

1949

Intelligens MRI kontrasztanyagok: szintézis és kémiai jellemzés

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Botár Richárd

témavezető: Dr. Kálmán Ferenc Krisztián

DEBRECENI EGYETEM Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Kémiai Tudományok Doktori Iskola Debrecen, 2023. Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Kémiai Tudományok Doktori Iskola K/2 programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2023.....

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Botár Richárd doktorjelölt 2017- 2021. között a fent megnevezett Doktori Iskola K/2 programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javaslom. Debrecen, 2023.....

a témavezető aláírása

Intelligens MRI kontrasztanyagok: szintézis és kémiai jellemzés

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében a kémia tudományágban

Írta: Botár Richárd okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémiai Tudományok Doktori Iskolája (K/2 programja) keretében

Témavezető: Dr. Kálmán Ferenc Krisztián

Az értekezés bírálói:

Dr	
Dr	

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr	
tagok:	Dr	
	Dr	
	Dr	
	Dr	

Az értekezés védésének időpontja: 2023.

I.	Bevezetés	1
II.	Irodalmi áttekintés	6
Ι	I.1. Képalkotó eljárások	6
Ι	I.2. Az MRI megjelenése	6
Ι	I.3. MRI kontrasztanyagok	7
	II.3.1. Paramágneses kontrasztanyagok	8
	II.3.2. A paramágneses komplexek relaxivitása	.10
	II.3.3. A Gd ³⁺ -ion alkalmazásának hátrányai	.11
Ι	I.4. Intelligens kontrasztanyagok	.12
	II.4.1. pH-érzékeny komplexek	.14
	II.4.2. Ionszenzor-komplexek	.19
	II.4.2.1. Ca ²⁺ -szenzor komplexek	.21
	II.4.2.2. Zn ²⁺ -szenzor komplexek	.24
Ι	I.5. A lantanoidák koordinációs kémiája és makrociklusos komplexeik.	.27
	II.5.1. A lantanoida-komplexek termodinamikai stabilitása	.28
	II.5.2. A lantanoida-komplexek inertsége	.30
Ι	I.6. Mn ²⁺ -koordinációs kémiája és makrociklusos komplexei	.32
	II.6.1. Mn ²⁺ -komplexek termodinamikai stabilitása	.32
	II.6.2. Mn ²⁺ -komplexek inertsége	.35
III	. Célkitűzések	.37
IV	. Alkalmazott vizsgálati módszerek, kísérleti körülmények	.39
Ι	V.1. Szintetikus munka	.39
	IV.1.1. A PC2A-NP ligandum előállítása	.40
Ι	V.2. Egyensúlyi vizsgálatok	.43
	IV.2.1. pH-potenciometria	.43
	IV.2.2. ¹ H-relaxometria	.45
	IV.2.3. UV-látható spektrofotometria	.46

Tartalomjegyzék

IV.2.4. ¹ H-NMR	.47
IV.3. ¹ H-relaxometria, <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> vizsgálatok	48
IV.3.1. ¹⁷ O-NMR spektroszkópia	50
IV.4. Kinetikai vizsgálatok	51
IV.4.1. UV-látható spektrofotometria	.51
IV.4.2. ¹ H-relaxometria	.52
V. Eredmények és értelmezésük	54
V.1. A ligandumok előállításainak ismertetése	54
V.1.1. A pH-szenzornak szánt ligandumok előállítása	.54
V.1.1.1. A PC2A-EA ligandum szintézise	.54
V.1.1.2. A PC2A-NP ligandum szintézise	.55
V.1.2. A Zn ²⁺ -szenzornak szánt ligandumok előállítása	.56
V.1.2.1. A PC2A-DPA ligandum szintézise	.56
V.2. Gd ³⁺ -ion alapú, Ca ²⁺ -szenzitív MRI kontrasztanyag-jelölt modellvegyületei vizsgálata	58
V.2.1. A DO3A-EAMA és a DO3A-PAMA ligandumok és komplexei egyensúlyi vizsgálata	ik 58
V.2.2. A [Gd(DO3A-EAMA)]- és [Gd(DO3A-PAMA)]-komplexek relaxációs paramétereinek vizsgálata	63
V.2.3. A [Gd(DO3A-EAMA)]- és [Gd(DO3A-PAMA)]-komplexek kinetikai inertségének vizsgálata	66
V.2.4. A fejezet rövid összefoglalása	.69
V.3. Mn ²⁺ -ion alapú, intelligens kontrasztanyagnak szánt ligandumok és komplexeik vizsgálata	71
V.3.1. Intelligens pH-szenzorok	.71
V.3.1.1. A pH-szenzornak szánt ligandumok és komplexeik egyensúlyi vizsgálata	71
V.3.1.2. A [Mn(PC2A-EA)]- és [Mn(PC2A-NP)]-komplexek relaxációs paramétereinek vizsgálata	79

	V.3.1.3. A [Mn(PC2A-EA)]- és [Mn(PC2A-NP)]-komplexek kinetik vizsgálata	ai 89
	V.3.1.4. A fejezet rövid összefoglalása	94
	V.3.2. Intelligens Zn ²⁺ -szenzor	95
	V.3.2.1. A PC2A-DPA ligandum és komplexeinek egyensúlyi vizsgálata	95
	V.3.2.2. A [Mn(PC2A-DPA)]-komplex relaxációs paramétereinek vizsgálata1	02
	V.3.2.3. A [Mn(PC2A-DPA)]-komplex kinetikai vizsgálata1	09
	V.3.2.4. In vitro (fantom) és in vivo egér kísérletek1	10
	V.3.2.5. A fejezet rövid összefoglalása1	14
VI.	Összefoglalás1	15
VII.	Summary1	19
VIII.	. Köszönetnyilvánítás1	23
IX.	Hivatkozások1	24
X.	Függelék1	37
Х.	1.1. ¹⁷ O-NMR mérésekre vonatkozó egyenletek1	37
X. set	1.2. A komplexek disszociációját jellemző lehetséges útvonalak és a bességi állandók számításakor használt általános egyenlet1	39

A dolgozatban használt rövidítések és szerkezeti képletek jegyzéke

ACN	acetonitril
CA	kontrasztanyag
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill szekvencia
СТ	komputertomográfia
DMP	1,4-dimetil-piperazin
DPA	dipikolil-amin
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
GBCA	gadolínium alapú kontrasztanyag
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav
HPLC	nagyteljesítményű vagy nagynyomású folyadékkromatográfia
HSA	humán szérumalbumin
LD50	medián halálos dózis
Ln	lantanoidák
MES	2-(N-morfolino)etánszulfonsav
MRI	mágneses rezonanciás képalkotás
NMP	1-metil-piperazin
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
NSF	nefrogén szisztémás fibrózis
PDA	fotódiódasoros detektor
РЕТ	pozitronemissziós tomográfia
q	hidratációs fok
Seronorm	liofilizált vérszérum
T ₁	longitudinális relaxációs idő
T ₂	transzverzális relaxációs idő
t 1/2	biológiai felezési idő
TFA	trifluor-ecetsav
TRIS	trisz-(hidroximetil)-amino-metán
UH	ultrahang
VRK	vékonyréteg kromatográfia
DMF	dimetilformamid







PyC3A-BPEN

I. Bevezetés

Napjaink orvoslása már-már elképzelhetetlen lenne olyan képalkotó diagnosztikai eszközök nélkül, amelyek segítségével fel tudunk állítani diagnózisokat nem-invazív vizsgálatokat követően, megelőzve számos felesleges beavatkozást, továbbá időben és pontosan tudunk diagnosztizálni különböző súlyos kimenetelű betegségeket (pl. daganatok). A tudomány fejlettségét mutatja, hogy számos ilyen technika áll már rendelkezésünkre, mint például a mágneses rezonanciás képalkotás (MRI) is, amely módszer elterjedtségét nagy felbontóképességének köszönheti.

A megfelelő felbontású kép elkészítéséhez a vizsgálatok jelentős részében kontrasztanyagok alkalmazása szükséges, ezek többnyire különböző ligandumok paramágneses fémionokkal alkotott komplexeit jelentik (leginkább Gd³⁺-ion; GBCAs – Gadolinium Based Contrast Agents).¹ Bár a Gd³⁺-ion f⁷ elektronjainak köszönhetően paramágneses tulajdonsággal bír, a szervezet idegen volta miatt az utóbbi években aggályok merültek fel használatával kapcsolatban. A 2000-es évek elején diagnosztizálták a nefrogén szisztémás fibrózis (NSF) nevű betegséget, amit a kontrasztos vizsgálatok során a szervezetben felszabadult szabad Gd³⁺-ion toxikus hatásának tulajdonítanak.² Az NSF ugyan csak nyíltláncú kontrasztanyagokkal vizsgált, csökkent vesefunkcióval rendelkező páciensek esetén volt jelentős, de felhívta a figyelmet arra, hogy érdemes fenntartásokkal kezelni a Gd³⁺-alapú kontrasztanyagok alkalmazását.

Mindezen túl, további probléma a GBCA-k tekintetében, hogy a kontrasztos MR vizsgálatok éves szinten tonnás nagyságrendű gadolínium igénnyel rendelkeznek, amelyek a vizsgálatot követően előbb-utóbb a szennyvizekbe kerülnek. A nehézfém koncentrációjának növekedését

1

(különösen a diagnosztikai központokból távozó vizekben) pozitív gadolínium anomáliaként ismerik.³ Manapság ezt még nem sorolják a megoldandó problémák körébe, de az egyre inkább teret hódító zöld kémia jegyében a későbbiekben biztosan foglalkozni kell majd a kérdéssel.

Talán az egyik olyan probléma (bár szemmel látható tünetei nincsenek), ami az MR vizsgálaton átesett betegek legnagyobb részét érint az az, hogy a kontrasztanyag (vagy a Gd³⁺-ion) a vizsgálatok során képes dúsulni egyes szövetekben – köztük a gyakran vizsgált agyban és csontokban is.⁴ Sorozatos vizsgálatok esetén ez a jelenség a kapott kép intenzitásának romlásához vezet, hiszen a háttér intenzitásának növekedését okozza, így a későbbi vizsgálatok során (ez körülbelül félévenkénti gyakoriságot jelent egy beteg esetében) a kontrasztanyagot egyre nagyobb dózisban kell alkalmazni a megfelelően kontrasztosság eléréséhez.

Ezen problémák hatására 2017-ben az Európai Gyógyszerügynökség javaslatot tett (EMA/424715/2017) a nyílt láncú GBCA-k közül a Magnevist és az Omniscan kivonására, a Multihance esetén pedig annak korlátozott alkalmazására. Már ezt megelőzően, az MRI kontrasztanyagok alkalmazása körül kialakult bizonytalanság miatt, megnőtt biztonságosabb a kontrasztanyagok iránti igény, ami természetesen a kutatás fellendülését is eredményezte. A kontrasztanyagok biztonságosabb felhasználásáért, ha csak az inertség kérdését tekintjük, alapvetően két dolgot tehetünk. Az egyik, hogy növeljük a Gd³⁺-tartalmú komplexek inertségét, hogy időt biztosítsunk azok teljes kiürülésére, a másik, hogy lecseréljük a Gd³⁺-at a szervezet számára jobban tolerálható paramágneses fémionra (pl. Mn²⁺ vagy Fe³⁺).

Számos tanulmány/értekezés/publikáció bizonyítja, hogy ezek a feladatok nem is olyan egyszerűek, mint ahogy azt az előző bekezdésben összefoglaltuk. Általában egy ligandum szerkezeti módosítása révén az egyik paraméterben elért javulás egy másik paraméter (gyakran) jelentős romlását idézheti elő. Továbbá az is elmondható, hogy eltérő koordinációs kémiai tulajdonságaik miatt egy komplexben a Gd³⁺-ion cseréje például Mn²⁺-ionra nem eredményezi automatikusan annak alkalmazhatóságát MRI kontrasztanyagként.

A szervezet egyes biológiai folyamatai előjelezhetik egy betegség korai stádiumát még az anatómiai elváltozás megjelenése előtt.^{5,6} A korai diagnózis felállítása érdekében igény mutatkozik olyan intelligens kontrasztanyagok fejlesztésére, ahol ezeket a folyamatokat monitorozni Az ilyen vizsgálatok esetében mindig alkalmaznunk tudjuk. kell kontrasztanyagot, ami érzékeny egy adott paraméter változására (például anion/kation koncentráció-, pH-változás). Az 1. ábrán egy hidratációs szám változáson alapuló intelligens kontrasztanyag működési elvét mutatjuk be. Ahogy látható, a vizsgálni kívánt paraméter változásával az oldallánc, vagy az adott molekularészlet donoratomja(i) (zöld körrel jelölt részlet) koordinálódik a központi fémionhoz, ezzel kiszorítva egy belső szférás vízmolekulát (pirossal jelölt részlet), így befolyásolva a komplex relaxivitását (q = n és q = (n-1)közötti változás). Természetesen a relaxivitás változhat a komplex rotációs dinamikájának befolyásolásával is, ahol a belső szférában található vízmolekulák száma változatlan marad, ahogy a dolgozatban erre példát is fogunk látni.



1. Ábra. Intelligens kontrasztanyag lehetséges működési sémája

A Ca²⁺-ion fontos szerepet tölt be a szervezetben, jelen van többek között az agyban, amikor neurotranszmitterek szabadulnak fel idegsejtekből. Angelovski és munkatársai vizsgálták több, szimmetrikus Ca²⁺-ion jelenlétére szelektív Gd³⁺-ion tartalmú komplex relaxációs tulajdonságait, ahol a Ca²⁺-ionra érzékeny egységként EGTA-típusú molekularészletet alkalmaztak.⁷ Ez a molekula hídként köt össze két makrociklusos egységet, amelyek felelősek a Gd³⁺-ionnal való kölcsönhatásért.

Ahhoz, hogy biokompatibilis kontrasztanyagokat fejlesszünk, az adott ligandum esetében nem elegendő csupán a fémion cseréje, hiszen ezek a fémionok a Gd³⁺-ionhoz képest merőben eltérő koordinációs kémiai tulajdonságokkal rendelkezhetnek. Ezért célszerű először is megválasztani az alkalmazni kívánt központi fémet, majd úgy tervezni és előállítani a ligandumokat, hogy a kialakuló komplex tulajdonságai megfeleljenek a kontrasztanyagokkal szemben felállított követelményeknek. Kutatócsoportunk hosszú évek óta tanulmányozza a Mn²⁺-ion koordinációs kémiáját e tekintetben.^{8–11} Minden eredmény arra mutat, hogy a Mn²⁺-ion jól használható biokompatibilis kontrasztanyagok fejlesztésére. Ezekre az eredményekre alapozva dolgoztunk azzal a céllal, hogy Mn²⁺-alapú intelligens kontrasztanyagokat állítsunk elő.

Csoportunk ezen a téren szerzett jelentős kutatási tapasztalatára támaszkodva egy olyan alapvázat kerestünk, amelynek Mn²⁺-komplexe a jó termodinamikai, kinetikai és relaxációs paraméterei mellett még rendelkezik az alapvázon egy szabad, szubsztituálható atommal, amelyet módosítva alakíthatjuk ki az intelligens viselkedésért felelős funkciót. A választás a 3,9-PC2A ligandumra esett, ugyanis amellett, hogy Mn²⁺-komplexének paraméterei bíztatóak az *in vivo* alkalmazás tekintetében (log*K*_{MnL} = 17,09; $r_{1p} = 2,91$ mM⁻¹s⁻¹ [25,0 °C; 0,49 T; pH = 7,4]; $t_{1/2} = 21,0$ óra [pH = 7,4; c_{Mn2+} = 0,01 mM]) a piridin-helyzetű N-atommal szembeni, *transz*-helyzetű N-atom alkalmas különböző oldalláncok kapcsolására.¹²

A szervezet pH-ja elég jól meghatározott egyes sejtekben és szövetekben, így azok akár kismértékű változása is nagy gondot tud okozni, illetve jól előrevetíti különböző kórképek kialakulását.

A prosztatarák az 50 év feletti férfiak körében a rákos megbetegedések csaknem 10 %-át teszi ki. Gyakran teljesen tünetmentes, lappangó állapotban kezdi pusztítani a szervezetet, sok esetben a diagnózist csak az anatómiai elváltozás után tudják felállítani. Az egészséges és beteg prosztata Zn²⁺-kiválasztása merőben különbözik egymástól, rákos elváltozás esetén annak koncentrációja drasztikusan, akár ötödére csökken.¹³ Nyomon követve ezt a koncentrációváltozást lehetőség nyílhat korai diagnózis felállítására.

II. Irodalmi áttekintés

II.1. Képalkotó eljárások

A modern orvostudomány egyik legdinamikusabban fejlődő területe a képalkotó diagnosztika, amelynek feladata, hogy nem invazív módon információt szolgáltasson a szervezetben zajló folyamatokról, elváltozásokról. Egészen a röntgensugárzás diagnosztikai célú alkalmazásáig¹⁴ az ilven információk begyűjtése csak és kizárólag sebészeti beavatkozások útján volt lehetséges, legtöbb esetben a beteg halála után. Nem is csoda, hogy számtalan kutatás vette kezdetét e tárgykörben, amelyeknek köszönhetően ma olyan széleskörűen használt technológiáknak vagyunk birtokában, mint az ultrahang (UH),¹⁵ a komputertomográfia (CT),¹⁶ a pozitron emissziós tomográfia (PET),¹⁷ a mágneses rezonanciás képalkotás (MRI) és még folytathatnánk a sort. Az említett technikák egy részénél a kontrasztanyagok alkalmazása elkerülhetetlen (pl. PET), míg más esetben azért alkalmaznak segédanyagokat, hogy csökkentsék a vizsgálat időtartamát és/vagy (ahogy nevéből is adódik) növeljék a kapott kép kontrasztosságát. Ezek a kontrasztanyagok az alkalmazott technika függvényében változnak (fémkomplexek, radioaktív készítmények, nehézatomot tartalmazó készítmények).

II.2. Az MRI megjelenése

Napjaink egyik legnagyobb jelentőséggel bíró képalkotói eljárása a már említett MRI, amelynek elvi alapjait Lauterbur és munkatársai¹⁸ fektették le az 1970-es években.¹⁹

6

A módszer széleskörű elterjedését nagy felbontóképességének köszönheti. Az egészséges és a kórosan elváltozott szövetek víztartalma és a vízprotonok relaxációs tulajdonságai eltérnek, lehetővé téve a módszer alkalmazását a gyakorlatban. Az MRI vizsgálatok 40%-ában azonban szükséges ún. kontrasztanyagok alkalmazása, amelyek csökkentik a vizsgálat időtartamát (csökkentve a vízprotonok T_1 vagy T_2 relaxációs idejét) és ezzel párhuzamosan növelik a kép kontrasztosságát, ezzel segítve a radiológus munkáját a pontos diagnózis felállításában.²⁰

II.3. MRI kontrasztanyagok

A vizsgálatok során alkalmazott szekvencia az esetek döntő többségében a spin-echo, ahol a jelintenzitást (SI) az alábbi egyenlettel írhatjuk le:

$$SI=N(H)\left[1-e^{-\frac{TR}{T_{l}}}\right]e^{-\frac{TE}{T_{2}}}$$
(1)

amelyben az N(H) a protonspinsűrűség egységi térfogatra vetítve, TE az echo késleltetési idő, a TR az ismétlési idő. Az egyenletből az következik, hogy a jel intenzitása növekedni fog a T_1 relaxációs idő csökkenésével (T_1 -CA), ellenben csökken, ha a T2 relaxációs idő csökken (T2-CA). Az intravénásan alkalmazott kontrasztanyagok esetén további három csoportosítási lehetőséget tárgyalhatunk: (1) extracelluláris térben dúsuló, (2) ún. "blood-pool", véráramban tartózkodó. illetve (3) célzott/szerv-specifikus kontrasztanyagokról beszélhetünk.¹

Ahhoz, hogy egy anyag alkalmazható legyen kontrasztanyagként, számos paraméternek meg kell felelnie. Ezek között található a komplex nagy

termodinamikai stabilitása, annak inertsége, a kis ozmotikus koncentráció (a töltéssel rendelkező kontrasztanyagok intravénás bejuttatásakor fellépő fájdalom kiküszöbölése végett) és persze a minimális dózis melletti maximális kontrasztnövelő hatás. A kontrasztnövelő hatás kvantifikálását a relaxivitással tudjuk kézzelfoghatóvá tenni, ami definíció szerint a paramágneses anyag 1 mM-oldatának relaxációsebesség növelő hatása a diamágneses közegben mérthez képest (r_{1p} (mM⁻¹s⁻¹); r_{2p} (mM⁻¹s⁻¹)).²¹

II.3.1. Paramágneses kontrasztanyagok

A paramágneses fémionok között a 7 párosítatlan elektronnal rendelkező Gd^{3+} -ion (f^7) és az 5 párosítatlan elektronnal rendelkező Mn^{2+} -ion (d^5) a legjobb jelölt kontrasztanyagként történő alkalmazásra. Szabad, ionos formában egyik sem alkalmazható, mivel LD_{50} értékük 0,1 - 0,3 mmol/ttkg körül van²² és a Gd^{3+} -ion képes a szervezetben akkumulálódni. Az előzőleg említett tulajdonságaikból is következik, hogy mindkét fémion csak nagy termodinamikai stabilitású és inertségű komplex formájában alkalmazható. Ahogy a következő bekezdésben is látható lesz, a mai klinikai gyakorlatban a gadolínium-alapú kontrasztanyagok (GBCA-k) uralják a piacot.^{1,23}

Az alkalmazott GBCA-k minden esetben valamilyen 8 donoratomot tartalmazó poliamino-polikarboxilát ligandum gadolíniumionnal alkotott komplexei, ahol a fémion 9. koordinációs helyét egy "gyorsan" cserélődő vízmolekula tölti be. A kontrasztanyagok fejlesztése során fontos mérföldkőnek számító GBCA-k szerkezeteit a 2. ábrán mutatom be.^{24–31}



2. Ábra. Gyakorlatban is alkalmazott GBCA-k szerkezete

A legtöbb kontrasztanyag az extracelluláris térben egyenletesen oszlik el, ezek alkalmazott dózisa 0,1-0,3 mmol/ttkg intravénásan, és körülbelül 1,6 órás biológiai felezési idővel ($t_{1/2}$) a vesén keresztül ürülnek ki. Az injektált anyag mennyisége akár egy nagyságrenddel is csökkenthető, ha az szervspecifikusságot mutat, hiszen így az egy adott szövetben/szervben képes dúsulni. Az ilyen, kereskedelmi forgalomban kapható kontrasztanyagok szerkezetét a 3. ábrán mutatom be.^{30,32,33}



3. Ábra. A gyakorlatban alkalmazott szervspecifikus GBCA-k szerkezete

Az előbbiekben bemutatott fejlesztések mögött komoly üzletág áll, hiszen a vizsgálatok száma folyamatosan növekszik, ezzel párhuzamosan növekszik a generikumok előállítása is. A [Gd(DTPA)]^{2–} engedélyeztetése utáni 10 évben összesen 30 tonna gadolíniumnak megfelelő kontrasztanyagot adtak be a pácienseknek. Ez a szám manapság 50 tonna/év, pénzben kifejezve a GBCA-k piaca csaknem egy milliárd dolláros forgalommal rendelkezik évente.³⁴ Történtek próbálkozások más, nem Gd³⁺-ion alapú kontrasztanyagok forgalmazására és alkalmazására is, de mai napig a Gd³⁺-alapú anyagok a meghatározók.^{35–39}

II.3.2. A paramágneses komplexek relaxivitása

A vízprotonok relaxációsebessége $(1/T_{obs})$ egy paramágneses komplex jelenlétében két részből származtatható, egyfelől a komplex diamágneses $(1/T_{\rm d}),$ másfelől komplex paramágneses a $(1/T_{1p})$ hozzájárulásából tevődik össze, amelyet következő egyenlettel а jellemezhetünk:

$$\frac{1}{T_{1obs}} = \frac{1}{T_{1d}} + \frac{1}{T_{1p}} = \frac{1}{T_{1d}} + r_1[Gd]$$
(2)

ahol az r_1 a komplex (longitudinális) relaxivitása (hasonlóan vezethető le a transzverzális relaxivitás is).^{21,40}

Egy komplex relaxivitását számos tényező befolyásolja, amelyek közül a legfontosabbak a fémionhoz közvetlenül koordinálódó, azaz a belső szférás vízmolekulák száma (q),⁴¹ a komplex forgó mozgására jellemző rotációs korrelációs idő (τ_R), a fémion elektron-spin relaxációs ideje (τ_S) és a vízcseresebesség ($k_{ex} = 1/\tau_m$), ami a fémionhoz koordinálódó vízmolekulák átlagos tartózkodási idejét jellemző érték, valamint a fém-vízproton távolsága (r_{MH}). Az említett paraméterek leírására elsősorban a Swift-Connick elméletet ⁴² és a Freed-modelt szoktuk használni.^{43,44}

II.3.3. A Gd³⁺-ion alkalmazásának hátrányai

Annak ellenére, hogy a gadolínium-alapú kontrasztanyagok egyeduralkodóként vannak jelen a piacon, mégis megingott bennük a felhasználók bizalma. Talán ennek is köszönhető, hogy a kontrasztanyag kutatások más, biokompatibilis anyagok fejlesztése felé vették az irányt.

Egyrészt, 2006-ban kapcsolták össze a kontrasztos MRI-vizsgálatok során szervezetben felszabadult Gd³⁺-ion toxikus hatását a nefrogén szisztémás fibrózis (NSF) nevű betegséggel, amelyet a '90-es évek végén írtak le először.^{45,46} Az NSF-fel járó tüneteket, mint például bőrelváltozások, fibrózis belső szerveken (tüdő, szív), leginkább a csökkent vesefunkcióval rendelkező betegek esetén diagnosztizálták. Ennek a felismerésnek, és persze az esetek nyomonkövetésének köszönhetően az Európai Gyógyszerügynökség javasolta a nyíltláncú Gd³⁺-alapú kontrasztanyagok európai piacról történő kivonását.⁴⁷

Másrészt ismert, bár kevésbé kutatott jelenség az ún. pozitív gadolínium anomália,³ miszerint a diagnosztikai központok környéki felszíni vizekben kimutatható Gd³⁺-szennyezés. Napjaink egyre inkább fókuszba kerülő zöld kémiájával ez nehezen egyeztethető össze, hiszen jelentős mennyiségű gadolínium kerülhet be a körforgásba.

Továbbá, a negatívumok között talán a leginkább aggasztó az a tény, hogy a kontrasztos vizsgálatok során a gadolínium, vagy a komplex (az alkalmazott kontrasztanyag függvényében) akkumulálódik az emberi szervezetben, főleg az agyban^{4,25} anélkül, hogy toxikus hatást fejtene ki, ugyanakkor ez a felhalmozódás jól érzékelhető a háttérintenzitás növekedésén a páciensek egyes vizsgálatai között. Ennek ellenére a Gd³⁺-alapú kontrasztanyagok a legbiztonságosabb készítmények közé tartoznak, a mellékhatások rátája elenyésző (enyhe mellékhatás 1000 adagonként <1, súlyos mellékhatás 40.000 adagonként jelentkezhet) így vezető piaci szerepüket várhatóan nem fogja megingatni más típusú kontrasztanyag.⁴⁸

II.4. Intelligens kontrasztanyagok

Manapság egyre nagyobb igény mutatkozik arra, hogy ne csak anatómiai elváltozásokat legyünk képesek detektálni a képalkotás segítségével, hanem képesek legyünk molekuláris szinten információt szerezni a szövetekben/szervekben zajló egy-egy folyamatról (pH-változás, anion/kation koncentráció változás stb.). Azáltal, hogy detektálni tudnánk fiziológiai vagy biokémiai rendellenességeket, lehetőség nyílna a korai diagnosztikára, amellyel még az anatómiai elváltozás megjelenése előtt felismerhetnénk a kóros folyamatokat.

Az anatómiai képalkotással ellentétben, ahol lehetőség nyílik kontrasztanyag nélküli vizsgálatra, a molekuláris képalkotás során minden esetben szükség van ún. intelligens/okos kontrasztanyagok használatára. Ezeknek a kontrasztanyagoknak a működési elve az esetek döntő többségében a belső szférás vízmolekulák számának, vagy a komplex rotációs dinamikájának változásán alapul.²¹

Talán a legfontosabb paraméter, amely az emberi szervezetben feltérképezhető okos CA-kal a sejtek és az extracelluláris tér pH-ja, hiszen majdnem mindegyik patológiás elváltozás együtt a jár a normál pH-érték csökkenésével. A pH változása vagy a belső szférában található vízmolekulák számára, vagy a változó protonáltsági fok miatt, a vizsgálni kívánt NMR aktív mag kémiai eltolódására van hatással.^{49,50}

12

A szervezetben található anionok és kationok koncentrációjának változása is sok esetben valamilyen betegséget sejtető folyamathoz köthető, így törekvések vannak ezeknek a változásoknak a követésére is a diagnosztika segítségével. Kationok esetében (mint az a későbbi fejezetben részletezésre is kerül) két célravezető stratégia lehetséges: vagy a fémionhoz közvetlenül koordinálódó vízmolekulák számán kell változtatni, vagy a komplex rotációs korrelációs idejét kell befolyásolni. Előbbi esetben egy/több, a vizsgálni kívánt fémionhoz specifikusan kötődő donoratom a kívánt fémion távollétében a komplex központi fémionjához koordinálódik, míg jelenlétében а donoratom(ok) disszociálnak a központi fémionról, ezzel teret adva a vízmolekulá(k)nak a fémion belső szférájában. A második esetben pedig a komplex méretét és flexibilitását kell változtatni. Erre jó példa lehet makromolekulák képződése, amelyek rotációs korrelációs ideje, ezáltal relaxivitási is nagyobb, mint a kis molekulatömegű komplexeké.^{21,51,52} Anionok követése esetén hasonló az elv az előbb leírtakhoz, csak itt a rotációs korrelációs idő változása a vizsgálni kívánt anion koordinációjával valósul meg.53

Sajnos az intelligens kontrasztanyagok alkalmazhatóságával kapcsolatban több probléma is felmerül. Ahhoz, hogy jól kiértékelhető MRI képet kapjunk nem csak a kontrasztanyag által kiváltott jelintenzitást kell figyelembe vennünk, hanem az ágens szöveti koncentrációját is ismernünk kell. Ennek a problémának a megoldására többfajta megoldás is született,⁵⁴ amelyek közül leginkább azokban az esetekben érnek el bíztató eredményeket, amikor képalkotó eljárásokat próbálnak meg ötvözni (pl. MRI + PET). Ennek lényege, hogy olyan kontrasztanyag kombinációt hozzunk létre (ez lehet akár két különböző fémion, vagy egy fémion két izotópjának ugyanazzal a ligandummal kialakuló komplexének keveréke), amelyből legalább az egyikkel meghatározható az adott szövetben jelenlevő ágens koncentrációja.

Sikeres kutatások folytak olyan bimodális hibrid komplexszel, ahol a Gd^{3+} -iont, mint paramágneses ágenst és a ¹⁸F radionuklidot, mint PET aktív mag tulajdonságait ötvözték. Ebben az esetben a PET jel intenzitása arányos a radionuklid koncentrációjával, a Gd^{3+} -komplex pedig a pH-függő relaxivitásért felel, ezáltal lehetőség nyílik a sejtek pH-értékének mérése kvantitatív, nem-invazív módon.⁵⁵ Elméletben minden olyan mag, ami β^+ -bomlásra képes (például ⁵²Mn)⁵⁶ alkalmazható lehet e tekintetben, csoportunk kutatási tevékenysége ezen témákra is kiterjed.

II.4.1. pH-érzékeny komplexek*

A pH *in vivo* meghatározása a képalkotás egyik nagy előrelépése lenne, hiszen a pH-változása számos betegség vagy elváltozás kezdeti jele lehet (fertőzések, rák, stroke stb.). Tumorok esetén a pH akár 0,5 – 1 egységgel is kisebb lehet az egészséges sejtekhez képest,⁵⁷ amelynek oka az anaerob glikolízisből származó laktát szekréció. A pH pontos és nagy felbontású monitorozása nem csak a diagnosztikai alkalmazások tekintetében lenne előnyös, hanem segítségével lehetőség nyílna követni egyes betegségek folyamatait, vagy követni terápiák által kiváltott hatásokat.⁵ Mai napig számos kutatás folyik ezen a területen, amelyek közül néhányat említünk csak meg a következőkben.^{58,59}

A szövetek intracelluláris pH-ját meg lehet becsülni a szervetlen foszfáttartalomhoz kapcsolódó ³¹P-NMR segítségével.⁶⁰ Több kutatás is vizsgálta a 3-aminopropil-foszfát (3-APP) pH-érzékeny ³¹P MR-rezonanciáját daganatok és egészséges szövetek extracelluláris pH-értékének meghatározásához.^{61,62} Ojugo és munkacsoportja ¹⁸F-magot tartalmazó

^{*} Minden, a fejezetben található ligandum szerkezete a fejezethez tartozó 4. ábrán kerül feltüntetésre

ligandummal ért el eredményeket az extracelluláris tér pH-értékének meghatározása terén, érzékenyebb módszert kidolgozva a 3-APP-hez képest.⁶³

Olyan, rövid elektronrelaxációval $(10^{-11} - 10^{-13} \text{ s})$ rendelkező átmeneti fém és lantanoida komplexek, amelyek komplexei rendelkeznek olyan p*K*a értékkel, ami beleesik a fiziológiás pH-tartományba (vagy abba a tartományba, ahol a kérdéses vizsgálatot el akarjuk végezni), jó jelöltek lehetnek a pH-változásának NMR technikával való nyomonkövetésére. A DOTP ligandum Yb³⁺-ionnal alkotott komplexét érdemes megemlíteni, ahol enyhén savas és enyhén bázikus közegben [Yb(DOTP)]^{5–}-komplex lépcsőzetes protonálódása a kémiai eltolódások folyamatos változásával jár együtt.⁵⁰

A fémkomplexek esetében nem csak a protonok tudnak értékelhető jelet adni mágneses térben, hanem a ¹⁹F jelének detektálása is megoldható.⁶⁴ Ennek azért is lehet nagy jelentősége, hiszen míg a proton MRI alkalmazása során jelentős háttér intenzitással kell számolnunk, addig ez a fluor mag esetében nem jelentkezik, mert a szervezet fluor tartalmának jelentős része a csontokban/fogakban szilárd formában található. Az ilyen komplexek egyik csoportja a Ho³⁺-ion DO3A-monoamid származékaival alkotott komplexei, ahol az oldalláncban található nitrocsoport befolyásolja az amidcsoport protonjának savasságát, így a CF3-csoport kémiai eltolódása akár 30 ppm egységet is változhat pH 4 - 9 tartományban. Egy másik csoportba az arilszulfonamid-csoporttal módosított DO3A ligandum lantanida-komplexei sorolhatóak, ahol bázikus közegben az amidcsoport deprotonálódása miatt a szulfonamid-nitrogén koordinálódik a központi fémionhoz, viszont savas közegben ez a koordináció nem valósul meg, így teret adva egy második vízmolekulának a komplex belső szférájában. A két forma közötti különbség megmutatkozik az aromás gyűrűn található -CF3 csoportok ¹⁹F-jeleinek kémiai eltolódásaiban is ($\Delta \delta = 40$ ppm), különös tekintettel pH 5,5 és 7,0 közötti tartományban.⁴⁹

Talán a legkézenfekvőbb megközelítés egy pH-szenzornak szánt kontrasztanyag esetén az, hogy a pH-ban történő változás a komplex hidratációs számának változásával jár együtt, ezzel befolyásolva annak relaxivitás értékét. A belső szférában két vízmolekulát tartalmazó Gd³⁺-komplexek között ismertek olyanok, amelyek könnyen és reverzibilisen képesek vegyeskomplexet kialakítani oxoanionokkal (pl. karbonát), amely folyamat a belső szférában található vízmolekulák teljes disszociációját eredményezi (q = 0). Az említett karbonátion esetében a komplex relaxivitása bázikus közegben a tipikusan külső szférás hozzájárulásra esik vissza (~2 mM⁻¹s⁻¹). Erre a viselkedésre egy példa a DO3AM-alapvázzal rendelkező L₁b fantázia névre hallgató ligandum Gd³⁺-komplexe, ahol a relaxivitás értékek különbsége a két állapot (q = 2 és q = 0) között 5,3 mM⁻¹s⁻¹-nek adódott.⁶⁵ Persze nem szabad elfelejteni, hogy biológiai rendszerekben számos karbonátiontól eltérő oxoanion van jelen, mint kompetítor, ami jelentősen befolyásolhatja az eredményeket.

Vizsgáltak olyan Gd³⁺-komplexeket is, ahol a ligandum egyik oldallánca hordozza magában a pH-szenzitív funkciót. Az elv hasonló a fentebb leírtakhoz: a pH változásával változik a komplex hidratációs száma, de ennek oka az oldalláncban található donoratom koordinációja a központi fémionhoz, illetve disszociációja a központi fémionról, a protonáltság függvényében. Ezt a jelenséget figyelhetjük meg az oldalláncban arilszulfonamid-csoportot tartalmazó DO3A-SA esetében is, ahol a pH-változásával a szulfonamid-nitrogén koordinációja/disszociációja befolyásolja a komplex belső szférájában található vízmolekulák számát, leginkább pH 5,5 – 8,5 közötti tartományban.⁶⁶ Egy másik ligandum esetében a DO3A-alapváznál oldalláncként metilén-nitrofenolt alkalmaztak, mint pH-szenzitív csoportot (DO3A-NP). A ligandum Gd^{3+} -komplexénél ~70%-os változást lehetett mérni a relaxivitásban a pH-változásával, ami a q = 1 és q = 2 közötti változással analóg relaxivitás értékeket mutatott.⁶⁷

A kép kontrasztosságának növekedése a kontrasztanyag saját koncentrációjától is függ, így intelligens kontrasztanyag alkalmazás esetén meg kell határozni annak lokális koncentrációját is. Ezt például a DO3A-SA ligandum Gd³⁺-komplexe esetén úgy oldották meg, hogy a ligandum oldalláncát egy adamantin egységgel módosították, amelyről ismert, hogy erős host-guest kölcsönhatást létesít β -ciklodextrinnel.⁶⁸ Egy ugyanilyen adamantin egységgel ellátott, de ¹⁹F-magot is tartalmazó molekulát alkalmazva, az injektált keverék arányát pontosan ismerve (szubsztrát: ¹⁹F-magot tartalmazó molekula: Gd³⁺-komplex) a ¹⁹F NMR jelét detektálva meg tudták határozni a pH-t és a Gd³⁺-komplex koncentrációját is.⁶⁹

A duális injektálás módszerét alkalmazva is sikeresen meg lehet határozni a pH-t. Sherry és munkacsoportja egy pH-független komplexet ([Gd(DOTP)]^{5–}) alkalmazva vizsgálta annak időfüggő jelváltozását.^{70,71} Ezután ugyanígy jártak el a már pH-függést mutató [Gd(DOTA-4AmP)]^{5–} komplexxel is. Mivel a két komplex – szerkezetükből fakadóan – hasonló biodisztribúcióval és farmakokinetikával rendelkezik, az idő-intenzitás görbék különbsége a relaxivitás értékek különbségéből adódik.

Az MRI más képalkotó technikákkal kombinálva szintén alkalmas lehet a pH meghatározására. A már említett pH-szenzitív $[Gd(DOTA-4AmP)]^{5-}$ -komplex módosításával ($[Gd(DOTA-4AmP-F)]^{5-}$), egy ¹⁹F atom beépítésével, a kontrasztanyag PET módszerrel is vizsgálhatóvá vált. PET/MR készülék segítségével meghatározásra kerültek a T_1 értékek, illetve meg tudták határozni az anyag koncentrációját is.⁵⁵ Fontos, hogy *in vivo* mérések esetén a két technika szimultán legyen alkalmazva, mivel csak így tudunk pontos pH-térképet alkotni a szervezetről. Egy másik közleményben olvashatunk olyan dimerről, amely két fémkötő egységet is tartalmaz: egy DO3A-SA kötőhelyet Gd³⁺-ion számára, illetve egy AAZTA kötőhelyet a PET érzékeny ⁶⁸Ga³⁺-ion számára (Gd-DO3A-SA-AAZTA). A szulfonamid kar két funkciót tölt be, egyfelől felelős a pH-érzékeny funkcióért, másfelől pedig linkerként szerepel a két kötőhely között.⁷²

Tanulmányoztak olyan DOTA-tetraamid származékot is, amely oldalláncában hidroxipiridil-csoportot tartalmaz (DOTA-tetraamidhidroxipiridil). Az amidcsoportok deprotonálódása során kialakul egy intramolekuláris sav-bázis kölcsönhatás a fenolos hidroxilcsoportok protonjaival, létrehozva ezzel egy második hidratációs szférát. Ez a relaxivitás értékekben is megmutatkozik, ami savasabb tartományban ~85%-kal csökkent a lúgos közegben mért értékhez képest.⁷³



4. Ábra. A fejezetben említett ligandumok és komplexek szerkezetei

II.4.2. Ionszenzor-komplexek

A fémionok, mint Zn^{2+} ; Ca^{2+} ; Cu^{2+} stb. fontos szerepet játszanak az emberi szervezet különböző folyamataiban.⁶ Az ionkoncentrációk változása a szervezetben sok esetben hozzárendelhető valamilyen abnormalitáshoz és jól jellemez meghatározott folyamatokat (például rákos elváltozások, neurodegeneratív megbetegedések). Ha lehetőség nyílna ezeket a folyamatokat

nem invazív módon monitorozni, az hatalmas előrelépés lehetne a korai diagnózis szempontjából. Sajnos ilyen ágensek előállítása nagy feladat elé állítja a kutatókat, ugyanis a kontrasztanyagokkal szemben támasztott alap követelményeken túl számos más paraméternek kell megfelelniük. A kontrasztanyagnak a gyors és reverzibilis kötődés mellett specifikusnak is kell lennie a választott ionra. Az ágensnek abban a koncentrációtartományban kell nagy érzékenységgel rendelkeznie, ahol a vizsgálatot akarjuk végezni. Talán ez is az oka, hogy az eddigi jelentős erőfeszítések ellenére sajnos kevés in vivo kísérletet végeztek ebben a tárgykörben. Először is, nem minden esetben határozható meg egyértelműen az a tartomány, ahol szeretnénk követni az ionkoncentráció változását. Általában egyensúly áll fenn az ionok szabad formája és a fehérjékhez kötött forma között, így a szabad ionkoncentráció függ az ionok fehérjékhez való affinitásától. Másrészről egy biológiai hatással ami ionkoncentráció folyamat, van az változására (pl. Ca2+-ionkoncentráció változás neurotranszmitterek esetén) rendkívül gyors, a másodperc törtrésze alatt végbemegy, ami sok esetben túl gyors ahhoz, hogy képalkotó eljárásokkal követni tudjuk.74,75

A kationszenzor MRI kontrasztanyagok kutatásában nagy áttörést jelentett a kalcium kimutatására alkalmas anyagok előállítása,^{76,77} ezt pedig gyorsan követte a cinkre^{78,79} és a rézre⁸⁰ érzékeny anyagok megjelenése. Egy ilyen típusú anyag általában két fő részből tevődik össze: egy MRI-ben alkalmazható fémion megkötésére szolgáló egységből, valamint egy olyan kötőhelyből, amely szelektíven képes kölcsönhatásba lépni a kívánt fémionnal. A relaxivitás növelésére a pH-szenzorokhoz hasonlóan itt is kétfajta stratégiát követhetünk: vagy úgy érünk el változást a relaxivitásban, hogy változik a fémionhoz koordinálódó vízmolekulák száma, vagy növeljük a komplex méretét, ami a rotációs korrelációs idő változást idézi elő.

II.4.2.1. Ca^{2+} -szenzor komplexek †

A kalcium rendkívül fontos szerepet tölt be az emberi szervezet felépítésében és annak folyamataiban. Másodlagos hírvivőként részt veszt a sejtkommunikációban, jelen van a neurotranszmitterek idegsejtekből való felszabadulásakor, de szerepe van minden izomösszehúzódáskor is. A szervezetben található kalcium 99%-a a csontokban és porcokban található kalcium-szulfát és kalcium-foszfát formában, a maradék 1% pedig az intra- és extracelluláris folyadékokban lelhető fel. A sejtek kalcium koncentrációja rendszerint 100 nM körül mozog, de ez különböző folyamatoknak köszönhetően akár 100-szorosára is emelkedhet. Ezzel szemben az extracelluláris térben található koncentráció akár 2,2 – 2,6 mM is lehet.⁸¹

Az első Ca^{2+} -ionra érzékeny kontrasztanyag a $[Gd(DOPTA)]^{4-}$ komplex volt, amely két [Gd(DO3A)] egységet tartalmaz egy BAPTA egységgel hídként összekapcsolva, amely egységről ismeretes, hogy rendkívüli szelektivitással tudja kötni a Ca^{2+} -iont.⁷⁷ Ca^{2+} -ion távollétében a BAPTA egység karboxilcsoportjának oxigén donoratomjai a makrociklusos egység Gd^{3+} -ionjával lépnek kölcsönhatásba, ezzel telítve annak belső koordinációs szféráját. Ám Ca^{2+} -ion jelenlétében ezek a karboxilátok már a Ca^{2+} -ionnal alakítanak ki koordinatív kötést, ezzel szabadon hagyva egy-egy koordinációs helyet a Gd^{3+} -komplex belső koordinációs szférájában, amit egy vízmolekula fog betölteni. Ennek következtében a relaxivitás érték a kezdeti állapothoz képest 77%-kal nő (1:1 komplex: Ca^{2+} arány esetén). Ahhoz, hogy a vizsgálatok során értékelhető eredményt kapjunk (kizárjuk az extracelluláris tér egy nagyságrenddel nagyobb Ca^{2+} -ion koncentrációjának zavaró hatását) célszerű a Ca^{2+} -kötő egységet maszkírozni. Ezt a BAPTA egység

⁺ Minden, a fejezetben található ligandum szerkezete a fejezethez tartozó 5. ábrán kerül feltüntetésre

karboxilcsoportjainak észteresítésével lehet elérni, amely észter-funkció a sejt belsejében az észteráz enzim hatására megszűnik, így szabaddá téve a karboxilcsoportokat.⁸² Így a relaxivitás növekedés 66%-osnak bizonyult és ami fontosabb, hogy ezzel a módszerrel sikeresen meg lehet különböztetni az intraés extracelluláris térben lévő Ca²⁺-ionokat.

Találunk példát olyan ligandumra is, ahol csupán egy makrociklusos egység és ehhez kapcsolódóan egy Ca²⁺-ionra szenzitív oldallánc található. Ilyen, DO3A-egységet és egy APTRA oldalláncot tartalmazó ligandum a DOPTRA, ahol a Ca²⁺-jelenlétének hatására a komplex relaxivitása megduplázódik (3,5 mM⁻¹s⁻¹ \rightarrow 6,9 mM⁻¹s⁻¹). Ugyanakkor az is igaz, hogy biológiai modellben a változás csak 25%, ezt a csökkenést a jelenlévő anionok Gd³⁺-ionhoz való kötődésével magyarázták.⁸³

MRI vizsgálatok szempontjából azonban érdemesebb az extracelluláris tér Ca²⁺-koncentráció-tartományát megcélozni, ami mM skálán mozog.⁸⁴ Ennek eléréséhez célszerű csökkenteni a hídként használt egység affinitását a Ca²⁺-ionhoz, amelynek egyik módja a karboxilátcsoportok cseréje valami más, kevésbé koordináló csoportra (pl. amidcsoport). Az ilyen módon előállított ligandumokban a BAPTA egységet helyettesítették az EGTA ligandum amidszármazékaival (EGTA-DO3A).⁷ A ligandumokat tesztelték az agy extracelluláris körülményeit modellező közegben is, ahol 10%-os relaxivitás változást tapasztaltak, ami már elég nagy ahhoz, hogy MRI-vel detektálható legyen.

Ugyanezen kutatócsoport létrehozott egy olyan ágenst, amely ötvözi a hidratációs szám- és a rotációs korrelációs idő változását.⁸⁵ A módszer elve az, hogy egy amfifil Ca²⁺-szenzornak szánt ligandumot építettek egy liposzóma kettősrétegébe. A ligandum tartalmaz egy [Gd(DO3A)] egységet, egy hídligandumot, ami a Ca²⁺-ion érzékeléséért felelős, és ehhez kapcsolódóan egy lipofil alkilláncot. A komplex működése az előző bekezdésekben taglaltak szerint alakul és Ca²⁺-ion jelenlétében relaxivitása csaknem 400%-kal növekszik. Ennek oka kettős, ugyanis a makrociklusos egység hidratációs számának változása mellett az eredetileg gyors intramolekuláris rotáció lelassul.



5. Ábra. A fejezetben található ligandumok szerkezete

II.4.2.2. Zn^{2+} -szenzor komplexek [‡]

Az emberi szervezetben a vas után a második legnagyobb mennyiségben előforduló fémion a Zn^{2+} (2 – 4 g cink / egészséges felnőtt szervezet), ez koncentrációegységben kifejezve µM tartományt jelent. A cink a fehérjéhez kötött formája mellett előfordul szabad ionos formában is, bár ennek a koncentrációja jóval alacsonyabb, mint a kötött formáé.⁸⁶ Funkcióját tekintve több, mint 300 enzim működésében játszik szerepet, emellett kritikus fontosságú az immunsejtek fejlődésében és működésében is.^{87,88} Extracelluláris térben (humán plazmában) a szabad cink koncentrációja elérheti a 8 – 10 µM-t is, legnagyobb koncentrációban pedig az agyban található meg, itt akár 300 µM koncentrációban is jelen lehet.^{89,90}

Hasonlóan a Ca²⁺-ion detektálására alkalmas ligandumokhoz, az irodalomban ismert komplexek többsége Gd³⁺-ion alapú és a relaxivitás változása a hidratációs szám változásának következménye, amit egy olyan oldallánc koordinációjával/disszociációjával érnek el, ami jó szelektivitást mutat a Zn²⁺-ionra. Tipikusan ilyen Zn²⁺-kötő ágens a DPA-egység.



6. Ábra. A DPA ligandum szerkezete

Irodalomból ismert a DTPA ligandum módosításával előállított DTPA-biszamid ligandum Gd³⁺-ionnal alkotott komplexe, ahol a DPA egység módosításával (egy piridilcsoport helyettesítése metilénkarboxilát-csoporttal) sikeresen értek el szelektivitást Zn²⁺-ionra.^{79,91} A módosítást azért kellett

[‡] Minden, a fejezetben található ligandum szerkezete a fejezethez tartozó 6. és 7. ábrán kerül feltüntetésre

elvégezni, mivel a 4 piridilcsoport sztérikus gátlása miatt az amidkoordináció gyenge, ezzel nehezítve a relaxációsebesség mérési eredményeinek kiértékelését. Zn²⁺-ion jelenlétében a komplex olyan geometriai átalakuláson megy keresztül, amelynek hatására kiszorul a belsőszférás vízmolekula a Gd³⁺-környezetéből, ezzel ~30%-kal csökkentve a komplex relaxivitását. A komplex, valamint annak DPA-analógja is szelektivitást mutat Zn²⁺-ionra Mg²⁺- és Ca²⁺-ionok jelenlétében is.

Makrociklusos Gd³⁺-ion alapú komplexekről is bizonyították, hogy használhatóak Zn²⁺-ion detektálására. Egy esetben oldalláncként egy iminodiacetát (DO3A-iminodiacetát) egységet alkalmaztak, mint Zn²⁺-kötő ágenst.⁹² Zn²⁺-ion jelenlétében nagy ugrást tapasztaltak a relaxivitásban, mivel annak kölcsönhatása az oldallánc donoratomjaival a komplex hidratációs számának változását eredményezi. Ez a nagymértékű változás nem csak *in vitro* körülmények között detektálható, hanem MRI szempontból informatív vérszérumban is érzékelhető marad.⁹³ Habár a releváns koncentrációtartományban tudták kimutatni Zn²⁺-ion jelenlétét, csak az *in vivo* kísérletek adhatnak biztos választ arra, hogy ez az ágens ténylegesen működőképes lehete az emberi szervezetben is.

Egy másik DOTA-biszamid alapú makrociklusos ágensről is bizonyították, hogy alkalmazható Zn²⁺-ion detektálására, a két DPA egységének köszönhetően, amelyek oldalláncként vannak jelen a makrocikluson. A relaxivitás változás alapja az, hogy a Zn²⁺-iont kötő kétmagvú komplex affinitása a HSA felé nagyobb, mint a Gd³⁺-komplexé, így a kialakult HSA-addukt mérete megnő a szabad formához képest, növelve a rotációs korrelációs időt.⁹⁴ 2 ekvivalens Zn²⁺-ion jelenlétében csupán 20%-os relaxivitás növekedést tapasztaltak, viszont ugyanilyen kondíciók mellett HSA-t is alkalmazva ez a növekmény csaknem 170%-osnak bizonyult, köszönhetően a kétmagvúkomplex-HSA addukt kialakulásának. *In vitro* vizsgálatokkal igazolták, hogy a komplexszel akár 30 μ M Zn²⁺-koncentrációt is képesek detektálni. A komplexet sikeresen vetették alá *in vivo* kísérleteknek is, ahol glükózzal stimulálták a Zn²⁺-termelődését egér hasnyálmirigyben és prosztatában.⁹⁵ Kihasználva azt, hogy a prosztata rákos megbetegedése esetén a Zn²⁺-szekréció akár az egészséges szint hatodára is visszaeshet, a komplexet alkalmazva sikerrel meg lehet különböztetni az egészséges és tumoros prosztatát, sőt a betegség előrehaladását is vizsgálni lehet, mivel az idő múlásával a Zn²⁺-ion koncentrációja csökkenést mutat.

A Gd³⁺-alapú komplexek mellett az irodalom említést tesz vízoldható Mn^{3+} -porfirin-komplexekről is (TPPS-BIPEN).⁹⁶ Mikor megtörténik a Mn^{3+} -komplex kölcsönhatása a Zn²⁺-ionnal, a komplex képes áthatolni a sejtmembránon, ilyenkor a T_1 relaxivitásban ~ 25%-os csökkenés figyelhető meg. Érdekes tény, hogy amikor a Mn^{3+} -komplexhez *in vitro* sejtes környezetben Zn²⁺-iont adtak, az előzőekkel ellentétben mind a T_1 , mind a T_2 relaxivitásban növekedést tapasztaltak.



7. Ábra. A fejezetben található ligandumok szerkezete

II.5. A lantanoidák koordinációs kémiája és makrociklusos komplexeik

Lantanoida (Ln, lantánszerű) ionok leggyakrabban +3 oxidációs számmal fordulnak elő. Ezt az állapotot az $5d^16s^2$ külső héjon lévő elektronok leadásával érik el, és elektronszerkezetükben csupán az f alhéjon elhelyezkedő elektronok számában találunk különbséget. Ezeket az elektronokat az $5s^25p^6$ külső, zárt elektronhéj teljesen leárnyékolja, ami az effektív magtöltés növekedése miatt az ionméret csökkenését eredményezi a La³⁺ \rightarrow Lu³⁺ irányba, amit lantanoidakontrakciónak nevezünk.^{97,98}
A La³⁺- és a Lu³⁺-ionok kivételével mindegyik lantanoida ion paramágneses tulajdonsággal és rövid elektronrelaxációs időkkel (10⁻¹³ s) rendelkezik. Ez utóbbi alól a Gd³⁺-ion (d⁷) kivétel, szimmetrikus elektronszerkezete mellett az elektronrelaxációs ideje nagyságrendekkel nagyobb, mint a csoport többi tagjának (10⁻⁹ s).⁹⁹ A sorozat első elemei 9, az utolsók pedig 8-as koordinációs számmal rendelkeznek, a Gd³⁺-ionok esetén mindkét érték megjelenik.¹⁰⁰ A lantanoidákról elmondható továbbá, hogy hard karakterűek, így a különböző donoratomokkal kialakított kölcsönhatások erőssége a donoratom hard jellegével arányosan növekszik (S<N<O), amely kötések alapvetően ionos jellegűek.¹⁰¹

II.5.1. A lantanoida-komplexek termodinamikai stabilitása

Számos kutatócsoport vizsgálta a lantanoidák, ezen belül is az MRI alkalmazás tekintetében különösen fontos Gd³⁺-ion nyíltláncú ligandumokkal kialakuló komplexeinek koordinációs kémiáját, de jelen bevezetőben ezeket (tekintettel a dolgozat tematikájára) nem taglalom.^{1,30,34}

Bár a makrociklusos ligandumok nagy hányada ugyanazokat a donoratomokat tartalmazza, mint a nyíltláncú analógjaik (amin-nitrogén, ill. amid, karboxilát vagy foszfonát/foszfinát oxigénatom), koordinációs kémiai szempontból a viselkedésük teljesen más. A makrociklushatásnak köszönhetően (ugyanannyi donoratom jelenlétében) nagyobb stabilitású komplexek képződnek, mint nyíltláncú ligandumok esetében.¹⁰²

Ugyanígy, a makrociklusos ligandumok esetén változik a protonálódási sorrend is a nyíltláncú analógjaikhoz képest. NMR technikát alkalmazva poliamino-polikarboxilátok esetén arra a következtetésre jutottak, hogy az első két protonálódási állandó a makrociklus két, egymással szemben elhelyezkedő nitrogénjének folyamatait írja le, majd a soron következő

állandók а karboxilátcsoportokat jellemzik. További makrociklusos nitrogénatomok protonálódása sokkal kisebb pH-n játszódik le, ezzel optimumon tartva a gyűrű töltéseloszlását.¹⁰³ Viszont, ha merevebbé tesszük a makrociklust úgy, hogy egyik nitrogénatomját piridingyűrűbe foglaljuk (PCTA és annak származékai) akkor az előzőleg említett szekvencia másképpen fog alakulni. A piridinszerű nitrogénatom csökkenteni fogja a vele szemben lévő (transz-helyzetű) nitrogénatom bázicitását, amit az első protonálódási állandó fog jellemezni. A második állandó szintén a makrociklus nitrogénatomjához fog tartozni, viszont a molekulán belüli átrendeződés következtében (a fellépő taszítás csökkentésére) a két proton a cisz-helyzetű nitrogénatomokon fog elhelyezkedni.¹⁰⁴ Ebből az összbázicitásbeli különbségből fakadóan a stabilitási állandó értékei kisebbek lesznek a PCTA-komplexeknél, mint az ugyanannyi donoratommal rendelkező DO3A-komplexek esetében.²¹

Egy ligandum összbázicitás értékét befolyásolni lehet az oldalláncok minőségével is. A DOTA ligandum acetátcsoportjait fokozatosan foszfonátcsoportokra cserélve (DO3AP – DO2A2P – DOA3P – DOTP) a makrociklus nitrogénjeinek protonálódási állandóiban növekedést tapasztaltak. Ennek köszönhetően a ligandum összbázicitása is nő, ezzel 4 log egység növekményt eredményez a Gd³⁺-komplexek stabilitási állandójában a DOTA²⁹ és a DOTP¹⁰⁵ kelátorok között.¹⁰⁶ Ugyanakkor az oldalláncokat semleges csoportokra cserélve (észterek, amidok)¹⁰⁷ a stabilitási állandók 10 log egységnyi csökkenését is tapasztalhatjuk a Gd(DOTA) megfelelő értékeihez képest.

Egy komplex stabilitási állandóját befolyásolja a makrociklus üregmérete is. Egy 9 tagú makrociklus (pl. NOTA) esetén a ligandum üregmérete túlontúl kicsinek, míg egy nagyobb, 13 (TRITA) vagy 14 (TETA)

tagú ligandum esetén pedig már nagynak tekinthető a Ln³⁺-ionok szempontjából.^{29,108}

A Gd³⁺-komplex stabilitása függ a ligandum töltésétől is. Azt tapasztalták, hogy egy ligandum negatív töltésének növekedésével a képződő komplex stabilitási állandójában is növekedés várható. ¹⁰⁹ Nagyon fontos látni ugyanakkor azt is, hogy a stabilitási állandó nagy értéke nem garancia a ténylegesen nagy stabilitásra, hiszen azt csak a protonálódási állandókat figyelembe véve lehet értékelni.^{110–112}

Manapság egyre inkább előtérbe kerülnek a bifunkciós ligandumok, amelyek megfelelően konjugált származékai szövet. ezáltal szervspecifikusságuknak köszönhetően nemcsak a diagnosztika, de a terápia területén is alkalmazhatók lehetnek. A bifunkciós kelátorok úgy vannak kialakítva, hogy a fémmegkötő részhez egy linker molekularészlet is kapcsolódik a konjugációt biztosítandó. Mint ahogy minden módosítás, ez is kihatással lehet/van a képződő komplex egyensúlyi viszonyaira. A makrociklus gerincén p-nitrobenzil csoportot tartalmazó NO₂-Bn-DOTA vagy NO₂-Bn-PCTA,^{10,113} valamint a makrociklusos nitrogénatomon módosított DOTA-NHS-észter¹¹⁴ ligandumok összbázicitásában csökkenést tapasztaltak az anyaligandumokhoz képest, a beépített funkciók elektronszívó hatása miatt.

II.5.2. A lantanoida-komplexek inertsége

Egér kísérletekben bizonyították, hogy a gyakorlatban alkalmazott Gd³⁺-alapú kontrasztanyagok (típustól függően) beadását követően két héttel 0,01-1,0% Gd³⁺-ion maradt vissza az egerek szervezetében attól függően, hogy nyíltláncú (nagyobb koncentráció) vagy makrociklusos komplexet kaptak (kisebb koncentráció).¹¹⁵ Az *in vivo* kísérletek eredményét alátámasztották az *in vitro* mért disszociációs sebességi állandók is, bizonyítva, hogy a

makrociklusos Gd³⁺-komplexek jóval inertebbek a nyíltláncú származékoknál.³⁰

Egy makrociklusos Gd³⁺-komplex esetén a szerkezet kompakt, az üregben található fémiont erősen koordinálják a makrociklus és az oldalláncok donoratomjai, így az nehezen hozzáférhető a különböző kompetítor ligandumok számára. Továbbá az oldallánc csoportjai általában monodentát ligandumként játszanak szerepet, így fémcsere reakciókban nem, vagy csak gyengén vesznek részt, így a kicserélő fémion általi reakcióút sem játszik döntő szerepet a disszociáció során. Viszont a fémionokkal ellentétben a proton sikerrel tud kompetítorként viselkedni a disszociációs reakciókban. Az a tapasztalat, hogy minél könnyebben tud egy komplex protonálódni (Gd(HL), ún. protonált köztitermék képződése mellett, annál nagyobb az esély a disszociációra. Természetesen itt is számos paraméter együttes hatása lesz a meghatározó.¹¹⁶

Ha merevítjük a ligandum szerkezetét, azzal lassíthatjuk a protontranszfer folyamatot, így növelve az inertséget. Ez mutatkozik meg például a [Gd(PCTA)]-komplex esetén is, ahol a sebességi állandó két nagyságrenddel kisebb a [Gd(DO3A)]-komplexekéhez képest, azonos denticitás mellett.¹¹⁷ Ebben az esetben a makrociklus oldalláncot nem hordozó nitrogénjének nagyobb bázicitása és a kevésbé merev szerkezet felelős a kisebb inertségért.

Ha az oldalláncba amidcsoporto(ka)t építünk be, az növelni fogja a Gd³⁺-komplexek inertséget, hiszen ezen csoportok bázicitása kicsi, így protonálódásuk nem, vagy csak nagyon nagy proton koncentrációnál következik be. Az inertséget nagyban befolyásolja az amid-nitrogénen található csoport minősége is.^{107,118}

II.6. Mn²⁺-koordinációs kémiája és makrociklusos komplexei

A mangán redoxi szempontból nagy változatosságot mutat, ugyanis +2 és +7 közötti oxidációs állapotban is jelen lehet. Vegyületeiben általában +2 oxidációs számmal szerepel, köszönhetően a szimmetrikus d⁵ elektronkonfigurációnak. Így fordul elő az emberi szervezetben is kb. 200 μg/kg mennyiségben.¹¹⁹

Sói csak nagyon tömény oldatukban halványrózsaszínűek a [Mn(H₂O)₆]²⁺-komplex képződésének köszönhetően, d-d átmenetei tiltottak, így mágneses momentuma egyenlő a csak-spin értékkel. Savas és semleges közegben nem, viszont lúgos közegben már oxidálódik MnO(OH)₂-vé.¹²⁰ Komplexei változatos térszerkezetekben kristályosodnak, ahol a Mn²⁺ koordinációs száma leggyakrabban 7, de nem ritka a 6-os és 8-as koordináció sem.¹²¹

II.6.1. Mn²⁺-komplexek termodinamikai stabilitása

A szimmetrikus d⁵ elektronkonfiguráció miatt a Mn²⁺-ion esetében nem számolhatunk kristálytér stabilizációs energiával, így a Mn²⁺ az endogén átmenetifémionokhoz képest sokkal kisebb stabilitású komplexeket képez. Általánosan elmondható, hogy a Mn²⁺-ion nagyobb stabilitású komplexeket képez makrociklusos vegyületekkel, mint nyíltláncú ligandumokkal.

Részeletesen tanulmányozták a makrociklusos NOTA ligandum Mn²⁺-komplexét, és bár a ligandum 6 donoratomot tartalmaz, hasonlóan a nyíltláncú EDTA-hoz,¹²² itt mégsem található meg a belsőszférás vízmolekula, így a komplex relaxivitása kicsi.¹²³ A belső szférás vízmolekula megjelenéséhez csökkenteni kell a ligandum donoratomjainak számát. Ha ezt megtesszük a NOTA esetében az NO2A komplex már ugyan tartalmaz belső

szférás vízmolekulát, de Mn^{2+} -komplexének stabilitása 3 nagyságrenddel kisebb a Mn(NOTA)-komplexétől.¹²⁴ Az NO2A ligandum bázicitásának csökkentése érdekében Drahos és munkatársai a makrociklus nem szubsztituált nitrogénatomját oxigénatomra cserélték. Sajnálatos módon az így származtatott ONO2A ligandum Mn²⁺-komplexének stabilitási állandója (log*K* = 7,43) ugyanakkor több nagyságrendet csökkent az anyaliganduméhoz képest és vizes oldatában egyensúly áll fenn az egy- illetve két vízmolekulát tartalmazó izomerek között.¹²⁵

A legszélesebb körben vizsgált ligandumok körét a makrociklusban 12 atomot tartalmazó vegyületek alkotják. A DOTA ligandum Mn^{2+} komplexe, bár kellően nagy termodinamikai stabilitással rendelkezik, relaxivitása csak a külső szférás hozzájárulással egyenlő, hiszen nincs vízmolekula a központi fémionhoz koordinálva.^{123,126} Az acetátcsoportok számának csökkenése nem meglepő módon a stabilitási állandó csökkenését eredményezi, $logK_{MnDOTA} = 19,44$, $logK_{MnDO3A} = 16,55,^9$ $logK_{Mn(cisz-DO2A)} = 15,68$ és $logK_{Mn(transz-DO2A)} = 15,22.^{127}$ Hasonlóan az ONO2A ligandumhoz, a ODO3A ligandum Mn^{2+} -komplexét is vizsgálták,⁹ és megállapították, hogy kellően nagy stabilitással rendelkezik az MRI felhasználás tekintetében (logK = 13,88).

Az acetátcsoportok cseréje amidcsoportra a Mn²⁺-komplexek esetében is a stabilitási állandó csökkenésével jár együtt, ahogy azt az irodalomban fellehető DOTAM ligandum Mn²⁺-komplexe esetén is láthatjuk $(\log K = 11,96).^{9}$ Hasonló tendencia figyelhető meg а $(\log K = 15,65)^{127}$ [Mn(*cisz*-DO2A)]-komplex és а $[Mn(cisz-DO2AM)]^{2+}$ -komplex $(\log K = 12,64)^{128}$ összehasonlításában, ahol a stabilitási állandó 3 log egységet csökken az amid oldallánc beépítésének hatására. Ellenben, kisebb mértékű csökkenés figyelhető meg az acetát-

foszfonát cseréjekor mind a DOTP ($\log K = 18,98$), mind pedig a DO3P ($\log K = 17,45$) ligandumok Mn²⁺-komplexének esetében.

A merevebb szerkezetű $[Mn(PCTA)]^{-komplex}$ relatíve nagy termodinamikai stabilitási állandóval rendelkezik $(\log K = 16,83)$,⁹ de belső szférás vízmolekulát ez a komplex sem tartalmaz, viszont jó platformnak bizonyult (inertség szempontjából is) további ligandumok szintéziséhez. Csökkentve az oldalláncban található acetátcsoportok számát jutottak a PC2A ligandumhoz, amely 3,6- illetve 3,9 helyzetben hordozza a rajta található két acetátcsoportot. Kutatócsoportunkban végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a szimmetrikus szerkezettel rendelkező 3,9-PC2A Mn²⁺-komplex stabilitási állandója (logK = 17,09) összemérhető a PCTA-komplex állandójával, és nagyobb az aszimmetrikus 3,6-PC2A Mn²⁺-komplexénél (logK = 15,53). Ezen eredmények birtokában kijelenthető, hogy a 3,9-PC2A egy kimondottan jó alapligandum további kelátorok tervezéséhez,¹² ahogy azt kutatási eredményeim is bizonyítják majd.

II.6.2. Mn²⁺-komplexek inertsége

Bár a mangán esszenciális mivolta miatt akár megengedhető is lenne labilisabb komplexek alkalmazása, de szem előtt kell tartani, hogy a Mn²⁺ felszabadulása (különösen a vizsgálat időtartama alatt) nem szerencsés a kép minőségének szempontjából, valamint hosszabb idejű jelentős kitettség manganizmushoz,¹²⁹ vagy akár Parkinson-kórhoz¹³⁰ hasonló tünetekhez vezethet.

Az "aranystandard"-ként is emlegetett $[Mn(DOTA)]^{2-}$ -komplex fiziológiás körülményekre számított biológiai felezési ideje 1024 órának adódik,¹³¹ ha figyelembe vesszük a spontán disszociációra meghatározott sebességi állandót is, amely folyamat szerepe kérdéses. Ha eltekintünk a spontán disszociációtól (ami DO3A és PCTA komplexek esetén nem is jelentkezik) akkor a $[Mn(DOTA)]^{2-}$ felezési ideje 1,1×10⁵ óra, míg ez a Mn(DO3A)-komplex esetén 1,1×10⁴ óra,⁹ továbbá a *cisz*- és *transz*-DO2A származékok esetén mindösszesen csak 48 és 58 óra.¹²⁷

Kinetikai szempontból is vizsgálták a háromszorosan szubsztituált tetraazaciklododekán foszfonátés amidszármazékait. Acetátfoszfonátcsoport csere esetén a komplex inertsége jelentősen csökken, 7 nagyságrendet csökken a [Mn(DO3A)]-komplexekhez képest. Ezzel ellentétben az amidszármazék inertsége összemérhető vele, hiszen csupán egy nagyságrend csökkenésről beszélhetünk ($t_{1/2} = 5200$ óra).⁹ Míg a kétszeresen helyettesített ciklododekán alapvázú amid származékok esetén а [Mn(cisz-DO2A)]-komplexhez képest a felezési idő 2-10-szeres növekedését tapasztalták, az amidcsoport minőségének a függvényében.^{128,132}

PCTA és annak származékai esetén is változatos képet kapunk az inertséget illetően. A piridingyűrűvel merevített vázú [Mn(PCTA)]-komplex fele akkora $(t_{1/2} = 59000)$ inertsége körülbelül óra), mint a [Mn(DOTA)]²⁻-komplexet jellemző érték (amennyiben utóbbi esetben a spontán disszociációra jellemző sebességi állandót nem vesszük alapul).⁹ Ha az acetátcsoportok helyett amidcsoportok vesznek részt a komplexképzésben, akkor az inertség még inkább növelhető – primer amid esetén egy $([Mn(PC3AMH)]^{2+}; t_{1/2} = 4.5 \times 10^5 \text{ ora}), \text{ tercier amid esetén pedig két}$ nagyságrenddel [Mn(PC3AMPip)]²⁺; $t_{1/2} = 1.0 \times 10^6$ óra).

Eggyel csökkentve a PCTA donoratomjainak számát a 3,6- és 3,9-PC2A ligandumokhoz jutunk, amelyek Mn^{2+} -komplexének inertsége messze elmarad a $[Mn(PCTA)]^-$ -tól (63,2 és 21,0 óra).¹² A további csökkentés pedig, a 6-PC1A ligandum komplexe esetén, újabb egy nagyságrendnyi romlást eredményez a felezési időben ($t_{1/2} = 2,40$ óra). Ellenben a 3,9-PC2A *transz*-nitrogénjének szubsztituálásával az inertség növelhető, mint ahogy azt a dolgozatban szereplő eredmények, illetve a [Mn(PC2A-BP)]-komplex vizsgálati eredményei is jól mutatják ($t_{1/2} = 286$ óra).¹³³

III. Célkitűzések

Angelovski és munkatársai relaxációs szempontból részletesen • tanulmányoztak pár Ca²⁺-ionra érzékeny komplexet, de azok egyensúlvi és kinetikai vizsálatai elmaradtak. Így célul tűztük ki a komplexek modellvegyületeinek számító makrociklusos ligandumok (DO3A-EAMA és DO3A-PAMA) termodinamikai, kinetikai és relaxációs tulajdonságainak teljeskörű vizsgálatát, különös tekintettel azok Gd³⁺-ionnal alkotott modellvegyületek komplexeire (8. ábra). Az egyes elemzésének eredményeiből jó eséllyel tudnánk következtetni azok kontrasztanyagként való alkalmazhatóságára.



 Ábra. A DO3A-EAMA és DO3A-PAMA Ca²⁺-szenzornak szánt ligandum modellvegyületeinek szerkezete

• Céljaink között szerepelt, hogy különböző oldalláncok alkalmazásával olyan PC2A-származék ligandumokat állítsunk elő és vizsgáljuk meg azok Mn^{2+} -komplexeit, amelyek érzékenyek a vér fiziológiás pH-értékének változására (pH = 7,4 ± 0,6). Egyik esetben az érzékenységért felelő oldalláncként etilamin-egységet (PC2A-EA), másik esetben pedig *p*-nitrofenol-egységet (PC2A-NP) alkalmaztunk. (9. ábra).



9. Ábra. A PC2A-EA és DO3A-PAMA pH-szenzornak szánt ligandumok szerkezetei

• Terveink között szerepelt egy olyan PC2A-származék ligandum előállítását is, amely Mn²⁺-komplexe segítségével képesek lehetünk követni a Zn²⁺-ion koncentráció fluktuációját. Ehhez olyan egységet kellett ráépíteni a kiválasztott platformra, ami kellő szelektivitással rendelkezik a Zn²⁺-ionra, így esett a választás a dipikolilamin-molekulára (10. ábra). Együttműködés keretein belül további céljaink közt szerepelt, hogy a komplexet egereken, *in vivo* körülmények között is vizsgáljuk.



10. Ábra. A PC2A-DPA Zn2+-szenzornak szánt ligandum szerkezete

IV. Alkalmazott vizsgálati módszerek, kísérleti körülmények

IV.1. Szintetikus munka

Vékonyrétegkromatográfiás (VRK) reakciókövetés során TLC Silicagel 60 F254 (Aluminium sheets) és Macherey-Nagel Polygram[©] Alox N/UV254. Silicagel 60 (partical size 0,040 – 0,063 mm) lapokat használtunk (Merck). A reakcióelegyek tisztításához oszlopkromatográfiás módszert alkalmaztam, amelyhez alumínium-oxid (Fluka, 507 C) vagy Silicagel 60 (Merck, szemcseméret: 0,040 – 0,063 mm) oszloptöltet állt rendelkezésünkre. Szerkezetmeghatározáshoz Bruker DRX 360/400 NMR készüléket használtam, minden mérésnél deuterált oldószerben oldva a mintát (részletezve a mellékletben). Az ESI-MS mérések a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén történtek Bruker microOTOF egy tömegspektrométer segítségével.

A reakciók előrehaladását egy Waters Alliance 2690 HPLC rendszerrel is követtük, amely az alábbi egységekkel jellemezhető: Waters 996 PDA detektor, Phenomenex C18(2) 150*4,6 mm 3 micron kolonna, Empower 2 szoftver. Mintáinkat minden esetben 1 mg/mL koncentrációban készítettük el ACN:víz 1:1 arányú elegyében oldva, melyet injektálás előtt 20 μm fecskendőszűrőn szűrtük.

A végtermék tisztítása egy félpreparatív HPLC rendszerrel történt (YL9101S degasser, YL9110S pumpa, YL9120S UV/VIS detektor, Phenomenex Luna Prep C18(2) 100A 250x21.20 mm 10 micron 00G-4324-P0 kolonna, YLClarity kezelőszoftver). Mind az analitikai, mind a félpreaparatív

munka során háromszorosan ioncserélt vizet és Sigma-Aldrich CHROMASOLV® Plus acetonitrilt alkalmaztunk.

IV.1.1. A PC2A-NP ligandum előállítása

A PC2A-NP előállítására vonatkozó reakciósémát a 11. ábrán mutatom be (közlésre előkészített adatok). A már publikált, további, a dolgozatban szereplő (PC2A-EA és PC2A-DPA) ligandumok szintéziseinek részletes leírása (receptek, NMR- és MS spektrumok) a dolgozat mellékletének részét képezik.



11. Ábra. A PC2A-NP ligandum előállításának sematikus ábrája

2-(6-((2-hidroxi-5-nitrobenzil)-3,9-bisz(2-nitrobenzilszulfonil)-3,6,9,15tetraaza-bicklo[9.3.1]pentadeka1(14),11(15),12-trién-6-il)) (10) előállítása

425 mg kiindulási makrociklust **(9)** (0,74 mmol) 40 mL diklórmetánban oldottam, majd frissen hevített Na₂CO₃-ot (10 ekv. 7,4 mmol, 780 mg) adtam hozzá. Ehhez csepegtettem az 2-hidroxi-5-nitrobenzilbromid (0,9 ekv. 0,67 mmol, 154,7 mg) 50 mL diklórmetánnal készült oldatát. HPLC vizsgálat alapján jellemzően egy csúcsot detektáltunk. NMR vizsgálat alapján a várt anyagra jellemző spektrumot kaptunk. Kitermelés: 97% (539 mg). ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 2,799 (t; 7,45 Hz; 4H) 3,340 (t; 6,84 Hz; 4H) 3,852 (s; 2H) 4,456 (s; 4H) 6,895 (d; 9,29 Hz; 1H) 7,381 (d; 7,92 Hz; 2H) 7,839 (t; 7,68; 1H) 7,919 (d; 2,75; 1H) 7,985 (d; 8,85 Hz; 4H) 8,162 (dd; 9,13 Hz; 1H) 8,390 (d; 8,83 Hz; 4H).

(6-((2-hidroxi-5-nitrobenzil)-3,6,9,15-tetraaza-bicklo [9.3.1]pentadeka-1(14),11(15),12- trién-3,9-diil) (11) előállítása¹³⁴

A makrociklust **(10)** (539 mg, 0,74 mmol) 20 mL vízmentes DMFben oldottam és vízmentes K₂CO₃-ot adtam hozzá (8 ekv., 5,9 mmol, 810 mg), majd lassan tiofenolt (2,9 ekv., 2,2 mmol, 216 μ L). Két óra elteltével HPLC technikával ellenőriztük a reakciót, ahol sem a kiindulási anyagra, sem a tiofenolra jellemző csúcsot nem láttunk. Az reakcióelegyet bepároltam, majd diklórmetánban oldottam és vízzel mostam. A szerves fázist bepároltam, majd víz:ACN 2:5 elegyben oldottam be (7 mL), és preparatív HPLC-s technikával tisztítottam. Az elválasztás után a kitermelés 34 % (88 mg, 0,25 mmol). ¹H-NMR (CD₃CN, 360 MHz): δ (ppm) 3,593 (s; 4H) 3,864 (s; 2H) 4,382 (s; 4H) 4,789 (s; 4H) 7,123 (d; 7,74 Hz; 1H) 7,501 (d; 8,30 Hz; 2H) 8,038 (t; 7,88; 1H) 8,223 (m; 2H).

(6-((2-hidroxi-5-nitrobenzil)-3,6,9,15-tetraaza-bicklo[9.3.1] pentadeka-1(14),11(15),12- trién-3,9-diil)diacetát (12) előállítás

A preparatív HPLC-vel tisztított kiindulási anyagot (11) (88 mg, 0,25 mmol) 20 mL vízmentes tetrahidrofuránban oldottam és trietil-amint adtam hozzá (8 ekv. 2 mmol, 282 μ L). Ehhez az elegyhez 60 °C-on csepegtettem az etilbrómacetát (1 ekv. 0,25 mmol, 28 μ L) vízmentes tetrahidrofurános oldatát (10 mL). Az oldószer vákuumban történő eltávolítása után a visszamaradt anyagot ACN:víz 1:1 arányú elegyében oldottam és preparatív HPLC-s technikát alkalmazva tisztítottam 44 %-os kitermelést eredményezve. (60,7 mg; 0,11 mmol). ¹H-NMR (CD₃CN; 360 MHz): δ (ppm) 1,319 (t; 5,59 Hz; 6H) 3,362 (s; 12H) 4,214 (k; 6,58 Hz; 8H) 4,517 (s; 2H) 7,269 (d; 7,83 Hz; 1H) 7,348 (d; 8,44 Hz; 2H) 7,937 (t; 8,28 Hz; 1H) 8,390 (d; 2,68 Hz; 1H).

2,2'-(6-(2-hidroxi-5-nitrobenzil)-3,6,9,15-tetraaza-bicklo [9.3.1]pentadeka-1(14),11(15),12-trién3,9-diil)diecetsav (13) előállítása

170 mg kiindulási észterszármazékot **(12)** (0,32 mmol) oldottam 10 mL etanolban, és 51,2 mg nátrium-hidroxidot (4 ekv., 1,28 mmol) adtam hozzá. Analitikai HPLC-vel követtem a reakciót: 10 perc elteltével a kromatogramon még látható volt a kiindulási anyagra jellemző csúcs, azonban a 60 °C-on 30 perc elteltével egy újabb HPLC vizsgálat után a kromatogramon nem volt detektálható a kiindulási anyagra jellemző csúcs. Ezt követően az oldószert eltávolítottuk rotációs vákuumbepárlóval. Kitermelés: 97%. (0,31 mmol, 146,8 mg) ¹H-NMR (D₂O; 360 MHz): δ (ppm) 3,533 (ds; 4H) 3,846 (ds; 4H) 4,103 (s; 2H) 4,680 (s; 4H) 4,753 (s; 4H) 7,057 (d; 7,57 Hz; 1H) 7,564 (d; 6,99 Hz; 2H) 8,127 (t; 7,43 Hz; 1H) 8,223 (dd; 8,12 Hz; 1H) 8,320 (d; 2,88 Hz; 2H). ¹³C-NMR (D₂O; 360 MHz): δ (ppm) 50,365; 52,376; 52,731; 56,564;

58,820; 116,532; 120,827; 127,241; 128,690; 140,211; 142,365; 150,723; 161,986; 170,824.

IV.2. Egyensúlyi vizsgálatok

IV.2.1. pH-potenciometria

A vizsgált ligandumok protonálódási állandóit, valamint a velük kialakuló fémkomplexek protonálódási- és stabilitási állandóit pH-potenciometriás módszer segítségével tanulmányoztam. A protonálódási folyamatokat a következő egyenletekkel jellemezhetjük (a töltések jelölésétől eltekintünk):

$$H_{i-1}L + H \Longrightarrow H_iL \tag{3}$$

$$K_{i}^{H} = \frac{[H_{i}L]}{[H_{i-1}L][H^{+}]}$$
 $i = 1, 2, 3...$ (4)

Különböző összetételű komplexek képződési viszonyait, valamint a stabilitási szorzatait az alábbi egyenletek írják le:

$$pM^{n^+} + qH^+ + rL^{m^-} \iff M_p H_q L_r^{pn+q-rm}$$
(5)

$$\beta_{pqr} = \frac{\left[M_{p}H_{q}L_{r}^{pn+q-rm}\right]}{\left[M^{n+}\right]^{p}\left[H^{+}\right]^{q}\left[L^{m-}\right]^{r}}$$
(6)

A kiértékelések során nem csak 1:1 fém:ligandum arányú rendszereket, hanem 2:1 arányúakat is feltételeztünk, mivel kétmagvú komplexek képződésére is lehet számítani. A fémkomplexek képződési folyamatait az alább feltüntetett egyenletekkel írhatjuk le:

$$M+L \rightleftharpoons ML$$
 (7)

$$K_{\rm ML} = \frac{[\rm ML]}{[\rm M][\rm L]} \tag{8}$$

$$H+MH_{i-1}L \iff MH_iL \tag{9}$$

$$K_{\rm MH_{i}L} = \frac{[\rm MH_{i}L]}{[\rm MH_{i-1}L][\rm H^{+}]} \quad i = 1, 2, 3...$$
(10)

$$ML(OH) + H \iff ML + H_2O$$
(11)

$$K_{\text{MLOH}} = \frac{[\text{ML}]}{[\text{ML(OH)}][\text{H}]}$$
(12)

$$K_{M_{2}L}^{OH} = \frac{[M_{2}L(OH)][H]}{[M_{2}L]}$$
(13)

$$K_{M_2(OH)L}^{OH} = \frac{[M_2L(OH)_2][H]}{[M_2(OH)L]}$$
(14)

Méréseink kivitelezéséhez Methrohm 888 Titrando automata bürettát használtunk Metrohm-6.0233.100 kombinált üvegelektróddal felszerelve. Az állandó (25,0 °C) hőmérsékletet termosztát segítségével biztosítottuk, minden minta mágneses keverő alkalmazásával volt kevertetve, valamint folyamatosan áramló N₂ gázzal biztosítottuk az inert atmoszférát. A titrálásokhoz használt 0,2 M NaOH oldat pontos koncentrációját kálium-hidrogén-ftalát oldattal határoztuk meg. Az elektród kétpontos kalibrációját kálium-hidrogén-ftalát-(pH = 4,002; 0,05 M) és nátrium-tetraborát-oldatok segítségével (pH = 9,177; 0,01 M) végeztük el. Az ionerősséget 0,15 M koncentrációra állítottuk be NaCl oldat segítségével.

A minták térfogata 5 – 6 mL volt és a ligandum/komplex koncentrációja 2 – 3 mM között változott. A ligandum oldatok koncentrációját minden esetben pH-metriás módszerrel határoztuk meg. A komplexek titrálásakor a fémion:ligandum arány 1:1 és, ahol lehetőség volt kétmagvú komplex képződésére, 2:1 volt.

A mért és számolt pH-értékek különbségéből számítható korrekciós faktort Irving¹³⁵ és munkatársai által javasolt módszerrel határoztuk meg. Ekkor egy 0,01 M sósav oldatot (I = 0,15 M NaCl) ismert koncentrációjú NaOH oldattal titráltunk. Az Irving faktor értékét a savas tartomány térfogatpH értékeiből, míg a vízionszorzatot (K_w) pedig ugyanezen titrálás pH = 10,8 – 12,0 közötti értékeiből számítottuk a PSEQUAD program segítségével.¹³⁶ Az eloszlásgörbék szerkesztéséhez a MEDUSA programot használtunk.

IV.2.2. ¹H-relaxometria

Abban az esetben, ha a komplexképződés már a pH-potenciometria adta pH-tartományon kívül, vagy a módszer adta időskálához képest lassabban játszódott le, más analitikai módszert (UV-látható spektrofotometria, ¹Hrelaxometria) hívtunk segítségül az egyensúlyi viszonyok tanulmányozására.

¹H-relaxometriás méréseket Bruker Minispec MQ20 és Bruker Minispec MQ60 készülékeken végeztünk állandó (25,0 vagy 37,0 °C) hőmérsékleten 0,49 és 1,41 T térerősségen. Az minták térfogata 0,3 vagy 0,4 mL volt változó komplexkoncentráció (0,2 – 1 mM) mellett. A T_1 relaxációs időket mágnesezettség inverzió módszerrel (180° – τ – 90° impulzus szekvenciával), a T_2 időket pedig CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) módszerrel határoztuk meg. Minden esetben csak azokat az értékeket vettük figyelembe, ahol a mérési hiba 1 %-on belül esett. A jelintenzitás – τ görbe exponcenciális, amelyből az alábbi egyenletre történő illesztés megadja a T_1 időket:

$$M_{\rm z} = M_{\rm o} \left(1 - \mathrm{e}^{-\tau/T_{\rm I}} \right) \tag{15}$$

ahol M_0 és M_z a 0 és a τ időt követő mágnesezettség.

A HSA-val való kötődési viszonyok tanulmányozása esetén a Terreno és munkatársai által javasolt módszert követtük,¹³⁷ amely esetben 8 mintát vizsgáltunk, ahol a Mn – Zn kétmagvú komplex koncentrációja 0,2 mM volt, változó HSA koncentráció mellett (0,1 – 2 mM). A közeg állandó pH-értékét HEPES puffer alkalmazásával biztosítottuk (pH = 7,4; c_{HEPES} = 20 mM). Emellett vizsgáltuk a [Mn(PC2A-DPA)]-komplex relaxációs paramétereit állandó [Zn(HSA)] (c = 0,8 mM), de változó komplexkoncentrációk mellett is pH=7,4 értéken.

A Ca²⁺-szenzor komplex makrociklusos modellvegyületeinek Gd³⁺-komplexei esetében szintén ¹H-relaxometriás módszert alkalmaztunk azok stabilitási állandóinak meghatározásához. A méréseket 0,49 T térerősségen, állandó 25,0 °C-on végeztük. 20-25 mintát készítettünk, ahol a komplex koncentrációja 1 mM, míg az ionerősség I = 0,15 M NaCl volt. A közeg állandó pH-ját vagy 0.15 mM koncentrációban NMP (N-metilpiperazin), vagy DMP (dimetilpiperazin) pufferrel biztosítottuk. A Gd³⁺-komplex lassú képződése miatt készítettünk egy komplex törzsoldatot, amelyet kiindulási oldatként használtunk a további minták elkészítéséhez. Az egyensúly beálltát követően (több nap) a *T*₁ idők rögzítésre kerültek.

IV.2.3. UV-látható spektrofotometria

A Cu²⁺-komplexek egyensúlyi vizsgálata során nem csak pH-potenciometriát, hanem UV-látható spektrofotometriás módszert is alkalmaztunk, amire a Cu²⁺-komplexek nagy látszólagos stabilitása miatt volt szükség. A méréseket egy termosztálható Cary 100 Bio UV-látható spektrofotométerrel végeztük. A pH-potenciometriás és UV-látható spektroszkópiás adatok kiértékelése párhuzamosan történt, a PSEQUAD program segítségével.

A PC2A-EA Cu²⁺-komplexének esetén a látszólagos stabilitási állandó meghatározáshoz kompetíciós módszert alkalmaztunk, ahol kicserélő ligandumként ciklént használtunk. 5 mintát készítettünk, ahol a Cu²⁺-ion és a ligandum koncentrációja megegyezett (2 mM), de a ciklént 1-20-szoros feleslegben tartalmazta. A pH állandó értéken tartására 50 mM NMP (pH = 4,8) puffert alkalmaztunk, az ionerősség pedig I = 0,15 M NaCl volt. T = 25,0 °C-on vettük fel a minták spektrumait $\lambda = 500-800$ nm között. A [Cu(L)] moláris abszorpciós koefficiensei is (beleértve azok protonált komplexeit) meghatározásra kerültek és a számolás során rögzítve voltak.

A makrociklusos vegyületek Cu²⁺-komplexe esetén (DO3A-EAMA és DO3A-PAMA) 9-12 darab egyedi minta készült, ahol a komplex koncentrációja 2 mM volt, míg a minták savkoncentrációja 0,05 – 1,0 M között változott. A moláris abszorpciós koefficienseket az $\lambda = 570 - 770$ nm közötti hullámhossz tartományból határoztuk meg.

IV.2.4. ¹*H*-*NMR*

Ahhoz, hogy meg tudjuk határozni a PC2A-EA ligandum protonálódási szekvenciáját, ¹H-NMR titrálást végeztünk. Egy ismert mennyiségű ($1,2 \times 10^{-5}$ mol) liofilizált mintát oldottunk fel D₂O-ban és 12,2es induló pH-ról pH = 6-ig összesen 19 darab ¹H-NMR spektrumot rögzítettünk. A spektrumokat MESTRENOVA program segítségével értékeltük ki.

IV.3. ¹H-relaxometria, *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok

A PC2A-EA ligandum esetén a pH-relaxivitás függést Seronorm (liofilizált vérszérum) és HSA jelen- és távollétében is vizsgáltuk. A Mn²⁺-komplex relaxometriás titrálását a savas tartományból a lúgos felé haladva végeztük el oly módon, hogy a pH-értékek beállításához tömény NaOH oldatot alkalmaztunk, gyors kevertetés mellett, hogy elkerüljük a lokális Mn(OH)² képződést, ami a Mn²⁺ oxidációjához vezethet. Azon minták esetében, ahol a HSA-val való kölcsönhatást vizsgáltuk, a komplex koncentrációja 0,2 mM, míg a HSA koncentrációja 0,7 mM volt. Az ionerősséget minden esetben 0,15 M-ra (NaCl) állítottuk. 50 mM HEPES puffer használata mellett a pH-t HCl gőzzel vagy tömény NaOH-oldattal állítottuk. 10 mérési pontot készítettünk a már említett két készülékkel (0,49 és 1,41 T térerő; 25,0 és 37,0 °C).

Vizsgáltuk a [Mn(PC2A-EA)]-komplex viselkedését Seronormban. A vásárolt Seronormot a gyártó ajánlása szerint 5 mL oldatban alkalmaztuk, az oldat koncentrációja a komplexre nézve 1 mM volt (10% ligandumfelesleg alkalmazása mellett). A mintákat 0,49; 1,41 illetve 3 T térerőn, 25,0 és 37,0 °C-on is vizsgáltuk.

Vizsgáltuk a [Mn(PC2A-DPA)] komplex kölcsönhatását HSAmolekulával 1,41 T térerőn, 37,0 °C-on, 50 mM HEPES puffer használata mellett pH = 7,4-en. Egy mérési sorozat készült állandó (0,1 mM) komplexkoncentráció, de változó (0,1 – 2,0 mM) HSA koncentráció mellett. A másik mérési sorozat ennek ellentettje volt, állandó HSA koncentráció mellett (0,8 mM) változtattuk a komplex koncentrációját (0,2 – 2,0 mM). Vizsgáltuk továbbá a [Mn(PC2A-DPA)Zn]²⁺-komplex (c = 0,2 mM) és a HSA kölcsönhatását növekvő HSA koncentráció (0,1 – 2,0 mM) esetén is. Mérések történtek még olyan körülmények között is, ahol a [Zn(HSA)]-adduktot (c = 0,8 mM) titráltuk [Mn(PC2A-DPA)]-komplexxel (0,1 – 6,0 mM).

A [Mn(PC2A-DPA)]-komplex esetén vizsgáltuk a komplex relaxivitását változó Zn²⁺-ion koncentráció (0-fél-egy-két ekvivalens Zn²⁺) mellett. Minden Zn²⁺-koncentrációnál 4 mintát készítettünk, ahol a komplex koncentrációja 0,2; 0,4; 0,8 és 1,2 mM volt, a pH-t 50 mM HEPES puffer segítségével tartottuk 7,4-értéken. A méréseket 1,41 T térerőn és 37,0 °C-on végeztük.

Hasonlóan az előzőekben részletezettekhez, itt is vizsgáltuk a [Mn(PC2A-DPA)]- és a [Mn(PC2A-DPA)Zn]-komplex relaxációs viselkedését Seronormban. Itt lehetőségünk volt nemcsak humán, hanem nyúlszérumban is vizsgálatokat végezni. A méréseket 3 T térerőn, pH = 7,4-en végeztük állandó 25,0 °C-on ($c_{komplex} = 0,2$ mM). Nyúlszérummal további vizsgálatokat is kiviteleztünk 0,49 és 1,41 T térerőn, 25,0 és 37,0 °C-on ($c_{komplex} = 1$ mM).

A DO3A-EAMA és DO3A-PAMA ligandumok Gd^{3+} -komplexei esetén relaxometriás módszerrel határoztuk meg a stabilitási állandókat Bruker Minispec MQ20 készülékkel (0,49 T; 25,0 °C). A komplexek lassú képződése miatt a következő módon jártunk el: a ligandumoldatok pH-ját 8,5 értékre állítottuk és gyors kevertetés mellett adtuk hozzá a Gd^{3+} -oldatot, majd az egyensúly beállta után a komplex törzsoldatot pH = 6,0 értékre állítottuk be. Ezt a törzsoldatot használtuk a minták elkészítéséhez. A 20-25 db mintában a komplex koncentrációja 1 mM volt, pH = 3-10 tartományban, amit NMP és DMP pufferek segítségével tartottunk állandó értéken, ionerősségként pedig 0,15 M NaCl-t alkalmaztunk.

A fantom MRI minták, illetve a kisállatkísérletek méréseit a klinikumban és a preklinikumban is alkamazott Philips Achivea 3T, Siemens Magnetom Essenza 1,5 T, Mediso NanoScan PET/MRI 1 T validált MR műszereken végeztük el, 1 T, 1,5 T és 3 T térerősségeken. A fantom MRI mérések által kapott képeket MATLAB (MathWorks) szoftverrel értékeltük ki. Az állatkísérleteket az Európai Uniós és a magyarországi törvényeknek megfelelően a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága regisztrálta (10/2019/DEMÁB). A kísérletben résztvevő egereket (n = 12 db) légkondicionált szobában (26 ± 2 °C) és 55 \pm 10 % páratartalom mellett, 12 órás cirkadián megvilágításban konvencionális állatházban tartották. A [Mn(PC2A-DPA)]-komplexet farokvénás injektálással 0,1 mmol/ttkg dózisban juttattuk a szervezetükbe, 50 µL 20 %(m/m) D-glükóz oldat intraperitoneális injektálása nélkül vagy mellett. Minden egeret hat alkalommal vizsgáltunk: natív, a komplex injektálása, valamint D-glükóz oldat injektálása után, minden esetben T_1 és T_2 képeket készítve. A felvételek a preklinikumban is használt nanoScan PET/MRI 3T (Mediso Ltd., Magyarország) készüléken készültek, kiértékelésükhöz InterView™ FUSION (Mediso Ltd., Magyarország) szoftvert alkalmaztunk.

IV.3.1.¹⁷O-NMR spektroszkópia

A ¹⁷O-NMR spektroszkópia kiváló lehetőséget biztos arra, hogy vizsgáljuk különböző paramágneses komplexek belső szférás vízmolekulái és az oldószer (bulk) vízmolekulái között fellépő cserefolyamatokat. ¹⁷O-NMR (9,4 T) spektroszkópiás mérésekhez Gale és munkacsoportja által javasolt módszert¹³⁸ alkalmaztuk, az adatok kiértékeléséhez a Swift-Connick egyenleteket használtuk (lásd melléklet).¹³⁹ A vizsgálatokat a 0 – 75 °C hőmérséklet tartományban végeztük olyan geometriával rendelkező NMR csőben, ami egy 10 mm átmérőjű gömbben végződik. Diamágneses

referenciának HClO₄ oldatot használtunk (pH = 3,3). A minták a Mn²⁺komplexet 1 mM koncentrációban tartalmazták különböző pH-értékeken (részletezve az eredmények és értékelésük fejezetben). A mérés érzékenységének növelésére 2% H₂¹⁷O-t (10% H₂¹⁷O, NUKEM) is adtunk a mintákhoz. Az illesztésekhez Micromath Scientist programot használtunk.

IV.4. Kinetikai vizsgálatok

A pszeudo-elsőrendű reakciók disszociácó sebességét általánosan az alábbi egyenlet írja le:

$$-\frac{d[ML]_{t}}{dt} = k_{obs}[ML]_{tot}$$
(16)

ahol a k_{obs} a pszeudo-elsőrendű sebességi állandó, a *tot* alsó index teljes, míg a *t* alsó index a komplex adott időpillanatbeli koncentrációját jelenti.

IV.4.1. UV-látható spektrofotometria §

A pszeudo elsőrendű sebességi állandókat a következő egyenlettel számítottuk a mérések során kapott idő-abszorbancia adatpárokból:

$$A_{t} = (A_{r} - A_{v})e^{(-k_{obs}t)} + A_{v}$$
(17)

ahol a \mathbf{t} az adott időpillanatban mért, az \mathbf{r} a reaktánsok, a \mathbf{v} a végtermék abszorbanciája.

A komplexek disszociációját jellemző sebességi paraméterek meghatározása után minden esetben kiszámítottuk a komplexre jellemző

[§] A komplex disszociációjára jellemző lehetséges reakcióutakat, valamint a sebességi állandók számítására használt egyenletet a dolgozat mellékletének X.1.2 alfejezetében mutatom be.

felezési időket fiziológiás körülményekre vonatkoztatva (pH = 7,4; $c_{M^{2+}} = 0,01 \text{ mM}$) az alábbi egyenlet alapján:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{\rm obs}}$$
(18)

A [MnH(PC2A-EA)]⁺-komplex inertségét UV-látható spektrofotmetriás (Cary 100 BIO UV-Vis) módszerrel, fémcserereakción keresztül vizsgáltuk. Ezekben a reakciókban a komplex koncentrációja 0,2 mM, a Cu²⁺ kicserélő fémioné annak 10-40-szeres feleslege volt, így biztosítva a pszeudo-elsőrendű feltételeket. Ionerősségként 0,15 M NaCl-t használtunk, a hőmérsékletet állandó 25,0 °C-on tartottuk, a minták pH-értéke pedig a 2,2-3,4 tartományban változott, amit 50 mM monoklór-ecetsav puffer biztosított.

A [Gd(DO3A-PAMA)] és [Gd(DO3A-EAMA)]-komplexek fémcsere reakcióit hasonló elv szerint vizsgáltuk 300 nm hullámhosszon pH = 3,6-5,3között, amely pH-értékeket 30 mM koncentrációban NMP és DMP pufferrel biztosítottuk. A komplex koncentrációja 0,1 mM volt *I* = 0,15 M NaCl mellett, a hőmérséklet pedig állandó 25,0 °C.

IV.4.2. ¹H-relaxometria

Relaxometriás módszerrel követtük a [Mn(PC2A-NP)]-komplex Zn^{2+} -ionnal történő kicserélődési reakcióit pH = 3,5 – 4,9 között, 25,0 °C hőmérsékleten 0,49 T térerőn. A Zn^{2+} -ion feleslege minden esetben húszszoros volt 0,5 mM komplexkoncentráció mellett. A pH állandó értéken tartásáról 50 mM DMP pufferrel gondoskodtunk.

Az irodalomban fellelhető adatokkal való könnyebb összehasonlíthatóság végett a Mn²⁺-komplexek esetén vizsgáltuk a komplexek inertségét a Caravan és munkacsoportja által javasolt módszerrel is.¹⁴⁰ A módszer általános leírása szerint a komplexek koncentrációja 1 mM, a Zn^{2+} -iont pedig 25 mM koncentrációban alkalmazzuk. A méréseket 1,41 T térerőn és pH = 6,0 értéken hajtottuk végre 50 mM MES puffer használatával.

A kinetikai mérések eredményeit Micromath Scientist programmal értékeltük ki.

V. Eredmények és értelmezésük

V.1. A ligandumok előállításainak ismertetése

V.1.1. A pH-szenzornak szánt ligandumok előállítása

V.1.1.1. A PC2A-EA ligandum szintézise

A PC2A-EA ligandum előállítását a 12. ábrán lévő reakciósémának megfelelően végeztük el. A reakciósor első lépésében a TREN (1) egyik primer aminocsoportjának Boc-csoporttal (2), másik két primer aminocsoportjának pedig *p*-nozilcsoporttal (3) történő védését hajtottuk végre. Ezt követően a templát reakcióban kialakítottuk a makrociklust 2,6-bisz(klórmetil)piridin alkalmazásával (4). A *p*-nozilcsoport szelektív hasítása után (5) cianometilcsoportokon keresztül (6) kialakítottuk a metilkarboxilátcsoportokat (7). Az analitikai tisztaság elérése céljából a PC2A-EA nyersterméket preparatív HPLC segítségével tisztítottuk.



12. Ábra. A PC2A-EA ligandum szintézisútvonala

V.1.1.2. A PC2A-NP ligandum szintézise

A PC2A-NP ligandum előállításának lépéseit a 13. ábrán mutatjuk be. A (8) számmal jelzett makrociklust Siaugue és csoportja által javasolt módon állítottuk elő.¹⁴¹ A Boc-védőcsoport szelektív hasítása (9) után a makrociklus szabad nitrogénatomjának alkilezését 2-hidroxi-5-nitrobenzil-bromiddal végeztük el (10). Ezt a lépést a *p*-nozilcsoportok eltávolítása (11), majd az így szabaddá váló makrociklusos nitrogénatomok etil-brómacetáttal való alkilezése (12) követte. Utolsó lépésben az észtercsoportok bázikus hidrolízisét (13) hajtottuk végre és az analitikai tisztaságú végterméket, mint az előzőekben, preparatív HPLC technika segítségével nyertük ki.



13. Ábra. A PC2A-NP ligandum szintézisútvonala

A 13. ábrán jelzett (9) ligandum szintézise analóg a PC2A-EA ligandum során alkalmazott szintetikus eljárással, annyi módosítással, hogy ebben az esetben kiindulási vegyületként nem trisz(2-aminoetil)amint, hanem dietilén-triamint használtam.

V.1.2. A Zn²⁺-szenzornak szánt ligandumok előállítása

V.1.2.1. A PC2A-DPA ligandum szintézise

A PC2A-DPA ligandum szintézisének útvonalát a 14. ábrán mutatjuk be. A reakciósor kiindulási makrociklusát Marín és munkacsoportja által javasolt módon szintetizáltuk.¹⁴² A tozilcsoportok hasítása után **(15)** a molekula primer aminocsoportján ftálimid védőcsoportot alkalmaztunk **(16)**. Ezt követően a makrociklus nitrogénatomjainak alkilezése következett *terc*butil-brómacetát használatával, majd eltávolítottuk a ftálimid védőcsoportot hidrazint alkalmazva (17). Az íly módon szabaddá vált primer aminocsoporton alakítottuk ki a későbbi, szenzor funkcióért felelős DPA molekularészletet (18). Végső lépésben az észterhidrolízis következett lúgos körülmények között (19), majd az előzőekhez hasonlóan itt is preparatív HPLC-s technikával tisztítottuk a nyersterméket.



14. Ábra. A PC2A-DPA ligandum szintézisútvonala

V.2. Gd³⁺-ion alapú, Ca²⁺-szenzitív MRI kontrasztanyag-jelölt modellvegyületei vizsgálata

V.2.1. A DO3A-EAMA és a DO3A-PAMA ligandumok és komplexeik egyensúlyi vizsgálata

Kutatómunkám ebben a témában két, Ca²⁺-szenzitív kontrasztanyag előállítására alkalmas ligandum (15. ábra) modellvegyületeinek, a DO3A-EAMA és DO3A-PAMA komplexképzők koordinációs kémiai vizsgálatára fókuszált. A modellvegyületek vizsgálata során kapott eredmények segítségével jól becsülhetőek a Ca²⁺-szenzornak szánt ligandum koordinációs kémiai paraméterei.



15. Ábra. A DO3A-EAMA és DO3A-PAMA kelátorok, illetve a belőlük származtatott Ca²⁺-ion szenzitív kontrasztanyag-jelölt ligandumok szerkezetei

Mind a két ligandum (DO3A-EAMA és DO3A-PAMA) esetében meghatároztuk azok protonálódási állandóit pH-potenciometriás módszer segítségével. A kapott eredményeket az 1. táblázatban mutatjuk be, összehasonlítva azokat a DO3A és DOTA ligandumok protonálódási állandóival.

Ligandum	DO3A-	DO3A-	DO3A	DO3A ^[a]	DOTA ^[a]
	PAMA	EAMA			
$\log K_1$	9,59(4)	9,23(1)	10,71	11,99	11,41
logK ₂	9,37(2)	9,03(3)	9,49	9,51	9,83
logK3	7,45(4)	8,08(2)	4,17	4,30	4,38
logK4	3,81(5)	4,29(3)	3,55	3,63	4,63
logK5	2,64 (1)	2,74(2)	1,75	1,84	1,92
logK ₆	-	1,45(2)	-	-	1,58
$\sum_{i=1}^{n} \log K_i^{H}$	32,86 (n = 5)	35,54 (n = 6)	29,67 (n = 5)	31,27 (n = 5)	33,75 (n = 5)
$\log \beta_{\rm mc}^{[b]}$	18,96	18,26	20,20	21,50	21,24

1. Táblázat. A DO3A-PAMA, DO3A-EAMA, DO3A és a DOTA ligandumokat jellemző protonálódási állandók (T = 25,0 °C, I = 0,15 M NaCl)

[a] 0, $\overline{1}$ M KCl¹⁴³ [b] a makrociklust jellemző bázicitás, $\log K_1 + \log K_2$

Az 1. táblázat adataiból látszik, hogy hasonló módon a DOTA és DO3A lingadumokhoz, az első két protonálódási folyamat pH = 9 felett megy végbe és a makrociklus egymáshoz képesti *transz*-helyzetű nitrogénatomjaihoz rendelhető.¹⁴⁴ A harmadik protonálódási állandóban viszont szembeötlő a különbség, hiszen míg a DOTA és DO3A ligandumok esetén ezek az értékek karboxilát csoportokhoz, addig az általunk vizsgált ligandumok esetében az oldalláncban található aminocsoportokhoz tartoznak. A DO3A-EAMA esetében a hatodik protonálódási állandó a makrociklus egy harmadik nitrogénatomjának protonálódását jellemző érték lehet.

Ha összehasonlítjuk a DO3A-EAMA és DO3A-PAMA első és második protonálódási állandóját az látható, hogy ezek az értékek a DO3A-PAMA esetén rendre nagyobbak. Ez annak a következménye, hogy a makrociklus nitrogénatomjához egy metilén-egységgel hosszabb oldallánc kapcsolódik, mint a DO3A-EAMA esetén, így az oldalláncban található amidcsoport elektronszívó hatása kevésbé tud érvényesülni. Az eltérő protonálódási állandókban szerepe lehet még a gyűrű nitrogének és a karboxilát oxigének között kialakuló H-kötések erősségének is, amelyek közvetlen hatással bírnak az ionerősségként alkalmazott Na⁺-ionok és a ligandumok között lejátszódó komplexképződési folyamatokra is. Értelemszerűen ebben a ligandum donoratomjaiért folytatott versengő reakcióban egy zártabb koordinációs kalitka kedvezőbb környezetet teremt a fémion számára.

A ligandumok összbázicitásának értéke arányos a ligandumok különböző fémionokkal alkotott komplexeinek stabilitási állandóival. Ugyanakkor azt is elmondhatjuk, hogy az összes protonálódási folyamatra kapott állandó összegzése is félrevezető lehet, hiszen a fémionhoz nem koordinálódó oldalláncbeli csoportokhoz rendelhető protonálódási folyamatok nincsenek (jelentős) hatással a komplexképződésre. Ezen okból kifolyólag csak a log β_{mc} értékeket érdemes esetünkben összehasonlítani, amelyeket az 1. táblázat utolsó sorában tüntettünk fel. Mivel a bázicitás értékek kisebbek az összehasonlító ligandumok értékeinél, így joggal feltételezhetjük, hogy a stabilitási állandók értékei is kisebbek lesznek.

A következő lépésben meghatároztuk a ligandumok különböző fémionokkal (Ca²⁺; Mg²⁺; Zn²⁺; Cu²⁺ és Gd³⁺) alkotott komplexeinek protonálódási és stabilitási állandóit, amely eredményeket a 2. táblázat foglalja magába. Cu²⁺-komplexek esetén a pH-potenciometria mellett spektrofometriás módszert alkalmaztunk a komplex állandóinak meghatározására, mivel a komplexképződési folyamat a pH-potenciometria alkalmazhatóságának pH-intervallumán kívül (pH<1,7) már lejátszódott. A Gd³⁺-komplex esetén – annak lassú képződése miatt – különmintás módszerrel dolgoztunk (egyedi minták készítése, lásd IV.2.3 fejezet) és mind a pH-, mind az ¹H-relaxivitás értékeket mértük az egyensúly beállását követően (T = 25,0 °C, monitorozás több héten keresztül, lásd. IV.2.2 és IV.2.3 fejezetek).

2. Táblázat. A DO3A-PAMA, DO3A-EAMA ligandumok komplexeinek egyensúlyi állandói, összehasonlítva a DO3A és DOTA komplexeit jellemző értékekkel (T = 25,0 °C, I = 0,15 M NaCl)

Ligandum	DO3A- PAMA	DO3A- EAMA	DO3A ^[a]	DOTA ^[a]
logK _{MgL}	7,23(5)	6,54(4)	11,64	11,49
$\log K_{ m MgHL}$	7,92(6)	7,99(5)	_	_
${ m log}K_{ m CaL}$	10,13(7)	9,02(7)	12,57	16,11
${ m log}K_{ m CaHL}$	7,53(4)	7,97(4)	4,60	
$\log K_{ZnL}$	16,84(9)	15,9(2)	21,57	20,21
$\log K_{\rm ZnHL}$	7,89(5)	7,79(9)	3,47	_
$\log K_{ZnH2L}$	3,84(4)	4,18(5)	2,07	
$\log K_{\text{ZnH3L}}$	2,95(2)	3,81(2)	_	_
$\log\!K_{ m CuL}$	20,54(8)	20,38(3)	25,75	24,83 ^b
$\log\!K_{ m CuHL}$	7,67(4)	7,72(2)	3,65	
$\log K_{ m CuH2L}$	3,59(2)	4,11(2)	1,69	_
$\log K_{ m CuH3L}$	1,59(2)	2,88(2)	—	_
$\log K_{ m CuH4L}$	_	1,76(3)	_	
$\log K_{\mathrm{GdL}}$	13,89(4)	14,59(5)	$ 21,56 \\ (19,06(4))^{[b]} $	24,70
$\log K_{\rm GdHL}$	8,09(9)	7,66(6)	_	_
$\log K_{\text{GdLH-1}}$	11,64(5)	9,09(6)	—	_

[a] Ref¹⁴³ I = 0,1 M KCl; [b] I = 0,15 M NaCl¹²⁶

A Ca²⁺- és Mg²⁺-komplexek esetén elmondható, hogy azok stabilitási állandói elmaradnak az összehasonlításban használt ligandumok komplexeinek állandóitól. Ez egyrészt annak köszönhető, hogy csökkent a ligandumok bázicitása, másrészt az általunk vizsgált ligandumok koordinációs kalitkái nagyobb flexibilitással is rendelkezhetnek a hosszabb oldallánc mozgásának eredményeként. Továbbá, az amid oldallánc hosszának növelése is negatívan befolyásolhatja a stabilitást, bár a ligandumok harmadik és a komplexek első protonálódási állandóját összevetve (amely mindkét esetben a kar amin nitrogénjéhez rendelhető) nem tapasztalunk jelentős különbséget, ami azt jelenti, hogy a kar amin nitrogénje eleve nem koordinál a fémionhoz.

A kialakuló Cu²⁺ és Zn²⁺-komplexek esetében azt láthatjuk, hogy azok stabilitási állandói kisebbek, mint az összehasonlításhoz használt megfelelő komplexeké, ez a ligandumok összbázicitásának csökkenésével magyarázható. Hasonlóan az előző bekezdésben taglaltakhoz, az oldalláncban található amin nitrogén ez esetben sem koordinálódik a fémionhoz, ami nem meglepő, hiszen a gyűrű nitrogének és az acetát oxigén eleve telíti a fémionok koordinációs szféráját. Ez magyarázatot adhat arra, hogy nincs jelentős különbség a két komplex (oldalláncban etilén, illetve propilén linkert tartalmazó) stabilitási állandója között.

Ahhoz, hogy a Gd³⁺-ionnal alkotott komplexek egyensúlyi viszonyairól még pontosabb képet kapjunk, a pH-potenciometriás adatokat ¹H-relaxometriás mérésekkel egészítettük ki, így a különmintákra kapott adatsorok egyesítésével csökkenteni tudtuk a meghatározott állandók bizonytalanságát, valamint az előre elkészített komplexoldatok direkt pH-potenciometriás titrálásával a komplex protonálódási folyamatait is jellemezni tudtuk. Az adatok szimultán illesztése során meghatároztuk a komplexek stabilitási- és protonálódási állandóit. Ahogy a 16. és 17. ábrán bemutatott eloszlási diagramokon is látható, a rendszerek leírhatóak egymagvú, protonált, illetve vegyes hidroxo-komplexek feltételezésével.

Mindkét vizsgált ligandum Gd³⁺-komplexének esetében látható, hogy azok stabilitási állandói rendre kisebb értékek, mint azt az összehasonlítási alapként szolgáló ligandumok komplexeit jellemző értékek. Ennek az lehet az oka, hogy csökkentve a töltéssel rendelkező donoratomok számát a [Gd(DOTA)]⁻-komplexet jellemző kompakt szerkezet megbomlik, másrészről

az irodalomban ismert^{145–147}, hogy ha egy metilkarboxilát-csoportot egy etilpropilamid-csoporttal helyettesítünk, az a stabilitási állandó vagy csökkenéséhez vezet. A [Gd(DO3A-EAMA)]-komplex esetében az amid-típusú oxigén donoratom koordinációjával megvalósuló kelátgyűrű tagszáma 6, míg a [Gd(DO3A-PAMA)]-komplex esetében 7, ez a változás meg is mutatkozik a stabilitási állandó értékeiben a [Gd(DO3A-EAMA)]-komplex javára. Összehasonlítva a ligandumok oldalláncában található aminocsoport $(\log K_3)$ és a komplexek protonálódási állandóit, elhanyagolható különbséget találunk, ami arra enged következtetni, hogy az oldallánc amin-típusú nitrogénje bizonyára nem vesz részt a koordinációban.

Az eloszlási diagramok azt is megmutaták, hogy a komplexek látszólagos stabilitása is kicsi, hiszen a komplexképződés csak pH = 6 fölött válik teljessé, illetve fiziológiás pH-értéken döntő többségben a komplexek protonált formája van jelen. A [Gd(DO3A-EAMA)]-komplex esetében a vegyes hidroxo-komplex képződése már pH = 7,5 érték körül elkezdődik, szemben a [Gd(DO3A-PAMA)(OH)]⁻-komplex képződését jellemző pH = 10 körüli értékkel.

V.2.2. A [Gd(DO3A-EAMA)]- és [Gd(DO3A-PAMA)]-komplexek relaxációs paramétereinek vizsgálata

Vizsgáltuk a Gd^{3+} -komplexek relaxációs sajátságait is, amely vizsgálatok eredményeit a 16. és 17. ábrán mutatjuk be. A nagy pH-értékeknél (pH > 10) mért kis relaxivitás értékek a rendszerben képződő vegyes hidroxokomplexek kis relaxáció növelő hatásának köszönhető.¹⁰⁴ Mind a két Gd^{3+} -komplex esetében jól látható, hogy a relaxivitás értékek pH = 10 alatt növekedésnek indulnak, összhangban az egyensúlyi modellel. [Gd(DO3A-EAMA)]-komplex esetében nehéz becsülni a komplex nem
protonált formájának relaxivitás értékét, mivel nincs olyan pH-tartomány, ahol [Gd(DO3A-EAMA)]-komplex dominánsan lenne jelen. Ellenben a а [Gd(DO3A-PAMA)]-komplex relaxivitása pH 10 körül jól mérhető, hiszen ebben a tartományban a deprotonált komplex a domináns részecske. Az itt mért relaxivitás érték $r_1 = 4.64 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, amely a belső koordinációs szférában egy vízmolekulát tartalmazó Gd³⁺-komplex jelenlétére utal.^{148,149} A q = 1 komplex kialakulása csak abban az esetben lehetséges, ha az oldallánc amidcsoportja koordinálódik a központi fémionhoz.150 Mindkét komplex esetében pH~6 értéken csaknem 100%-ban azok protonált formája van jelen, amelyeknek a relaxivitása [Gd(HDO3A-EAMA)]⁺-komplex esetében $r_1 = 7.23 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nek és [Gd(HDO3A-PAMA)]⁺-komplex esetében $r_1 = 8,75 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nek adódott, ami a kis molekulatömegű és belső koordinációs szférájukban két vízmolekulát tartalmazó Gd³⁺-komplexekre jellemző. pH<6 esetében a komplex disszociációja figyelhető meg az ezzel együttjáró relaxivitás érték növekedésével, míg el nem érjük a szabad Gd³⁺-ion relaxivitását, $r_1 > 14 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$.



16. Ábra. A [Gd(DO3A-EAMA)] rendszerben képződő komplexek koncentráció eloszlási görbéi és relaxivitásának változása a pH-függvényében ($c_M : c_L = 1: 1, 0,49 \text{ T}, I = 0,15 \text{ M}$ NaCl, 25,0 °C)



17. Ábra. A [Gd(DO3A-PAMA)] rendszerben képződő komplexek koncentráció eloszlási görbéi és relaxivitásának változása a pH-függvényében ($c_M : c_L = 1: 1, 0,49 \text{ T}, I = 0,15 \text{ M}$ NaCl, 25,0 °C)

V.2.3. A [Gd(DO3A-EAMA)]- és [Gd(DO3A-PAMA)]-komplexek kinetikai inertségének vizsgálata

Ahogy azt már korábban tapasztalták, a DO3A ligandum szabad nitrogénjére alkilezett oldalláncok tulajdonságai nagyban befolyásolhatják a Gd³⁺-komplexek inertségét.¹⁵¹ A komplexek *in vivo* disszociációját elősegíthetik az emberi szervezetben megtalálható esszenciális fémionok (Cu²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺), ezért a komplexek inertségét Cu²⁺-ion (19. egyenlet) jelenlétében vizsgáltuk UV- látható spektrofotometriás alkalmazva.

$$[GdL] + Cu^{2+} \rightleftharpoons [CuL]^{-+} Gd^{3+}$$
(19)

A kicserélő fémion mennyiségét úgy választottuk meg, hogy az legalább 10-szerese legyen a komplexének, így biztosítva a pszeudo-elsőrendű feltételeket. A fémcsere sebességet ilyen körülmények között az 20. egyenlet írja le, ahol a k_{obs} a pszeudo-elsőrendű sebességi állandó, [GdL]t pedig a Gd³⁺-komplexek teljes koncentrációja.

$$-\frac{d[GdL]_t}{dt} = k_{obs}[GdL]_{tot}$$
(20)

A vizsgálatok során arra jutottunk, hogy a komplexek disszociációjában a kicserélő fémionnak nincs, míg a proton-asszisztált útnak van szerepe (21. egyenlet) és a k_{obs} értékek mindkét komplex esetén egyenes arányosságot mutattak az alkalmazott savkoncentrációval. A többi állandó vagy összemérhető volt saját hibájával, vagy kis, negatív értéket adott.

$$k_{\text{obs}} = k_1[\text{H}^+] \tag{21}$$

A 18. és 19. ábrákon a pszeudo-elsőrendű sebességi állandók illesztését mutatjuk be. A mérésinket 4 különböző Cu²⁺-koncentrációt (10-40-szeres felesleg) alkalmazva hajtottuk végre különböző pH-értékeken.

Az ábrákon látható fekete vonal a Scientist programmal számított illesztés eredményét reprezentálja.



18. Ábra. A pszeudo-elsőrendű sebességi állandók savkoncentráció függése a [Gd(DO3A-PAMA)]-komplex fémcsere reakciójában. (T = 25,0 °C, I = 0,15 M NaCl, 10 (), 20 (), 30 (), 30 () () () () kicserélő fémion felesleg)



19. Ábra. A pszeudo-elsőrendű sebességi állandók savkoncentráció függése a [Gd(DO3A-EAMA)]-komplex fémcsere reakciójában (T = 25,0 °C, I = 0,15 M NaCl, 10- (\blacklozenge), 20- (\blacksquare), 30- (\blacktriangle) és 40-szeres (\bullet) kicserélő fémion felesleg)

A proton asszisztált disszociáció első lépése a protonált oldalláncról a makrociklus N-atomjára történő protontranszfer, amelyet a fémion és a proton között fellépő elektrosztatikus taszítás miatt, a fémion koordinációs kalitkából való kilépése követ. A komplexek vizsgálata során kapott, a proton asszisztált útvonalakra jellemző sebességi állandókat a 3. táblázatban mutatom be.

3. Táblázat. A [Gd(DO3A-EAMA]-, a [Gd(DO3A-PAMA)]-, a [Gd(DOTA)]⁻ és a [Gd(DO3A)]-komplexek disszociációját jellemző sebességi állandók (25,0 °C, I = 0,15 M NaCl)

	$k_1 (M^{-1}s^{-1})$	$t_{1/2} ({ m \acute{o}ra})^{[c]}$
[Gd(DO3A-EAMA)]	0,53±0,02	363,3
[Gd(DO3A-PAMA)]	3,2±0,1	60,2
[Gd(DOTA)] ⁻	1,8x10 ^{-6 [a]}	1,07x10 ^{8 [b]}
[Gd(DO3A)] ^[b]	0,023	8400

[a] Ref^{152} ; [b] Ref^{143} ; [c] pH = 6,0

Ahogy a 3. táblázat adataiból látszik, a propil-egységet tartalmazó [Gd(DO3A-PAMA)]-komplex körülbelül 6-szor labilisabb, mint az etil-egységgel rendelkező [Gd(DO3A-EAMA)]. Ugyan a protonált komplex esetén (a vizsgált pH-tartományban ezek a részecskék a dominánsak) az oldallánc amidcsoportja nem koordinálódik a központi fémionhoz, mégis a sebességi állandók egy nagyságrendbeli eltérése egyértelműen az oldalláncban található szénlánc tagszámának tudható be. Valószínűleg a propil-egység nagyobb flexibilitása megkönnyíti a protonált aminocsoport és egy acetátcsoport vagy az amincsoport és a makrociklus nitrogénje közötti protontranszfer létrejöttét, ezzel elősegítve a komplex disszociációját.

Továbbá az is elmondható, hogy a [Gd(DO3A-EAMA)]-komplex disszociációját jellemző érték messze elmarad az "arany standardként"

emlegetett [Gd(DOTA)]⁻-komplexre jellemző értéktől, de körülbelül egy nagyságrenddel nagyobb a [Gd(DO3A)]-komplex disszociációját jellemző sebességi állandótól.

A könnyebb összehasonlíthatóság kedvéért pH = 6,0 értéken kiszámítottuk a komplexekre jellemző felezési időket. A pH = 6,0 értéket indokolja, hogy itt döntően a $[Gd(HL)]^+$ -részecske jellemzi a rendszert (ahogy a vizsgálat során is), viszont fiziológiás pH-értéken már az oldalláncban található amin nitrogén deprotonálódása megkezdődik, ami a [Gd(L)]részecskék jelenlétét eredményezi. A 3. táblázat adataiból kiolvasható, hogy az általunk vizsgált komplexek felezési ideje ugyan kisebb, mint a DO3A– vagy DOTA–analógoké (a szerkezet változása, töltéssel rendelkező donoartom(ok) eltávolítása miatt a komplex kompakt szerkezete megbomlik), viszont adott körülmények között nagyobb inertséggel rendelkeznek, mint a gyakorlatban is alkalmazott Magnevist[®] ($[Gd(DTPA)]^-$) kontrasztanyag (19,5 óra).¹⁵²

V.2.4. A fejezet rövid összefoglalása

A [Gd(DO3A-EAMA)]- és [Gd(DO3A-PAMA)]-komplexek vizsgálatainak eredményeit az alábbiak szerint foglalhatjuk össze:

• A ligandumok és komplexeik egyensúlyi viszonyait vizsgálva kiderült, hogy a [Gd(DO3A-EAMA)]-komplexet jellemző stabilitási állandó nagyobb a [Gd(DO3A-PAMA)]-komplex állandójánál.

• A Gd^{3+} -komplexek relaxivitását vizsgálva a két belsőszférás vízmolekulát tartalmazó formára jellemző értékeket kaptunk (q = 2) pH = 6 értéken, ahol döntően [Gd(HDO3A-EAMA)]⁺ és [Gd(HDO3A-PAMA)]⁺ egyszeresen protonált részecskéi vannak jelen. Nagy pH-értékek felé haladva a relaxivitásban csökkenés mutatkozik.

• A Gd³⁺-komplexek inertségét vizsgálva elmondható, hogy az oldalláncban propilén-egységet tartalmazó [Gd(DO3A-PAMA)]-komplex hozzávetőleg 6-szor labilisabb az [Gd(DO3A-EAMA)]-komplexnél.

• Mindezen tulajdonságokat figyelembe véve a Ca²⁺-szenzor komplexek gyakorlati alkalmazása elképzelhető, továbbá az eredmények számos értékes információval látnak el minket további, Ca²⁺-ion szenzitív kontrasztanyagnak szánt ligandumok tervezése terén.

V.3. Mn²⁺-ion alapú, intelligens kontrasztanyagnak szánt ligandumok és komplexeik vizsgálata

V.3.1. Intelligens pH-szenzorok

V.3.1.1. A pH-szenzornak szánt ligandumok és komplexeik egyensúlyi vizsgálata

Az intelligens pH-szenzorok ligandumai többnyire tartalmaznak egy olyan funkcióscsoportot, amely a fiziológiás pH-tartományban deprotonálódik és koordinálódik a központi fémionhoz. Ez a folyamat a paramágneses fémionok komplexei esetében a koordinált vízmolekulák számának csökkenésével jár, ami előidézi a relaxációs hatás csökkenését is. A pHszenzitív kontrasztanyag jelöltek előállításához tervezett PC2A-EA és PC2A-NP (20. ábra) ligandumok és komplexeik egyensúlyi folyamatainak tanulmányozására ebben az esetben is pH-potenciometriát alkalmaztunk, amely egyben az előbb említett pH-szenzitivitásról is információt szolgáltat.



20. Ábra. A PC2A-EA, PC2A-NP és a PC2A-SA ligandumok szerkezetei

A kapott állandókat a 4. táblázat tartalmazza, összehasonlítva a PCTA és egy, a csoportunkban korábban vizsgált, szintén pH-szenzornak szánt ligandum, a PC2A-SA megfelelő értékeivel.

	PC2A-EA	PC2A-NP	PC2A-SA ^[a]	PCTA ^[b]
$\log K_1^{\mathrm{H}}$	11,34(1)	11,12(2)	11,40	9,97
$\log K_2^{\mathrm{H}}$	8,93(2)	6,94(7)	9,92	6,73
$\log K_3^{\mathrm{H}}$	6,91(3)	6,63(4)	6,63	3,22
$\log K_4^{\mathrm{H}}$	1,97(3)	2,51(4)	1,96	1,40
$\log \beta_{\rm mc}^{[c]}$	18,25	17,75	18,03	16,70

4. Táblázat. A PC2A-EA, PC2A-NP, PC2A-SA és a PCTA ligandumok protonálódási állandói (T = 25,0 °C, I = 0,15 M NaCl)

[a] csoportunkban meghatározott, közlésre előkészített adatok; [b] Ref.¹⁵³; [c] $\log \beta_{mc}$, a makrociklus bázicitása, PC2A-EA, PC2A-NP, PC2A-SA esetében $\log K_1^{\text{H}} + \log K_3^{\text{H}}$, míg PCTA esetében $\log K_1^{\text{H}} + \log K_2^{\text{H}}$

Amíg a 4. táblázat adatai alapján azt egyértelműen kijelenthetjük, hogy az első protonálódási állandó a makrociklushoz, azon belül is a piridintípusú nitrogénatommal szembeni, *transz*-helyzetű nitrogénhez tartozik (irodalmi adatok alapján ez a piklén makrociklus legbázikusabb nitrogénje),¹⁵⁴ addig a második protonálódási folyamat helye már nem olyan egyértelmű. Így a PC2A-EA ligandum esetében ¹H-NMR titrálást végeztünk a pH = 6-12 tartományban azért, hogy egyértelműen el tudjuk dönteni, hogy melyik protonálódási állandó tartozik a szenzor funkcióért felelős etilamin molekularészlet primer amin csoportjához. A ¹H-NMR spektrumban található jelek kémiai eltolódásának változását a 21. ábrán mutatjuk be.



21. Ábra. A PC2A-EA ligandum ¹H-NMR jeleinek kémiai eltolódása a pH-függvényében, PC2A-EA ligandum szerkezetének esetében a számozás az ¹H-NMR jelek kémiai eltolódásának hozzárendelését reprezentálja

Az egyes protonokhoz tartozó jelek kémiai eltolódásából arra a következtetésre jutottunk, hogy a második protonálódási állandó $(\log K_2^{\rm H})$ a primer aminocsoporthoz, míg a harmadik protonálódási állandó a makrociklus *cisz*-helyzetű nitrogénatomjához rendelhető. Itt érdemes megjegyezni, hogy a kémiai eltolódások változásából kivehető az is, hogy a *transz*-helyzetű nitrogénatomon elhelyezkedő proton a harmadik protonálódási folyamatban (második proton belépése a gyűrűre) átkerül egy *cisz*-helyzetű nitrogénatomra (6;8;17 protonokhoz tartozó jelek kémiai eltolódásának változása pH = 6-7

között) a protonok között fellépő elektrosztatikus taszítás csökkentése érdekében.¹⁰⁴ A PC2A-NP ligandum esetében sem egyértelmű a protonálódási sorrend meghatározása, hiszen a második és a harmadik protonálódási állandó egyaránt tartozhat akár a makrociklus nitrogénatomjához, vagy egy fenolos hidroxilcsoporthoz is.

Összeségében a ligandumok bázicitásáról/összbázicitásáról azt mondhatjuk, hogy bár azok nagyobbak, mint azt a PCTA esetében tapasztaltuk, egymástól gyakorlatilag csak a szenzor-funkcióscsoportok bázicitásában különböznek.

A ligandumok protonálódási állandóinak meghatározása után vizsgáltuk azok Mn²⁺-, valamint más, esszenciális fémionokkal kialakuló komplexeik (Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺) egyensúlyi viszonyait is. A Mn²⁺-, Mg²⁺-Ca²⁺-. Zn²⁺-komplexek stabilitási és protonálódási állandóinak meghatározásához pH-potenciometriát, míg a Cu2+-ionnal kialakuló komplexek esetében az előző módszer mellett UV-látható spektrofotometriás módszert is alkalmaztunk. Erre azért volt szükség, mivel a ligandumok Cu^{2+} -komplexe már pH < 2 alatt csaknem 100%-ban képződik. A [Cu(PC2A-EA)]-komplex stabilitási állandóját kompetíciós módszerrel határoztuk meg pH = 4.8 értéken, ahol kicserélő ligandumként növekvő koncentrációban ciklént alkalmaztunk. A nagy feleslegben használt ciklén gyakorlatilag kiszorítja a Cu²⁺-iont a vizsgált komplexekből, és az így képződött [Cu(ciklén)]²⁺-komplex keletkezése az abszorbciós spektrumokban jól követhető változást eredményez (22. ábra). A pH-potenciometria és az UVlátható spektrofotometria eredményeit szimultán illesztettük a PSEQUAD program segítségével.¹⁵⁵

74



22. Ábra. A Cu²⁺-PC2A-EA-ciklén rendszert jellemző abszorpciós spektrumok ($c_{Lig} = c_{Cu2+} = 1,97$ mM; pH = 4,8 $c_{NMP} = 50$ mM; T = 25,0 °C, I = 0,15 M NaCl; ekvivalens (•); 2- (•); 5- (•); 10- (•) és 20-szoros (•) ciklén felesleg

A számított stabilitási és protonálódási állandókat az 5. táblázatban foglaljuk össze, összehasonlítva a már említett PCTA és PC2A-SA ligandumokhoz tartozó egyensúlyi eredményekkel.

		PC2A-EA	PC2A-NP	PC2A-SA ^[a]	РСТА
Mg^{2+}	$\log K_{\rm ML}$	6,61(8)	9,92(2)	6,17	12,35 ^[b]
	$\log K_{\rm MHL}$	10,29(5)	5,2(2)	10,99	3,82 ^[b]
Ca^{2+}	$\log K_{\rm ML}$	9,97(6)	10,18(3)	9,70	12,72 ^[b]
Ca	$\log K_{\rm MHL}$	8,11(3)	5,1(1)	9,55	3,79 ^[b]
	$\log K_{\rm ML}$	21,4(1)	19,45(9)	20,1	20,48 ^[b]
Zn^{2+}	$\log K_{\rm MHL}$	6,41(4)	5,41(1)	8,56	3,10 ^[b]
	$\log K_{\rm MH2L}$	2,43(6)	-	-	-
Cu ²⁺	$\log K_{\rm ML}$	25,6(1)	>23	>23	18,79 ^[b]
	$\log K_{\rm MHL}$	5,69(4)	5,26(6)	8,56	3,58 ^[b]
	$\log K_{\rm MH2L}$	2,63(4)	2,41(6)	2,37	-
	$\log K_{\rm ML}$	19,01(4)	18,05(6)	17,96	16,83 ^[c]
Mn ²⁺	$\log K_{\rm MHL}$	6,88(2)	4,58(2)	8,77	1,96 ^[c]
	$\log K_{\rm MH2L}$	2,50(3)	-		-
	pMn ^d	9,27	9,67	9,77	9,74 ^[c]

5. Táblázat. A PC2A-EA, PC2A-NP, PC2A-SA és PCTA ligandumok esszenciális fémionokkal kialakuló komplexeinek egyensúlyi állandói (T = 25,0 °C, I = 0,15 M NaCl)

[a] csoportunkban meghatározott, közlésre előkészített adatok; [b] Ref.¹¹⁷ I = 0,1 M KCl; [c] Ref.¹⁵³ I = 0,15 M NaCl; [d] $c_{Mn} = c_L = 0,01$ mM, pH = 7,4¹⁵⁶

A Mg²⁺ és Ca²⁺-ionokkal kialakuló komplexek esetében nemcsak 1:1 fém:ligandum arányú komplexek képződését sikerült kimutatni, de azok protonálódási állandóit is tudtuk számolni. Ugyanakkor az is elmondható, hogy a PC2A-SA ligandumhoz hasonlóan a PC2A-EA esetében ennek értéke olyan nagy, hogy az nem tartozhat máshoz, mint a gyűrű egyik nitrogématomjának protonálódásához. Ez egyben azt is jelenti, hogy a protonált Mg²⁺-komplex nem a klasszikus értelemben vett "in-cage" komplex, hiszen a H⁺-ion elektrosztatikus taszítása miatt a Mg²⁺ biztos, hogy nem makrociklusos nitrogének és az acetát oxigének által kialakított koordinációs kalitkában helyezkedik el. A PC2A-NP ligandum esetében, ahol eleve nagyobb MgL stabilitást mértünk, a protonálódási állandó értékét csak nagy hibával tudtuk meghatározni, és az illesztések során kapott eloszlási diagramok azt mutatták, hogy az csak kis mértékben képződik. Nem meglepő módon a Ca²⁺-komplexek stabilitása nagyobb a Mg²⁺-komplexekénél és a protonálódási állandók alapján, itt már az ML komplex protonálódása nem a gyűrűn, hanem az oldallánc aminocsoportján következik be.

A Zn²⁺-komplexek egyensúlyi vizsgálatának eredményeit tekintve kijelenthető, hogy a stabilitási állandók értékei a PC2A-EA ligandummal alkotott komplex esetén a legnagyobbak, ami jó egyezést mutat a makrociklusra kapott bázicitás értékekkel is. Továbbá, a másik két komplexhez képest kapott több, mint egy nagyságrendnyi növekedésben annak is szerepe lehet, hogy a PC2A-EA ligandum esetében lehetőség van az oldalláncban található amin típusú nitrogén koordinációjára. Az amin koordinációja feltételezhetően nem eredményez 7-es koordinációs környezetet a Zn²⁺-ion körül, hanem azzal párhuzamosan egy acetát oxigén kilépése történik meg. A PC2A-NP komplexek esetén a stabilitási állandó értéke jó egyezést mutat a PC2A-ligandum (a makrociklus *transz*-N-atomja nem funkcionalizált) hasonló komplexének értékével (log*K*zn(PC2A) = 19,49).¹⁵⁷ ami arra utal, hogy itt az oldalláncban található fenolos hidroxilcsoport koordinációja nem következik be, ami már a kelátgyűrű tagszámának növekedésével is járna.

A [Cu(PC2A-EA)]-komplex stabilitási állandója több mint 6 nagyságrenddel nagyobb, mint a PCTA komplexé, amiben nyílván szerepe van a ligandumok bázicitásában mutatkozó különbségnek is, de egyértelmű, hogy az acetát etilamin csere az utóbbi erősebb koordinációjának köszönhetően növeli a kialakuló komplex stabilitását. Ennek jele az is, hogy a ligandum etilamincsoportjának protonálódási állandója 8,93-ról 5,69-re csökken a Cu²⁺-komplex esetén. A PC2A-NP ligandum Cu²⁺-komplexének stabilitási állandóját végül nem határoztuk meg, de előkísérleteink alapján azt feltételezzük, hogy az nagyobb $\log K_{CuL} = 23$ -nál.

Számunkra természetesen a legfontosabb a Mn2+-ionnal kialakuló komplexek stabilitási és protonálódási állandóinak megismerése volt. Ahogy azt az irodalmi részben már említettük, a kristálytér stabilizációs energia hiánya miatt, a Mn²⁺-komplexek stabilitási állandói nagyságrendekkel kisebbek, mint például a Zn²⁺ vagy a Cu²⁺-komplexeké. Éppen ezért a Mn²⁺-komplexek esetében nem is törekszünk arra, hogy minél nagyobb termodinamikai stabilitásra tegyünk szert, a cél igazából csak annyi, hogy a komplex stabilitása elég nagy legyen a teljes képződéshez. Hiszen, ha a Mn²⁺komplex fiziológiás pH-n 100%-ban képződik, akkor az i.v. injektálást követőn annak in vivo stabilitását elsősorban inertsége fogja meghatározni. Az általunk vizsgált két komplex közül a [Mn(PC2A-EA)]-nak nagyobb a stabilitási állandója, ugyanakkor a fiziológiás pH-ra számolt látszólagos stabilitása (pMn) kisebb, mint a PC2A-NP ligandum Mn²⁺-komplexének pMn értéke. A komplexek stabiltásának összehasonlítására gyakran alkalmazzák a pM-értéket (pM = -log[M]), amely azt mutatja meg, hogy egy adott összetétel mellett, adott pH-n a fémion milyen koncentrációban marad szabad formában.¹⁵⁶ Bár úgy kezeljük az így kapott értékeket, mint látszólagos stabilitási állandókat, ugyanakkor könnyű belátni, hogy nem azok, viszont a komplexek stabilitásának összehasonlítására kiválóan alkalmasak. A pMn adatok összehasonlításából az látszik, hogy a PC2A-EA komplex körülbelül 0,4 egységgel kisebb pMn értékkel rendelkezik a másik három komplex pMn értékeihez képest, míg azok nem különböznek jelentősen egymástól. Egy adott komplexre a pMn értéke attól is függ, hogy milyen analitikai koncentrációkból indulunk ki. A Mn²⁺-komplexek esetében, az irodalomban is alkalmazottak szerint a fémion és a ligandum koncentrációját is 0,01 mM-osnak választjuk. Így, ha nincs komplexképződés, akkor a pMn értéke 5, hiszen az összes fém szabad formában marad, míg egy 9-es értéknél márcsak az eredeti mennyiség 0,01%-a marad szabad fémionként. A mangán esszenciális voltának köszönhetően azt mondhatjuk, hogy ha a fémion több mint 99,9%-a komplex formába kerül, az már megfelel az *in vivo* alkalmazás feltételeinek. A kapott adatokból megállapítható, hogy mindkét komplex eleget tesz ennek a feltételeknek.

Egy pH-szenzitív kontrasztanyag egyik legfontosabb tulajdonsága a komplexek (funkcióhoz kapcsolódó) protonálódási állandójának értéke, aminek pH = 6-8 közé, a vér fiziológiás tartományába (ideális esetben 6,2-6,4) kell esnie. Mindegyik komplexre kijelenthetjük, hogy a komplexképződés a pH-érzékeny oldallánc protonálódási álladójának csökkenésével jár együtt. Ugyanakkor a PC2A-NP ligandum Mn²⁺-komplexének esetében a folyamat jóval kisebb $(\log K_{\rm MHL} = 4,58),$ protonálódási míg az összehasonlításhoz használt PC2A-SA Mn2+-komplexének esetében pedig nagyobb pH-n (log $K_{MHL} = 8,77$) következik be a fiziológiáshoz képest. A [Mn(PC2A-EA)] esetében a protonálódási állandó értéke $\log K_{MHL} = 6,88$ -nak adódott, ami bíztató volt a további vizsgálatok tekintetében.

V.3.1.2. A [Mn(PC2A-EA)]- és [Mn(PC2A-NP)]-komplexek relaxációs paramétereinek vizsgálata

Elvégeztük a ligandumok Mn²⁺-ionnal alkotott komplexeinek relaxometriás titrálását, egyfelől azért, hogy információt nyerjünk a komplexek pH-szenzitivitásáról, másrészt pedig azért, hogy alátámasszuk az egyensúlyi modellünk helyességét.

A [Mn(PC2A-NP)]-komplexre vonatkozóan (23. ábra) az látható, hogy a komplexképződés pH = 4,5 értékre gyakorlatilag befejeződik és pH = 6,0 értékre a komplex relaxivitása a külső szférás hozzájárulásra csökken $(r_{1p} = 1,57 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1})$. A relaxivitás értékek változása jó egyezést mutat a részecskeeloszlással (ezáltal elmondhatjuk, hogy az egyensúlyi modellünk helyesen írja le a Mn²⁺-komplex egyensúlyi rendszerét), és ahogy már a ligandum Mn²⁺-kompléxenek protonálódási állandójából tudni lehetett, a pH-szenzitivitás távol esik a fiziológiás pH-tartománytól.



23. Ábra. A [Mn(PC2A-NP)] rendszerben képződő komplexek koncentráció eloszlási görbéi és relaxivitásának változása a pH-függvényében ($c_M : c_L = 1: 1, T = 25,0$ °C, 0,49 T)

A [Mn(HPC2A-EA)]⁺-komplex (24. ábra) relaxivitása rendkívül hasonló a komplex belső szférájában egy vízmolekulát tartalmazó Mn²⁺komplexekéhez¹⁵⁸ és a pH = 3,7-5,8 tartományban állandónak tekinthető. pH = 3,7 alatt a relaxivitás értékek növekedését tapasztaljuk, ami a kétszeresen protonált komplex megjelenésére, majd a komplex disszociációjára utal. A relaxivitás értékekben pH = 5,8 felett egy jelentős csökkenés következik be egészen r_{1p} = 2,33 mM⁻¹s⁻¹ értékig, ami közel esik a csak külső szférás hozzájáruláshoz hasonló relaxivitás értékhez. Ez a hozzávetőleg 1,5 egységnyi változás az r_1 relaxivitás értékekben a teljes fiziológiás (pH = 6-8) tartományban a pH-érzékeny etilamincsoport deprotonálódásával és koordinációjával értelmezhető, ami a komplex belső szférájában lévő vízmolekula teljes kiszorulását eredményezi.



24. Ábra. A [Mn(PC2A-EA)] rendszerben képződő komplexek koncentráció eloszlási görbéi és relaxivitásának változása a pH-függvényében ($c_M : c_L = 1: 1, T = 25,0$ °C, 0,49 T)

A pH-eltolódás hatására bekövetkező relaxivitás változás ugyan elegendő lehet a komplex *in vivo* alkalmazásához, ugyanakkor ez az adat vizes oldatra vonatkozik. Irodalmi előzmények már rámutattak arra a tényre, hogy aromás egységekkel rendelkező komplexek képesek kölcsönhatást kialakítani a vérben fellelhető fehérjékkel,¹⁵⁹ amely kölcsönhatás a relaxivitás növekedését eredményezheti, így vizsgáltuk a [Mn(PC2A-EA)]-komplex relaxivitásának változását Seronorm[®] (lásd IV.3.) jelenlétében is, különböző térerősségeken. A vizsgálatok a relaxivitás szignifikáns emelkedését mutatták, tehát a komplex kölcsönhatásba lép a vérszérum fehérjéivel, ami a komplex oldatbéli mozgékonyságát lassítja, miközben a relaxivitást növeli. A Mn^{2+} esetében az r_{2p} transzverzális relaxivitás értékek változása sokkal

szembetűnőbb, a lehetséges fiziológiás pH-tartományban $\Delta r_{2p} = 6,6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nek adódott. A relaxivitás értékeket a 6. táblázatban foglaljuk össze (a pH-tartomány itt szűkebb, ezzel is modellezve az egészséges és beteg sejtek közötti pH különbséget).

6. Táblázat. A [Mn(PC2A-EA)]-komplex relaxivitásának változása Seronormban, különböző pH-, hőmérséklet (25,0 és 37,0 °C) és térerő értékeknél (20 (0,49 T); 60 (1,41 T) és 128 MHz (3T))

[Mn(PC2A-EA)] (20 MHz, 37,0 °C)				
	$r_1 (\mathrm{mM}^{-1}\mathrm{s}^{-1})$	$r_2 (\mathrm{mM}^{-1}\mathrm{s}^{-1})$		
6,8	4,07	5,94		
7,4	3,51	4,94		
Δ	0,56	1,00		
[Mn(PC	C2A-EA)] (60 M	Hz, 37,0 °C)		
	$r_1 (\mathrm{mM}^{-1}\mathrm{s}^{-1})$	$r_2 (\mathrm{mM}^{-1}\mathrm{s}^{-1})$		
6,8	3,21	8,81		
7,4	2,69	6,63		
Δ	0,52	2,18		
[Mn(PC2A-EA)] (MRI, 3 T, 25±2 °C)				
	$r_1 (\mathrm{mM}^{-1}\mathrm{s}^{-1})$	$r_2 (\mathrm{mM}^{-1}\mathrm{s}^{-1})$		
6,8	4,43	8,36		
7,4	3,61	3,44		
Δ	0,82	4,92		

A paramágneses fémkomplexek relaxivitását sokféle paraméter befolyásolja. Az egyik ezek közül a komplex belső szférájában található vízmolekula cseresebessége (k_{ex}). Annak kiderítésére, hogy ez az általunk vizsgált komplexeknél mekkora jelentőséggel bír, ¹⁷O-NMR spektroszkópiás méréseket végeztünk (9,4 T).¹³⁸ Különböző hőmérsékleteken mértük egy diamágneses referenciának (HClO₄ oldat) és a komplexek oldatainak longitudinális (T_1) és transzverzális (T_2) relaxációs idejét (25. ábra), valamint a ¹⁷O-jelének kémiai eltolódás értékeit. A vízmolekula transzverzális relaxációs idejét (ln(1/ T_{2r})) a Swift-Connik egyenletekkel illesztettük, feltételezve az elektronspin relaxációk egy exponenciális függvény szerinti változását.¹³⁹



25. Ábra. A [Mn(PC2A-EA)]- (kék; pH = 6,0) és [Mn(PC2A-NP)]-komplexekre (piros; pH = 4,6) számolt ln($1/T_{2r}$) értékek az 1/T függvényében (400 MHz). A folytonos vonalak a kísérleti pontok legjobb illesztését mutatják.

Az ¹⁷O-NMR mérésekből meg tudtuk határozni a komplex belső szférájában található vízmolekula cseresebességét (k_{ex}^{298}), a hozzá tartozó aktiválási entalpiát (ΔH^{\ddagger}) és a Mn²⁺-ion elektronrelaxációjának sebességét ($1/T_{1e}^{298}$). A 7. táblázat eredményeit elemezve láthatjuk, hogy a két komplex vízcseresebessége közel azonos, hiszen a két komplexben a fémion koordinációs környezete gyakorlatilag megegyezik. Ám ezek az értékek egy

nagyságrenddel kisebbek, mint a PC2A Mn²⁺-komplexének vízcseresebességére jellemző érték. Ez az eltérés a [Mn(PC2A)]-komplex kevésbé kompakt, flexibilisebb szerkezetével magyarázható. A PC2A-EA Mn²⁺-komplexénél meghatározott pozitív entrópia értékéből a vízcsere disszociatív mechanizmusára következtetünk, vagyis a koordinált vízmolekula kilépését követően lép be egy újabb vízmolekula a fémion belső koordinációs szférájába. Nem meglepő, hogy a PC2A-SA ligandum komplexére is hasonló vízcseresebesség adódik, bár itt a mechanizmust illetően azt kell, hogy mondjuk, hogy az mind disszociatív, mind asszociatív módon lejátszódhat.

Mn ²⁺ -komplexek esetén (400 MHz)					
	[Mn(PC2A-	[Mn(PC2A-	[Mn(PC2A-	[Mn(3,9-	
	EA)]	NP)]	SA)]	PC2A)] ¹⁰	
r_{1p} (mM ⁻¹ s ⁻¹) ^a	2,5	1,6	4,0	2,91	
$\frac{k_{\rm ex}^{298}}{({\rm x}10^7~{\rm s}^{-1})^{\rm b}}$	4,0 ±0 ,1	$4,5 \pm 0,1$	5,9	12,6	
ΔH^{\ddagger} (kJ mol ⁻¹) ^b	36 ± 1	44 ± 1	27	37,5	
$\frac{\Delta S^{\ddagger}}{(J \text{ K}^{-1} \text{ mol}^{-1})^{b}}$	21 ± 3	49 ± 2	-4,8	-	
$1/T_{1e}^{298}$		20 1		11	

7. Táblázat. A ¹⁷O-NMR mérésekből számolt vízcseresebesség és relaxációs paraméterek a Mn²⁺-komplexek esetén (400 MHz)

 $\begin{array}{|c|c|c|c|c|c|c|c|} \hline 1/T_{1e}^{296} & 6,6 \pm 0,7 & 30 \pm 1 & 5,7 & 11 \\ \hline (x 10^{7}/s^{-1})^{b} & 6,6 \pm 0,7 & 30 \pm 1 & 5,7 & 11 \\ \hline [a] relaxometriás módszerrel meghatározva; 20 MHz (0,49 T), <math>T = 25,0$ °C, pH = 7,4; [b] ¹⁷O-NMR méréssel meghatározva; [c] Ref ¹⁵⁷; (r_{1p} : paramágneses relaxivitás, k_{ex}^{298} : vízcseresebesség aktiválási entalpiája, ΔS^{\ddagger} : vízcseresebesség aktiválási entalpiája, ΔS^{\ddagger} : vízcseresebesség aktiválási entalpiája, $1/T_{1e}^{298}$: fémion elektronrelaxációjának sebessége) A [Mn(HPC2A-EA)]⁺-komplex esetén az ¹⁷O-NMR vizsgálat arra is kiváló lehetőséget biztosított, hogy igazoljuk a belső-szférás vízmolekula jelenlétét. Ehhez nem csak pH = 6,0 értéken végeztük el a méréseket (itt feltételezhetően q = 1), hanem nagyobb, pH=8,2 értéken is (ahol feltételeztük, hogy q = 0). A Gale¹³⁸ és munkatársai által kidolgozott módszernek megfelelően illesztettük az $1/T_{2r}$ értékeket (26. ábra) az 1/T-függvényében és meghatároztuk a r_{2max} értékét. A kapott értékből a belső szférás vízmolekulák számát a 22. egyenlettel lehet számolni, ahol az előzőleg említett r_{2max} érték mellett a q a belső szférás vízmolekulák száma, az S az eredő spinkvantumszám, az Ao/ \hbar pedig a hiperfinom csatolási állandó. Az eredmények alátámasztották feltételezéseinket, miszerint a Mn²⁺-komplex relaxivitásának változása a pH-függvényében a belső szférás víz

$$q = r_{2\max}^{o}[H_2O]\left(\frac{2}{\sqrt{\frac{S(S+1)A_0}{3-\hbar}}}\right) \cong \frac{r_{2\max}^o}{510}$$
(22)



26. Ábra. A $[Mn(HPC2A-EA)]^+$ (piros, pH = 6,0) és a [Mn(PC2A-EA)]-komplexre (fekete, pH = 8,2) számolt $1/T_{2r}$ értékek az 1000/T függvényében (400 MHz). A folytonos vonalak a kísérleti pontok Lorentz függvény szerinti legjobb illesztését mutatják.

Hasonlóan jártunk el a [Mn(PC2A-NP)]-komplex esetén is, amit a 27. ábra mutat. A vizsgálathoz olyan pH-értéket választottunk, ahol 50%-ban van jelen a protonált (q = 1) és deprotonált (q = 0) Mn²⁺-komplex. Az eredményeket a 8. táblázatban foglalom össze mindkét komplexre.



27. Ábra. A [Mn(PC2A-NP)]-komplexre számolt $1/T_{2r}$ értékek az 1000/T függvényében (400 MHz, pH = 4,6). A folytonos vonalak a kísérleti pontok Lorentz függvény szerinti legjobb illesztését mutatják.

8. Táblázat. [Mn(PC2A-EA)]- és [Mn(PC2A-NP)]-komplexre kapott $r_{2\max}^o$ és q értékek különböző pH-értékeken.

	$[Mn(HPC2A-EA)]^+$	[Mn(PC2A-EA)]	[Mn(PC2A-NP)]
	pH = 6,0	pH = 8,2	pH = 4,6
$r_{2\max}^{o}$ (mM ⁻¹ s ⁻¹)	409,9	116,5	199,1
<i>q</i> (db)	$0,80\pm0,2$	$0,23 \pm 0,2$	$0,39 \pm 0,2$

Következő lépésként fantom MRI vizsgálatokat végeztünk különböző (1; 1,5; 3 T) térerősségeken, hogy kiderítsük, hogyan viselkedik a [Mn(PC2A-EA)]-komplex a klinikai gyakorlatban alkalmazott MRI készülékeken. A 28. ábrán mutatjuk be a 3 T térerőn végzett kísérletek eredményeit ($c_{[Mn(PC2A-EA)]} = 1$ mM Seronormban). Ahogy azt a 0,49 és 1,41 T térerősségen mért eredmények is mutatták, mind a T_1 , mind a T_2 relaxációs idők függnek a pH-változásától, ugyanakkor ez a változás a T_2 relaxációs idők

esetében hangsúlyosabb. A vizsgálati eredmények megmutatták, hogy a relaxivitások ilyen mértékű változása jól nyomon követhető a humán diagnosztikában alkalmazott készülékekkel.



28. Ábra. A [Mn(PC2A-EA)]-komplex reprezentatív T_1 - (bal oldal) és T_2 -súlyozott (jobb oldal) MRI képe humán szérumban (Seronorm) különböző pH-értékeken (pH = 7,50 (1), 7,25 (2), 7,08 (3), 6,81 (4) és 6,67 (5), c_[Mn(PC2A-EA)] = 1 mM). A minták T_1 relaxációs idői: 298±2 (1), 257±2 (2), 232±2 (3), 233±2 (4), 222±2(5) ms, a T_2 adatok pedig a következők: 456±52(1), 200±11(2), 144±6(3), 125±5(4) és 113±4(5) ms (TRs = 3500 ms, TE = 7,45 ms, térbeli felbontás = 0,481x0,417x1 mm³).

V.3.1.3. A [Mn(PC2A-EA)]- és [Mn(PC2A-NP)]-komplexek kinetikai vizsgálata

Kiemelt fontosságú a komplexek inertségének vizsgálata, amelyek során a fémion indukált cserereakciókat a [Mn(PC2A-EA)]-komplex esetében UV-látható spektrofotometriás, a [Mn(PC2A-NP)]-komplex esetében pedig relaxometriás módszerrel vizsgáltuk. A [Mn(PC2A-EA)]-komplex esetében a kicserélő Cu²⁺-iont 10-40-szeres feleslegben alkalmaztuk, hogy így biztosítsuk a pszeudo-elsőrendű feltételeket. A kicserélődési reakciókat az alábbi (23) egyenlettel írhatjuk le:

$$[MnL] + M^{2+} \rightleftharpoons [ML] + Mn^{2+}$$
(23)

A pszeudo-elsőrendű reakciót jellemző sebességi állandót az alábbi (24) egyenlettel tudjuk kifejezni, ahol a k_{obs} a reakció pszeudo-elsőrendű sebességi állandóját, a [MnL]t pedig a Mn²⁺-komplex koncentrációját fejezi ki:

$$-\frac{d[MnL]_{t}}{dt} = k_{obs}[MnL]_{tot}$$
(24)

A 29. és a 30. ábrán a számított pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat láthatjuk az alkalmazott savkoncentrációk függvényében, a [Mn(PC2A-EA)]-komplex esetében különböző fémionkoncentrációk, míg a [Mn(PC2A-NP)]-komplex esetében 10-szeres feleslegű Zn²⁺ kicserélő fémion koncentráció alkalmazásával.



29. Ábra. A [Mn(PC2A-EA)]-komplex pszeudo-elsőrendű sebességi állandói (k_{obs}) az alkalmazott savkoncentrációk függvényében (T = 25,0 °C, I = 0,15 M NaCl; 10- (\bullet), 20- (\blacksquare), 30- (\blacktriangle) és 40-szeres (\bullet) kicserélő fémion felesleg



30. Ábra. A [Mn(PC2A-NP)]-komplex pszeudo-elsőrendű sebességi állandói (k_{obs}) az alkalmazott savkoncentrációk függvényében (T = 25,0 °C, I = 0,15 M NaCl, 0,49 T; $c_{Zn2+} = 10$ mM; $c_{komplex} = 0,5$ mM)

A [Mn(PC2A-NP)]-komplex esetében csak 20-szoros fémfelesleget használtunk, mivel előzetes tapasztalataink azt mutatták, illetve a hozzá nagyon hasonló szerkezettel rendelkező [Mn(PC2A-EA)]-komplex vizsgálata során kiderült, hogy a reakció sebessége független a kicserélő fémion koncentrációjától, csak a proton asszisztált reakcióútnak van szerepe.

A Mn^{2+} -komplexek kinetikai vizsgálata azt mutatta, hogy míg a [Mn(PC2A-NP)]-komplex disszociációjának sebessége négyzetesen is függ a protonkoncentrációtól (9. táblázat), addig [Mn(PC2A-EA)] esetében csak lineáris függés mutatható ki. Mindkét komplex esetében ki tudtuk számolni a protonált köztitermékek protonálódási állandóját ($K_{\rm H}$) is. Ezalapján a két komplexre kapott $k_{\rm obs}$ értékek az alábbi egyenletekkel illeszthetők (25. és 26. egyenlet).

$$k_{\rm obs} = \frac{k_1 [{\rm H}^+]}{1 + K_{\rm MnHL} [{\rm H}^+]}$$
(25)

$$k_{\rm obs} = \frac{k_1 [{\rm H}^+] + k_2 [{\rm H}^+]^2}{1 + K_{\rm MnHL} [{\rm H}^+]}$$
(26)

ahol a k_1 és k_2 a Mn²⁺-komplex proton asszisztált disszociációját jellemző sebességi állandók, a K_{MnHL} a [Mn(HPC2A-NP)]⁺ és az [Mn(H₂PC2A-EA)]²⁺ köztitermékek protonálódási állandói. A 9. táblázat tartalmazza továbbá a Mn²⁺-komplexek pH = 7,4 értékre számított felezési idejét ($t_{1/2}$) is.

	[Mn(PC2A-NP)]	[Mn(PC2A-EA)]	[Mn(PC2A-SA)]
$k_1 (M^{-1}s^{-1})$	$0,7{\pm}0,1$	0,60±0,01	4,8±0,2
$k_2 (M^{-2}s^{-1})$	$(3,2\pm0,2)\times10^4$	-	-
$K_{\rm MnHL}({ m M}^{-1})$	4600±400	102±10	1400±260
$t_{1/2} (pH = 7,4)$ (óra)	6700	8050	1000

9. Táblázat. A [Mn(PC2A-NP)]-, [Mn(PC2A-EA)]- és [Mn(PC2A-SA)]-komplexek disszociációját jellemző sebességi állandók, azok protonálódási állandói és disszociációjuk $t_{1/2}$ értékei (pH = 7,4, T = 25,0 °C)

Az eredmények elemzése előtt, meg kell még említenünk azt a tényt, hogy a kinetikai vizsgálatokat meglehetősen savas, pH = 2-4, tartományban végeztük, ahol a [Mn(HPC2A-EA)]⁺ és a [Mn(PC2A-NP)] komplexek a domináns részecskék, amelyek protonálódását és а képződött [Mn(H2PC2A-EA)]²⁺ és a [Mn(HPC2A-NP)]⁺ köztitermékek disszociációját tudjuk vizsgálni. Felvetődhet a kérdés, hogy akkor a pH = 7,4-re ezen adatok felhasználásával számított t1/2 értékek mennyire relevánsak. Véleményünk szerint az így számított felezési időkkel alábecsüljük a fiziológiás pH-n mutatkozó inertséget, hiszen a protonáltsági fok növekedésével a komplexek egyre labilisabbá válnak, mivel a disszociációhoz szükséges proton transzfer(ek) könnyebben lejátszódnak. A Mn²⁺-komplexek inertségét tekintve kijelenthető, hogy a [Mn(PC2A-EA)]-komplex és a [Mn(PC2A-NP)]-komplex disszociációját jellemző állandók egy nagyságrenddel kisebbek, mint amit az összehasonlításként használt [Mn(PC2A-SA)]-komplex esetében találtunk. Ennek magyarázata lehet a PC2A ligandumon az oldalláncban az amidcsoport cseréje primer aminocsoportra, ami az oldallánc protonálódási állandójának csökkenésével jár, vagyis az oldallánc protonja mobilisabb lesz, a transzfer Érdemes könnyebben bekövetkezik. megjegyezni, hogy а [Mn(PC2A-EA)]-komplex sebességi állandója ugyancsak egy nagyságrenddel kisebb, mint a Mn²⁺-komplexek esetében az egyik leginertebbnek tekintett, belső szférában egy vízmolekulát koordináló [Mn(1,4-DO2AMMe₂)]²⁺komplex disszociációját jellemző állandó.¹⁶⁰ A felezési időket összehasonlítva látható, hogy a [Mn(PC2A-EA)]-komplex esetében a jó pH-szenzitivitás megfelelő inertséggel párosul, ami bíztató az *in vivo* alkalmazás tekintetében.

Az előbbiekben bemutatott kinetikai vizsgálatok meglehetősen részletes képet adnak a [Mn(PC2A-EA)]-komplex disszociációjának mechanizmusáról, ugyanakkor az alkalmazott 25,0 °C-os kísérleti hőmérséklet relatíve messze van az in vivo alkalmazás során az emberi test által biztosított 37,0 °C-os hőmérséklettől. Korábbi tapasztalatok alapján azt mondhatjuk, hogy ha szobahőmérsékletről fiziológiás hőmérsékletre térünk át, akkor az körülbelül 4-szeresére növeli a disszociáció sebességét.¹⁶¹ Az utóbbi időben Caravan és munkatársai javaslatára¹⁶² elterjedőben van egy kísérleti módszer, amellyel az egyes Mn²⁺-komplexek (vagy akár Gd³⁺) disszociáció sebessége adott körülmények között összehasonlítható. A módszer lényege, hogy 37,0 °C-on követjük a rendszer relaxivitás változását, amely a Mn²⁺-komplexre nézve 1 mM-os, míg Zn²⁺-ionból ennek 25-szörösét tartalmazza ezzel biztosítva a pszeudo-előrendű kinetikai feltételt. A reakció pufferelt közegben (MES) 6-os pH-n játszódik le. Így lehetőség nyílik teljesen eltérő szerkezetű komplexek inertségének gyors összehasonlítására. A módszer természetesen nem tökéletes, hiszen nem fiziológás pH-n dolgozunk (a Zn²⁺ hidrolízise miatt), valamint nem árul el semmit a kicserélő fémion által asszisztált folyamatokról, mégis kielégítő és gyors összehasonlítási alapot szolgáltat.

A [Mn(PC2A-EA)]-komplexre így kapott elsőrendű sebességi állandó $(3,54\pm0,04)\times10^{-6}$ s⁻¹ ($t_{1/2} = 54,4$ h), amely 190-szer nagyobb inertséget jelent, mint ami a Caravan és munkatársai által Mn²⁺-alapú kontrasztanyagnak szánt [Mn(PyC3A)(H₂O)]⁻-komplexre adódott ($6,76\times10^{-4}$ s⁻¹, $t_{1/2} = 0,29$ h).¹⁶²

Figyelembe véve a kapott eredményeket annyi bizonyos, hogy koordinációs kémiai és kinetikai szempontokból semmi akadálya, hogy a [Mn(PC2A-EA)]-komplexet *in vivo* vizsgálatokban is alkalmazzák.

V.3.1.4. A fejezet rövid összefoglalása

A [Mn(PC2A-EA)]- és [Mn(PC2A-NP)]-komplexek vizsgálatainak eredményeit az alábbiak szerint foglalhatjuk össze:

• A Mn^{2+} -komplex stabilitási állandója a PC2A-EA komplexe esetén nagyobb, a pMn értékek közel azonos és kiemelkedően jó stabilitást jeleznek mindkét komplexre. Egy pH-szenzornak szánt komplex esetében nagyon fontos paraméter a Mn^{2+} -komplex protonálódási állandója, amelynek a fiziológiás pH-tartományba kell esnie. Ennek a feltételnek a [Mn(PC2A-EA)]-komplex eleget is tesz.

• Vizsgálva a komplexek relaxációs sajátságait látható, hogy pH > 6 esetben a [Mn(PC2A-NP)]-komplex relaxivitása a külső szférás hozzájárulásra csökkent, míg a [Mn(PC2A-EA)]-komplex longitudinális és transzverzális relaxivitásának változása pH = 6,8 - 7,4 tartományban rendre 0,82 és 4,92 a gyakorlatban is alkalmazott térerőn (128 MHz, 25,0 °C), ami már alkalmas az MRI-vel történő detektálásra.

• Vizsgálva a komplexek inertségét és kiszámítva pH = 7,4 értékre a komplexek felezési idejét látható, hogy ugyan nagyságrendekkel kisebb értéket kaptunk a [Mn(PCTA)]–komplexet jellemző értéknél $(5,9\times10^4 \text{ óra})^{153}$, ám még így is kellően nagyok az *in vivo* alkalmazás tekintetében.

V.3.2. Intelligens Zn^{2+} -szenzor



31. Ábra. A PC2A-DPA szerkezeti képlete

V.3.2.1. A PC2A-DPA ligandum és komplexeinek egyensúlyi vizsgálata

Meghatároztuk a Zn-szenzornak szánt PC2A-DPA ligandum (31. ábra) protonálódási állandóit, a kapott eredményeket a 10. táblázat mutatja összevetve a PC2A és a dolgozat V.3.1.1 fejezetében tárgyalt PC2A-EA ligandum p K_a értékeivel.

	PC2A-DPA	PC2A ^[b]	PC2A-EA
$\log K_1$	10,65(3)	12,25	11,34
$\log K_2$	6,55(6)	5,97	8,93
logK ₃	5,84(5)	3,47	6,91
$\log K_4$	4,39(8)	1,99	1,97
$\log K_5$	2,1(1)	-	-
$\sum \log \beta_{mc}$	16,49 ^[a]	18,22	18,25 ^[a]

10. Táblázat. A PC2A-DPA, PC2A és a PC2A-EA ligandumok protonálódási állandói (T = 25,0 °C, I = 0,15 M NaCl)

[a] a PC2A-DPA és a PC2A-EA esetén a $\sum \log \beta_{mc}$ érték a $\log K_1$ és $\log K_3$ értékekből tevődik össze; [b] Ref¹⁵⁷ 25,0 °C, I = 0.15 M NaCl

Ahogy a 10. táblázat adataiból látható, a PC2A-EA etilamincsoportjának cseréje egy dipikolilamin-csoportra (DPA) a makrociklus nitrogénatomok bázicitásának csökkenését eredményezi ($\sum \log K_2^{H}$). A makrociklus bázicitásának csökkenésében feltehetően a DPA oldalláncban található aromás egységeknek van jelentős szerepe. Ugyan a PC2A-EA ligandum vizsgálatával ellentétben jelen esetben nem végeztünk ¹H-NMR titrálást a ligandum protonálódási szekvenciájának meghatározására, de nagy bizonyossággal kijelenthető, hogy a DPA oldallánc tercier aminonitrogénatomjának a protonálódását a $\log K_2$ érték jellemzi. Ez a kijelentés azzal támasztható alá, hogy egy donoratomhoz tartozó pKa értéke nem lehet nagyobb egy komplexben ($\log K_{MnL}^{H} = 6.03$), mint a szabad ligandumban $(\log K_3 = 5,84)$, lásd 11. táblázat. Vagyis, ha az első két protonálódási állandó a makrociklus nitrogénjeihez, míg a harmadik az oldallánc nitrogénjéhez tartozna, akkor a komplex protonálódási állandójának kisebbnek kellene lenni 5,8-nál a fémion és proton között fellépő taszítás miatt. A bázicitás értékek összehasonlításából látható, hogy PC2A-DPA ligandum bázicitása körülbelül 2 nagyságrenddel kisebb, ami feltehetően a Mn²⁺-komplex kisebb stabilitási állandóját eredményezi.

A ligandum protonálódási állandóinak meghatározása után vizsgáltuk a kialakuló Mn²⁺- és Zn²⁺-komplexek egyensúlyi viszonyait is. A komplexeket jellemző stabilitási és protonálódási állandókat a 11. táblázatban adtuk meg összehasonlítva a PC2A és PC2A-EA megfelelő értékeivel.

	PC2A-DPA	PC2A ^[b]	PC2A-EA
$\log K_{\mathrm{MnL}}$	15,87(6)	17,09	19,01
$\log K_{\rm MnHL}$	6,03(3)	2,14	6,88
$\log K_{MnH2L}$	4,14(1)	—	2,50
$\log K_{\rm Mn2L}$	3,0(1)	-	_
pMn ^[a]	8,79	8,64	9,27
$\log K_{ZnL}$	19,05(6)	19,49	21,4(1)
$\log K_{\rm ZnHL}$	5,60(4)	2,74	6,41(4)
$\log K_{\text{ZnH2L}}$	3,63(2)	-	2,43(6)
$\log K_{\text{Zn2L}}$	6,52(3)	_	_
$\log K_{\mathrm{Zn2L}}^{\mathrm{OH}}$	-8,13(6)	-	_
$\log K_{\text{Zn2(OH)L}}^{OH}$	-9,65(6)	_	_

11. Táblázat. A PC2A-DPA komplexek egyensúlyi állandói, összehasonlítva a PC2A és a PC2A-EA komplexeit jellemző értékekkel (T = 25,0 °C, I = 0,15 M NaCl)

[a] pMn = $-\log [Mn^{2+}_{free}]$, $c_{Mn} = c_L = 0.01 \text{ mM}$; [b] Ref ¹⁵⁷ 25,0 °C, I = 0.15 M NaCl

Elmondhatjuk, hogy a ligandum mindkét ionnal alkotott komplexének titrálási görbéje jól illeszthető egymagvú (valamint az egymagvú komplex egyszeresen, illetve kétszeres protonált) formával, továbbá kétmagvú, valamint a Zn₂L komplex esetében vegyes-hidroxo komplexek figyelembe vételével. A PC2A-DPA mind a Mn²⁺-ionnal, mind a Zn²⁺-ionnal alkotott komplexének stabilitási állandója kisebb, mint az összehasonlításként használt PC2A és PC2A-EA komplexek állandói, amire a ligandum kisebb összbázicitás értékből már számítani lehetett. A jobb összehasonlíthatóság végett itt is megadjuk a Mn²⁺-komplexekre jellemző pMn értékeket csakúgy, mint ahogy azt az előző fejezetben megtettük.¹⁶³ A PC2A-DPA komplexre kapott érték a másik két pMn érték között helyezkedik el és számításaink azt igazolták, hogy az említett paraméterek mellett a szabad Mn²⁺-ion mennyisége kevesebb, mint 0,1% fiziológiás körülmények között. A kétmagvú komplexeket jellemző állandókat tekintve kijelenthetjük azt, hogy a második fémion a DPA funkcióval alkot komplexet – a számított log *K*_{ML}^M állandók jó egyezést mutatnak az irodalmi, M(DPA) komplexet jellemző stabilitási állandókkal (log *K*_{Mn(DPA)}=3,52 és log *K*_{Zn(DPA)}=7,63; 20 °C; *I*=0,1 M KNO₃).¹⁶⁴

Mivel a Zn-szenzitivitás megköveteli a kétmagvú $[Mn(PC2A-DPA)Zn]^{2+}$ -komplex kialakulását, valamint annak HSA molekulához való kötődését ezért következő lépésként tanulmányoztuk a $[Mn(PC2A-DPA)] - Zn^{2+}$ – HSA rendszert. Meghatároztuk a vízprotonok relaxációs sebességét, R_{1obs} és R_{2obs} (s⁻¹), a komplex oldatában növekvő HSA koncentrációk mellett. A sebességi állandók változását a 32. ábrán, a számszerű eredményeket pedig a 12. és 13. táblázatban mutatjuk be.¹⁶⁵



32. Ábra. A [Mn(PC2A-DPA)Zn]²⁺-komplex longitudinális (felül) és transzverzális (alul) relaxációsebességei az alkalmazott HSA koncentrációk függvényében (0,49 T, $c_{komplex} = 0,202 \text{ mM}, \text{pH} = 7,4, 25,0 \text{ °C} (\bullet)$)
| | T_1 mé | erések | T ₂ mérések | | |
|---|----------------|----------------|------------------------|----------------|--|
| | 25 °C | 37 °C | 25 °C | 37 °C | |
| logK _{aff} | $3,5 \pm 0,2$ | $3,6 \pm 0,2$ | $3,5 \pm 0,1$ | $3,3 \pm 0,1$ | |
| $r_{(1,2)b}$
(mM ⁻¹ s ⁻¹) | $20,3 \pm 0,8$ | $15,7 \pm 0,5$ | $26,2 \pm 0,8$ | $20,8 \pm 0,7$ | |
| | | | | | |
| | 25 | °C | 37 °C | | |
| | T_1 | T_2 | T_1 | T_2 | |
| log <i>K</i> _{aff} | 3,5 = | ± 0,1 | $3,5 \pm 0,1$ | | |
| $r_{(1,2)b}$
(mM ⁻¹ s ⁻¹) | $20,0 \pm 0,5$ | $26,0 \pm 0,7$ | 16,1 ± 0,5 | $20,0 \pm 0,5$ | |

12. Táblázat. A $[Mn(PC2A-DPA)Zn]^{2+}$ -komplex affinitási állandói és a komplexeket jellemző relaxivitás értékek $(r_{(1,2)b} (mM^{-1}s^{-1}))$. A félkövér betűtípussal szedett rész a R_{1obs} és R_{2obs} értékek szimultán illesztésével kapott affinitási állandókat mutatja adott hőmérsékleten.

A [Mn(PC2A-DPA)(H₂O)Zn]²⁺–HSA addukt stabilitására hasonló értékeket kaptunk, mint az irodalomban fellelhető adatok, amelyeket a 13. táblázatban mutatunk be. A kapott adatok alapján végzett számítás azt mutatta, hogy a kötődés elég erős ahhoz, hogy a Mn²⁺-komplex 61%-a HSA-hoz kötött formában legyen jelen.

13. Táblázat. Különböző közegben mért (R_1), illetve HSA-hoz kötött formában lévő komplexre számított (r_{1p}^{b}) relaxáció sebesség és relaxivitás értékek, a Mn²⁺-komplex Zn²⁺-ionhoz ($K_D(Zn)$) valamint Zn²⁺-ion jelenlétében HSA-hoz való kötődését jellemző K_D állandók, és a komplex vízcseresebességeit jellemző állandók HSA távollétében (T = 37,0 °C, 100 mM HEPES puffer mellett)

	R_{I} (s ⁻¹) *0.5 és 1.41 T; 37 °C								
komplexek	(-) Zn ²⁺	(+) Zn ²⁺ [a]	(+) 0.7 mM HSA	(+) Zn ²⁺ (+) 0.7 mM HSA	K _{D(Zn)} (nM)	$K_{D(\mathrm{HSA})}{}^{[e]}$ ($\mu\mathrm{M}$)	$rac{K_{D(\mathrm{HSA})}^{\mathrm{[h]}}}{(\mu\mathrm{M})}$	r_{lp} (mM ⁻¹ s ⁻¹)	k_{ex}^{310} (×10 ⁶ s ⁻¹) ^[j]
[Mn(PC2A- DPA)]	3,11 ^[b]	3,43 ^[b]	6,83 ^[b]	9,08 ^[b]	$302\pm20^{[d]}$	40 ± 4	7,6±0,8	$16,1\pm0,5$	76 ± 4
[Mn(PyC3A- BPEN)] ⁻	3,7*	4,1*	10,8 ^{*,[c]}	17,4 ^{*,[c]}	93 ^[f1]	28 ^[f2]	66	21 ^[i]	51
[Gd(DO3AM- BPEN)]	4,8*	5,1 ^{*,}	5,8 ^{*,[c]}	17,8 ^{*,[c]}	118 ^[g1]	55 ^[g2]	48	20 ^[i]	2,9

[a] ML: Zn²⁺-ion aránya 1:1; [b] látszólagos R₁ értékek 0,96; 0,94; 1,12 és 0,75 mM komplex koncentrációt alkalmazva

[c] A [Mn(PyC3A-BPEN)] – és [Gd(DO3AM-BPEN)]-komplexeket jellemző értékek az őket jellemző T1 relaxációs idők négy különböző mintán (0,1, 0,2, 0,3, 0,5 mM) 0,6

mM HSA mellett (± 0,6 mM Zn²+) történő mérésével lettek meghatározva;

[d] pH-potenciometriás titrálás segítségével meghatározott értékek;

[e] proton relaxiációsebesség illesztéséből számított adatok Aime és munkatársai szerinti módszert alkalmazva, Ref¹⁶⁶

[f] Ref¹⁶⁷ [g] Ref¹⁶⁸ 1; Zn-szenzitív fluoreszcens ligandum (ZnAF-2F) kompetitív kötődési kísérleteiből meghatározott érték; 2; Protonrelaxációs mérések illesztéséből számított érték

[h] Fluoreszcenciás módszerrel, danzilglicin kompetícióval meghatározott értékek Sherry és munkatársai szerinti módszert alkalmazva, Ref¹⁶⁸

[i] Ref,^{167,168} inkább látszólagos r_{1p} értékek, mintsem a teljesen kötött formát jellemző r_{1p} értékek, mérési körülmények részletezve a hivatkozott közleményekben;

[j] ¹⁷O-NMR mérésekből meghatározott adatok HSA távollétében

V.3.2.2. A [Mn(PC2A-DPA)]-komplex relaxációs paramétereinek vizsgálata

A rendszerre kapott relaxivitás értékeket együtt ábrázolva a számított részecskeeloszlással (33. ábra) látható, hogy a relaxivitás értékek 4,5 – 8,5 pH között állandónak mondhatók és a belső szférában egy vízmolekulát tartalmazó Mn^{2+} -komplexekre jellemző értékeknél valamivel nagyobbak $(1/T_{1obs} = 4,6 \text{ s}^{-1}).^{169,170}$

Továbbá ebben a tartományban az is alátámasztást nyert, hogy az intelligens funkcióért felelős DPA molekularészlet aminocsoportja nem koordinálódik a Mn²⁺-ionhoz, mivel az ezen a donoratomon történő deprotonálódási folyamat nincs hatással a relaxivitás értékek nagyságára, azaz a belső szférás vízmolekulák száma állandó marad a pH növelésével.

pH = 4,5 érték alatt a relaxivitás értékek növekedése a [MnH₂L] részecske megjelenésének, ill. a komplex disszociációjának is köszönhető, viszont pH = 8,5 érték felett kismértékű csökkenés figyelhető meg a relaxivitás értékekben, ami a Mn²⁺-ion Mn³⁺-á történő oxidációjával magyarázható.



33. Ábra. A [Mn(PC2A-DPA)] rendszerben képződő komplexek koncentráció eloszlási görbéi görbéi és relaxivitásának változása a pH függvényében ($c_M : c_L = 1: 1, 1,41 \text{ T}, 25,0 \text{ °C}, I = 0,15 \text{ M NaCl}$)

A relaxivitás érték nagyon jól jellemezi a komplex képességét arra, hogy milyen mértékben képes gyorsítani a külső és belsőszférás vízmolekulák relaxációs sebességét, ezért meghatároztuk a [Mn(PC2A-DPA)]-komplex r_{1p} és r_{2p} értékeit 0,5; 1 és 2 ekvivalens Zn²⁺-ion jelen- és távolléte mellett. A 14. táblázatban található adatok jól mutatják, hogy a Zn²⁺-ion koncentrációjának növelése inkább az r_{2p} értékre van hatással ($\Delta r_{2p} = 2,55$ mM⁻¹s⁻¹ a Zn²⁺-iont nem-, illetve 1 ekvivalens mennyiségben tartalmazó oldat között), ugyanakkor a relaxációs hatás növekedése nem túl nagy.

Az emberi szervezetben történő viselkedést azonban jobban modellezhetjük, ha a komplex relaxivitását 0,7 mM koncentrációjú HSA oldatban vizsgáljuk. Azt tapasztaltuk, hogy a [Mn(PC2A-DPA)]-komplex önmagában is alakít ki kölcsönhatást a HSA-val, hiszen 0,7 mM HSA jelenléte a relaxivitás növekedés $r_{1p \text{ MnL}} = 3,24 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ $\rightarrow r_{1p \text{ MnL(HSA)}} = 6,10 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nek adódott. Itt ugyanakkor azt is meg kell említeni, hogy a komplexek relaxivitására hatással van az oldat sűrűsége is, ami lassítja a komplex mozgását az oldatban (nő a rotációs-korrelációs idő), ami a relaxivitás növekedéséhez vezet. Ugyanakkor a 14. táblázat utolsó három sorában jól látható, hogy a rendszerhez Zn^{2+} -iont adva, mind az r_{1p} és r_{2p} értékek esetében további jelentős növekedést figyelhetünk meg, ami egyértelműen a HSA-val való kölcsönhatás eredménye. A magyarázata itt is az, hogy a [Mn(PC2A-DPA)]– Zn^{2+} –HSA addukt kialakulása révén, a fehérjéhez kötött komplex mozgása lassul így relaxivitása jelentős mértékben nő.

14. Táblázat. A [Mn(PC2A-DPA)]-komplex és a [Mn(PC2A-DPA)]–Zn²⁺ addukt relaxivitás értékei 0,5; 1 és 2 mM Zn²⁺-ion és 0,7 mM HSA jelen és távollétében (pH = 7,4; 37,0 °C, 1,41 T)

	$r_1 (\mathrm{mM}^{-1}\mathrm{s}^{-1})$	$r_2 (\mathrm{mM}^{-1}\mathrm{s}^{-1})$
MnL	3,24	7,18
MnL+0,5 ekv. Zn^{2+}	3,22	9,02
MnL+1,0 ekv. Zn^{2+}	3,64	9,73
MnL+2,0 ekv. Zn^{2+}	3,69	10,17
MnL 0,7 mM HSA mellett	6,10	13,48
MnL+0,5 ekv. Zn ²⁺ 0,7 mM HSA mellett	10,81	24,47
MnL+1,0 ekv. Zn ²⁺ 0,7 mM HSA mellett	12,14	26,89

Méréseink során nem csak HSA-t, hanem Seronormot (humán és nyúl), azaz liofilizált vérszérumot is használtunk az élő szervezet modellezésére. A méréseket különböző hőmérsékleten és térerőkön végeztük el, az eredményeket a 15. táblázatban foglaljuk össze.

A kapott eredmények alapján hasonló megállapítások tehetők, mint a "tisztán" HSA-ban végzett méréseknél. Annyit érdemes azonban megemlíteni, hogy a humán szérumban mért r_{1p} és r_{2p} értékek egyaránt nagyobbak a nyúlszérumban mért értékekhez képest (34. ábra), ami egyértelműen a két szérum összetételének eltéréséből adódik.

	1,41 T, 25,0 °C		0,49 T, 25,0 °C	
	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r_2 (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r_2 (mM ⁻¹ s ⁻¹)
[Mn(PC2A-DPA)]	14,26	39,55	13,74	23,82
[Mn(PC2A-DPA)Zn]	19,58	55,71	22,32	34,33
	1,41 T,	37,0 °C	0,49 T,	37,0 °C
	$ \begin{array}{c} 1,41 \text{ T}, \\ r_1 \\ (\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}) \end{array} $	37,0 °C (mM ⁻¹ s ⁻¹)	0,49 T, <i>r</i> ₁ (mM ⁻¹ s ⁻¹)	37,0 °C (mM ⁻¹ s ⁻¹)
[Mn(PC2A-DPA)]	1,41 T, <i>r</i> ₁ (mM ⁻¹ s ⁻¹) 10,17	37,0 °C (mM ⁻¹ s ⁻¹) 27,82	0,49 T, <i>r</i> ₁ (mM ⁻¹ s ⁻¹) 11,87	37,0 °C (mM ⁻¹ s ⁻¹) 20,06

15. Táblázat. [Mn(PC2A-DPA)] és [Mn(PC2A-DPA)Zn]-komplexek relaxivitás értékei nyúlszérumban (25,0 és 37,0 °C, 0,49 és 1,41 T)



MnLZn nyúl Seronormban MnLZn humán Seronormban

34. Ábra. A $[Mn(PC2A-DPA)Zn]^{2+}$ -komplexre meghatározott r_{1p} és r_{2p} értékek nyúl, illetve humán Seronorm oldatokban (3 T, c_{komplex} = 0,2 mM, pH = 7,4, 25,0 °C)

Természetesen a [Mn(PC2A-DPA)]-komplex esetében is elvégeztük az ¹⁷O-NMR-es méréseket a belső koordinációs szférában található vízmolekula cseresebességének, valamint számának és a komplex különböző relaxációs paramétereinek (aktiválási entalpia, entrópia, elektronrelaxáció sebesség) meghatározására.¹³⁸ A vizsgálatokat a korábban már részletezett módon végeztük, így itt csak az eredmények bemutatására fókuszálunk.

A Swift-Connik egyenletekkel történő illesztésből (35. ábra)¹³⁹ a vízcseresebesség értéke ($k_{ex} = (7,6 \pm 0,4) \times 10^7 \text{ s}^{-1}$) nagyjából a fele a [Mn(PC2A)(H₂O)]-komplexre ($k_{ex} = 1,26 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$) meghatározott állandónak, ami a ligandumba beépített DPA-egység vízcsere-sebességre kifejtett lassító hatásának eredménye. Ilyen fajta hatás figyelhető meg a benzilcsoportot tartalmazó NO2A alapvázú Mn²⁺-komplexek esetében is.¹⁷¹ A ΔS^{\ddagger} pozitív értéke a vízcsere disszociatív módjára enged következtetni. A meghatározott relaxációs paramétereket a 16. táblázatban foglaljuk össze.



35. Ábra. A [Mn(PC2A)(H₂O)]-komplex diamágneses effektussal korrigált transzverzális ¹⁷O relaxáció sebességének természetes alapú logaritmusa a hőmérséklet reciprokának függvényében (9,4 T, pH = 7,4).

16. Táblázat. A ¹⁷O-NMR mérésekből számolt vízcseresebesség és relaxációs paraméterek a [Mn(PC2A-DPA)]-komplex esetén (pH = 7,4)

	[Mn(PC2A-DPA)(H ₂ O)]	[Mn(3,9-PC2A)]
$r_{1p} (\mathrm{mM}^{-1}\mathrm{s}^{-1})^{[a]}$	3,24	2,91
$k_{\rm ex}^{298} ({\rm x}10^7~{\rm s}^{-1})^{[b]}$	$7,6 \pm 0,4$	12,6
$\Delta H^{\ddagger} (\mathrm{kJ} \mathrm{mol}^{-1})^{[\mathrm{b}]}$	36 ± 1	37,5
$\Delta S^{\ddagger} (\mathrm{J} \mathrm{K}^{-1} \mathrm{mol}^{-1})^{[b]}$	27 ± 4	-
$\frac{1/T_{1e}^{298}}{(x10^8 \text{ s}^{-1})^{[b]}}$	$1,2 \pm 0,1$	11
$A_0/\hbar (x10^6 \text{ rad s}^{-1})$	40 ^[c]	-42,4

[a] relaxometriás módszerrel meghatározva, [Mn(PC2A-DPA)(H₂O)] 1,41 T, [Mn(3,9-PC2A)] 0,49 T, T = 25,0 °C; [b] ¹⁷O-NMR módszerrel meghatározva; [c] fixálva az illesztés során (r_{1p} : paramágneses relaxivitás, k_{ex}^{298} : vízcseresebesség, ΔH^{\ddagger} : vízcseresebesség aktiválási entalpiája, ΔS^{\ddagger} : vízcseresebesség aktiválási entrópiája, A_0/\hbar : hiperfinom csatolási állandó, $1/T_{1e}^{298}$: fémion elektronrelaxációjának sebessége)

A fémionhoz koordinálódó (ú.n. belső szférás) vízmolekulák számának meghatározása az előzőekben ismertetett, Gale és munkatársai által kidolgozott módszer alapján történt (36. ábra)¹³⁸ és egy 0,6 ± 0,2 értéket adott. A kapott értéket, valamint a komplex relaxivitását ($r_{1p} = 3,24 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) figyelmbe véve, a számítások során a komplex belső szférájában található vízmolekulák számát 1-re rögzítettük (hasonlóan az általunk és az irodalomban fellelhető PC2A-származék komplexekhez).¹³³



36. Ábra. A [Mn(PC2A-DPA)]-komplex ¹⁷O-transzverzális relaxivitásának változása a hőmérséklet reciprokának függvényében ($r_{2max}^{o} = 318 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$; (400 MHz, pH = 7,4). A folytonos vonal a Lorentz függvény szerinti illesztés eredményeit mutatják

Érdekes lett volna továbbá azt is megvizsgálni, hogy a Zn^{2+} -ionnak milyen hatása van a $[Mn(PC2A-DPA)(H_2O)Zn]^{2+}$ -komplex belső szférájában koordinált vízmolekula cseresebességére, ugyanakkor ezeket a vizsgálatokat elvetettük. Ennek oka az, hogy a magasabb hőmérsékleten bekövetkező fémcserereakció, a szabad Mn^{2+} -ion, vagy a

 $[Zn(PC2A-DPA)(H_2O)Mn]^{2+}$ komplex (ahol q > 1) megjelenése bizonytalanná tette volna a kapott eredményeket.

V.3.2.3. A [Mn(PC2A-DPA)]-komplex kinetikai vizsgálata

Bár a [Mn(PC2A-DPA)]-komplex disszociációs kinetikáját nem vizsgáltuk részletesen, azért ebben az esetben is elvégeztük a Caravan és munkatársai által javasolt relaxometriás kísérletet ($c_{[Mn(PC2A-DPA)]} = 1$ mM; $c_{Zn2+} = 25$ mM; 1,41 T; 37,0 °C, pH = 6,0, 37. ábra).¹⁴⁰ A meghatározott pszeudo-elsőrendű sebességi állandó ($k_{obs} = (2,98 \pm 0,01) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) segítségével kiszámítottuk a komplex felezési idejét pH=6,0-ra, ami 64,5 órának adódott. Ez az érték több mint két nagyságrenddel nagyobb inertséget mutat, mint az összehasonlításként használt, Gd³⁺-alapú kontrasztanyagok alternatívájaként javasolt [Mn(PyC3A)(H₂O)]⁻-komplexé ($k_{obs} = 6,76 \pm 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $t_{1/2} = 0,29$ óra). A kapott eredmény alapján elmondhatjuk, hogy a komplexünk az emberi szervezetben (a kiürülés körülbelül 1,6 órás felezési idejét figyelembe véve) csak nagyon kis mértékben disszociál és a vérben (pH = 7,4) akár több száz órás felezési idővel is rendelkezhet, hiszen a disszociáció mértéke a pH növelésével csökken.



37. Ábra. A [Mn(PC2A-DPA)]-komplex fémcsere reakciójának követése 25 ekvivalens Zn²⁺ion jelenlétében, a relaxivitás (r_{2p}) érték változása az idő függvényében ($c_{komplex} = 1 \text{ mM}$, pH = 6,0, T = 37,0 °C, 1,41 T)

V.3.2.4. In vitro (fantom) és in vivo egér kísérletek

Ahhoz, hogy az előzőekben bemutatott bíztató fizikai-kémiai eredményeket "láthatóvá" tegyük, először fantom, majd kisállat MRI vizsgálatokat végeztünk. Az *in vitro* kísérletekhez 6 mintát készítettünk (+1 háttér), amelyek között megtalálható a [Mn(PC2A-DPA)]-komplex Zn²⁺, HSA és Seronorm jelen- és távollétében. A méréseket két, a klinikai gyakorlatban is használatos műszeren végeztük el, az eredményeket a 38. ábrán és 17. táblázatban mutatjuk be.



38. Ábra. T_1 - (felső sáv) and T_2 -(alsó sáv) súlyozott MR képek különböző térerőkön. A T_1 és T_2 relaxációs idők ms egységben vannak megadva

17. Táblázat. A relaxációs idők (ms) és a R_{obs} értékek (s ⁻¹ , z	zárójelben) kvantitatív kiértékelése
1,5 és 3 T térerősségen ($c_{[Mn(PC2A-DPA)]} = 0,2 \text{ mM}, 25 \text{ °C}, hut$	ımán Seronorm oldatban)

Térerősség	1,5	Т	3 T		
Minta neve	T1-súlyozott	T2-súlyozott	T1-súlyozott	T2-súlyozott	
MnLig	633 ± 9 (1,6)	358 ± 14 (2,8)	693 ± 7 (1,4)	279,6 ± 8,6 (3,6)	
MnLig+HSA	419 ± 7 (2,4)	212 ± 6 (4,7)	543 ± 4 (1,8)	145 ± 5 (6,9)	
MnLigZn _{0.5} +HSA	304 ± 4 (3,3)	164 ± 3 (6,1)	452 ± 9 (2,2)	102 ± 3 (9,8)	
MnLigZn+HSA	275 ± 1 (3,6)	158 ± 3 (6,3)	438 ± 2 (2,3)	89 ± 2 (11,2)	
MnLig + Sero	390 ± 3 (2,6)	193 ± 5 (5,2)	519 ± 4 (1,9)	112 ± 3 (8,9)	
MnLigZn+Sero	155 ± 3 (6,5)	145 ± 7 (6,9)	292 ± 1 (3,4)	47 ± 1 (21,5)	
HSA+puffer	1061 ± 30 (0,94)	515 ± 89 (1,9)	$1384 \pm 16,2 \\ (0,7)$	716 ± 90,2 (1,4)	

Mindkét térerőn a korábbi relaxometriás méréseknek megfelelően alakulnak a relaxáció növelő hatások. A 38. ábrán jól látható, hogy a [Mn(PC2A-DPA)Zn]²⁺-komplex legnagyobb kontraszt növekedést а Seronormos oldatánál találjuk, amelynek súlyozott T₂ relaxációs ideje 1,5 T térerőn kevesebb, mint fele, míg 3 T térerőn hatoda a [Mn(PC2A-DPA)]relaxivitás komplexének. Ez а növekedés már reprodukálhatóan megjeleníthető a gyakorlatban alkalmazott készülékeken is.

A [Mn(PC2A-DPA] *in vivo* viselkedését egészséges laboratóriumi egereken teszteltük úgy, hogy 0,1 mmol/ttkg koncentrációban alkalmazva a komplexet T_1 és T_2 súlyozott felvételeket készítettünk. A natív felvételhez képest a T_1 -súlyozott felvételeken csupán kb. 20%-os kontrasztnövekedést tapasztaltunk D-glükóz jelenléte nélkül, ám intraperitoneális D-glükóz injektálás után ez a kontrasztnövekedés körülbelül 60%-ra emelkedett. Ehhez hasonló hatást észleltünk T_2 -súlyozott képek elkészítése esetén is. (39. ábra)

A kapott eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy az általunk előállított és vizsgált [Mn(PC2A-DPA)]-komplex képes arra, hogy segítségével *in vivo* körülmények között detektálható legyen a Zn²⁺-ionok koncentráció változására egészséges prosztatában.

112



39. Ábra. Transzaxiális T_1 (felső sor) és T_2 (középső sor) MR képek az egér prosztatájáról (3 T) rendre: natív; [Mn(PC2A-DPA)]-komplex injektálása után intraperitoneális D-glükóz injektálás nélkül; [Mn(PC2A-DPA)]-komplex injektálása, majd intraperitoneális D-glükóz injektálás után. (a piros körben látható a prosztata). Az alsó sor grafikonjai a készített képek kvantitatív kiértékelését mutatják (prosztata, n = 3/csoport)

V.3.2.5. A fejezet rövid összefoglalása

A [Mn(PC2A-DPA)]-komplexek vizsgálatainak eredményeit az alábbiak szerint foglalhatjuk össze:

• A gyakorlati alkalmazás tekintetében fontos Mn^{2+} -komplex stabilitási állandója kisebb, mint a [Mn(PC2A)]-komplexé, de még így is elég nagy ahhoz, hogy a szabad Mn^{2+} -ion mennyisége kevesebb, mint 0,1% legyen pH = 7,4 értéken

• Az általunk vizsgált komplexek vízcseresebessége kisebb, mint a [Mn(PC2A)]-komplexre jellemző érték, ami a beépített funkcióscsoportok hatásával magyarázható.

• A komplex inertségét kellően nagynak találtuk az *in vivo* alkalmazhatóság tekintetében.

• Részletesen tanulmányoztuk a Mn²⁺-komplex, valamint annak Zn²⁺-ionnal kialakuló kétmagvú komplexe relaxivitását különböző közegekben. A [Mn(PC2A-DPA)(H₂O)Zn]²⁺–HSA adduktban a kétmagvú komplex 60%-a kötött formában van jelen. A [Mn(PC2A-DPA)Zn]²⁺-komplex relaxivitása jelentős növekedést mutat HSA mellett.

• Együttműködés keretein belül egérkísérletek végeztünk, ahol várakozásainknak megfelelően jó minőségű felvételeket sikerült készíteni egér prosztatáról glükózzal történő stimulációt használva.

114

VI. Összefoglalás

Doktori munkám során olyan makrociklusos ligandumok Gd³⁺- és Mn²⁺-komplexeit vizsgáltuk, amelyek potenciális intelligens kontrasztanyag jelöltek lehetnek. A vizsgált komplexek között pH, illetve a szervezetben megtalálható ionokra (Ca²⁺- és Zn²⁺-ionok) érzékeny anyagok szerepeltek. A Mn²⁺-alapú intelligens kontrasztanyag jelöltek ligandumait, PC2A-EA, PC2A-NP és PC2A-DPA magam állítottam elő, míg a Ca²⁺-szenzorok modellvegyületeinek szánt ligandumokat (DO3A-PAMA és DO3A-EAMA) együttműködő partnerünktől kaptuk.

Vizsgáltuk a DO3A-PAMA és DO3A-EAMA ligandumok egyensúlyi viszonyait pár esszenciális fémionnal (Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺) és hogy Gd³⁺-ionnal. Megállapítottuk, а DO3A-PAMA ligandum makrociklusának bázicitása nagyobb, mint a DO3A-EAMA-é, ami az egy metiléncsoporttal hosszabb oldallánc hatása lehet, mivel így az abban megtalálható amidcsoport elektronszívó hatása kevésbé érvényesül. A [Gd(DO3A-EAMA)]-komplexet jellemző stabilitási állandó nagyobb a [Gd(DO3A-PAMA)]-komplex állandójánál, ami az amid típusú oxigén koordinációjával megvalósuló kelátgyűrű tagszámának növekedésével magyarázható. Az általunk vizsgált stabilitási állandók értékei elmaradnak a DO3A és DOTA-komplexeket jellemző értékektől, aminek magyarázata az, hogy csökkent a töltéssel rendelkező donoratomok száma, megbomlik a DOTA-komplexekre jellemző kompakt szerkezet, valamint egy acetátcsoport cseréje alkilamid-csoportra is csökkenést eredményez a stabilitási állandóban.

A Gd³⁺-komplexek relaxivitását vizsgálva a két belső szférás vízmolekulát tartalmazó formára jellemző értékeket kaptunk. A pH-növelésével a relaxivitásban csökkenés mutatkozik, ami az amid típusú oxigén

koordinációjával magyarázható és a belső szférában egy vízmolekulát tartalmazó komplexekre jellemző érték.

A Gd³⁺-komplexek kinetikai vizsgálatai alapján elmondható, hogy az oldalláncban propilén-egységet tartalmazó [Gd(DO3A-PAMA)]-komplex hozzávetőleg 6-szor labilisabb a [Gd(DO3A-EAMA)]-komplexnél. A vizsgálat során alkalmazott pH-tartományban az oldallánc amidcsoportja nem koordinálódik a fémionhoz, a sebességi állandók különbsége a hosszabb szénlánc nagyobb flexibilitásának köszönhető, mivel ez a tulajdonság megkönnyíti az oldallánc aminocsoportja és egyik az acetátcsoport/makrociklus nitrogén közötti protontranszfert. Ugyanakkor a fiziológiás pH-ra (7,4) számított felezési idők messze elmaradnak a [Gd(DOTA)]-komplexre jellemző értéktől, de még mindig elfogadhatók a gyakorlati alkalmazás tekintetében.

Kellően nagy termodinamikai stabilitásuk, elfogadható inertségük és a jó relaxációnövelő hatásuk alkalmassá teheti a komplexeket a gyakorlati alkalmazásra és jó alapjait képezhetnek egy Ca²⁺-ionra érzékeny kontrasztanyagnak. Az eredmények számos értékes információval látnak el minket további, Ca²⁺-ion szenzitív kontrasztanyagnak szánt ligandumok tervezése terén is.

Vizsgáltuk a PC2A-származék ligandumok Mn²⁺-ionnal kialakuló komplexeinek fiziko-kémiai tulajdonságait azzal a céllal, hogy információt nyerjünk azok pH- (PC2A-EA és PC2A-NP), illetve Zn²⁺-ion (PC2A-DPA) érzékenységükről az *in vivo* alkalmazásuk tekintetében. NMR-spektroszkópiás titrálás segítségével a PC2A-EA ligandum esetén sikerült a protonálódási szekvenciát is leírni. Megvizsgáltuk a ligandumok néhány fémionnal (Mn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺) kialakuló komplexének egyensúlyi viszonyait is. A gyakorlati alkalmazás tekintetében fontos Mn²⁺-komplex stabilitási állandója

a PC2A-EA ligandum esetén a legnagyobb és a pH-szenzornak szánt komplexei esetén mindkét esetben nagyobb, ligandumok mint а [Mn(PCTA)]⁻-komplexet jellemző érték. Egy pH-szenzornak szánt komplex esetében nagyon fontos paraméter a Mn²⁺-komplex protonálódási állandója, amelynek a fiziológiás pH-tartományhoz közel kell esnie. Ennek a feltételnek a [Mn(PC2A-EA)]-komplex eleget is tesz, viszont a [Mn(PC2A-NP)]komplex protonálódási állandója ezen tartományon kívül esik. Vizsgálva a komplexek relaxációs sajátságait látható, hogy pH > 6 esetben a [Mn(PC2A-NP)]-komplex relaxivitása a külső szférás hozzájárulásra csökkent, míg a [Mn(PC2A-EA)]-komplex longitudinális és transzverzális relaxivitásának változása pH = 6.8 - 7.4 tartományban rendre $0.56 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $1.01 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (0,49 T, 25,0 °C-on mérve). Ez a különbség azonban sokkal beszédesebb a gyakorlatban is alkalmazott térerőn (3 T, 25 ± 2 °C), 0,82 és 4,92, ami már alkalmassá teheti az ágens MRI-vel történő detektálását.

Az általunk vizsgált komplexek vízcseresebessége kisebb, mint a [Mn(PC2A)]-komplexre jellemző érték, ami a beépített funkcióscsoportok hatásával magyarázható. A komplexek inertségüket tekintve kellően nagyok az *in vivo* alkalmazhatóság tekintetében.

A Zn²⁺-kötő PC2A-DPA ligandum esetén fontos paraméter a kétmagvú komplex stabilitási állandója, valamint a komplex HSA-val kialakuló kölcsönhatását jellemző affinitási állandó. Ezen adatok alapján hogy a [Mn(PC2A-DPA)(H₂O)Zn]²⁺–HSA adduktban a elmondható, komplex 60%-a kötött formában kétmagvú van jelen. А [Mn(PC2A-DPA)Zn]²⁺-komplex relaxivitása jelentős növekedést mutat HSA mellett, ami a köztük történő kölcsönhatással magyarázható és elegendően nagy az MRI-vel történő nyomonkövetéshez. Együttműködés keretein belül egérkísérleteket végeztünk, ahol várakozásainknak megfelelően jó minőségű

117

felvételeket sikerült készíteni egér prosztatáról glükózzal történő stimulációt használva.

Összességében elmondható, hogy funkcióját tekintve mind a [Mn(PC2A-EA)]-komplex, mind pedig a [Mn(PC2A-DPA)]-komplex alkalmazható lehet a klinikai gyakorlatban, mint pH- illetve Zn²⁺-ionra érzékeny ágens.

VII. Summary

During my PhD work coordination chemical properties of some macrocyclic Gd³⁺ and Mn²⁺ complexes have been studied in detail, which can be considered as potential "smart"-MRI contrast agent candidates. The PC2A-EA, PC2A-NP and PC2A-DPA ligands were synthetized in our laboratory, while the DO3A-PAMA and DO3A-EAMA chelators were provided by our cooperative partner (see appendix for more details).

The protonation constants of the DO3A-PAMA and DO3A-EAMA, and the protonation and stability constants of their complexes formed with some essential metal ions (Ca²⁺; Mg²⁺; Zn²⁺; Cu²⁺) and Gd³⁺ ion were determined. The basicity of the macrocyclic backbone of DO3A-PAMA ligand is somewhat higher than that was found for DO3A-EAMA which is the result of the longer distance between the N donor and the amide functional group in the DO3A-PAMA where the electron withdrawing effect of the amide group is weaker. The stability constants of the Gd³⁺ complexes are lower than the corresponding values obtained for DO3A and DOTA chelates. The [Gd(DO3A-EAMA)] complex possesses higher stability than [Gd(DO3A-PAMA)], since the larger chelate-ring (6 \rightarrow 7) formed during the amide oxigen coordination in the PAMA complex.

The similar protonation constant of the amine group in the side-chain determined for the ligand and its Gd³⁺ complex suggests that the pendant does not take part in the coordination of the metal center. In sum, the stability constants of the investigated complexes are lower than those of DO3A and DOTA complexes, due to the replacement of acetate pendant arms by alkylamide moieties.

At pH = 6.0, where the monoprotonated Gd^{3+} -complexes are dominant, the relaxivity values show bishydrated complexes in solution in which 2 water molecules are coordinated in the inner-sphere of the chelates. At higher pH values, the relaxivity of the complexes is decreasing continuously due to the amide-oxygen coordination to the metal center.

The inertness of [Gd(DO3A-PAMA)] complex is 6 times lower than that of [Gd(DO3A-EAMA)] probably because of the higher flexibility of the longer side-chain which facilitates the proton transfer to the N atoms of the macrocycle. However, the calculated $t_{1/2}$ values (pH = 6.0) are significantly lower than those were gained for the comparative complexes, although being high enough for biological investigations.

Altogether, the results delivered valuable information which can be used for further ligand design when tailoring smart/intelligent (Ca^{2+} -responsive) probes.

 Mn^{2+} -complexes of several PC2A-derivative ligands have been studied in order to obtain information on their potential in sensing pH (PC2A-EA and PC2A-NP) or Zn²⁺ concentration (PC2A-DPA) during *in vivo* applications.

Based on the equilibrium studies, one can conclude that the basicity of PC2A-EA and PC2A-NP is higher than that was found for PCTA ligand, while PC2A-DPA has somewhat lover basicity. The stability and protonation constants of complexes formed with biologically relevant metal ions were determined, and the [Mn(PC2A-EA)] was found to be the most stable among the investigated ones. According to the calculated pMn values, all of the investigated Mn²⁺ complexes are suitable for *in vivo* applications (their pMn values are greater than 8). The protonation constant of the Mn^{2+} complexes considered as pHresponsive probes is one of the most important parameter since the protonation (affecting the relaxivity) has to occur near to physiological pH. The [Mn(PC2A-EA)] complex fulfills this requirement, but unfortunately, the protonation of [Mn(PC2A-NP)] takes place at a lover pH, below the desired pH window.

The stability constant of the dinuclear complex of PC2A-DPA $(\log K_{Zn2L} = 6.52(3))$ and the effective binding affinity to HSA $(K_D = 40 \ \mu M)$ were determined and used to calculate the amount of the complex that is bound to the HSA. The calculation shows that 60% of $[Mn(PC2A-DPA)(H_2O)Zn]^{2+}$ is linked to the protein under the experimental conditions applied.

As expected, above pH 6 the relaxivity of [Mn(PC2A-NP)] complex corresponds to the value characterizing the other-sphere relaxation, when q =0. On the other hand, the [Mn(PC2A-EA)] presents a change both in the longitudinal ($\Delta r_{1p} = 0.56 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) and transvers ($\Delta r_{2p} = 1.01 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) relaxivity at 0,49 T, in the pH range of 6.8 – 7.4, which becomes more significant at the clinically applied 3 T magnetic field ($\Delta r_{1p} = 0.82 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $\Delta r_{2p} = 4.92 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$).

The relaxivity of [Mn(PC2A-DPA)Zn]²⁺ complex is increasing significantly in the presence of HSA due to a relatively strong interaction between the complex and the protein making the system suitable for *in vivo* applications. Successful *in vivo* experiments were carried out using mice model, in which the glucose stimulated zinc secretion in the prostate was detected by our compound in MRI.

The water exchange rate constants, k_{ex}^{298} determined for the studied Mn²⁺ complexes are lower than that obtained for [Mn(PC2A)] which is the

result of the incorporation of the pendant arm responsible for the response of the probe into the ligand structure causing significant changes in the coordination environment.

The complexes are more labile than the parent [Mn(PCTA)] complex, but the calculated half-lives show that the inertness is high enough to be applied as MRI probes. In summary, both [Mn(PC2A-EA)] and [Mn(PC2A-DPA)] complexes are applicable *in vivo* as responsive/smart imaging probes.

VIII. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném köszönetem kifejezni témavezetőmnek, Dr. Kálmán Ferencnek, akivel már alapképzéses korom óta dolgoztunk közösen többek között azért, hogy ez a dolgozat elkészülhessen. Köszönöm az évek során tanúsított szakmai segítségét, illetve támogatását.

Köszönöm Dr. Tircsó Gyulának a ligandumok szintézisei, különösen a kísérlettervezések során nyújtott segítségét.

Köszönöm a lehetőséget Dr. Tóth Imre professor emeritusnak, hogy PhD-hallgató éveim alatt lehetőséget nyújtott a kémia új és izgalmas területeinek megismerésére is.

Köszönöm továbbá kutatócsoportunk egykor és jelenlegi tagjainak és irodatársaimnak, Takács Katalinnak, Dr. Tóth-Molnár Enikőnek, Babinszkiné Dr. Farkas Editnek, Dr. Sebestyén Annamáriának, Dr. Garda Zoltánnak, Dr. Baranyai Zsoltnak, Horváth Dávidnak és Tarnóczi Katinkának támogatásukat és a hosszú évek alatt közösen együtt töltött minőségi időt. Köszönöm az informatikai és matematikai ismereteim bővítését Zékány Lászlónak.

Szeretném külön megköszönni Csupász Tibornak, Váradi Balázsnak és Dr. Lihi Norbertnek a barátságukat és a felejthetetlen légkört, amit teremtettek/teremtettünk a mindennapok során.

Végül szeretném megköszönni szüleimnek, családomnak, barátaimnak a türelmet és támogatást. Külön köszönet illeti Feleségemet és kisfiamat, akik mindvégig mellettem álltak és megteremtették azt a légkört, ami elengedhetetlen volt a dolgozat megszületéséhez.

IX. Hivatkozások

- Wahsner, J.; Gale, E. M.; Rodríguez-Rodríguez, A.; Caravan, P. Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chem. Rev.* 2019, *119* (2), 957–1057. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00363.
- Grobner, T. Gadolinium a Specific Trigger for the Development of Nephrogenic Fibrosing Dermopathy and Nephrogenic Systemic Fibrosis? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, *21* (4), 1104–1108. https://doi.org/10.1093/ndt/gfk062.
- (3) Knappe, A.; Möller, P.; Dulski, P.; Pekdeger, A. Positive Gadolinium Anomaly in Surface Water and Ground Water of the Urban Area Berlin, Germany. *Geochemistry* 2005, 65 (2), 167–189. https://doi.org/10.1016/j.chemer.2004.08.004.
- (4) Kanda, T.; Fukusato, T.; Matsuda, M.; Toyoda, K.; Oba, H.; Kotoku, J.; Haruyama, T.; Kitajima, K.; Furui, S. Gadolinium-Based Contrast Agent Accumulates in the Brain Even in Subjects without Severe Renal Dysfunction: Evaluation of Autopsy Brain Specimens with Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy. *Radiology* 2015, 276 (1), 228–232. https://doi.org/10.1148/radiol.2015142690.
- (5) Zhang, X.; Lin, Y.; Gillies, R. J. Tumor PH and Its Measurement. J. Nucl. Med. 2010, 51 (8), 1167–1170. https://doi.org/10.2967/jnumed.109.068981.
- (6) Ohki, K.; Chung, S.; Ch'ng, Y. H.; Kara, P.; Reid, R. C. Functional Imaging with Cellular Resolution Reveals Precise Micro-Architecture in Visual Cortex. *Nature* 2005, 433 (7026), 597–603. https://doi.org/10.1038/nature03274.
- (7) Angelovski, G.; Fouskova, P.; Mamedov, I.; Canals, S.; Toth, E.; Logothetis, N. K. Smart Magnetic Resonance Imaging Agents That Sense Extracellular Calcium Fluctuations. *ChemBioChem* 2008, 9 (11), 1729–1734. https://doi.org/10.1002/cbic.200800165.
- (8) Garda, Z.; Molnár, E.; Hamon, N.; Barriada, J. L.; Esteban-Gómez, D.; Váradi, B.; Nagy, V.; Pota, K.; Kálmán, F. K.; Tóth, I.; Lihi, N.; Platas-Iglesias, C.; Tóth, É.; Tripier, R.; Tircsó, G. Complexation of Mn(II) by Rigid Pyclen Diacetates: Equilibrium, Kinetic, Relaxometric, Density Functional Theory, and Superoxide Dismutase Activity Studies. *Inorg. Chem.* **2021**, *60* (2), 1133–1148. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c03276.
- (9) Garda, Z.; Molnár, E.; Kálmán, F. K.; Botár, R.; Nagy, V.; Baranyai, Z.; Brücher, E.; Kovács, Z.; Tóth, I.; Tircsó, G. Effect of the Nature of Donor Atoms on the Thermodynamic, Kinetic and Relaxation Properties of Mn(II) Complexes Formed With Some Trisubstituted 12-Membered Macrocyclic Ligands. *Front. Chem.* 2018, *6*, 232. https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00232.
- (10) Tircsó, G.; Benyó, E. T.; Suh, E. H.; Jurek, P.; Kiefer, G. E.; Sherry, A. D.; Kovács, Z. (S)-5-(p-Nitrobenzyl)-PCTA, a Promising Bifunctional Ligand with Advantageous Metal Ion Complexation Kinetics. *Bioconjug. Chem.* 2009, 20 (3), 565–575. https://doi.org/10.1021/bc8004914.
- (11) Molnár, E.; Váradi, B.; Garda, Z.; Botár, R.; Kálmán, F. K.; Tóth, É.; Platas-Iglesias, C.; Tóth, I.; Brücher, E.; Tircsó, G. Remarkable Differences and Similarities between the Isomeric Mn(II)- Cis and Trans- 1,2-Diaminocyclohexane- N, N, N', N'-Tetraacetate Complexes. *Inorganica Chim. Acta* 2018, 472, 254–263. https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.07.071.
- (12) Garda, Z.; Molnár, E.; Hamon, N.; Barriada, J. L.; Esteban-Gómez, D.; Váradi, B.; Nagy, V.; Pota, K.; Kálmán, F. K.; Tóth, I.; Lihi, N.; Platas-Iglesias, C.; Tóth, É.; Tripier, R.; Tircsó, G. Complexation of Mn(II) by Rigid Pyclen Diacetates: Equilibrium,

Kinetic, Relaxometric, Density Functional Theory, and Superoxide Dismutase Activity Studies. *Inorg. Chem.* **2021**, *60* (2), 1133–1148. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c03276.

- (13) Zaichick, V. A Systematic Review of the Zinc Content of the Normal Human Prostate Gland. *Biol. Trace Elem. Res.* **2021**, *199* (10), 3593–3607. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02495-z.
- (14) Röntgen, W. C. On a New Kind of Rays. *Science* **1896**, *3* (59), 227–231. https://doi.org/10.1126/science.3.59.227.
- (15) Aldrich, J. E. Basic Physics of Ultrasound Imaging: Crit. Care Med. 2007, 35 (Suppl), S131–S137. https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000260624.99430.22.
- (16) The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1979. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2023. Sun. 19 Feb 2023.
- (17) Positron Emission Tomography: Basic Sciences; Bailey, D. L., Ed.; Springer: New York, 2005.
- (18) Lauterbur, P. C. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature* **1973**, *242* (5394), 190–191. https://doi.org/10.1038/242190a0.
- (19) Rudin, M. Nobel Prize 2003 in Physiology and Medicine. Anal. Bioanal. Chem. 2003, 377 (6), 955–955. https://doi.org/10.1007/s00216-003-2342-y.
- (20) Runge, V. M. Critical Questions Regarding Gadolinium Deposition in the Brain and Body After Injections of the Gadolinium-Based Contrast Agents, Safety, and Clinical Recommendations in Consideration of the EMA's Pharmacovigilance and Risk Assessment Committee Recommendation for Suspension of the Marketing Authorizations for 4 Linear Agents. *Invest. Radiol.* 2017, *52* (6), 317–323. https://doi.org/10.1097/RLI.00000000000374.
- (21) Helm, L.; Merbach, A. E.; Tóth, É. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging, 2nd edition.; John Wiley & Sons Inc: Hoboken, NJ, 2013.
- (22) Lauffer, R. B. Paramagnetic Metal Complexes as Water Proton Relaxation Agents for NMR Imaging: Theory and Design. *Chem. Rev.* **1987**, *87* (5), 901–927. https://doi.org/10.1021/cr00081a003.
- (23) Tircsó, G.; Molnár, E.; Csupász, T.; Garda, Z.; Botár, R.; Kálmán, F. K.; Kovács, Z.; Brücher, E.; Tóth, I. 2 Gadolinium(III)-Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. A Re-Appraisal. In *Metal Ions in Bio-Imaging Techniques*; Sigel, A., Freisinger, E., Sigel, R. K. O., Eds.; De Gruyter, 2021; pp 39–70. https://doi.org/10.1515/9783110685701-008.
- (24) Weinmann, H.; Brasch, R.; Press, W.; Wesbey, G. Characteristics of Gadolinium-DTPA Complex: A Potential NMR Contrast Agent. Am. J. Roentgenol. 1984, 142 (3), 619– 624. https://doi.org/10.2214/ajr.142.3.619.
- (25) Desreux, J. F.; Barthélemy, P. P. Highly Stable Lanthanide Macrocyclic Complexes: In Search of New Contrast Agents for NMR Imaging. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B* 1988, 15 (1), 9–15. https://doi.org/10.1016/0883-2897(88)90153-5.
- (26) Kumar, K.; Chang, C. A.; Tweedle, M. F. Equilibrium and Kinetic Studies of Lanthanide Complexes of Macrocyclic Polyamino Carboxylates. *Inorg. Chem.* **1993**, *32* (5), 587– 593. https://doi.org/10.1021/ic00057a017.
- (27) Rizkalla, E. N.; Choppin, G. R.; Cacheris, W. Thermodynamics, Proton NMR, and Fluorescence Studies for the Complexation of Trivalent Lanthanides, Calcium(2+), Copper(2+), and Zinc(2+) by Diethylenetriaminepentaacetic Acid Bis(Methylamide). *Inorg. Chem.* **1993**, *32* (5), 582–586. https://doi.org/10.1021/ic00057a016.
- (28) Smith, R. M.; Martell, A. E. Critical Stability Constants, Enthalpies and Entropies for the Formation of Metal Complexes of Aminopolycarboxylic Acids and Carboxylic

Acids. Sci. Total Environ. 1987, 64 (1–2), 125–147. https://doi.org/10.1016/0048-9697(87)90127-6.

- (29) Cacheris, W. P.; Nickle, S. K.; Sherry, A. D. Thermodynamic Study of Lanthanide Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane-N,N',N"-Triacetic Acid and 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N",N"''-Tetraacetic Acid. *Inorg. Chem.* 1987, 26 (6), 958–960. https://doi.org/10.1021/ic00253a038.
- (30) Port, M.; Idée, J.-M.; Medina, C.; Robic, C.; Sabatou, M.; Corot, C. Efficiency, Thermodynamic and Kinetic Stability of Marketed Gadolinium Chelates and Their Possible Clinical Consequences: A Critical Review. *BioMetals* 2008, 21 (4), 469–490. https://doi.org/10.1007/s10534-008-9135-x.
- (31) Do, Q. N.; Ratnakar, J. S.; Kovács, Z.; Tircsó, G.; Krisztián Kálmán, F.; Baranyai, Z.; Brücher, E.; Tóth, I. Chapter 1. General Synthetic and Physical Methods. In *New Developments in NMR*; Pierre, V. C., Allen, M. J., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2017; pp 1–120. https://doi.org/10.1039/9781788010146-00001.
- (32) Uggeri, F.; Aime, S.; Anelli, P. L.; Botta, M.; Brocchetta, M.; de Haeen, C.; Ermondi, G.; Grandi, M.; Paoli, P. Novel Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. Synthesis and Characterization of the Ligand BOPTA and Its Ln(III) Complexes (Ln = Gd, La, Lu). X-Ray Structure of Disodium (TPS-9-145337286-C-S)-[4-Carboxy-5,8,11-Tris(Carboxymethyl)-1-Phenyl-2-Oxa-5,8,11-Triazatridecan-13-Oato(5-)]Gadolinate(2-) in a Mixture with Its Enantiomer. *Inorg. Chem.* 1995, *34* (3), 633–643. https://doi.org/10.1021/ic00107a017.
- (33) Lauffer, R. B.; Parmelee, D. J.; Dunham, S. U.; Ouellet, H. S.; Dolan, R. P.; Witte, S.; McMurry, T. J.; Walovitch, R. C. MS-325: Albumin-Targeted Contrast Agent for MR Angiography. *Radiology* **1998**, 207 (2), 529–538. https://doi.org/10.1148/radiology.207.2.9577506.
- (34) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* 1999, 99 (9), 2293–2352. https://doi.org/10.1021/cr980440x.
- (35) Pan, D. Manganese-Based MRI Contrast Agents: Past, Present and Future. *Tetrahedron* 2011, 4 (67(44)), 8431–8444. https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.07.076.
- (36) Toft, K. G.; Hustvedt, S. O.; Grant, D.; Martinsen, I.; Gordon, P. B.; Friisk, G. A.; Korsmo, Å. J.; Skotland, T. Metabolism and Pharmacokinetics of MnDPDP in Man. *Acta Radiol.* 1997, 38 (5), 677–689. https://doi.org/10.1080/02841859709172400.
- (37) Wang, Y.-X. J. Superparamagnetic Iron Oxide Based MRI Contrast Agents: Current Status of Clinical Application. *Quant. Imaging Med. Surg.* **2011**, *1* (1), 35–40. https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2011.08.03.
- (38) Vaninbroukx, J.; Bosmans, H.; Sunaert, S.; Demedts, M.; Delcroix, M.; Marchal, G.; Verschakelen, J. The Use of ECG and Respiratory Triggering to Improve the Sensitivity of Oxygen-Enhanced Proton MRI of Lung Ventilation. *Eur. Radiol.* 2003, *13* (6), 1260– 1265. https://doi.org/10.1007/s00330-002-1694-6.
- (39) Harisinghani, M. G.; Barentsz, J.; Hahn, P. F.; Deserno, W. M.; Tabatabaei, S.; van de Kaa, C. H.; de la Rosette, J.; Weissleder, R. Noninvasive Detection of Clinically Occult Lymph-Node Metastases in Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348 (25), 2491– 2499. https://doi.org/10.1056/NEJMoa022749.
- (40) Aime, S.; Botta, M.; Crich, S. G.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R.; Piccinini, M.; Sisti, M.; Terreno, E. Towards MRI Contrast Agents of Improved Efficacy. NMR Relaxometric Investigations of the Binding Interaction to HSA of a Novel Heptadentate Macrocyclic Triphosphonate Gd(III)-Complex. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 1997, 2 (4), 470–479. https://doi.org/10.1007/s007750050158.

- (41) Parker, D.; Williams, J. A. G. Getting Excited about Lanthanide Complexation Chemistry. J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1996, No. 18, 3613. https://doi.org/10.1039/dt9960003613.
- (42) Luz, Z.; Meiboom, S. Proton Relaxation in Dilute Solutions of Cobalt(II) and Nickel(II) Ions in Methanol and the Rate of Methanol Exchange of the Solvation Sphere. J. Chem. Phys. 1964, 40 (9), 2686–2692. https://doi.org/10.1063/1.1725581.
- (43) Freed, J. H. Dynamic Effects of Pair Correlation Functions on Spin Relaxation by Translational Diffusion in Liquids. II. Finite Jumps and Independent T₁ Processes. J. Chem. Phys. **1978**, 68 (9), 4034–4037. https://doi.org/10.1063/1.436302.
- (44) Dawson, J. H. A Review of: "Metal Ions in Biological Systems, Volume 12, Properties of Copper H. Sigel, Editor, Xx + 353 Pages, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1981. \$57.50." *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.* 1984, 14 (3), 431–432. https://doi.org/10.1080/00945718408055899.
- (45) Marckmann, P.; Skov, L.; Rossen, K.; Dupont, A.; Damholt, M. B.; Heaf, J. G.; Thomsen, H. S. Nephrogenic Systemic Fibrosis: Suspected Causative Role of Gadodiamide Used for Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. J. Am. Soc. Nephrol. 2006, 17 (9), 2359–2362. https://doi.org/10.1681/ASN.2006060601.
- (46) Endrikat, J.; Dohanish, S.; Schleyer, N.; Schwenke, S.; Agarwal, S.; Balzer, T. 10 Years of Nephrogenic Systemic Fibrosis: A Comprehensive Analysis of Nephrogenic Systemic Fibrosis Reports Received by a Pharmaceutical Company from 2006 to 2016. *Invest. Radiol.* 2018, 53 (9), 541–550. https://doi.org/10.1097/RLI.00000000000462.
- (47) European Medicines Agency. *PRAC confirms restrictions on the use of linear gadolinium agents*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/gadolinium-article-31-referral-prac-confirms-restrictions-use-linear-gadolinium-agents en.pdf.
- (48) Prince, M. R.; Zhang, H.; Zou, Z.; Staron, R. B.; Brill, P. W. Incidence of Immediate Gadolinium Contrast Media Reactions. *Am. J. Roentgenol.* **2011**, *196* (2), W138–W143. https://doi.org/10.2214/AJR.10.4885.
- (49) Kenwright, A. M.; Kuprov, I.; De Luca, E.; Parker, D.; Pandya, S. U.; Senanayake, P. K.; Smith, D. G. 19F NMR Based PH Probes: Lanthanide(Iii) Complexes with PH-Sensitive Chemical Shifts. *Chem. Commun.* 2008, No. 22, 2514. https://doi.org/10.1039/b802838a.
- (50) Aime, S.; Botta, M.; Milone, L.; Terreno, E. Paramagnetic Complexes as Novel NMR PH Indicators. *Chem. Commun.* 1996, No. 11, 1265. https://doi.org/10.1039/cc9960001265.
- (51) Parac-Vogt, T. N.; Vander Elst, L.; Kimpe, K.; Laurent, S.; Burtéa, C.; Chen, F.; Van Deun, R.; Ni, Y.; Muller, R. N.; Binnemans, K. Pharmacokinetic Andin Vivo Evaluation of a Self-Assembled Gadolinium(III)-Iron(II) Contrast Agent with High Relaxivity. *Contrast Media Mol. Imaging* 2006, *1* (6), 267–278. https://doi.org/10.1002/cmmi.114.
- (52) Livramento, J. B.; Tóth, É.; Sour, A.; Borel, A.; Merbach, A. E.; Ruloff, R. High Relaxivity Confined to a Small Molecular Space: A Metallostar-Based, Potential MRI Contrast Agent. Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44 (10), 1480–1484. https://doi.org/10.1002/anie.200461875.
- (53) Surman, A. J.; Bonnet, C. S.; Lowe, M. P.; Kenny, G. D.; Bell, J. D.; Tóth, É.; Vilar, R. A Pyrophosphate-Responsive Gadolinium(III) MRI Contrast Agent. *Chem. Eur. J.* 2011, *17* (1), 223–230. https://doi.org/10.1002/chem.201001397.
- (54) Aime, S.; Fedeli, F.; Sanino, A.; Terreno, E. A R ₂ /R ₁ Ratiometric Procedure for a Concentration-Independent, PH-Responsive, Gd(III)-Based MRI Agent. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128 (35), 11326–11327. https://doi.org/10.1021/ja062387x.
- (55) Frullano, L.; Catana, C.; Benner, T.; Sherry, A. D.; Caravan, P. Bimodal MR-PET Agent for Quantitative PH Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (13), 2382–2384. https://doi.org/10.1002/anie.201000075.

- (56) Csupász, T.; Szücs, D.; Kálmán, F. K.; Hollóczki, O.; Fekete, A.; Szikra, D.; Tóth, É.; Tóth, I.; Tircsó, G. A New Oxygen Containing Pyclen-Type Ligand as a Manganese(II) Binder for MRI and 52Mn PET Applications: Equilibrium, Kinetic, Relaxometric, Structural and Radiochemical Studies. *Molecules* 2022, 27 (2), 371. https://doi.org/10.3390/molecules27020371.
- (57) Swietach, P.; Vaughan-Jones, R. D.; Harris, A. L.; Hulikova, A. The Chemistry, Physiology and Pathology of PH in Cancer. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2014, 369 (1638), 20130099. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0099.
- (58) van Sluis, R.; Bhujwalla, Z. M.; Raghunand, N.; Ballesteros, P.; Alvarez, J.; Cerden, S.; Galons, J.-P.; Gillies, R. J. In Vivo Imaging of Extracellular PH Using1H MRSI. *Magn. Reson. Med.* **1999**, *41* (4), 743–750. https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2594(199904)41:4<743::AID-MRM13>3.0.CO;2-Z.
- (59) Gallagher, F. A.; Kettunen, M. I.; Day, S. E.; Hu, D.-E.; Ardenkjær-Larsen, J. H.; Zandt, R. in 't; Jensen, P. R.; Karlsson, M.; Golman, K.; Lerche, M. H.; Brindle, K. M. Magnetic Resonance Imaging of PH in Vivo Using Hyperpolarized 13C-Labelled Bicarbonate. *Nature* **2008**, *453* (7197), 940–943. https://doi.org/10.1038/nature07017.
- (60) Stubbs, M.; Bhujwalla, Z. M.; Tozer, G. M.; Rodrigues, L. M.; Maxwell, R. J.; Morgan, R.; Howe, F. A.; Griffiths, J. R. An Assessment Of31P MRS as a Method of Measuring PH in Rat Tumours. *NMR Biomed.* 1992, 5 (6), 351–359. https://doi.org/10.1002/nbm.1940050606.
- (61) Raghunand, N.; Altbach, M. I.; van Sluis, R.; Baggett, B.; Taylor, C. W.; Bhujwalla, Z. M.; Gillies, R. J. Plasmalemmal PH-Gradients in Drug-Sensitive and Drug-Resistant MCF-7 Human Breast Carcinoma Xenografts Measured by 31P Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochem. Pharmacol.* 1999, 57 (3), 309–312. https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00306-2.
- (62) Raghunand, N.; Mahoney, B.; van Sluis, R.; Baggett, B.; Gillies, R. J. Acute Metabolic Alkalosis Enhances Response of C3H Mouse Mammary Tumors to the Weak Base Mitoxantrone. *Neoplasia* 2001, 3 (3), 227–235. https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900151.
- (63) Ojugo, A. S. E.; McSheehy, P. M. J.; McIntyre, D. J. O.; McCoy, C.; Stubbs, M.; Leach, M. O.; Judson, I. R.; Griffiths, J. R. Measurement of the Extracellular PH of Solid Tumours in Mice by Magnetic Resonance Spectroscopy: A Comparison of Exogenous19F And31P Probes. *NMR Biomed.* 1999, *12* (8), 495–504. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1492(199912)12:8<495::AID-NBM594>3.0.CO;2-K.
- (64) Khan, F.; Kuprov, I.; Craggs, T. D.; Hore, P. J.; Jackson, S. E. ¹⁹ F NMR Studies of the Native and Denatured States of Green Fluorescent Protein. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128 (33), 10729–10737. https://doi.org/10.1021/ja060618u.
- (65) Bruce, J. I.; Dickins, R. S.; Govenlock, L. J.; Gunnlaugsson, T.; Lopinski, S.; Lowe, M. P.; Parker, D.; Peacock, R. D.; Perry, J. J. B.; Aime, S.; Botta, M. The Selectivity of Reversible Oxy-Anion Binding in Aqueous Solution at a Chiral Europium and Terbium Center: Signaling of Carbonate Chelation by Changes in the Form and Circular Polarization of Luminescence Emission. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122 (40), 9674–9684. https://doi.org/10.1021/ja001797x.
- (66) Lowe, M. P.; Parker, D.; Reany, O.; Aime, S.; Botta, M.; Castellano, G.; Gianolio, E.; Pagliarin, R. PH-Dependent Modulation of Relaxivity and Luminescence in Macrocyclic Gadolinium and Europium Complexes Based on Reversible Intramolecular Sulfonamide Ligation. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123 (31), 7601–7609. https://doi.org/10.1021/ja0103647.
- (67) Woods, M.; Kiefer, G. E.; Bott, S.; Castillo-Muzquiz, A.; Eshelbrenner, C.; Michaudet, L.; McMillan, K.; Mudigunda, S. D. K.; Ogrin, D.; Tircsó, G.; Zhang, S.; Zhao, P.; Sherry, A. D. Synthesis, Relaxometric and Photophysical Properties of a New PH-

Responsive MRI Contrast Agent: The Effect of Other Ligating Groups on Dissociation of a *p* -Nitrophenolic Pendant Arm. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (30), 9248–9256. https://doi.org/10.1021/ja048299z.

- (68) Carrazana, J.; Jover, A.; Meijide, F.; Soto, V. H.; Vázquez Tato, J. Complexation of Adamantyl Compounds by β-Cyclodextrin and Monoaminoderivatives. J. Phys. Chem. B 2005, 109 (19), 9719–9726. https://doi.org/10.1021/jp0505781.
- (69) Gianolio, E.; Napolitano, R.; Fedeli, F.; Arena, F.; Aime, S. Poly-β-Cyclodextrin Based Platform for PH Mapping via a Ratiometric 19F/1H MRI Method. *Chem. Commun.* 2009, No. 40, 6044–6046. https://doi.org/10.1039/B914540K.
- (70) Raghunand, N.; Howison, C.; Sherry, A. D.; Zhang, S.; Gillies, R. J. Renal and Systemic PH Imaging by Contrast-Enhanced MRI. *Magn. Reson. Med.* 2003, 49 (2), 249–257. https://doi.org/10.1002/mrm.10347.
- (71) Garcia-Martin, M. L.; Martinez, G. V.; Raghunand, N.; Sherry, A. D.; Zhang, S.; Gillies, R. J. High Resolution PHe Imaging of Rat Glioma Using PH-Dependent Relaxivity. *Magn. Reson. Med.* 2006, 55 (2), 309–315. https://doi.org/10.1002/mrm.20773.
- (72) Aiba, Y.; Hamano, Y.; Kameshima, W.; Araki, Y.; Wada, T.; Accetta, A.; Sforza, S.; Corradini, R.; Marchelli, R.; Komiyama, M. PNA–NLS Conjugates as Single-Molecular Activators of Target Sites in Double-Stranded DNA for Site-Selective Scission. Org. Biomol. Chem. 2013, 11 (32), 5233. https://doi.org/10.1039/c3ob40947c.
- (73) Woods, M.; Zhang, S.; Ebron, V. H.; Sherry, A. D. PH-Sensitive Modulation of the Second Hydration Sphere in Lanthanide(III) Tetraamide-DOTA Complexes: A Novel Approach to Smart MR Contrast Media. *Chem. - Eur. J.* 2003, *9* (19), 4634–4640. https://doi.org/10.1002/chem.200305159.
- (74) Bonnet, C. S.; Tóth, E. MRI Probes for Sensing Biologically Relevant Metal Ions. *Future Med. Chem.* **2010**, *2* (3), 367–384. https://doi.org/10.4155/fmc.09.161.
- (75) Yoo, B.; Pagel, M. D. An Overview of Responsive MRI Contrast Agents for Molecular Imaging. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 2008, 13, 1733–1752. https://doi.org/10.2741/2796.
- (76) Sculley, J.; Yuan, D.; Zhou, H.-C. The Current Status of Hydrogen Storage in Metal– Organic Frameworks—Updated. *Energy Env. Sci* 2011, 4 (8), 2721–2735. https://doi.org/10.1039/C1EE01240A.
- (77) Li, W.; Fraser, S. E.; Meade, T. J. A Calcium-Sensitive Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121 (6), 1413–1414. https://doi.org/10.1021/ja9837021.
- (78) Thapa, B.; Suh, E. H.; Parrott, D.; Khalighinejad, P.; Sharma, G.; Chirayil, S.; Sherry, A. D. Imaging β-Cell Function Using a Zinc-Responsive MRI Contrast Agent May Identify First Responder Islets. *Front. Endocrinol.* 2022, *12.* https://doi.org/10.3389/fendo.2021.809867.
- (79) Hanaoka, K.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Narazaki, M.; Yokawa, T.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Nagano, T. Design and Synthesis of a Novel Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent for Selective Sensing of Zinc Ion. *Chem. Biol.* 2002, 9 (9), 1027–1032. https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00216-8.
- (80) Que, E. L.; Gianolio, E.; Baker, S. L.; Wong, A. P.; Aime, S.; Chang, C. J. Copper-Responsive Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131 (24), 8527–8536. https://doi.org/10.1021/ja900884j.
- (81) Strasdeit, H. Bioinorganic Chemistry. Heraugegeben vonI. Bertini, H. B. Gray, S. J. Lippard undJ. S. Valentine. University Science Books, Mill Valley, CA (USA). Angew. Chem. 1995, 107 (8), 1019–1019. https://doi.org/10.1002/ange.19951070834.
- (82) Shinmi, D.; Taguchi, E.; Iwano, J.; Yamaguchi, T.; Masuda, K.; Enokizono, J.; Shiraishi, Y. One-Step Conjugation Method for Site-Specific Antibody–Drug

Conjugates through Reactive Cysteine-Engineered Antibodies. *Bioconjug. Chem.* **2016**, 27 (5), 1324–1331. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00133.

- (83) Dhingra, K.; Maier, M. E.; Beyerlein, M.; Angelovski, G.; Logothetis, N. K. Synthesis and Characterization of a Smart Contrast Agent Sensitive to Calcium. *Chem Commun* 2008, No. 29, 3444–3446. https://doi.org/10.1039/B801975D.
- (84) Hammoud, D. A.; Hoffman, J. M.; Pomper, M. G. Molecular Neuroimaging: From Conventional to Emerging Techniques. *Radiology* 2007, 245 (1), 21–42. https://doi.org/10.1148/radiol.2451060731.
- (85) Garello, F.; Vibhute, S.; Gündüz, S.; Logothetis, N. K.; Terreno, E.; Angelovski, G. Innovative Design of Ca-Sensitive Paramagnetic Liposomes Results in an Unprecedented Increase in Longitudinal Relaxivity. *Biomacromolecules* 2016, *17* (4), 1303–1311. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01668.
- (86) Maret, W.; Li, Y. Coordination Dynamics of Zinc in Proteins. Chem. Rev. 2009, 109 (10), 4682–4707. https://doi.org/10.1021/cr800556u.
- (87) Zastrow, M. L.; Pecoraro, V. L. Designing Hydrolytic Zinc Metalloenzymes. Biochemistry 2014, 53 (6), 957–978. https://doi.org/10.1021/bi4016617.
- (88) Prasad, A. S. Zinc in Human Health: Effect of Zinc on Immune Cells. *Mol. Med.* 2008, 14 (5–6), 353–357. https://doi.org/10.2119/2008-00033.Prasad.
- (89) Zalewski, P.; Truong-Tran, A.; Lincoln, S.; Ward, D.; Shankar, A.; Coyle, P.; Jayaram, L.; Copley, A.; Grosser, D.; Murgia, C.; Lang, C.; Ruffin, R. Use of a Zinc Fluorophore to Measure Labile Pools of Zinc in Body Fluids and Cell-Conditioned Media. *BioTechniques* 2006, 40 (4), 509–520. https://doi.org/10.2144/06404RR02.
- (90) Frederickson, C. J.; Koh, J.-Y.; Bush, A. I. The Neurobiology of Zinc in Health and Disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, *6* (6), 449–462. https://doi.org/10.1038/nrn1671.
- (91) Hanaoka, K.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Nagano, T. Selective Sensing of Zinc Ions with a Novel Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent⁺. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 2001, No. 9, 1840–1843. https://doi.org/10.1039/b100994j.
- (92) Major, J. L.; Boiteau, R. M.; Meade, T. J. Mechanisms of Zn ^{II} -Activated Magnetic Resonance Imaging Agents. *Inorg. Chem.* 2008, 47 (22), 10788–10795. https://doi.org/10.1021/ic801458u.
- (93) Major, J. L.; Parigi, G.; Luchinat, C.; Meade, T. J. The Synthesis and *in Vitro* Testing of a Zinc-Activated MRI Contrast Agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007, 104 (35), 13881– 13886. https://doi.org/10.1073/pnas.0706247104.
- (94) Esqueda, A. C.; López, J. A.; Andreu-de-Riquer, G.; Alvarado-Monzón, J. C.; Ratnakar, J.; Lubag, A. J. M.; Sherry, A. D.; De León-Rodríguez, L. M. A New Gadolinium-Based MRI Zinc Sensor. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131 (32), 11387–11391. https://doi.org/10.1021/ja901875v.
- (95) Clavijo Jordan, M. V.; Lo, S.-T.; Chen, S.; Preihs, C.; Chirayil, S.; Zhang, S.; Kapur, P.; Li, W.-H.; De Leon-Rodriguez, L. M.; Lubag, A. J. M.; Rofsky, N. M.; Sherry, A. D. Zinc-Sensitive MRI Contrast Agent Detects Differential Release of Zn(II) Ions from the Healthy vs. Malignant Mouse Prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016, *113* (37). https://doi.org/10.1073/pnas.1609450113.
- (96) Zhang, X.; Lovejoy, K. S.; Jasanoff, A.; Lippard, S. J. Water-Soluble Porphyrins as a Dual-Function Molecular Imaging Platform for MRI and Fluorescence Zinc Sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (26), 10780–10785. https://doi.org/10.1073/pnas.0702393104.
- (97) Shannon, R. D. Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides. *Acta Crystallogr. Sect. A* 1976, 32 (5), 751– 767. https://doi.org/10.1107/S0567739476001551.
- (98) Cotton, S. A. *Lanthanide and Actinide Chemistry*; Inorganic chemistry; Wiley: Chichester, England; Hoboken, NJ, 2006.

- (99) Peters, J. A.; Huskens, J.; Raber, D. J. Lanthanide Induced Shifts and Relaxation Rate Enhancements. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 1996, 28 (3–4), 283–350. https://doi.org/10.1016/0079-6565(95)01026-2.
- (100) Benelli, C.; Caneschi, A.; Gatteschi, D.; Pardi, L.; Rey, P. Structure and Magnetic Properties of Linear-Chain Complexes of Rare-Earth Ions (Gadolinium, Europium) with Nitronyl Nitroxides. *Inorg. Chem.* **1989**, *28* (2), 275–280. https://doi.org/10.1021/ic00301a024.
- (101) Rare Earths, Softcover reprint of the original 1st ed. 1975.; Springer Berlin: Berlin, 2014.
- (102) Cabbiness, D. K.; Margerum, D. W. Macrocyclic Effect on the Stability of Copper (II) Tetramine Complexes. J. Am. Chem. Soc. 1969, 91 (23), 6540–6541.
- (103) Desreux, J.; Merciny, E.; Loncin, M. Nuclear Magnetic Resonance and Potentiometric Studies of the Protonation Scheme of Two Tetraaza Tetraacetic Macrocycles. *Inorg. Chem.* 1981, 20 (4), 987–991.
- (104) Aime, S.; Botta, M.; Geninatti Crich, S.; Giovenzana, G. B.; Jommi, G.; Pagliarin, R.; Sisti, M. Synthesis and NMR Studies of Three Pyridine-Containing Triaza Macrocyclic Triacetate Ligands and Their Complexes with Lanthanide Ions. *Inorg. Chem.* 1997, 36 (14), 2992–3000. https://doi.org/10.1021/ic960794b.
- (105) Sherry, A. D.; Ren, J.; Huskens, J.; Brücher, E.; Tóth, É.; Geraldes, C. F. C. G.; Castro, M. M. C. A.; Cacheris, W. P. Characterization of Lanthanide(III) DOTP Complexes: Thermodynamics, Protonation, and Coordination to Alkali Metal Ions. *Inorg. Chem.* **1996**, *35* (16), 4604–4612. https://doi.org/10.1021/ic9600590.
- (106) Kálmán, F. K.; Baranyai, Z.; Tóth, I.; Bányai, I.; Király, R.; Brücher, E.; Aime, S.; Sun, X.; Sherry, A. D.; Kovács, Z. Synthesis, Potentiometric, Kinetic, and NMR Studies of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,7-Bis(Acetic Acid)-4,10-Bis(Methylenephosphonic Acid) (DO2A2P) and Its Complexes with Ca(II), Cu(II), Zn(II) and Lanthanide(III) Ions. *Inorg. Chem.* 2008, 47 (9), 3851–3862. https://doi.org/10.1021/ic7024704.
- (107) Pasha, A.; Tircsó, G.; Benyó, E. T.; Brücher, E.; Sherry, A. D. Synthesis and Characterization of DOTA-(Amide) 4 Derivatives: Equilibrium and Kinetic Behavior of Their Lanthanide(III) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2007, 2007 (27), 4340–4349. https://doi.org/10.1002/ejic.200700354.
- (108) Clarke, E. T.; Martell, A. E. Stabilities of Trivalent Metal Ion Complexes of the Tetraacetate Derivatives of 12-, 13- and 14-Membered Tetraazamacrocycles. *Inorganica Chim. Acta* **1991**, *190* (1), 37–46. https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)80229-7.
- (109) Avecilla, F.; Peters, J. A.; Geraldes, C. F. G. C. X-ray Crystal Structure of a Sodium Salt of [Gd(DOTP)] ⁵⁻: Implications for Its Second-Sphere Relaxivity and the ²³ Na NMR Hyperfine Shift Effects of [Tm(DOTP)] ⁵⁻. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 2003 (23), 4179–4186. https://doi.org/10.1002/ejic.200300312.
- (110) Szilágyi, E.; Tóth, É.; Kovács, Z.; Platzek, J.; Radüchel, B.; Brücher, E. Equilibria and Formation Kinetics of Some Cyclen Derivative Complexes of Lanthanides. *Inorganica Chim. Acta* 2000, 298 (2), 226–234. https://doi.org/10.1016/S0020-1693(99)00467-3.
- (111) Chang, C. A.; Chen, Y.-H.; Chen, H.-Y.; Shieh, F.-K. Capillary Electrophoresis, Potentiometric and Laser Excited Luminescence Studies of Lanthanide(III) Complexes of 1,7-Dicarboxymethyl-1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (DO2A). *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1998**, No. 19, 3243–3248. https://doi.org/10.1039/a803565b.
- (112) Burai, L.; Ren, J.; Kovacs, Z.; Brücher, E.; Sherry, A. D. Synthesis, Potentiometry, and NMR Studies of Two New 1,7-Disubstituted Tetraazacyclododecanes and Their Complexes Formed with Lanthanide, Alkaline Earth Metal, Mn²⁺, and Zn²⁺ Ions. *Inorg. Chem.* **1998**, *37* (1), 69–75. https://doi.org/10.1021/ic970599c.

- (113) Woods, M.; Kovacs, Z.; Kiraly, R.; Brücher, E.; Zhang, S.; Sherry, A. D. Solution Dynamics and Stability of Lanthanide(III) (S) - 2-(p-Nitrobenzyl)DOTA Complexes. *Inorg. Chem.* 2004, 43 (9), 2845–2851. https://doi.org/10.1021/ic0353007.
- (114) De León-Rodríguez, L. M.; Kovacs, Z. The Synthesis and Chelation Chemistry of DOTA-Peptide Conjugates. *Bioconjug. Chem.* 2008, 19 (2), 391–402. https://doi.org/10.1021/bc700328s.
- (115) Wedeking, P.; Kumar, K.; Tweedle, M. F. Dissociation of Gadolinium Chelates in Mice: Relationship to Chemical Characteristics. *Magn. Reson. Imaging* **1992**, *10* (4), 641–648. https://doi.org/10.1016/0730-725X(92)90016-S.
- (116) Szilágyi, E.; Tóth, É.; Brücher, E.; Merbach, A. E. Lanthanide(III)–1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid Complexes in Acidic Medium: Significant Decrease in Water Exchange Rate †. J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1999, No. 15, 2481–2486. https://doi.org/10.1039/a903379c.
- (117) Tircsó, G.; Kovács, Z.; Sherry, A. D. Equilibrium and Formation/Dissociation Kinetics of Some Ln ^{III} PCTA Complexes. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (23), 9269–9280. https://doi.org/10.1021/ic0608750.
- (118) Aime, S.; Barge, A.; Bruce, J. I.; Botta, M.; Howard, J. A. K.; Moloney, J. M.; Parker, D.; de Sousa, A. S.; Woods, M. NMR, Relaxometric, and Structural Studies of the Hydration and Exchange Dynamics of Cationic Lanthanide Complexes of Macrocyclic Tetraamide Ligands. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121 (24), 5762–5771. https://doi.org/10.1021/ja990225d.
- (119) Greenwood, N. N.; Earnshaw, A.; Brücher Ernő. Az elemek kémiája: [felsőoktatási tankönyv], 2., jav. kiad.; Nemzeti Tankönyvkiadó: Budapest, 2004.
- (120) Cotton, F. A.; Wilkinson, G. Advanced Inorganic Chemistry: A Comprehensive Text, 3d ed., completely rev.; Interscience Publishers: New York, 1972.
- (121) Collomb, M.-N.; Deronzier, A. Manganese: Inorganic & Coordination ChemistryBased in Part on the Article Manganese: Inorganic & Coordination Chemistry by Charles A. McAuliffe, Stephen M. Godfrey, & Michael Watkinson Which Appeared in the *Encyclopedia of Inorganic Chemistry, First Edition*. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*; Scott, R. A., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2011; p eibc0119. https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0119.
- (122) Rolla, G.; De Biasio, V.; Giovenzana, G. B.; Botta, M.; Tei, L. Supramolecular Assemblies Based on Amphiphilic Mn(2+)-Complexes as High Relaxivity MRI Probes. *Dalton Trans. Camb. Engl. 2003* **2018**, 47 (31), 10660–10670. https://doi.org/10.1039/c8dt01250d.
- (123) Geraldes, C. F. G. C.; Sherry, A. D.; Brown, R. D.; Koenig, S. H. Magnetic Field Dependence of Solvent Proton Relaxation Rates Induced by Gd3+ and Mn2+ Complexes of Various Polyaza Macrocyclic Ligands: Implications for NMR Imaging. *Magn. Reson. Med.* **1986**, *3* (2), 242–250. https://doi.org/10.1002/mrm.1910030207.
- (124) Lázár, I.; Király, R.; Takács, Z. Synthesis, Potentiometric and ¹ H NMR Study of Protonation and Complex Formation of 1,4,7-Triazacyclononane-1,4-Diacetate. J. Coord. Chem. 2000, 51 (2), 293–304. https://doi.org/10.1080/00958970008055135.
- (125) Drahoš, B.; Pniok, M.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Císařová, I.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Tóth, É. Mn2+ Complexes of 1-Oxa-4,7-Diazacyclononane Based Ligands with Acetic, Phosphonic and Phosphinic Acid Pendant Arms: Stability and Relaxation Studies. *Dalton Trans.* 2011, 40 (39), 10131. https://doi.org/10.1039/c1dt10543d.
- (126) Takács, A.; Napolitano, R.; Purgel, M.; Bényei, A. C.; Zékány, L.; Brücher, E.; Tóth, I.; Baranyai, Z.; Aime, S. Solution Structures, Stabilities, Kinetics, and Dynamics of DO3A and DO3A–Sulphonamide Complexes. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (6), 2858–2872. https://doi.org/10.1021/ic4025958.

- (127) Garda, Z.; Forgács, A.; Do, Q. N.; Kálmán, F. K.; Timári, S.; Baranyai, Z.; Tei, L.; Tóth, I.; Kovács, Z.; Tircsó, G. Physico-Chemical Properties of MnII Complexes Formed with Cis- and Trans-DO2A: Thermodynamic, Electrochemical and Kinetic Studies. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *163*, 206–213. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.07.018.
- (128) Forgács, A.; Tei, L.; Baranyai, Z.; Tóth, I.; Zékány, L.; Botta, M. A Bisamide Derivative of [Mn(1,4-DO2A)] – Solution Thermodynamic, Kinetic, and NMR Relaxometric Studies. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, 2016 (8), 1165–1174. https://doi.org/10.1002/ejic.201501415.
- (129) Avila, D. S.; Puntel, R. L.; Aschner, M. Manganese in Health and Disease. In *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases*; Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R. K. O., Eds.; Metal Ions in Life Sciences; Springer Netherlands: Dordrecht, 2013; Vol. 13, pp 199–227. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7500-8 7.
- (130) Olanow, C. W. Manganese-Induced Parkinsonism and Parkinson's Disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2004, 1012 (1), 209–223. https://doi.org/10.1196/annals.1306.018.
- (131) Drahoš, B.; Lukeš, I.; Tóth, É. Manganese(II) Complexes as Potential Contrast Agents for MRI. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012, 2012 (12), 1975–1986. https://doi.org/10.1002/ejic.201101336.
- (132) Forgács, A.; Regueiro-Figueroa, M.; Barriada, J. L.; Esteban-Gómez, D.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Botta, M.; Platas-Iglesias, C. Mono-, Bi-, and Trinuclear Bis-Hydrated Mn²⁺ Complexes as Potential MRI Contrast Agents. *Inorg. Chem.* 2015, 54 (19), 9576–9587. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01677.
- (133) Kálmán, F. K.; Nagy, V.; Váradi, B.; Garda, Z.; Molnár, E.; Trencsényi, G.; Kiss, J.; Même, S.; Même, W.; Tóth, É.; Tircsó, G. Mn(II)-Based MRI Contrast Agent Candidate for Vascular Imaging. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (11), 6057–6065. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00197.
- (134) Siaugue, J.-M.; Segat-Dioury, F.; Sylvestre, I.; Favre-Réguillon, A.; Foos, J.; Madic, C.; Guy, A. Regioselective Synthesis of N-Functionalized 12-Membered Azapyridinomacrocycles Bearing Trialkylcarboxylic Acid Side Chains. *Tetrahedron* 2001, 57 (22), 4713–4718. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00328-3.
- (135) Irving, H. M.; Miles, M. G.; Pettit, L. D. A Study of Some Problems in Determining the Stoicheiometric Proton Dissociation Constants of Complexes by Potentiometric Titrations Using a Glass Electrode. *Anal. Chim. Acta* 1967, 38, 475–488. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)80616-4.
- (136) Zekany, L.; Nagypal, I. PSEQUAD: A Comprehensive Program for the Evaluation of Potentiometric and/or Spectrophotometric Equilibrium Data Using Analytical Derivatives. In Computational Methods for the Determination of Formation Constants; Leggett, D. J., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1985; pp 291–353. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4934-1 8.
- (137) Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Crich, S. G.; Terreno, E. Gd(III) Complexes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: A Proton Relaxation Enhancement Study of the Interaction with Human Serum Albumin. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 1996, *1* (4), 312–319. https://doi.org/10.1007/s007750050059.
- (138) Gale, E. M.; Zhu, J.; Caravan, P. Direct Measurement of the Mn(II) Hydration State in Metal Complexes and Metalloproteins through ¹⁷ O NMR Line Widths. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135 (49), 18600–18608. https://doi.org/10.1021/ja4094132.
- (139) Swift, T. J.; Connick, R. E. Erratum: NMR-Relaxation Mechanisms of ¹⁷ O in Aqueous Solutions of Paramagnetic Cations and the Lifetime of Water Molecules in the First Coordination Sphere. J. Chem. Phys. **1964**, 41 (8), 2553–2554. https://doi.org/10.1063/1.1726303.

- (140) Gale, E. M.; Atanasova, I. P.; Blasi, F.; Ay, I.; Caravan, P. A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137 (49), 15548–15557. https://doi.org/10.1021/jacs.5b10748.
- (141) Siaugue, J.-M.; Segat-Dioury, F.; Sylvestre, I.; Favre-Réguillon, A.; Foos, J.; Madic, C.; Guy, A. Regioselective Synthesis of N-Functionalized 12-Membered Azapyridinomacrocycles Bearing Trialkylcarboxylic Acid Side Chains. *Tetrahedron* 2001, 57 (22), 4713–4718. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00328-3.
- (142) Marín, C.; Clares, M. P.; Ramírez-Macías, I.; Blasco, S.; Olmo, F.; Soriano, C.; Verdejo, B.; Rosales, M. J.; Gomez-Herrera, D.; García-España, E.; Sánchez-Moreno, M. In Vitro Activity of Scorpiand-like Azamacrocycle Derivatives in Promastigotes and Intracellular Amastigotes of Leishmania Infantum and Leishmania Braziliensis. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 466–477. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.01.001.
- (143) Takács, A.; Napolitano, R.; Purgel, M.; Bényei, A. C.; Zékány, L.; Brücher, E.; Tóth, I.; Baranyai, Z.; Aime, S. Solution Structures, Stabilities, Kinetics, and Dynamics of DO3A and DO3A–Sulphonamide Complexes. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (6), 2858–2872. https://doi.org/10.1021/ic4025958.
- (144) Desreux, J. F.; Merciny, E.; Loncin, M. F. Nuclear Magnetic Resonance and Potentiometric Studies of the Protonation Scheme of Two Tetraaza Tetraacetic Macrocycles. *Inorg. Chem.* **1981**, 20 (4), 987–991. https://doi.org/10.1021/ic50218a008.
- (145) Tei, L.; Baranyai, Z.; Gaino, L.; Forgács, A.; Vágner, A.; Botta, M. Thermodynamic Stability, Kinetic Inertness and Relaxometric Properties of Monoamide Derivatives of Lanthanide(III) DOTA Complexes. *Dalton Trans.* 2015, 44 (12), 5467–5478. https://doi.org/10.1039/C4DT03939D.
- (146) Rojas-Quijano, F. A.; Tircsó, G.; Tircsóné Benyó, E.; Baranyai, Z.; Tran Hoang, H.; Kálmán, F. K.; Gulaka, P. K.; Kodibagkar, V. D.; Aime, S.; Kovács, Z.; Sherry, A. D. Synthesis and Characterization of a Hypoxia-Sensitive MRI Probe. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18* (31), 9669–9676. https://doi.org/10.1002/chem.201200266.
- (147) Balogh, E.; Tripier, R.; Fousková, P.; Reviriego, F.; Handel, H.; Tóth, É. Monopropionate Analogues of DOTA4– and DTPA5–: Kinetics of Formation and Dissociation of Their Lanthanide(Iii) Complexes. *Dalton Trans.* 2007, No. 32, 3572. https://doi.org/10.1039/b706353a.
- (148) Aime, S.; Botta, M.; Crich, S. G.; Giovenzana, G.; Pagliarin, R.; Sisti, M.; Terreno, E. NMR Relaxometric Studies of Gd(III) Complexes with Heptadentate Macrocyclic Ligands. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36* (S1), S200–S208. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-458X(199806)36:13<S200::AID-OMR324>3.0.CO;2-H.
- (149) Aime, S.; Gianolio, E.; Corpillo, D.; Cavallotti, C.; Palmisano, G.; Sisti, M.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R. Designing Novel Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. Synthesis and Relaxometric Characterization of Three Gadolinium(III) Complexes Based on Functionalized Pyridine-Containing Macrocyclic Ligands. *Helv. Chim. Acta* 2003, *86* (3), 615–632. https://doi.org/10.1002/hlca.200390061.
- (150) Kadjane, P.; Platas-Iglesias, C.; Boehm-Sturm, P.; Truffault, V.; Hagberg, G. E.; Hoehn, M.; Logothetis, N. K.; Angelovski, G. Dual-Frequency Calcium-Responsive MRI Agents. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20* (24), 7351–7362. https://doi.org/10.1002/chem.201400159.
- (151) Polasek, M.; Caravan, P. Is Macrocycle a Synonym for Kinetic Inertness in Gd(III) Complexes? Effect of Coordinating and Noncoordinating Substituents on Inertness and Relaxivity of Gd(III) Chelates with DO3A-like Ligands. *Inorg. Chem.* 2013, *52* (7), 4084–4096. https://doi.org/10.1021/ic400227k.

- (152) Baranyai, Z.; Pálinkás, Z.; Uggeri, F.; Maiocchi, A.; Aime, S.; Brücher, E. Dissociation Kinetics of Open-Chain and Macrocyclic Gadolinium(III)-Aminopolycarboxylate Complexes Related to Magnetic Resonance Imaging: Catalytic Effect of Endogenous Ligands. *Chem. Eur. J.* 2012, *18* (51), 16426–16435. https://doi.org/10.1002/chem.201202930.
- (153) Garda, Z.; Molnár, E.; Kálmán, F. K.; Botár, R.; Nagy, V.; Baranyai, Z.; Brücher, E.; Kovács, Z.; Tóth, I.; Tircsó, G. Effect of the Nature of Donor Atoms on the Thermodynamic, Kinetic and Relaxation Properties of Mn(II) Complexes Formed With Some Trisubstituted 12-Membered Macrocyclic Ligands. *Front. Chem.* 2018, *6*, 232. https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00232.
- (154) Aime, S.; Botta, M.; Geninatti Crich, S.; Giovenzana, G. B.; Jommi, G.; Pagliarin, R.; Sisti, M. Synthesis and NMR Studies of Three Pyridine-Containing Triaza Macrocyclic Triacetate Ligands and Their Complexes with Lanthanide Ions. *Inorg. Chem.* 1997, 36 (14), 2992–3000. https://doi.org/10.1021/ic960794b.
- (155) Zékány, L.; Nagypál, I. Computational Methods for the Determination of Formation Constants; Springer US: Boston, MA, 1985.
- (156) Drahoš, B.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Tóth, É. Mn²⁺ Complexes with Pyridine-Containing 15-Membered Macrocycles: Thermodynamic, Kinetic, Crystallographic, and ¹ H/¹⁷ O Relaxation Studies. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (7), 3224–3238. https://doi.org/10.1021/ic9020756.
- (157) Garda, Z.; Molnár, E.; Hamon, N.; Barriada, J. L.; Esteban-Gómez, D.; Váradi, B.; Nagy, V.; Pota, K.; Kálmán, F. K.; Tóth, I.; Lihi, N.; Platas-Iglesias, C.; Tóth, É.; Tripier, R.; Tircsó, G. Complexation of Mn(II) by Rigid Pyclen Diacetates: Equilibrium, Kinetic, Relaxometric, Density Functional Theory, and Superoxide Dismutase Activity Studies. *Inorg. Chem.* **2021**, *60* (2), 1133–1148. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c03276.
- (158) Pota, K.; Garda, Z.; Kálmán, F. K.; Barriada, J. L.; Esteban-Gómez, D.; Platas-Iglesias, C.; Tóth, I.; Brücher, E.; Tircsó, G. Taking the next Step toward Inert Mn²⁺ Complexes of Open-Chain Ligands: The Case of the Rigid PhDTA Ligand. *New J. Chem.* **2018**, *42* (10), 8001–8011. https://doi.org/10.1039/C8NJ00121A.
- (159) Drahoš, B.; Lukeš, I.; Tóth, É. Manganese(II) Complexes as Potential Contrast Agents for MRI. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012, 2012 (12), 1975–1986. https://doi.org/10.1002/ejic.201101336.
- (160) Forgács, A.; Tei, L.; Baranyai, Z.; Tóth, I.; Zékány, L.; Botta, M. A Bisamide Derivative of [Mn(1,4-DO2A)] Solution Thermodynamic, Kinetic, and NMR Relaxometric Studies. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2016, 2016 (8), 1165–1174. https://doi.org/10.1002/ejic.201501415.
- (161) Baranyai, Z.; Pálinkás, Z.; Uggeri, F.; Maiocchi, A.; Aime, S.; Brücher, E. Dissociation Kinetics of Open-Chain and Macrocyclic Gadolinium(III)-Aminopolycarboxylate Complexes Related to Magnetic Resonance Imaging: Catalytic Effect of Endogenous Ligands. *Chem. Eur. J.* 2012, *18* (51), 16426–16435. https://doi.org/10.1002/chem.201202930.
- (162) Gale, E. M.; Atanasova, I. P.; Blasi, F.; Ay, I.; Caravan, P. A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137 (49), 15548–15557. https://doi.org/10.1021/jacs.5b10748.
- (163) Drahoš, B.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Tóth, É. Mn²⁺ Complexes with Pyridine-Containing 15-Membered Macrocycles: Thermodynamic, Kinetic, Crystallographic, and ¹ H/¹⁷ O Relaxation Studies. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (7), 3224–3238. https://doi.org/10.1021/ic9020756.
- (164) Anderegg, G.; Hubmann, E.; Podder, N. G.; Wenk, F. Pyridinderivate als Komplexbildner. XI. Die Thermodynamik der Metallkomplexbildung mit Bis-, Tris-
und Tetrakis[(2-pyridyl)methyl]-aminen. *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60* (1), 123–140. https://doi.org/10.1002/hlca.19770600115.

- (165) Aime, S.; Chiaussa, M.; Digilio, G.; Gianolio, E.; Terreno, E. Contrast Agents for Magnetic Resonance Angiographic Applications: 1H and 170 NMR Relaxometric Investigations on Two Gadolinium(III) DTPA-like Chelates Endowed with High Binding Affinity to Human Serum Albumin. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 1999, 4 (6), 766–774. https://doi.org/10.1007/s007750050349.
- (166) Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Crich, S. G.; Terreno, E. Gd(III) Complexes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: A Proton Relaxation Enhancement Study of the Interaction with Human Serum Albumin. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 1996, *1* (4), 312–319. https://doi.org/10.1007/s007750050059.
- (167) Chirayil, S.; Clavijo-Jordan, V.; F. Martins, A.; Paranawithana, N.; Soundrarajan, J.; Sherry, D. A Manganese(II)-Based Responsive Contrast Agent Detects Glucose-Stimulated Zinc Secretion from the Mouse Pancreas and Prostate by MRI.; preprint; 2020. https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12430082.v1.
- (168) Martins, A. F.; Clavijo Jordan, V.; Bochner, F.; Chirayil, S.; Paranawithana, N.; Zhang, S.; Lo, S.-T.; Wen, X.; Zhao, P.; Neeman, M.; Sherry, A. D. Imaging Insulin Secretion from Mouse Pancreas by MRI Is Improved by Use of a Zinc-Responsive MRI Sensor with Lower Affinity for Zn²⁺ Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (50), 17456–17464. https://doi.org/10.1021/jacs.8b07607.
- (169) Barandov, A.; Bartelle, B. B.; Williamson, C. G.; Loucks, E. S.; Lippard, S. J.; Jasanoff, A. Sensing Intracellular Calcium Ions Using a Manganese-Based MRI Contrast Agent. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1). https://doi.org/10.1038/s41467-019-08558-7.
- (170) Malikidogo, K. P.; Martin, H.; Bonnet, C. S. From Zn(II) to Cu(II) Detection by MRI Using Metal-Based Probes: Current Progress and Challenges. *Pharmaceuticals* 2020, *13* (12), 436. https://doi.org/10.3390/ph13120436.
- (171) Pujales-Paradela, R.; Carniato, F.; Esteban-Gómez, D.; Botta, M.; Platas-Iglesias, C. Controlling Water Exchange Rates in Potential Mn²⁺-Based MRI Agents Derived from NO2A ²⁻. *Dalton Trans.* **2019**, *48* (12), 3962–3972. https://doi.org/10.1039/C9DT00211A.

X. Függelék

X.1.1. ¹⁷O-NMR mérésekre vonatkozó egyenletek

A redukált relaxációsebességek $(1/T_{1r} \text{ és } 1/T_{2r})$ és a kémiai eltolódás ($\Delta \omega_r$) az F1 és F2 Swift-Connick egyenletekkel számíthatóak ki a paramágneses komplex és egy diamágneses standard (pH = 3,0 HClO₄ oldat) ¹⁷O-NMR relaxációsebességeiből és a ¹⁷OH₂ jel kémiai eltolódásából.

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{P_m} \left[\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2A}} \right] = \frac{1}{\tau_m} \frac{T_{2m}^{-2} + \tau_m^{-1} T_{2m}^{-1} + \Delta \omega_m^2}{\tau_m (\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta \omega_m^2} + \frac{1}{T_{2OS}}$$
F1

$$\Delta\omega_{\rm r} = \frac{1}{P_{\rm m}}(\omega - \omega_{\rm A}) = \frac{\Delta\omega_{\rm m}}{\left(1 + \tau_{\rm m}T_{\rm 2m}^{-1}\right)^2 + \tau_{\rm m}^2 \Delta\omega_{\rm m}^2} + \Delta\omega_{\rm OS}$$
F2

ahol $1/T_{2m}$ a koordinált vízmolekula transzverzális relaxációsebessége, $\Delta \omega_m$ a koordinált és az oldószer vízmolekuláinak kémiai eltolódása, P_m a koordinált vízmolekulák móltörtje, τ_m a koordinált vízmolekulák átlagos élettartama, $1/T_{2OS}$ a külsőszférás vízmolekulák transzverzális relaxációs ideje és $\Delta \omega_{OS}$ a külsőszférás vízmolekulák kémiai eltolódása.

$$\Delta\omega_{\rm m} = \frac{g_{\rm L}\mu_{\rm B}S(S+1)B}{3k_{\rm B}T}\frac{A}{\hbar}$$
 F3

ahol B a mágneses tér, S az elektronspin ($Mn^{2+} = 5/2$, $Gd^{3+} = 7/2$), g_L az iztóp Landé g-faktora, μ_B a Bohr magneton, k_B Boltzmann állandó, \hbar a Planck állandó és A/ \hbar a hiperfinom csatolási állandó.

A skaláris hozzájárulás $(1/T_{2SC})$ az alábbi F4 egyenlettel lehet kifejezni, amely a transzverzális relaxációsebességet határozza meg:

$$\frac{1}{T_{2m}} \cong \frac{1}{T_{2SC}} = \frac{S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{h}\right)^2 \tau_{S1}$$
 F4

ahol $1/\tau_{s_1}$ a vízcseresebesség ($k_{ex} = 1/\tau_m$) és az elektronspin relaxációsebesség ($1/T_{1e}$) öszege.

A vízcseresebesség hőmérsékletfüggését az Eyring egyenlet írja le:

$$\frac{1}{\tau_{\rm m}} = k_{\rm ex} = \frac{k_{\rm B}T}{h} exp\left\{\frac{\Delta S_{\rm m}^{\#}}{R} - \frac{\Delta H_{\rm m}^{\#}}{R}\right\} = \frac{k_{\rm ex}^{298}T}{298,15} \exp\left\{\frac{\Delta H_{\rm m}^{\#}}{R}\left(\frac{1}{298,15} - \frac{1}{T}\right)\right\}$$
F5

ahol k_{ex}^{298} a vízcseresebesség, $\Delta S_m^{\#}$ és $\Delta H_m^{\#}$ pedig a vízcserére jellemző aktiválási entrópia és entalpia 298,15 K-en.

Az egyesített Solomon-Bloembergen-Morgan egyenlet (F6) leírja a paramágneses fémionok komplexeiben a koordinálódó vízmolekulák longitudinális relaxációs idejét.

$$\frac{1}{T_{1m}^{H}} = \frac{2}{15} \left(\frac{\gamma_{1}^{2} g^{2} \mu_{B}^{2}}{r_{MH}^{6}} \right) S(S+1) \left(\frac{\mu_{0}}{4\pi} \right)^{2} \left(7 \frac{\tau_{c2}}{1+\omega_{S}^{2} \tau_{c2}^{2}} + 3 \frac{\tau_{C1}}{1+\omega_{I}^{2} \tau_{c1}^{2}} \right)$$
F6

ahol γ_{I} a proton mag giromágneses hányadosa, r_{MH} az effektív távolság a párosítatlan elektronok töltése és a belsőszférás vízprotonok között, μ_{0} a vákuum permeabilitása és ω_{I} és ω_{S} a proton és az elektron Larmor frekvenciája. A τ_{ci} (i = 1,2) korrelációs idő leírja (F7) a komplex belső szférájában elhelyezkedő vízprotonok relaxációs folyamatait:

$$\frac{1}{\tau_{\rm Ci}} = \frac{1}{\tau_{\rm R}} + \frac{1}{T_{\rm ie}} + \frac{1}{\tau_{\rm m}}$$
 i = 1,2 F7

ahol τ_R a proton vektor reorientációs korrelációs ideje, ami kisméretű molekulák esetében egyenlő a komplex rotációs-korrelációs idejével.

A zérus tér felhasadás (ZFS) leírja a komplex fémionjának párosítatlan elektronjainak relaxációsebességét az alábbi módon (F8 és F9):

$$\left(\frac{1}{T_{1e}}\right)^{ZFS} = \frac{1}{25}\Delta^2 \tau_{\rm v} [4S(S+1) - 3] \left(\frac{1}{1 + \omega_{\rm S}^2 \tau_{\rm v}^2} + \frac{4}{1 + 4\omega_{\rm S}^2 \tau_{\rm v}^2}\right)$$
F8

$$\left(\frac{1}{T_{2e}}\right)^{ZFS} = \frac{1}{50} \Delta^2 \tau_{v} [4S(S+1) - 3] \left(3 + \frac{5}{1 + \omega_{S}^{2} \tau_{v}^{2}} + \frac{2}{1 + 4\omega_{S}^{2} \tau_{v}^{2}}\right)$$
F9

ahol Δ^2 a zérus-tér tenzorának a jele és τ_v a ZFS változásának korrelációs ideje. Az Eyring egyenlet megadja a τ_v és τ_R hőmérsékletfüggését is (F10):

$$\frac{1}{\tau_{j}} = \frac{(\tau_{j}^{-1})^{298}T}{298,15} \exp\left\{\frac{\Delta H_{j}^{\#}}{R} \left(\frac{1}{298,15} - \frac{1}{T}\right)\right\} \qquad J = v, R \qquad F10$$

ahol $\Delta H_v^{\#}$ és $\Delta H_R^{\#}$ a ZFS változás és rotációs mozgás aktiválási entalpiája.

X.1.2. A komplexek disszociációját jellemző lehetséges útvonalak és a sebességi állandók számításakor használt általános egyenlet

A lehetséges reakciók útvonalait az alábbi F1. ábra szemlélteti:



F1. Ábra. A komplexekre jellemző lehetséges disszociációs útvonalak

Jelen dolgozat alapján a sémán szereplő M^I vagy a Gd³⁺-iont, vagy a Mn²⁺-iont, míg az M^{II} pedig a kinetikai reakcióban szereplő kicserélő fémiont reprezentálja. A k_0 a spontán-, a k_H , k_H^H a proton-, a $k_{M^{II}}$ és $k_{M^{II}}^H$ a fém- és a proton-fém katalizált, a $k_{M^{II}}^{OH}$ pedig a hidroxo-fém asszisztált utak sebességi állandóját jelöli. A $K_M^{I}_{HL}$, $K_M^{I}_{H2L}$ és $K_M^{I}_{LM}^{II}$ a protonált és a kétmagvú köztitermékek stabilitására vonatkozó állandójk.

Figyelembe véve az egyes reakcióutakat és a köztitermékekre jellemző stabilitási és protonálódási állandókat az alábbi (F11) egyenletből ki tudjuk számítani a reakcióutakra vonatkozó sebességi állandókat:

$$k_{\rm obs} = \frac{k_0 + k_1 [{\rm H}^+] + k_2 [{\rm H}^+]^2 + k_3 [{\rm M}^{\rm n+}] + k_4 [{\rm M}^{\rm n+}] [{\rm H}^+]}{1 + K_{\rm MHL} [{\rm H}^+] + K_{\rm MH2} [{\rm H}^+]^2 + K_{\rm M} I_{\rm LM} II [{\rm M}^{\rm n+}]}$$
F11

ahol $K_{M}^{I}_{HL} = [M(HL)]/[M(L)][H^{+}], \qquad K_{M}^{I}_{H_{2}L} = [M(H_{2}L)]/[M(HL)][H^{+}],$ $K_{M}^{I}_{LM}{}^{II} = [M^{I}LM^{II}]/[M^{I}L][M^{II}], \qquad k_{1} = k_{H} \cdot K_{M}{}^{I}_{HL}, \qquad k_{2} = k_{H}^{H} \cdot K_{M}{}^{I}_{HL} \cdot K_{M}{}^{I}_{H_{2}L},$ $k_{3} = k_{M}{}^{II} \cdot K_{M}{}^{I}_{LM}{}^{II}, \qquad k_{4} = k_{M}^{H}{}^{II} \cdot K_{M}{}^{I}_{LM}{}^{II}.$