), **2** (**2*@AMB@Fe**) a **3** (**3*@AMB@Fe**).

Infračervená spektroskopie

FTIR spektroskopie byla provedena ve střední oblasti $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Na základě porovnání spekter (obr. č. 18) výchozího systému (**AMB@Fe**), funkcionalizujícího komplexu a výsledného funkcionalizovaného systému (**1*@AMB@Fe**, **2*@AMB@Fe**, **3*@AMB@Fe**) lze konstatovat, že ve spektrech finálních systémů byly detekovány charakteristické vibrace výchozích reakčních komponent (**AMB@Fe**, Pt(II) komplex **1–3**), což lze pokládat za důkaz přítomnosti Pt(II) komplexu v připravovaných nanočásticích (obr. č. 18). Charakteristické vibrace deprotonované karboxylové skupiny organické kyseliny a Fe–O byly detekovány ve spektrech při *ca* 1600 resp. 550 cm^{-1} .

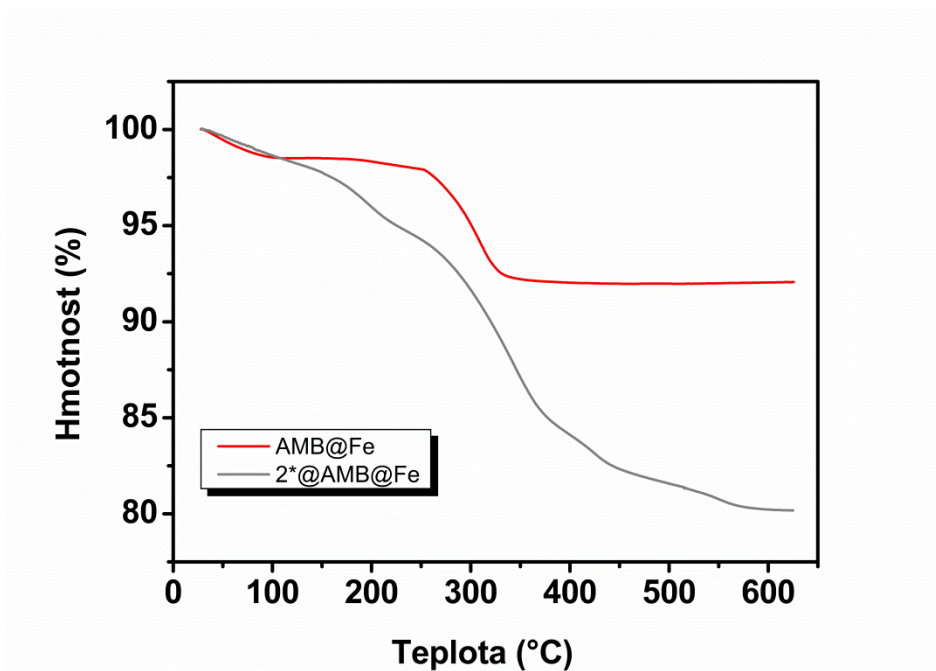


Obr. č. 18. Porovnání mid-FTIR spekter výsledných funkcionalizovaných maghemitových nanočástic pokrytých *p*-aminobenzoovou kyselinou (**1*@AMB@Fe**; modře) se spektry výchozích nanočástic (**AMB@Fe**; červeně) a samotného funkcionalizujícího komplexu **1** (zeleně).

Infračervená spektroskopie byla provedena také v oblasti od 150-600 cm^{-1} (far-FTIR) a poskytla nepřímý důkaz o kovalentní vazbě mezi Pt(II) iontem a výchozím systémem (**AMB@Fe**) v rámci studovaných funkcionalizovaných systémů (**1*@AMB@Fe**, **2*@AMB@Fe**, **3*@AMB@Fe**). Far-FTIR experimenty prokázaly změny ve vnitřní koordinační sféře v blízkosti centrálního atomu, ze kterých lze usuzovat na koordinaci Pt(II) komplexu na amino skupinu kyseliny p-aminobenzoové pokrývající maghemitové částice výchozích **AMB@Fe** systémů. Úvaha byla následující - ve far-FTIR spektru výchozího dichloro komplexu **1** byly detekovány $\nu(\text{Pt}-\text{Cl})$ vibrace s příslušnými maximy při 336 a 345 cm^{-1} , zatímco ve spektru aktivovaného aqua komplexu (**1***) byly přítomny vibrace $\nu(\text{Pt}-\text{O})$ (322 a 332 cm^{-1}). Ve spektru výsledného funkcionalizovaného systému (**1*@AMB@Fe**) nebyly v uvedených oblastech detekována žádná maxima, předpokládaná maxima $\nu(\text{Pt}-\text{N})$ vazby mezi centrálním atomem a AMB však nebyla detekována, neboť byly překryty analogickými vibracemi mezi Pt(II) a dusíkovými atomy 7-azaindolového kruhu.

Simultánní TG/DTA termická analýza

Z výsledků TG/DTA termické analýzy je patrný poměrně velký rozdíl mezi hmotnostními úbytky pozorovanými na výchozích nanočásticích (**AMB@Fe**; červeně) a

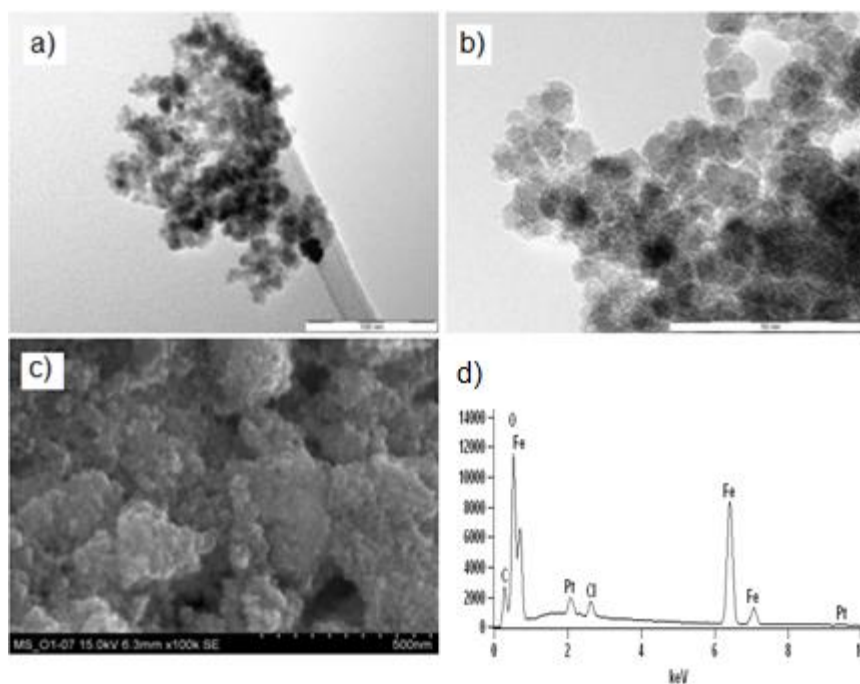


Obr. č. 19. Termogravimetrická (TG) křivka výchozího systému (**AMB@Fe**; červeně) v porovnání s funkcionalizovaným systémem (**2*@AMB@Fe**; šedě)

funkcionalizovaným systémem obsahujícími komplex platiny ($2^* @ \text{AMB} @ \text{Fe}$; šedě) (obr. č. 19). Na počátku TG křivky výchozího systému je patrný pokles, který je přisuzován ztrátě vody naabsorbované na povrchu nanočástic (64). Za tímto poklesem následuje v rozmezí od 150 °C do 200 °C oblast termické stability, za kterým dochází k druhému hmotnostnímu úbytku, který souvisí s oxidací organické vrstvy pokrývající maghemitové jádro. Od teploty zhruba 340 °C jsme pozorovali teplotně stabilní systém. TG křivka funkcionalizovaného systému (šedě) má odlišný tvar v porovnání s TG křivkou výchozího systému, s čímž byl spojen také odlišný hmotnostní úbytek. Rozdíl v průběhu termických analýz výchozích a výsledných nanosystémů poukazoval na to, že výsledný systém obsahoval příslušný platnatý komplex.

Mikroskopické techniky (SEM/EDS, TEM)

Pomocí těchto metod byly získány velice cenné informace týkající se tvaru, velikosti a jednotnosti připravených nanočásticových systémů. Bylo zjištěno, že připravené systémy jsou kulovitými útvary obsahující maghemitové jádro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) potažené vrstvou kyseliny *p*-aminobenzoové s navázanou funkcionalizující kyselinou. Analýzou TEM snímků byla určena průměrná velikost připravených systémů, která je 13 nm. EDS poskytla relevantní informace

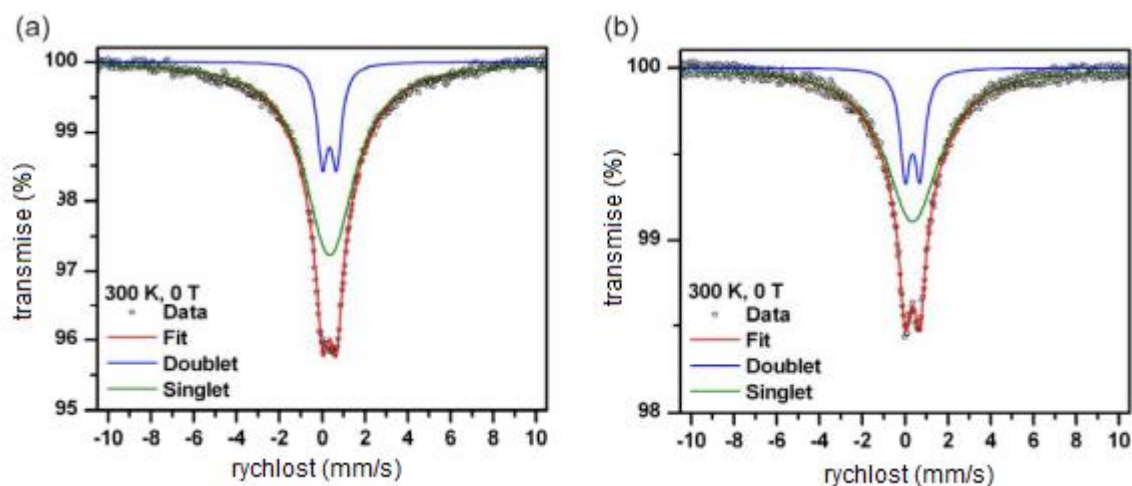


Obr. č. 20. a) TEM snímek systému $1^* @ \text{AMB} @ \text{Fe}$, s rozlišením 100 nm b) s rozlišením 50 nm, c) SEM snímek s rozlišením 500 nm d) příslušné EDS.

o prvkovém složení studovaných nanočástic a jednoznačně potvrdila přítomnost platiny ve výsledných systémech. Jinými slovy prokázala navázání funkcionalizujících platnatých komplexů na výchozí nanočásticové systémy (obr. č. 20d).

Mössbauerova spektroskopie

Mössbauerova spektra byly měřeny za pokojové teploty na systémech **AMB@Fe** a **2*@AMB@Fe** (obr. č. 21). Měřené systémy nevykazují přítomnost valenčního stavu Fe(II), což znamená, že obsahují magnetické jádro složené výhradně z γ -Fe₂O₃. Výsledky Mössbauerovy spektroskopie při pokojové teplotě také prokázaly superparamagnetické vlastnosti studovaných nanočásticových systému. Výsledné parametry Mössbauerovy spektroskopie jsou vedeny v příloze předložené bakalářské práce.



Obr. č. 21. Mössbauerova spektra výchozího nanočásticového systému (**AMB@Fe**; **a**) a funkcionalizovaného systému (**2*@AMB@Fe**; **b**), pořízená při pokojové teplotě. Doublet byl přidělen k relaxační komponentě Fe³⁺ a singlet k superparamagnetické složce Fe³⁺.

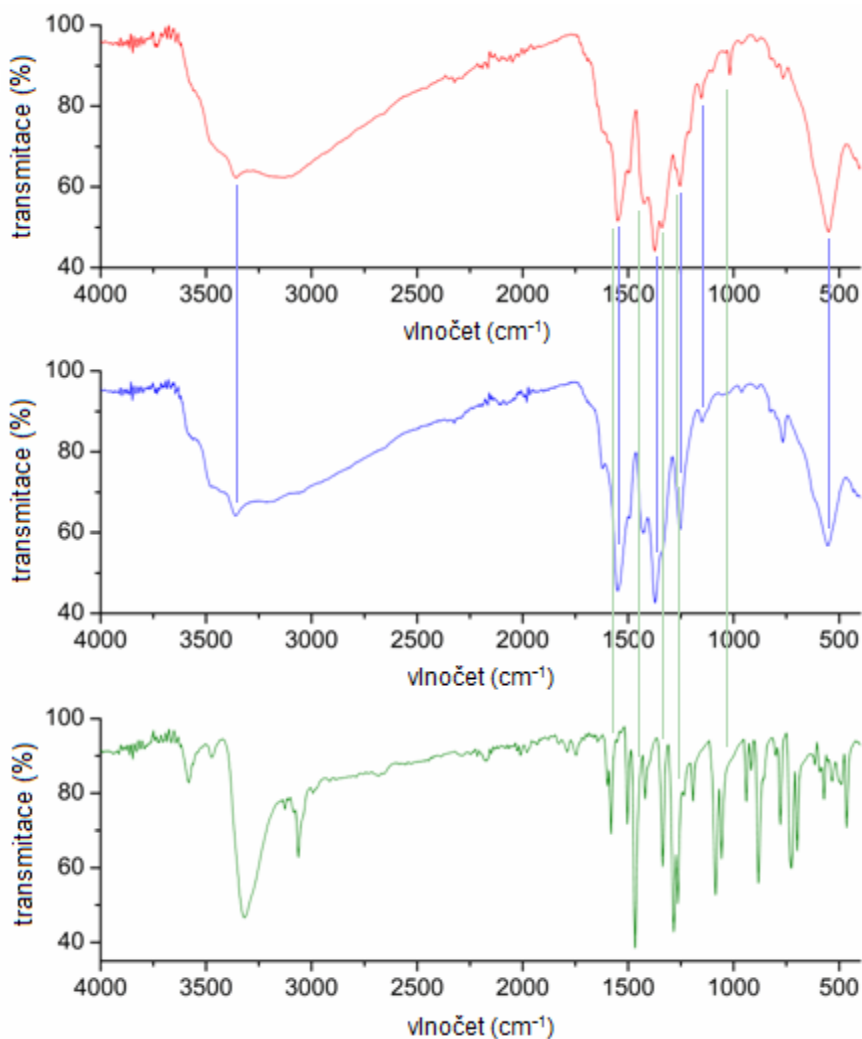
4.3 Funkcionalizované ATA@Fe nanočástice

Druhá série z řady připravovaných nanočásticových systémů vycházela z maghemitových nanočástic potažených aminotereftalovou kyselinou (**ATA@Fe**), které byly dále funkcionalizovány platnatými komplexy **1** (**1*@ATA@Fe**), **2** (**2@ATA@Fe**) a **3** (**3@ATA@Fe**).

Infračervená spektroskopie

Analogicky jako v předchozím případě byly porovnány mid-FTIR spektra (obr. č. 22)

(400-4000 cm^{-1}) výchozího systému (**ATA@Fe**) s funkcionalizovaným systémem (**1*@ATA@Fe**, **2@ATA@Fe**, **3@ATA@Fe**) a funkcionalizujícím Pt(II) komplexem. S jistotou lze konstatovat, že ve spektrech finálních systémů byly detekovány charakteristické vibrace funkcionalizujících Pt(II) komplexů (např. **2** při 1251 a 1340 cm^{-1}), čímž byla prokázána jejich přítomnost v připravených nanočásticích (obr. č. 22). Spektra, také obsahovala píky charakteristických vibrací karboxylové skupiny použité kyseliny (ca 1600 cm^{-1}) a Fe–O (550 cm^{-1}).

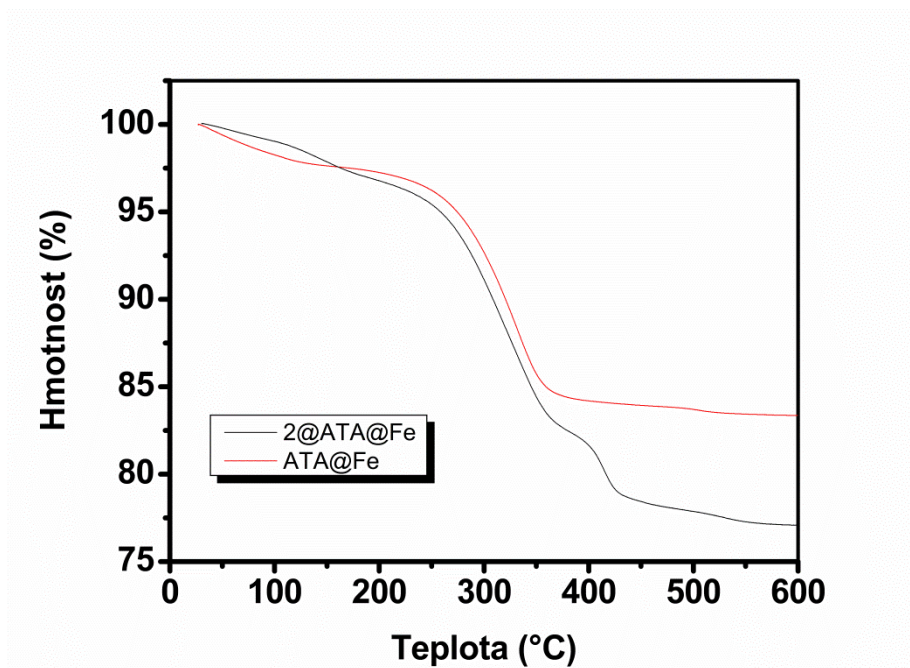


Obr. č. 22. Srovnání mid-FTIR spekter finálního funkcionalizovaného systému (**2@ATA@Fe**; červeně), a výchozího maghemitového systému (**ATA@Fe**; modře) a samotného funkcionalizujícího komplexu **2** (zeleně).

Simultánní TG/DTA termická analýza

Z výsledků TG/DTA termické analýzy je patrný rozdíl mezi hmotnostními úbytky

pozorovanými na výchozích nanočásticích (**ATA@Fe**; červeně) a funkcionalizovaných systémech (**2@ATA@Fe**; šedě) (obrázek č. 24). Na počátku TG křivky výchozího i funkcionalizovaného systému je opět znatelný mírný pokles způsobený ztrátou fyzikálně vázané vody (7). Druhý výrazný hmotnostní úbytek pozorujeme na obou TG křivkách za teplotou 200 °C, za kterou dochází k oxidaci organické části studovaných systémů. I v tomto případě lze konstatovat, že rozdíl v průběhu termických analýz výchozích a výsledných nanosystémů poukazoval na přítomnost příslušného platnatého komplexu ve výsledných systémech.

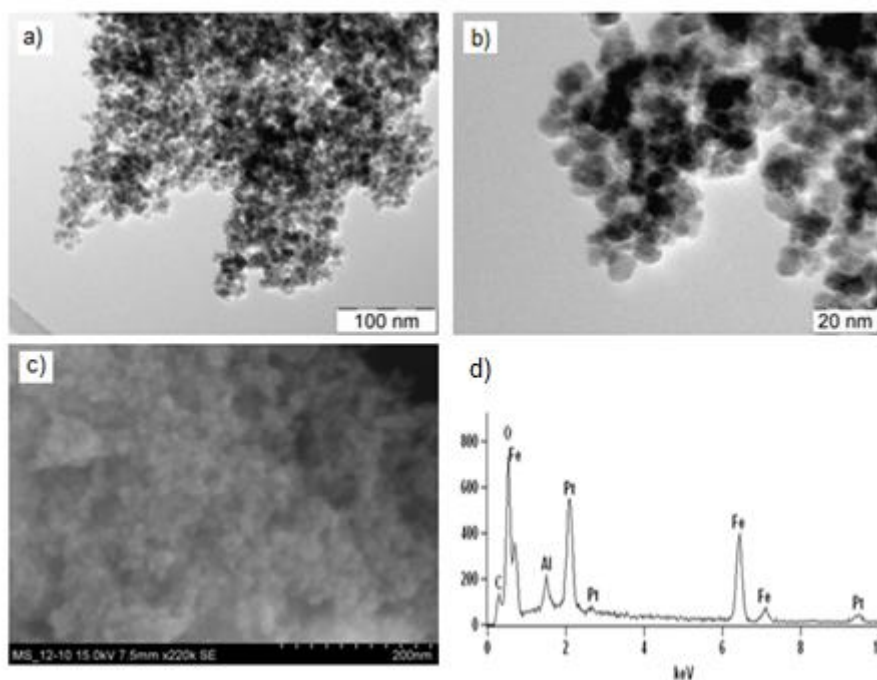


Obr. č. 23. Termogravimetrická (TG) křivka výchozího systému (**ATA@Fe**; červeně) v porovnání s funkcionalizovaným systémem (**2@ATA@Fe**; šedě)

Mikroskopické techniky (SEM/EDS, TEM)

Z výsledků poskytnutých kombinací mikroskopických technik SEM a TEM (obr. č. 24), bylo zjištěno, že připravené systémy jsou kulovitými útvary obsahující maghemitové jádro $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ potažené vrstvou kyseliny aminotereftalové, na které je navázána funkcionalizující Pt(II) částice. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) neshledala výrazné rozdíly v morfologii připravovaných funkcionalizovaných systémů ve srovnání s výše uvedenými systémy s *p*-aminobenzoovou kyselinou. Průměrná velikost nanočástic byla určena na 9,4 nm. Energiově disperzní spektroskopie rovněž podala přímý důkaz přítomnosti

Pt(II) komplexů ve finálních, funkcionalizovaných systémech.



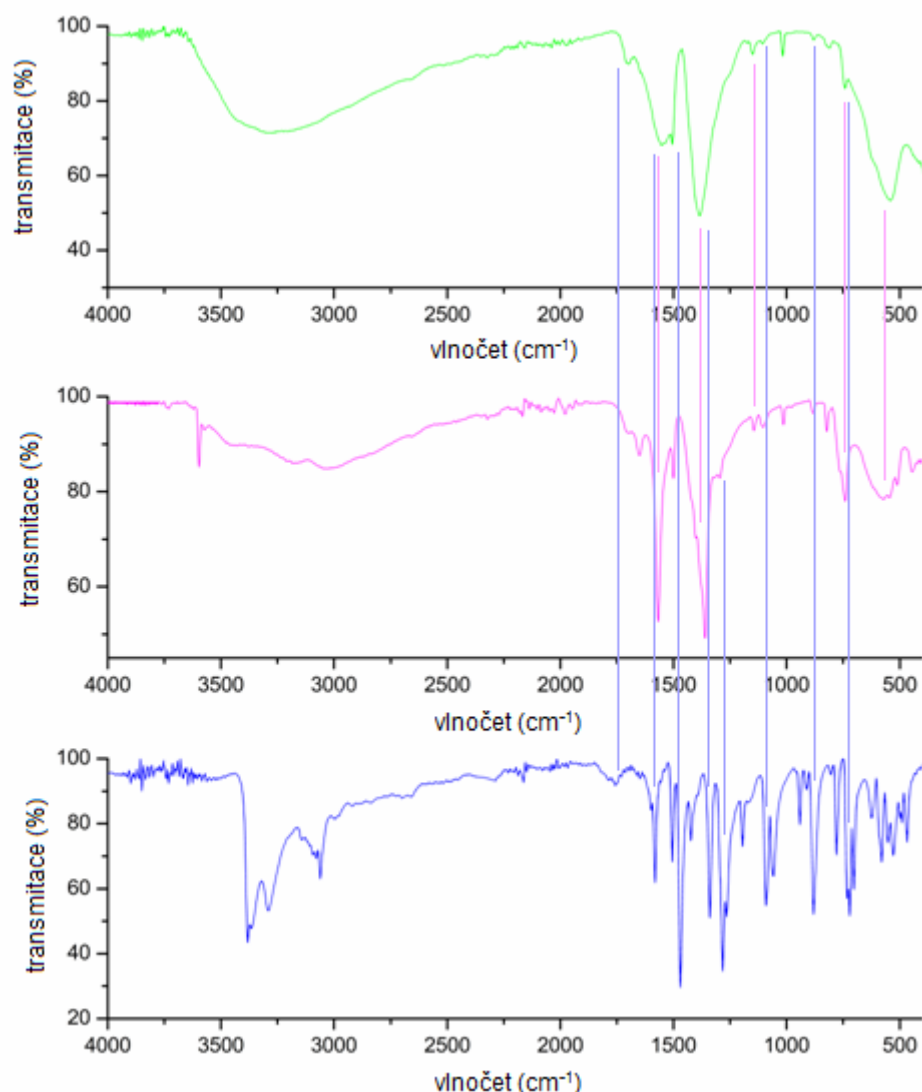
Obr. č. 24. a) TEM snímek systému **2@ATA@Fe**, s rozlišením 100 nm, b) s rozlišením 20 nm c) SEM snímek s rozlišením 200 nm d) příslušné EDS

4.4 FunkcionalizovanéTA@Fe nanočástice

Třetí typ připravených nanosystémů, nyní s kyselinou tereftalovou, byl připraven s Pt(II) komplexy CDDP (**CDDP@TA@Fe**), OXA (**OXA@TA@Fe**), **1** (**1*@TA@Fe**) a **2** (**2*@TA@Fe**).

Infračervená spektroskopie

Mid-FTIR spektroskopie byla provedena v oblasti $400\text{--}4000\text{cm}^{-1}$. Spektra (obr. č. 25) poskytly relevantní informace, které byly získány porovnáním výchozího funkcionalizovaného systému (**TA@Fe**) s funkcionalizovanými systémy (**CDDP@TA@Fe**, **OXA@TA@Fe**, **1*@TA@Fe** a **2*@TA@Fe**) a funkcionalizujícím Pt(II) komplexem. Spektra vykazovala charakteristické vibrace výchozích reakčních komponent, což opět dokázalo přítomnost kyseliny tereftalové (maximum píku vibrace karboxylové kyseliny při ca 1649 cm^{-1}), maghemitu (maximum píku vibrace Fe–O při ca 539 cm^{-1}) a Pt(II) komplexu ve finálním funkcionalizovaném systému.

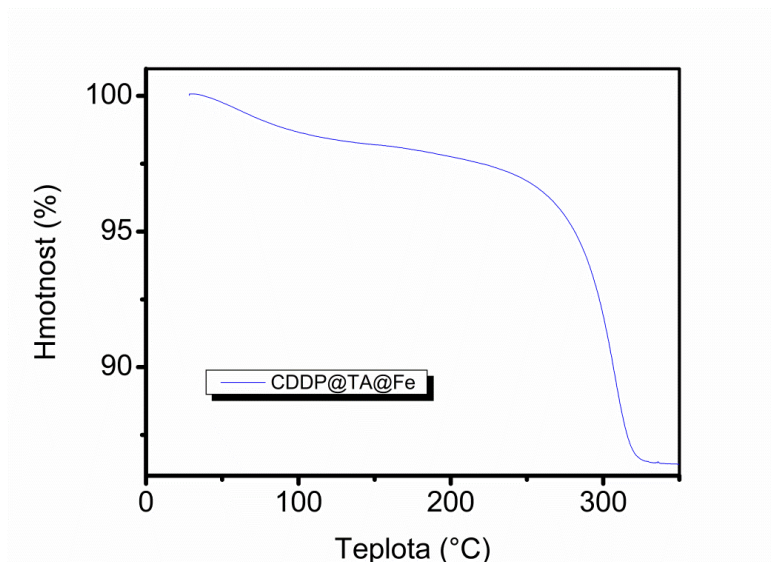


Obr. č. 25. Srovnání Mid-FTIR spekter funkcionalizovaného systému ($1^*@TA@Fe$; zeleně), s výchozím maghemitovým systémem ($TA@Fe$; fialově) a samotným funkcionalizovaným komplexem **1** (modře).

Simultánní TG/DTA termická analýza

Z výsledků TG/DTA termické analýzy je patrný hmotnostní úbytek funkcionalizované nanočástice obsahující komplex platiny ($CDDP@TA@Fe$; modře) (obr. č. 26). Na počátku TG křivky funkcionalizovaného systému, v rozmezí od 30 °C do 260 °C, je znatelný mírný pokles, který je přisuzován ztrátě vody, která je naabsorbována na povrchu nanočástic (63). Za tímto poklesem následuje v rozmezí od 260 °C do 330 °C strmý pád křivky, čímž dochází k druhému hmotnostnímu úbytku, který rovněž souvisí s oxidací organické vrstvy pokrývající

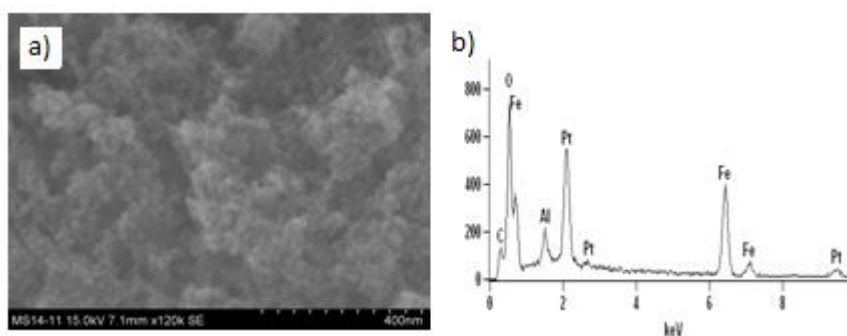
maghemitové jádro. Od teploty zhruba 340 °C byl pozorován teplotně stabilní systém. TG křivka funkcionalizovaného systému (modře) poukazovala na to, že výsledný systém obsahoval příslušný platnatý komplex (CDDP).



Obr. č. 26. Termogravimetrická (TG) křivka funkcionalizovaného systému **CDDP@TA@Fe**

Mikroskopické techniky (SEM/EDS)

Pomocí mikroskopických technik byly získány informace, týkající se tvaru, velikosti a jednotnosti připravených nanočásticových systémů. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) se obecně využívá ke studiu povrchu materiálů a její morfologie. Bylo zjištěno, že výchozí funkcionalizované systémy mají kulovité útvary, obsahující maghemitové jádro Fe_2O_3 potažené vrstvou kyseliny tereftalové.



Obr. č. 27. a) SEM snímek systému **CDDP@TA@Fe** s rozlišením 400 nm, b) příslušné EDS

5. Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá studiem nanosystémů pro magnetický cílený transport léčiv, při kterém je, obecně řečeno, magnetický nosič léčiva schopen cíleně transportovat léčiva přímo do potřebné tkáně (např. nádoru), čímž je schopen vyhnout se zdravé tkáni a tím minimalizovat atak toxického léčiva na zdravou tkáň, který přináší pacientům nepříjemné vedlejší účinky v průběhu samotné terapie. Strategie využívající cílený transport léčiv přináší nové možnosti při léčbě a diagnostice nádorových onemocnění. Teoretická část této práce je zaměřena na seznámení s podstatou cíleného transportu, využitelností magnetických nanočástic na bázi oxidů železa v biomedicíně a zavádí čtenáře do samotné historie a mechanismu účinku významného protinádorového léčiva jakým je cisplatina. Experimentální část je zaměřena na přípravu a následnou charakterizaci připravených nanočásticových systémů obsahujících maghemitové jádro pokryté tenkou vrstvou organické kyseliny (AMB, ATA, TA), čímž vznikají výchozí systémy (**AMB@Fe**, **ATA@Fe**, **TA@Fe**), které jsou dále funkcionizovány různými protinádorově aktivními platnatými komplexy (např. komplexy s deriváty 7-azaindolu (**1-3**), oxaliplatinou nebo cisplatinou). Finální funkcionizované systémy (**1*@AMB@Fe**, **2*@AMB@Fe**, **3*@AMB@Fe**, **1*@ATA@Fe**, **2@ATA@Fe**, **3@ATA@Fe**, **CDDP@TA@Fe**, **OXA@TA@Fe**, **1*@TA@Fe**, **2*@TA@Fe**) byly studovány pomocí instrumentálních metod (FTIR, EDS a Mössbauerova spektroskopie, TG/DTA termická analýza, SEM, TEM), které poskytly relevantní informace o jejich složení (byla prokázána přítomnost funkcionizujících Pt(II) komplexů ve výsledných systémech), velikosti (okolo 10 nm) a morfologii (kulovité nanočástice s maghemitovým jádrem).

Summary

This Bachelor's thesis deals with the study of magnetic nanosystems for targeted drug delivery, where, generally speaking, magnetic carrier is able to transport the drug directly to the desired tissue (e.g. tumours) and avoid healthy tissue and thus minimize the attack of toxic drugs to healthy tissue, which brings the patients negative side effects during the therapy. Using of the targeted drug delivery brings new possibilities in the treatment and diagnosis of cancer. The theoretical part of this thesis is focused on the nature of drug delivery, the utility of magnetic nanoparticles of iron oxide in biomedicine and history and mechanism of action of important anticancer drug cisplatin. The experimental part is focused on preparation and characterization of the prepared nanosystems containing maghemite core coated with an organic acid (AMB, ATA or TA) in the initial systems **AMB@Fe**, **ATA@Fe**, **TA@Fe**, which are further functionalized various antitumor active platinum complexes (e.g. complexes with 7-azaindole derivatives (**1–3**), oxaliplatin or cisplatin). The final functionalized systems (**1*@AMB@Fe**, **2*@AMB@Fe**, **3*@AMB@Fe**, **1*@ATA@Fe**, **2@ATA@Fe**, **3@ATA@Fe**, **CDDP@TA@Fe**, **OXA@TA@Fe**, **1*@TA@Fe**, **2*@TA@Fe**) were studied by FTIR, EDS and Mössbauer spectroscopy, TG / DTA thermal analysis, SEM and TEM, which provided relevant information about their composition (showed the presence of the functionalizing Pt(II) complexes in the resulting systems), size (approximately 10 nm) and morphology (spherical core-shell nanoparticles with maghemite core).

6. Použitá literatura

1. *The footprints of cancer development: cancer biomarkers.* **Ullah, MF a Aatif, M.** 2009, *Cancer Treat Rev* 35(3), stránky 193-200.
2. *Cancer cell invasion: treatment and monitoring opportunities in nanomedicine.* **Veiseh, O, Kievit, FM a Zhang, M.** 2011, *Adv Drug Deliv Rev* 63(8), stránky 582-596.
3. *Heparin immobilized gold nanoparticles for targeted detection and apoptotic death of metastatic cancer cells.* **Lee, K a další.** 2010, *Biomaterials* 31(25), stránky 6530–6536.
4. *Targeted multifunctional lipid-based nanocarriers for image-guided drug delivery.* **Koning, GA a Krijger, GC.** 2007, *Anti Cancer Agents Med Chem* 7, stránky 425-440.
5. *Využití nanočásticových systémů v medicíně.* **Rabišková, M.** 2008, *Remedia*, stránky 89-97.
6. **Arshady, R a Kono, K.** *Smart nanoparticles in nanomedicine.* London : Kentus Books, 2006. str. 417.
7. <https://www.cnio.es/ing/grupos/plantillas/personalizable.asp?pag=1434>. *Spanish National Cancer Research Centre* . [Online] July 2011.
8. *Societal implications of nanoscience and nanotechnology: maximizing human benefit.* **Roco, MC a Bainbridge, WS.** 2005, *J Nanopart Res* 7(1), stránky 1-13.
9. **R.Glanville, Allan.** *Scientifica, comprehensive guide to the word of science.* Australia : Millennium House Pty Ltd 2008, 2008.
10. <http://nanotechnologie.vsb.cz/>. [Online]
11. *Iron uptake and metabolism in the new millenium.* **Dunn, Rahmanto a další,** 2006, *Trends Cell Biol.*, stránky 93-100.
12. *Metabolismus železa a jeho regulace.* **Sedláčková, T a Racek, J.** 2009, *Klin. Biochem. Meb*, stránky 17-23.
13. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics. 3rd Edition vyd.* **Rédei a George, P.** 2008, Springer.
14. *Oh the irony: Iron as a cancer cause or cure?* **Foy, S,P a Labhasetwar, V.** 2011,

Biomaterials 32, stránky 9155-9158.

15. *Preparation and properties of various magnetic nanoparticles* . **Drbohlavova, J a další.** 2009, Sensors , stránky 2352-2362.

16. *Iron(III) oxides from thermal processes synthesis, structural and magnetic properties, Mossbauer spectroscopy characterization, and applications.* **Zboril, R, Mashlan, M a další.** 2002, Chem Mater, stránky 969-982.

17. *Maghemite nanoparticles by view of Mössbauer spectroscopy.* **Tuček, J a Zbořil, R.** 2006, Nanotechnology 6, stránky 926-947.

18. *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine.* **Pankhurst, Q, A, a další.** 2003, J.Physic. D: Appl. Phys.36, stránky R167-R181.

19. http://www.emg.tu-bs.de/forschung/material/maghemite_d.html. [Online]

20. *Microspheres, microcapsules and liposomes.* **Arshady, R.** 1999, Citus Books.

21. *Manipulation of iron transporter genes results in the suppression of human and mouse mammary adenocarcinomas.* **XP, Jiang, RL, Elliott a JF, Head.** 30: Anticancer Res, 2010, stránky 759-65.

22. *Imaging of cellular therapies.* **Srinivas, M., a další.** 62 : Adv Drug Deliv Rev, 2010, stránky 1080-1093.

23. *Magnetic nanoparticle-based cancer therapy.* **Jing, Yu, a další.** 22: Chinese Phys. B, 2013.

24. *Presentation of new magnetic field therapy system for treatment of human solid tumors with magnetic fluid hypertemia.* **Jordan a Scholz.** 2001, J. Magn Magn Mater, stránky 118-126.

25. *Magnetic targeted carriers offer site specific drug delivery* . **Goodwin.** 2000, News international Oncology, stránky 9-22.

26. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Doxorubicin.svg>. *wikipedia.* [Online]

27. *Evaluation of neck and body metastases to nodes with ferumoxtran 10-enhanced MR imaging: phase III safety and efficacy study1.* **Anzai, Y a Piccoli, CW.** 2003, Radiology

228(3), stránky 777-788.

28. *Molecular bases of cellular iron toxicity*. **Eaton, JW a Qian, M.** 2002, Free Radic Biol. Med 32(9), stránky 833-840.

29. *Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering*. **Chomoucka, J., Drbohlavova, J. a Huska, D.,** 2010, Pharmacological Research 62, stránky 144-149.

30. *Chemical conjugation of urokinase to magnetic nanoparticles for targeted thrombolysis*. **Bi, F, a další.** 2009, Biomaterials , stránky 5125-5130.

31. *Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: drug loading and in vitro drug release study*. **Gaihre, B, a další.** 2009, Int J Pharm, stránky 180-189.

32. *Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging.*. **Veiseh, Gunn a Zhang.** 2010, Advanced Drug Delivery Reviews.

33. *Synthesis of fluorescent-maghemite nanoparticles as multimodal imaging agents for amyloid-beta fibrils detection and removal by a magnetic field*. **Skaat, H a Margel, S.** 2009, Biochem Biophys Res Commun, stránky 645-649.

34. *Cisplatin drug delivery using gold-coated iron oxide nanoparticles for enhanced tumour targeting with external magnetic fields*. **Wagstaff, Amelia, a další.** 2012, Inorganica Chimica Acta, stránky 328-333.

35. *Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Biological Coatings*. **Dozier, D., Palchoundhury, Soubantika a Bao, Yuping.** 2010, JOSHUA, stránky 16-18.

36. *Surface design of core-shell superparamagnetic iron oxide nanoparticles drives record relaxivity values in functional MRI contrast agents*. **Maity, Dipak, a další.** 2012, ChemComm, stránky 11398-11400.

37. *4-Aminobenzoic Acid-Coated Maghemite Nanoparticles as Potential Anticancer Drug Magnetic Carriers: A Case Study on Highly Cytotoxic Cisplatin-Like Complexes Involving 7-Azaindoles*. **Štarha, P; Stavárek, M; Tuček, J; Trávníček, Z.,** 2013, Molecules, stránky 1622-1634.

38. *Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: focus on liposomal doxorubicin (Myocet TM)*. **R., C., F., Leonard, a další.** 18: J.Breast, stránky 218-224.

39. *A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting.* **J., Gautier, a další.** 423: International Journal of Pharmaceutics, 2012, International Journal of Pharmaceutics , stránky 16-25.
40. *Nanotechnology with soft materials.* **Hamley, I. ,W.,.** 2003, Angewandte Chemie International Edition 42 (15), stránky 1692-1712.
41. *Alkyl phosphonate/phosphate coating on magnetite nanoparticles:a comparison with fatty acids.* **Sahoo, Y., Pizem, H. a Fried, T.** 2001, Langmuir 17 (25) , stránky 7907-7911.
42. *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy.* **Mahmoudi, Morteza, a další.** 2011, Advanced Drug Delivery Reviews (63), stránky 24-26.
43. *Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice.* **Moghimi, S.M., Hunter, A.C. a Murray, J.C.** 2001, Pharmacological Reviews 53 (2) , stránky 283-318.
44. *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications.* **Gupta, A.K. a Gupta, M.** 2005, Biomaterials 26 (18), stránky 3995-4021.
45. *Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy.* **Forrest, Kievit a Zhang.** 2011, Accounts of chemical research, stránky 853-862.
46. *A nanoparticle size series for in-vivo fluorescence imaging.* **Popovic, Z., a další.** 2010, Angew. Chem., Int. Ed, stránky 8649 – 8652.
47. *Cell Membranes Open" Doors" for Cationic Nanoparticles/Biomolecules: Insights into Uptake Kinetics.* **Lin, Jiaqi a Alexander-Katz, Alfredo.** 2013, American Chemical Society, stránky 10799-10808.
48. *Tuning payload delivery in tumour cylindroids using gold nanoparticles.* **Kim, B., a další.** 2010, Nat. Nanotechnol., stránky 465 – 472.
49. **Peyrone, M.** 1845, Ann. Chem. Pharm, str. 1.
50. *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy.* **Kelland, L.** 7: Nature Reviews, Cancer, 2007, NatureRevCancer, stránky 573-584.
51. **Rosenberg, B, VanCamp, L a Krigas, T.** 1965, Nature, str. 698.

52. *Platinum compounds: a new class of potent. antitumour agents.* **Rosenberg, B., a další.** 1969, Nature 222, stránky 385-386.
53. *Molekulární aspekty mechanismu protinádorového působení cisplatiny.* **Brabec, V.** 1990, Biologické listy, 55(1), stránky 42-58.
54. **Giaccone, G.** 2000, Drugs , str. U4.
55. *Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity.* **Cepeda, Fuertes a Castilla.** 2007, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, stránky 3-18.
56. *Chem.Rev.* **Fuertes, M. A., Alonso, C. a Pérez, J. M.** 2003, Chem. Rev., stránky 103,645.
57. **Judson, I. a Kelland, L. R.** 2000, Drugs, stránky 59,29.
58. **Payet, D.G., Sip, F. a Leng, M.** 1993, Nucl. Acids Res., str. 5846.
59. **Brabec, Viktor a Kašpárková, Jana.** Platinum-Based Drugs. M. and Tiekink, E. R. T. (eds.) In Gielen. *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine.* Chichester : John Wiley & Sons, Ltd., 2005, stránky 489-506.
60. *Adv. Drug. Del.* **Torchilin, V.,** Rev.(63), 2011, str. 131.
61. *Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility.* **Bae, You, Han a Park, Kinam.** 153, 2011, Journal of Controlled Release, stránky 198-205.
62. *N-acylated chitosan stabilized iron oxide nanoparticles as a novel nano-matrix and ceramic modification* **Bhattacharai, SR, a další,** 2007, Carbohydr Polym, stránky 467-477.
63. *Surface Design of Core Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Drives Record Relaxivity Values in Functional MRI Contrast Agents.* **Maity, Dipak, a další.,** The Royal Society of Chemistry, 2012, Sv. Electronic Supplementary Material (ESI) for Chemical Communications.
64. *Pharmaceutical nanotechnology elaboration of PLLA-based superparamagnetic nanoparticles: Characterization, magnetic behaviour study and in vitro relaxivity evaluation.* **Hamoudeh, Faraj, a další.** 338: Elsevier, 2007, International Journal of Pharmaceutics, stránky 248-257.

7. Přílohy

Přílohou tištěné formy bakalářské práce je vědecká publikace *4-Aminobenzoic Acid-Coated Maghemite Nanoparticles as Potential Anticancer Drug Magnetic Carriers: A Case Study on Highly Cytotoxic Cisplatin-Like Complexes Involving 7-Azaindoles*. **P. Štarha, M. Stavárek, J. Tuček a Z. Trávníček**, *Molecules* 19 (2014) 1622-1634.

Article

4-Aminobenzoic Acid-Coated Maghemite Nanoparticles as Potential Anticancer Drug Magnetic Carriers: A Case Study on Highly Cytotoxic *Cisplatin*-Like Complexes Involving 7-Azaindoles

Pavel Štarha ¹, Martin Stavárek ¹, Jiří Tuček ² and Zdeněk Trávníček ^{1,*}

¹ Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, Olomouc CZ 77146, Czech Republic; E-Mails: pavel.starha@upol.cz (P.Š.); martin.stavarek01@upol.cz (M.S.)

² Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Experimental Physics, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, Olomouc CZ 77146, Czech Republic; E-Mail: jiri.tucek@upol.cz

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: zdenek.travnicek@upol.cz
Tel.: +420-585-634-352; Fax: +420-585-634-954.

Received: 23 December 2013; in revised form: 17 January 2014 / Accepted: 23 January 2014 /
Published: 28 January 2014

Abstract: This study describes a one-pot synthesis of superparamagnetic maghemite-based 4-aminobenzoic acid-coated spherical core-shell nanoparticles (PABA@FeNPs) as suitable nanocomposites potentially usable as magnetic carriers for drug delivery. The PABA@FeNPs system was subsequently functionalized by the activated species (**1*** and **2***) of highly *in vitro* cytotoxic *cis*-[PtCl₂(3Claza)₂] (**1**; 3Claza stands for 3-chloro-7-azaindole) or *cis*-[PtCl₂(5Braza)₂] (**2**; 5Braza stands for 5-bromo-7-azaindole), which were prepared by a silver(I) ion assisted dechlorination of the parent dichlorido complexes. The products **1***@PABA@FeNPs and **2***@PABA@FeNPs, as well as an intermediate PABA@FeNPs, were characterized by a combination of various techniques, such as Mössbauer, FTIR and EDS spectroscopy, thermal analysis, SEM and TEM. The results showed that the products consist of well-dispersed maghemite-based nanoparticles of 13 nm average size that represent an easily obtainable system for delivery of highly cytotoxic *cisplatin*-like complexes in oncological practice.

Keywords: maghemite; nanoparticles; magnetic; platinum complexes; 7-azaindole derivatives; drug delivery

1. Introduction

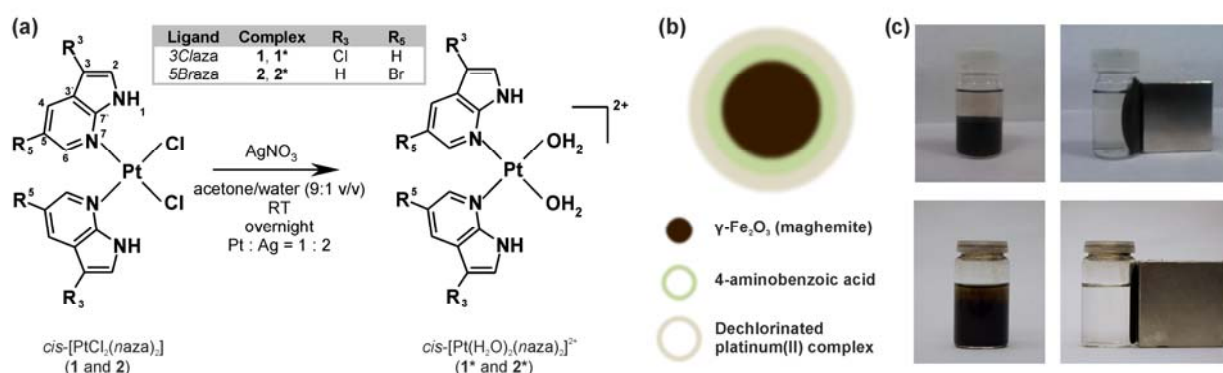
The platinum(II) complexes, such as cisplatin, oxaliplatin or carboplatin, are well-established anticancer chemotherapeutics used worldwide for the treatment of various types of cancer [1]. Application of these drugs causes several negative side-effects, such as nephrotoxicity, neurotoxicity or myelosuppression, which represent a permanent incentive for bioinorganic chemists to find novel non-platinum drugs (e.g., ruthenium complexes) or platinum complexes with diminished side-effects or to study the possibilities of the targeted drug delivery of the known as well as novel cytotoxic platinum complexes to the tumour tissues. The latter option, *i.e.*, targeted drug delivery, offers various approaches, as reviewed e.g., in [2–4]. One of them is based on the use of magnetic nanoparticles (NPs) coated with a suitable shell, comprising e.g., organic molecules of the same entity, that is able to interact with the drug [5,6]. A distribution of such systems within the organism suffering with cancer could be affected by an external magnetic field, whose application concentrates the drug into the tumour tissue.

Among all the magnetic nanoparticles of transition metals and their oxides, iron oxide-based nanosystems hold a paramount position in various medical fields due to their promising properties including magnetic (e.g., superparamagnetism, strong magnetic response and saturation under small applied magnetic fields, excellent heating performance in the frequencies of the alternating magnetic field safe for humans) and biochemical (e.g., very low toxicity, biocompatibility, biodegradability) features [7,8]. To date, they have been successfully employed as negative contrast agents in magnetic resonance imaging, for cell labelling and separation, drug delivery, and as functional components in magnetically-assisted hyperthermia for cancer treatment. Once iron oxide nanoparticles are functionalized with suitable bioactive substances, the resulting system then performs both the diagnostic and therapeutic actions, giving birth to a novel branch of medicine known as theranostics [9]. Many iron oxide-based (both maghemite or magnetite) nanocarriers designed and fabricated for magnetic drug delivery purposes have been reported in the literature to date, involving various synthetic approaches and the use of different organic-coating layers [5,6,10–19]. Regarding the nanocomposites with maghemite-based core-shell NPs functionalized with platinum-based drugs (*i.e.*, structurally similar to those reported in this work), to the best of our knowledge only two such works have been reported to date. Both of them report maghemite-based NPs with dechlorinated cisplatin bound to 4-oxo-4-(3-(triethoxysilyl)propylamino)butanoic acid (OTPBA) [20,21]. These systems showed remarkable, time-dependent *in vitro* cytotoxicity against MCF7, HeLa, A549 and A549R human cancer cell lines, which is comparable with that of cisplatin after 72 h, and moreover, they can be simultaneously used as MRI contrast agents. Several other works have dealt with similar magnetite-based NPs suitable for magnetic drug delivery and studied cisplatin as the model drug as follows: Deng and Lei reported the Fe₃O₄/SiO₂ cores with PEG–PLA shell (PEG = polyethylene glycol, PLA = polylactic acid) and loaded cisplatin [22]. A similar system, but with a PLA shell, was studied by Devi *et al.*, who focused on

loading and release properties of cisplatin [23]. Ashjari *et al.* published the preparation of cisplatin-functionalized magnetite NPs with biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) with different morphological properties of the resulting composite [24]. Several other studies focused on the analogical systems (magnetite core and cisplatin as the functionalizing agent) differing in organic shells, such as folate acid- [25], squalene- [26], carboxymethylcellulose- [27], dextrane- [28] or poly(ethyl-2-cyanoacrylate)- [29] based layer. Finally, Li *et al.* studied the effect of cisplatin-loaded magnetite-based NPs on multidrug resistance and its mechanism [30]. Although all of the mentioned nanosystems have to be considered as universal in terms of functionalization by the platinum complexes, it has to be noted that to the best of our knowledge only one work [31] has reported iron oxide-based NPs functionalized with platinum complexes other than the mentioned cisplatin. In particular, the magnetite-silica composite nanoparticles were investigated as carriers of a photoactive platinum diimine complex.

In an effort to research the possibilities of targeted delivery of the recently reported highly *in vitro* cytotoxic cisplatin-like complexes involving 7-azaindole derivatives investigated by our team [32–34], we developed a novel system based on easily obtainable magnetic nanoparticles. They consist of maghemite-based 4-aminobenzoic acid (PABA)-coated core-shell nanoparticles (PABA@FeNPs) functionalized by the activated (*i.e.*, dechlorinated) platinum(II) complexes bearing various 7-azaindoles (the complexes **1** and **2**, whose activated form is symbolized as **1*** and **2***; Figure 1a). The obtained systems **1***@PABA@FeNPs and **2***@PABA@FeNPs (Figure 1b) were thoroughly characterized by relevant techniques including Mössbauer and FTIR spectroscopy, simultaneous TG/DTA thermal analysis, transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) equipped with energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The resulting nanocomposites, which were found to be 13.0 ± 2.1 nm of size with acceptable dispersibility, are of high potential from the magnetic drug delivery point of view.

Figure 1. (a) The structural formulas of highly cytotoxic *cis*-[PtCl₂(3Claza)₂] (**1**; 3Claza = 3-chloro-7-azaindole) and *cis*-[PtCl₂(5Braza)₂] (**2**; 5Braza = 5-bromo-7-azaindole), and the corresponding activated diaqua species symbolized as **1*** and **2*** used for the interaction with PABA@FeNPs; (b) the proposed composition of the studied **1***@PABA@FeNPs and **2***@PABA@FeNPs based on the maghemite core coated with 4-aminobenzoic acid and functionalized with **1*** or **2***; and (c) photos of the obtained aqueous suspensions of PABA@FeNPs (*up*) and **2***@PABA@FeNPs (*down*) without (*left*) and with (*right*) an external magnetic field.



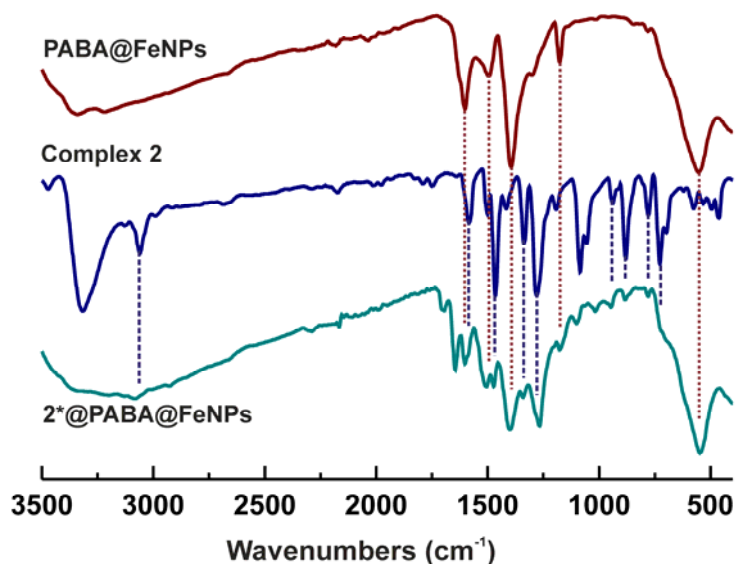
2. Results and Discussion

2.1. Preparation and Properties of PABA@FeNPs

The maghemite-based nanoparticles (FeNPs) coated with 4-aminobenzoic acid (PABA@FeNPs) were prepared by a method using a mixture of the Fe(III) and Fe(II) salts ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in this work), which was mixed together with PABA in deionized water under atmospheric conditions. NH_4OH was finally added to the mixture which resulted in the formation of the maghemite-based PABA@FeNPs nanoparticles. It has to be noted that the usual preparation of maghemite-based NPs involves magnetite NPs (prepared from the mixture of Fe(III) and Fe(II) salts under nitrogen [35,36]) and subsequently oxidized by e.g., diluted nitric acid [20,21]. Since we aimed to prepare maghemite-based NPs, we used a different approach—we did not perform the syntheses under nitrogen but under atmospheric conditions, which was found to be sufficient for the magnetite oxidation to occur without addition of any other oxidizing agent.

The presence of the organic layer coating the maghemite NPs within the obtained PABA@FeNPs was proved by the FTIR spectra recorded in the $400\text{--}4,000\text{ cm}^{-1}$ region (Figure 2 and Figure S1) as well as by the thermal analysis (Figure S2) [35,37]. The FTIR spectrum of PABA@FeNPs contained the characteristic peak of maghemite at *ca.* 550 cm^{-1} clearly assignable to the $\nu(\text{Fe}\text{--}\text{O})$ vibration, as well as a series of peaks, whose positions in the spectrum correlates with those of free PABA molecule (see Figure S1 and Experimental Section). The results of the FTIR spectroscopy also indirectly proved that PABA is bonded to $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ within the PABA@FeNPs nanocomposite through the deprotonated carboxyl group, because there is only one major peak in the region characteristic for this functional group with a band centred at $1,603\text{ cm}^{-1}$, as compared with four in total peaks found in the spectrum of free PABA at $1,571$, $1,597$, $1,623$ and $1,660\text{ cm}^{-1}$ (Figure S1).

Figure 2. FTIR spectra of the maghemite nanoparticles coated with 4-aminobenzoic acid (PABA@FeNPs; red line), the parent complex **2** involving 5-bromo-7-azaindole (blue line), and the resulting system with the activated complex (**2***) bound on the maghemite nanoparticles coated with 4-aminobenzoic acid (**2*@PABA@FeNPs**).



The PABA@FeNPs hybrid systems exhibited, as expected, a strong attraction to the magnetic field (Figure 1c) and good stability in solution (no macroscopic changes, e.g., colour or magnetism, after one week of standing in the fridge) and in solid state (usable with no changes of their properties after more than two months of standing in the fridge).

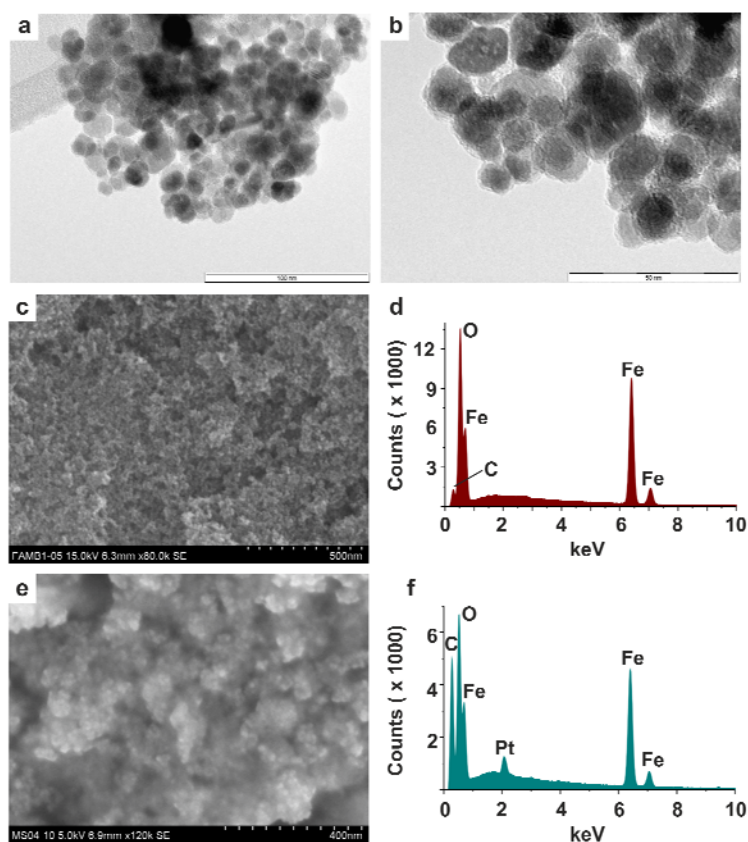
2.2. Functionalization of PABA@FeNPs by Platinum(II) Complexes

We assumed a bonding of the platinum(II) complexes through Pt–N bonds formed between the Pt(II) atom of the activated species and the amino group of PABA. As previously reported, PABA with a substituted carboxyl group (which simulates the bonding of PABA to the maghemite NPs through the mentioned functional group) binds to platinum through the amino group [38–40]. Further, the X-ray structures of several platinum(II) complexes involving aniline or its variously substituted derivatives, such as 4-alkylanilines (e.g., [41,42]) are described in the literature. These facts proved PABA is a suitable coating agent for magnetic therapeutic/theranostic systems functionalized with platinum-based agents.

The initial *cis*-dichloridoplatinum(II) complexes of the composition *cis*-[PtCl₂(*naza*)₂] (**1** and **2**), which were recently described in the literature by our team as having significant antitumor properties [33,34], were activated by their reactions with a stoichiometric amount of silver(I) nitrate, resulting in dechlorination and formation of the diaquaplatinum(II) species *cis*-[Pt(H₂O)₂(3*Claza*)₂]²⁺ (**1***) and *cis*-[Pt(H₂O)₂(5*Braza*)₂]²⁺ (**2***). The activated species, involving the labile Pt–aqua bonds which represent suitable sites for consequent formation of the mentioned Pt–N bonds with PABA, were allowed to interact in acetone with the PABA@FeNPs nanoparticles for 48 h. The final systems (**1***@PABA@FeNPs and **2***@PABA@FeNPs), which showed strong attraction to the external magnetic field (Figure 1c), were magnetically isolated, purified and stored in the fridge. The presence of the platinum(II) species within the obtained maghemite-based nanocomposite was proved by FTIR spectroscopy (Figure 2) as well as by EDS spectroscopy (Figure 3f). FTIR spectroscopic experiments were performed with the aim to better characterize the studied systems. The detailed analysis of FTIR spectra revealed that bands observed in the spectrum of **1***@PABA@FeNPs at 785, 1,018, 1,099, 1,277, 1,338, 1,516, 1,602, 2,906 and 3,107 cm⁻¹ and in the spectrum of **2***@PABA@FeNPs at 700, 883, 946, 1,267, 1,341, 1,473, 1,603 and 3,082 cm⁻¹ were not detected in the spectrum of the PABA@FeNPs system. Moreover, the positions of these bands correlate well with those detected in the spectra of the complexes **1** and **2** (Figure 2 for the complex **2** and **2***@PABA@FeNPs), thus showing on the presence of the platinum(II) 7-azaindole species within the resulting nanocomposites. An interpretation of the far-FTIR spectra recorded at 150–600 cm⁻¹ provides indirect proof of the covalent bonding between the platinum(II) species and PABA@FeNPs within the studied nanosystems **1***@PABA@FeNPs and **2***@PABA@FeNPs. In particular, the performed far-FTIR experiments regarding **2**, **2*** and **2***@PABA@FeNPs indicated changes in inner coordination spheres in the vicinity of the central platinum(II) atom, *i.e.*, the changes going from a PtCl₂N₂ donor set (the starting complex **2**; two ν(Pt–Cl) maxima at 336 and 345 cm⁻¹), through a PtN₂O₂ donor set (the dechlorinated complex **2***; two ν(Pt–O) maxima at 322 and 332 cm⁻¹) to a PtN₄ one (the resulting system **2***@PABA@FeNPs; no bands detected in the region mentioned for both the ν(Pt–Cl) or ν(Pt–O) vibrations), as depicted in Figure S3. In other words, although we did not detect the vibrations connected with the anticipated

Pt–N bonds between the platinum(II) species and amino group of PABA, we assume that these vibrations are overlapped (analogically to those at *ca* 520 cm^{-1} assignable to Pt–N bonds between the central Pt(II) atom and 7-azaindole rings) by a wide and intensive band belonging to $\nu(\text{Fe–O})$. The $\nu(\text{Fe–O})$ vibration was, together with a band centred at 579 cm^{-1} assignable to the vibrations connected with the deformation of the 7-azaindole moiety [43], the only band detected in the discussed far-FTIR spectrum of 2^*@PABA@FeNPs . TEM images of the prepared 1^*@PABA@FeNPs and 2^*@PABA@FeNPs systems provided the relevant information regarding the shape, size, and uniformity of the resulting NPs (Figures 3a,b). The systems were found to be spherical, core-shell well-dispersed composites with an average size of 13.0 ± 2.1 nm. SEM was used to investigate the surface morphology of the prepared maghemite-based NPs (Figure 3c,e). A comparison of the SEM images depicted for PABA@FeNPs (Figure 3c) and 2^*@PABA@FeNPs (Figure 3e) did not show any noticeable difference between their properties, since both systems were detected by SEM (as well as by the above-mentioned TEM) as having a spherical shape of individual NPs, which agglomerated together to the structure without any specific shape.

Figure 3. TEM images of 2^*@PABA@FeNPs {(a) with 100 nm resolution and (b) with 50 nm resolution}, SEM images of PABA@FeNPs (c) and 2^*@PABA@FeNPs (e) given with their EDS patterns (d, f).



Simultaneous TG/DTA thermal analysis revealed a considerable difference between the weight losses of PABA@FeNPs and those involving functionalized platinum(II) complexes (represented by 2^*@PABA@FeNPs ; Figure S2). PABA@FeNPs did not show any weight increase in the 100–150 °C range (after the loss of water physically adsorbed on the the prepared NPs), which is known to be

connected with an oxidation of Fe^{2+} ions, which indirectly proved the chemical composition of the magnetic core (maghemite). The PABA@FeNPs system was thermally stable between 114 and 148 °C, when its thermal degradation (connected with an oxidation of the organic layer coating the maghemite core) started and continued to 460 °C (total weight loss equals 8.0%). The product of the thermal decomposition, most probably $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ as previously reported for maghemite NPs [44], did not show any weight change up to 530 °C, however, an exothermic effect unambiguously assignable to the $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ to $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ conversion was detected on the DTA curve with the maximum at 488 °C (Figure S2). A considerably different weight loss (19.8%) as well as TG-curve shape (a continual decomposition) was found for 2^*@PABA@FeNPs indirectly proving the presence of the platinum(II) species within the resulting system (Figure S2).

2.3. Mössbauer Spectroscopy

The ^{57}Fe Mössbauer spectra of the samples studied are depicted in Figure 4, while the values of the Mössbauer hyperfine parameters, derived from the fitting of the recorded Mössbauer spectra, are listed in Table 1.

Figure 4. Room-temperature Mössbauer spectra of (a) PABA@FeNPs and (b) 2^*@PABA@FeNPs ; doublet - assigned to the Fe^{3+} relaxation component, singlet - assigned to the Fe^{3+} superparamagnetic component.

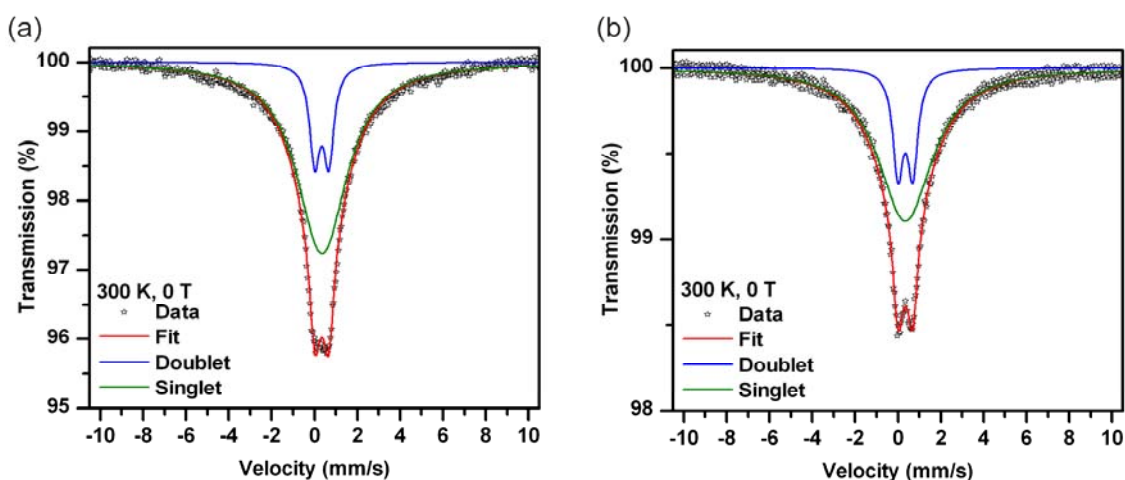


Table 1. Values of the Mössbauer hyperfine parameters, derived from the fitting of the room-temperature Mössbauer spectra of PABA@FeNPs and 2^*@PABA@FeNPs , where δ is the isomer shift, ΔE_Q is the quadrupole splitting and RA is the spectral area of the individual spectral components.

Sample	Component	$\delta \pm 0.01$ (mm/s)	$\Delta E_Q \pm 0.01$ (mm/s)	RA ± 1 (%)	Assignment
PABA@FeNPs	Doublet	0.34	0.66	18	Fe^{3+} relaxation component
	Singlet	0.35		82	Fe^{3+} superparamagnetic component
2^*@PABA@FeNPs	Doublet	0.35	0.69	88	Fe^{3+} relaxation component
	Singlet	0.35		78	Fe^{3+} superparamagnetic component

The room-temperature Mössbauer spectrum of both the PABA@FeNPs and 2*@PABA@FeNPs sample shows only relaxation components (*i.e.*, singlet and doublet, see Figures 4a,b, respectively) with the values of the Mössbauer hyperfine parameters (see Table 1) typical of high-spin Fe(III) atom in iron(III) oxides [45]; there is no indication of presence of the Fe²⁺ valence state. Thus, the nanoparticles in both samples are solely of -Fe₂O₃ origin. This is expected in connection with their small size with a large surface area securing their complete oxidation. On the timescale of the Mössbauer technique, all the nanoparticles in both assemblies behave in a superparamagnetic manner at room temperature. The doublet component belongs to the nanoparticles with thermally fluctuating superspins having relaxation times much smaller than the characteristic measurement time (τ_m) of the Mössbauer spectroscopy, while the presence of a singlet corresponds to those nanoparticles the superspin of which thermally fluctuates between the energetically favored orientations with a relaxation time close to τ_m . The PABA@FeNPs and 2*@PABA@FeNPs systems would show superparamagnetic features in the magnetization measurements at room temperature, however, their magnetic characteristics will be significantly driven by finite-size and surface effects (manifested, for example, by a smaller saturation magnetization or lack of saturation and reduced magnetic response under small applied magnetic fields).

3. Experimental

3.1. Materials and Methods

The starting materials K₂[PtCl₄], 3-chloro-7-azaindole (3Claza), 5-bromo-7-azaindole (5Braza), iron(III) chloride hexahydrate (FeCl₃·6H₂O), iron(II) chloride tetrahydrate (FeCl₂·4H₂O), *p*-aminobenzoic acid (PABA), 25% NH₄OH, silver nitrate (AgNO₃) and solvents were supplied by Sigma-Aldrich Co. (Prague, CzechRepublic) and Acros Organics Co. (Pardubice, CzechRepublic), and used as received. The platinum(II) complexes *cis*-[PtCl₂(3Claza)₂] (1) and *cis*-[PtCl₂(5Braza)₂] (2) (Figure 1a) were prepared as described in our recent paper [33].

Transmission electron microscopy (TEM) was carried out on a JEOL 2010 microscope (200 kV, 1.9 Å point-to-point resolution). A drop of high-purity water with the ultrasonically dispersed samples was placed onto a holey-carbon film supported by a copper-mesh TEM grid and dried in air at room temperature. Scanning electron microscopy (SEM) was performed, together with energy-dispersive X-ray (EDS) spectroscopy, by a Hitachi 6600 FEG microscope (5–15 keV accelerating voltage; the dried samples were placed on an aluminum holder equipped with double-sided adhesive carbon tape). The ⁵⁷Fe Mössbauer spectra of the studied samples were recorded at room temperature employing a Mössbauer spectrometer operating at the constant acceleration mode and equipped with a 50 mCi ⁵⁷Co(Rh) source. The isomer shift values are related to α -Fe at room temperature. The Mössbauer spectra were fitted with the MossWinn software program; prior to fitting, the signal-to-noise ratio was enhanced by a statistically based algorithm [46]. Infrared spectra (400–4000 cm⁻¹ and 150–600 cm⁻¹ regions) were recorded on a Nexus 670 FT-IR (Thermo Nicolet, Waltham, MA, USA) using the ATR technique. Simultaneous thermogravimetric (TG) and differential thermal (DTA) analyses were performed using an Exstar TG/DTA 6200 thermal analyzer (Seiko Instruments Inc., Chiba, Japan) from room temperature to 650 °C (5.0 °C min⁻¹) in dynamic air atmosphere (50 mL min⁻¹).

3.2. PABA@FeNPs Nanoparticles

4-Aminobenzoic acid (PABA; 0.62 g, 4.5 mmol) was, due to its poor solubility at laboratory temperature, dissolved in hot (80 °C) deionized water (75 mL) and then, FeCl₃·6H₂O (1.17 g; 4.3 mmol) dissolved in deionized water (5 mL) was added. The mixture was stirred at 80 °C for 30 min and then FeCl₂·4H₂O (0.86 g; 4.3 mmol) dissolved in deionized water (2 mL) was added to the solution. After 30 min of stirring at 80 °C the last reagent (10 mL of 25% NH₄OH) was slowly added. The solution turned dark black as the PABA@FeNPs formed. The suspension was intensively stirred at 80 °C for 60 min. Finally, nanoparticles were magnetically isolated and washed with deionized water (3 × 20 mL) and acetone (3 × 20 mL). Part of the final ferrofluid suspension of PABA@FeNPs (Figure 1c) was stored under degassed acetone in the fridge, while the rest of the product was dried with nitrogen gas and in desiccator over silica gel, and stored in the fridge. PABA@FeNPs: FTIR (ν_{ATR}/cm⁻¹): 552vs, 783w, 1,179m, 1,395vs, 1,493m, 1,603s, 3,219s, 3,334s.

3.3. Synthesis of 1*@PABA@FeNPs and 2*@PABA@FeNPs

The complexes **1** (110 mg; 0.2 mmol) and **2** (130 mg; 0.2 mmol) were dissolved in acetone (10 mL) and two molar equivalents of AgNO₃ dissolved in a minimum volume of deionized water were added. The mixture was stirred at laboratory temperature in the dark for 24 h. After that, AgCl was removed by filtration and washed with acetone (3 × 1 mL) to produce the filtrate containing the solution of the dechlorinated complexes of the composition *cis*-[Pt(H₂O)₂(3Claza)₂]²⁺ (**1***), and *cis*-[Pt(H₂O)₂(5Braza)₂]²⁺ (**2***) (Figure 1a). PABA@FeNPs (0.5 mL of the acetone suspension involving 100 mg of PABA@FeNPs) was poured in and the mixture was stirred for 48 h to produce the final systems **1*@PABA@FeNPs** and **2*@PABA@FeNPs** (Figures 1b,c). These products were magnetically isolated, washed with acetone (3 × 20 mL), dried (nitrogen and then in desiccator over silica gel) and stored in the fridge. **1*@PABA@FeNPs**: FTIR (ν_{ATR}/cm⁻¹): 550vs, 785w, 1,018m, 1,099w, 1,179m, 1,208m, 1,277s, 1,338s, 1,398vs, 1,516m, 1,602s, 1,694w, 2,906s, 3,107s. **2*@PABA@FeNPs**: FTIR (ν_{ATR}/cm⁻¹): 547vs, 700w, 883w, 946w, 1,017w, 1,101w, 1,177m, 1,267vs, 1,341s, 1,400vs, 1,473s, 1,500s, 1,603m, 1,646s, 1,694w, 3,082s. For far-FTIR spectra of **2**, **2***, PABA@FeNPs and **2*@PABA@FeNPs** see Supplementary Materials.

4. Conclusions

A simple approach was applied to obtain magnetic 4-aminobenzoic acid-coated maghemite nanoparticles with good stability in solution, with high magnetic response to the external magnetic field and showing superparamagnetic behaviour as proved by the Mössbauer spectroscopy experiments at room temperature. The systems were designed to be able to bind highly cytotoxic platinum(II) complexes involving 7-azaindole derivatives represented by the diaquaplatinum(II) species **1*** and **2*** prepared by a Ag(I) ion-assisted activation from the initial highly cytotoxic dichlorido complexes. The incorporation of the platinum(II) species was proved by relevant techniques (FTIR, EDS), while a combination of the microscopic techniques (SEM, TEM) showed the obtained core-shell nanocomposites as having the spherical shape and an average size of 13 nm in diameter. Although we are aware of the fact that other important properties of the reported systems (e.g., release of the

complex, *in vitro* cytotoxicity, *in vitro* toxicity or MRI experiments), should by also elucidated (the results will be a subject of our forthcoming studies), we have reason to believe that the prepared systems fulfil the basic requirements (magnetism, size, dispersibility or functionalization with therapeutically active substance) for the nanoparticles used in the field of theranostic nanomedicine.

Supplementary Materials

Supplementary materials can be accessed at: <http://www.mdpi.com/19/2/1622/s1>.

Acknowledgments

The authors gratefully thank the Czech Science Foundation (GAČRP207/11/0841), Operational Program Research and Development for Innovations-European Regional Development Fund (CZ.1.05/2.1.00/03.0058), Operational Program Education for Competitiveness-European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/20.0017) of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and Palacký University in Olomouc (PrF_2013_015). The authors would like to thank Jana Gáliková and Klára Šafářová for performing FTIR, and TEM and SEM experiments, respectively.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PŠ, ZT. Performed the experiments: MS, PŠ, JT. Analyzed the data: PŠ, JT, ZT. Wrote the paper: PŠ, JT, ZT.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 573–584.
2. Butler, J.S.; Sadler, P.J. Targeted delivery of platinum-based anticancer complexes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 175–188.
3. Zhang, Y.; Chan, H.F.; Leong, K.W. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 104–120.
4. Goncalves, A.S.; Macedo, A.S.; Souto, E.B. Therapeutic nanosystems for oncology nanomedicine. *Clin. Transl. Oncol.* **2012**, *14*, 883–890.
5. Chomoucka, J.; Drbohlavova, J.; Huska, D.; Adam, V.; Kizek, R.; Hubalek, J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacol. Res.* **2010**, *62*, 144–149.
6. Kievit, F.M.; Zhang, M. Surface Engineering of iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 853–862.
7. Gupta, A.K.; Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021.

8. Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Elst, L.V.; Muller, R.N. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
9. Kelkar, S.S.; Reineke, T.M. Theranostics: Combining Imaging and Therapy. *Bioconjugate. Chem.* **2011**, *22*, 1879–1903.
10. Wang, N.; Guan, Y.; Yang, L.; Jia, L.; Wei, X.; Liu, H.; Guo, G. Magnetic nanoparticles (MNPs) covalently coated by PEO–PPO–PEO block copolymer for drug delivery. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *395*, 50–57.
11. Nowicka, A.M.; Kowalczyk, A.; Jarzebinska, A.; Donten, M.; Krysinski, P.; Stojek, Z. Progress in targeting tumor cells by using drug-magnetic nanoparticles conjugate. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 828–833.
12. Karsten, S.; Nan, A.; Turcu, R.; Liebscher, J. A new access to polypyrrole-based functionalized magnetic core-shell nanoparticles. *J. Polym. Sci. Part. A Polym. Chem.* **2012**, *50*, 3986–3995.
13. Fan, C.H.; Ting, C.Y.; Lin, H.J.; Wang, C.H.; Liu, H.L.; Yen, T.C.; Yeh, C.K. SPIO-conjugated, doxorubicin-loaded microbubbles for concurrent MRI and focused-ultrasound enhanced brain-tumor drug delivery. *Biomaterials* **2013**, *34*, 3706–3715.
14. Gautiera, J.; Munniera, E.; Paillard, A.; Hervéa, K.; Douziech-Eyrollesa, L.; Soucé, M.; Dubois, P.; Chourpa, I. A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423*, 16–25.
15. Kim, J.E.; Shin, J.Y.; Cho, M.H. Magnetic nanoparticles: An update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 685–700.
16. Qi, L.; Wu, L.; Zheng, S.; Wang, Y.; Fu, H.; Cui, D. Cell-Penetrating Magnetic Nanoparticles for Highly Efficient Delivery and Intracellular Imaging of siRNA. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2723–2730.
17. Huang, P.; Li, Z.; Lin, J.; Yang, D.; Gao, G.; Xu, C.; Bao, L.; Zhang, C.; Wang, K.; Song, H.; *et al.* Photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles for *in vivo* simultaneous magnetofluorescent imaging and targeting therapy. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3447–3458.
18. Pan, B.; Cui, D.; Sheng, Y.; Ozkan C.; Gao, F.; He, R.; Li, Q.; Xu, P.; Huang, T. Dendrimer-modified magnetic nanoparticles enhance efficiency of gene delivery system. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8156–8163.
19. Knezevic, N.Z.; Ruiz-Hernandez, E.; Hennink, W.E.; Vallet-Regi, M. Magnetic mesoporous silica-based core/shell nanoparticles for biomedical applications. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 9584–9593.
20. Wang, J.; Wang, X.; Song, Y.; Wang, J.; Zhang, C.; Chang, C.; Yan, J.; Qiu, L.; Wua, M.; Guo, Z. A platinum anticancer theranostic agent with magnetic targeting potential derived from maghemite nanoparticles. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2605–2612.
21. Wang, J.; Wang, X.; Song, Y.; Zhu, C.; Wang, J.; Wang, K.; Guo, Z. Detecting and delivering platinum anticancer drugs using fluorescent maghemite nanoparticles. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2786–2788.
22. Deng, H.; Lei, Z. Preparation and characterization of hollow Fe₃O₄/SiO₂@PEG–PLA nanoparticles for drug delivery. *Composites Part. B* **2013**, *54*, 194–199.
23. Devi, S.V.; Prakash, T. Kinetics of cisplatin release by in-vitro using poly(D,L-Lactide) coated Fe₃O₄ nanocarriers. *IEEE Trans. Nanobiosci.* **2013**, *12*, 60–63.

24. Ashjari, M.; Khoee, S.; Mahdavian, A.R. Controlling the morphology and surface property of magnetic/cisplatin-loaded nanocapsules via W/O/W double emulsion method. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2012**, *408*, 87–96.
25. Xie, M.; Xu, Y.; Liu, J.; Zhang, T.; Zhang, H. Preparation and characterization of Folate targeting magnetic nanomedicine loaded with cisplatin. *J. Nanomater.* **2012**, *2012*, 921034.
26. Arias, J.L.; Reddy, L.H.; Othman, M.; Gillet, B.; Desmaele, D.; Zouhiri, F.; Dosio, F.; Gref, R.; Couvreur, P. Squalene based nanocomposites: A new platform for the design of multifunctional pharmaceutical theragnostics. *ACS Nano.* **2011**, *5*, 1513–1521.
27. Xing, R.; Wang, X.; Zhang, C.; Wang, J.; Zhang, Y.; Song, Y.; Guo, Z. Superparamagnetic magnetite nanocrystal clusters as potential magnetic carriers for the delivery of platinum anticancer drugs. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 11142–11149.
28. Sonoda, A.; Nitta, N.; Nitta-Seko, A.; Ohta, S.; Takamatsu, S.; Ikehata, Y.; Nagano, I.; Jo, J.; Tabata, Y.; Takahashi, M.; *et al.* Complex comprised of dextran magnetite and conjugated cisplatin exhibiting selective hyperthermic and controlled-release potential. *Int. J. Nanomed.* **2010**, *5*, 499–504.
29. Yang, J.; Lee, H.; Hyung, W.; Park, S.B.; Haam, S. Magnetic PECA nanoparticles as drug carriers for targeted delivery: Synthesis and release characteristics. *J. Microencapsul.* **2006**, *23*, 203–212.
30. Li, K.; Chen, B.; Xu, L.; Feng, J.; Xia, G.; Cheng, J.; Wang, J.; Gao, F.; Wang, X. Reversal of multidrug resistance by cisplatin-loaded magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in A549/DDP lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 1867–1877.
31. Zhang, Z.; Chai, A. Core-shell magnetite-silica composite nanoparticles enhancing DNA damage induced by a photoactive platinum-diimine complex in red light. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *117*, 71–76.
32. Štarha, P.; Marek, J.; Trávníček, Z. Cisplatin and oxaliplatin derivatives involving 7-azaindole: Structural characterisations. *Polyhedron* **2012**, *33*, 104–409.
33. Štarha, P.; Trávníček, Z.; Popa, A.; Popa, I.; Muchová, T.; Brabec, V. How to modify 7-azaindole to form cytotoxic Pt(II) complexes: Highly *in vitro* anticancer effective cisplatin derivatives involving halogeno-substituted 7-azaindole. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *105*, 57–63.
34. Muchová, T.; Prachařová, J.; Štarha, P.; Olivová, R.; Vrána, O.; Benešová, B.; Kašpárková, J.; Trávníček, Z.; Brabec, V. Insight into the toxic effects of cis-dichloridoplatinum(II) complexes containing 7-azaindole halogeno derivatives in tumor cells. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2013**, *18*, 579–589.
35. Maity, D.; Zoppellaro, G.; Sedenkova, V.; Tucek, J.; Safarova, K.; Polakova, K.; Tomankova, K.; Diwoky, C.; Stollberger, R.; Machala, L.; *et al.* Surface design of core-shell superparamagnetic iron oxide nanoparticles drives record relaxivity values in functional MRI contrast agents. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11398–11400.
36. Hamoudeh, M.; Al Faraj, A.; Canet-Soulas, E.; Bessueille, F.; Leonard, D.; Fessi, H. Pharmaceutical nanotechnology elaboration of PLLA-based superparamagnetic nanoparticles: Characterization, magnetic behaviour study and *in vitro* relaxivity evaluation. *Int. J. Pharm.* **2007**, *338*, 248–257.
37. Dorniani, D.; Bin Hussein, M.Z.; Kura, A.U.; Fakurazi, S.; Shaari, A.H.; Ahmad, Z. Preparation of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coated with gallic acid for drug delivery. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 5745–5756.

38. Cafaggi, S.; Esposito, M.; Parodi, B.; Viale, M. A water-soluble 1,2-diaminocyclohexaneplatinum(II) complex containing procaine hydrochloride: Synthesis and antiproliferative activity *in vitro*. *Pharmazie* **1994**, *49*, 617–618.
39. Kukushkin, Y.N.; Blyumental, T.O.; Konovalov, L.V. Complex compounds of platinum(II) with p- and m-aminobenzoic acids. *Zh. Obshch. Khim.* **1979**, *49*, 1376–1379.
40. Rudyi, R.I.; Solomentseva, A.I.; Cherkashina, N.V.; Evstafeva, O.N.; Salyn, Y.V.; Moiseev, I.I. Complexes of platinum(II) and platinum(IV) with aromatic amines. *Koord. Khim.* **1976**, *2*, 499–506.
41. Davies, G.R.; Hewertson, W.; Mais, R.H.B.; Owston, P.G.; Patel, C.G. π -Complexes of platinum (II) with unsaturated hydrocarbons. Part II. Crystal and molecular structure of *trans*-dichloro-(π -di-*t*-butylacetyl-ene)-*p*-toluidineplatinum (II). *J. Chem. Soc. A* **1970**, 1873–1877.
42. Rochon, F.D.; Bonnier, C. Study of Pt(II)-aromatic amines complexes of the types *cis*- and *trans*-Pt(amine)₂I₂, [Pt(amine)₄]I₂ and I(amine)Pt(μ -I)₂Pt(amine)I. *Inorg. Chim. Acta* **2007**, *360*, 461–472.
43. Karthikeyan, B. Density functional calculations on the structure, vibrational frequencies and normal modes of 7-Azaindole. *Spectrochim. Acta* **2006**, *A64*, 1083–1087.
44. Ye, X.; Lin, D.; Jiao, Z.; Zhang, L. The thermal stability of nanocrystalline maghemite Fe₂O₃. *J. Phys. D-Appl. Phys.* **1998**, *31*, 2739–2744.
45. Cornell, R.M.; Schwertmann, U. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*; Wiley-VCH Publishers: Weinheim, Germany, 2003.
46. Prochazka, R.; Tucek, P.; Tucek, J.; Marek, J.; Mashlan, M.; Pechousek, J. Statistical analysis and digital processing of the Mössbauer spectra. *Meas. Sci. Technol.* **2010**, *21*, 025107.

Sample Availability: Samples of the compounds **1**, **2**, **1***, **2***, PABA@FeNPs, **1***PABA@FeNPs and **2***PABA@FeNPs are available from the authors.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).