



Orvosi képzésben használt vegyületek szerkezetének és dinamikájának vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Horváthné Csajbók Éva

Témavezető: Dr. Bányai István

Debreceni Egyetem
Debrecen, 2005.

1. Bevezetés és célkitűzések

Az orvosi diagnosztikában, kezelések során és a gyógyulás nyomonkövetésében fontos szerepet játszanak a különböző képalkotó eljárások. Míg az orvostudomány történetében hosszú évszázadokig az emberi test felépítésének belső szerveinek vizsgálata sebészeti beavatkozást igényelt (anatómia szavunk eredeti görög jelentése: szétvágni), a XX. században a tomográfia módszerével a test „felszeletését” virtuális módon valósítják meg.

A széles körben alkalmazott módszerek közül a CT (komputer tomográfia) a végső kép kontrasztját a különböző szövetek különböző elektronsűrűsége alakítja ki. A módszer lényege az, hogy az alkalmazott röntgensugarak a vizsgált beteg testének keresztmetszetén különböző irányokból haladhatnak át. Az áthaladt röntgensugár intenzitását érzékeny kristálydetektorokkal mérik, és a mért jeleket számítógép segítségével dolgozzák fel és alakítják képpé. Az MRI (mágneses rezonancia képalkotás), hasonlóan elődjéhez, a CT-hez, szintén számítógépes képfeldolgozáson alapul. Itt azonban nem használnak ionizáló sugárzást: a ^1H -atommagok NMR (mágneses magrezonancia) jelének intenzitását mérik. A ^1H -atommag kiválasztásának oka a nagy NMR érzékenysége, a nagy természetes izotópgyakorisága és nagy koncentrációja az emberi szervezetben (az emberi szervezet több, mint 70%-a víz).

Hogy a képek kontrasztját (minőségét) növeljék, gyakran használnak különböző kontrasztanyagokat mindkét képalkotó módszer alkalmazásakor.

A CT kontrasztanyagok általában nagy atomtömegű elemeket tartalmaznak (I, Ba, Ce, Gd, Tb, Dy, Yb, Au, Pb, Bi). A kontrasztnövekedés elsősorban ezek fotoelektron-hatásának köszönhető, amely az attenuációs koefficiens nagy növekedéséhez, és így megnövekedett jelintenzitás-különbséghez (nagyobb kontraszthoz) vezet.

Az MRI-ben paramágneses ionokat (elsősorban a Gd^{3+} -iont) használnak kontrasztnövelésre. Ezek a paramágneses ionok még alacsony koncentrációban is képesek a vízprotonok T_1 (és T_2) relaxációs idejét csökkenteni, és így kontrasztnövekedést eredményeznek.

A Gd^{3+} kilenc koordinációs helyéből általában nyolcat egy kelátképző ligandum donoratomjai foglalnak el, a fennmaradó helyet pedig egy vízmolekula. A koordinált vízmolekula protonjai a paramágneses centrum közvetlen közelében sokkal gyorsabban relaxálnak. Ez a relaxáció-gyorsító hatás a koordinált vízmolekulák gyors cseréje révén az oldószer-víz molekulákon is tapasztalható.

Mind a CT, mind az MRI kontrasztanyagok szigorú követelményeknek kell megfeleljenek. Bejuttatásuk után a test megfelelő részeibe kell eljutniuk, és ott kontraszthatást kifejteniük. Ezután a kontrasztanyagoknak teljesen ki kell ürülniük a szervezetből, anélkül, hogy metabolizálódtak volna. A nehézfémek kedvezőtlen élettani hatásait és korlátozott kiürülésüket előnyösen változtatja meg, ha kelátkomplexeiket használjuk, hiszen ezeknek a komplexeknek sokkal kisebb az *in vivo* kötődésük és így a toxicitásuk is. A jó kontrasztanyagok tulajdonságait (nagy stabilitás és kinetikai inertség, hatékony kontrasztnövelő hatás) mind az oldatbeli szerkezet, mind az oldatbeli (intra- vagy intermolekuláris) dinamika alapvetően meghatározza, így ezek vizsgálata elengedhetetlen a már használatban lévő és a potenciális kontrasztanyagok esetében is.

A Debreceni Egyetemen és a Delfti Műszaki Egyetemen végzett PhD munkám során poliamino-polikarboxilát (EOB-DTPA) és makrociklusos (DOTA) ligandumok inert és labilis fémkomplexeinek szerkezetét és dinamikáját vizsgáltam, főként NMR spektroszkópiás módszerrel. Célunk az volt, hogy a kontrasztanyag felhasználás szempontjából fontos szerkezeti és dinamikai információkat nyerjünk. Vizsgálataink főként az oldatban lévő különböző izomerek szerkezeti különbségeire, illetve a közöttük lejátszódó

cserefolyamatokra irányultak. Egy új típusú kontrasztanyag, a Gd(III)-tartalmú zeolit nanorészecskék esetén a relaxivitást (a kontrasztanyag hatékonyságát) meghatározó paraméterek szisztematikus vizsgálatát tűztük ki célul, azért, hogy ezen nanorészecskék kontrasztnövelő hatásának mechanizmusát felderítsük.

2. Alkalmazott vizsgálati módszerek

A vizsgálatok fő eszköze az NMR spektroszkópia volt, ám ahol szükséges és lehetséges volt, más módszereket (röntgendiffrakció, NMR relaxometria, stb.) is használtunk.

A ^1H és ^{13}C NMR méréseket Bruker AM 360 és Bruker DMX 500-as spektrométereken végeztük. A ^1H - ^1H COSY spektrumokat a standard Bruker program felhasználásával, 45° -os *mixing pulse* alkalmazásával vettük fel. A ^1H - ^{13}C korrelációs spektrumokat Bruker DMX 500-as spektrométeren inverz módban mértük, z irányú gradiens impulzusok alkalmazásával. A standard Bruker HSQC és HMQC impulzusprogramokat használtuk. Az adatok feldolgozása a Bruker WinNMR szoftvercsomagjával történt. A vonalszélességeket dekonvolúcióval határoztuk meg, Lorentz-görbékkel illesztve az egyes csúcsokhoz.

Az NMR diszperziós méréseket Stelar berendezésen végeztük, a 20 és 60 MHz-es T_1 és T_2 mérésekhez Bruker Minispec relaxométereket használtunk, a 300 MHz-es mérésekhez Varian Inova-300 spektrométert, az 500 MHz-es T_1 és T_2 meghatározáshoz pedig Bruker DMX 500-as spektrométert. A T_1 meghatározást inversion recovery módszerrel, a T_2 mérést pedig CPMG szekvenciával végeztük.

A porröntgen diffrakciót D-5000 Siemens készüléken mértük, a Ni-szűrt $\text{Cu}_{K\alpha}$ röntgensugár segítségével. MAS szilárdfázisú NMR méréseket Varian VXR-400S spektrométeren végeztük, a rezonanciafrekvenciák: 79.460 MHz (^{29}Si) és 104.229 MHz (^{27}Al).

3. Új tudományos eredmények

Tanulmányoztuk:

- egy inert és egy labilis DOTA komplex szerkezetét és dinamikáját ($(\text{BiDOTA})^-$ és $\text{K}(\text{H}_x\text{DOTA})^{(3-x)-}$)
- a DTPA-váz C5-ös helyzetbeni szubsztitúciójának szerkezeti és dinamikai hatását ($\text{Lu}(\text{S-EOB-DTPA})^{2-}$)
- a pórusméret, a Si/Al arány megváltoztatása és a kalcinálás hatását a Gd(III)-tartalmú zeolit nanorészecskék relaxivitására

3.1 Megállapítottuk, hogy a $\text{Bi}(\text{DOTA})^-$ komplex szerkezete a TSA (csavart négyzetes antiprizmás) elrendeződésnek felel meg, hasonlóan a nagyobb méretű lantanida ionok DOTA komplexeihez. ^1H NMR spektrumok hőmérsékletfüggése és 274 K-en felvett 2D EXSY spektrum alapján, a komplex dinamikájáról a azt állapítottuk meg, hogy az észlelt fluxionális mozgások egyrészt *i*) a makrociklus mozgásához ($\delta\delta\delta\delta \leftrightarrow \lambda\lambda\lambda\lambda$, gyűrűinverzió), másrészt *ii*) az acetát-karok helicitás-változásához ($\Delta \leftrightarrow \Lambda$) tartoznak. Az, hogy a két mozgásra hasonló aktiválási paramétereket kaptunk, kétféleképpen értelmezhetjük. Az egyik magyarázat az, hogy a két mozgás koncertikus módon, azonos sebességgel zajlik. A másik magyarázat az, hogy az átrendeződés két lépésben zajlik, a lassú, sebességmeghatározó gyűrűinverziós lépést követi a gyors acetát-kar helicitásváltozás. Mivel a $\Lambda(\lambda\lambda\lambda\lambda)/\Delta(\delta\delta\delta\delta)$ enantiomer pár nincs jelen az NMR spektrumban észlelhető mennyiségben, mindkét feltételezés helyes lehet.

3.2 Ezek mellett a fluxionális mozgások mellett, egy új típusú gyűrűmozgást észleltünk a labilis $\text{K}(\text{DOTA})^-$ komplexnél, 13-as pH-n. Ez az általunk gyűrűátfordulásnak nevezett gyűrűmozgás a fém-ligandum kötések felszakadását igényli. Az aktiválási paraméterek elemzése azt mutatta, hogy kisebb hőmérsékleteken a gyűrűinverzió a fő, gyorsabb gyűrűmozgás, és az emellett jelen lévő gyűrűátfordulás sokkal lassabb. Az acetát-karok helicitásváltozása a gyűrűinverzióhoz hasonló sebességgel zajlik. Magasabb

hőmérsékleten a káliumion könnyebben disszociál a komplexből, és így az új mozgás, a gyűrűátfordulás kedvezményezettebbé válik. Ekkor az acetát-karok helicitásváltozása a gyűrűátforduláshoz hasonló sebességűvé válik.

3.3 Kisebb pH-n, a HDO- $K(H_xDOTA)^{(3-x)-}$ rendszerben azt találtuk, hogy az intramolekuláris cserefolyamatok mellett, a HDO és a $K(H_xDOTA)^{(3-x)-}$ között is megfigyelhető cserereakció. Azt feltételezzük, hogy egy ionpár kialakulása a K^+ és az igen stabil H_2DOTA^{2-} között a felelős ezért a cserefolyamatért. Ez a $K(H_2DOTA)^-$ részecske protonálódva egy $K(H_3DOTA)$ részecskévé alakul, ami protoncsere-reakcióba léphet a HDO-val. A kálium feltehetően az acetátkarokhoz koordinálódik, a makrociklus „üregébe” még nem került be, de így is képes lelassítani a makrociklus belső mozgását. 6-9,5 pH között, ahol (részlegesen káliumiont koordináló) H_2DOTA^{2-} és $HDOTA^{3-}$ található, az intermolekuláris protoncsere a HDO-val a *lassú csere tartományba*, az intramolekuláris cserefolyamat (belső mozgás) a *gyors csere tartományba* esett az NMR időskálán.

3.4 A $(Lu(S-EOB-DTPA)^{2-})$ komplexen a DTPA-váz C5-ös helyzetbeni szubsztitúciójának szerkezeti és dinamikai hatását tanulmányoztuk. Két jelkészletet figyeltünk meg a 330 K-en felvett 1H és a ^{13}C NMR spektrumban, ezeket két olyan izomerhez rendeltük, amelyek egymástól a középső nitrogén konfigurációjában különböznek. Az izomerarányra 35:65-öt kaptunk. 300 K-nél alacsonyabb hőmérsékleten a két izomerhez tartozó jelek egymástól független szélesedést mutattak. Ez a megfigyelés az acetát-karok mozgásának következménye, ami gyors, ám detektálható folyamat az NMR időskálán. Az etilén-diamin protonok csatolási képét elemezve meghatároztuk, hogy az acetát karok preferált (és egyedülként detektálható) elhelyezkedése a Λ -val jelölt mód.

3.5 A Gd^{3+} -tartalmú zeolit nanorészecskék esetén, a különböző paraméterek változtatásának hatását tanulmányoztuk a relaxivitásra. A következőket állapítottuk meg:

- i)* Az Y szerkezet dealuminálása relaxitásnövekedéssel járt a GdNaY zeolitok esetében, amit NMRD illesztéseink alapján a pórusok megnövekedett víztartalmával magyaráztunk, amely ellentételezte a megnövekedett hidrofóbicitásúvá vált zeolit pórusnyílásokon keresztüli lassabb vízdiffúziót.
- ii)* Az eredeti, nem dealuminált, hasonló Gd^{3+} -tartalmú GdNaY és GdNaA minták összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy a GdNaA mintának sokkal kisebb a relaxitása, amelyet a kisebb pórusokkal (kisebb belső víztartalom) és kisebb pórusnyílásokkal (lassabb diffúzió) magyaráztunk.
- iii)* A kalcinálás a Gd^{3+} -ionok részleges vándorlását eredményezte az Y zeoliton belüli nagyobb üregekből a kisebb üregek felé, amelyek azonban az NMR időskálán igen lassan cserélnek vizet mind a nagyobb pórusokkal, mind a zeoliton kívüli vízzel. Ez az r_1 relaxitás értékek csökkenését eredményezte.
- iv)* Nagyobb térerőkön megmutattuk, hogy ezek a nanorészecskék külső-szférás hatások eredményeképpen jelentős r_2 relaxitást mutatnak.

4. Az eredmények lehetséges gyakorlati alkalmazása

Munkánk alap kutatás, a nyert szerkezeti és dinamikai információk azonban hozzájárulhatnak új, hatásosabb kontrasztanyagok tervezéséhez. A 3.5 szakaszban bemutatott eredmények felhasználhatóak Gd^{3+} -tartalmú zeolit nanorészecskék szintézise során, amelyek potenciális MRI kontrasztanyagok az emésztőrendszeri és érrendszeri vizsgálatok során. Ezen nanorészecskék másik előnye az, hogy jelentős r_1 relaxitást mutatnak azokon az alacsonyabb térerőkön, ahol az MRI felvételek többsége készül. Azonban az új, modernebb, MRI készülékek nagyobb térerőn működnek, ahol ezek a nanorészecskék jelentős r_2 relaxitást növelő hatását is kihasználhatják.

5. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm az OTKA (T035127), a Marie Curie ösztöndíj és a COST D18 program anyagi támogatását.

6. Publikációs lista

5.1 Az értekezés alapját képező közlemények

Dynamic Properties of DOTA-ligand: ^1H NMR and ^{17}O NMR Studies

I. Bányai, É. Csajbók, E. Brücher

J. Inorg. Biochem. **2001**, 86, 137 (Conf. abstract from the 10th International Conference on Bioinorganic Chemistry, Florence, Italy, 26th-31st of August, 2001)

Csajbók, É.; Baranyai, Z.; Bányai, I.; Brücher, E.; Király, R.; Müller-Fahrnow, A.; Platzeck, J.; Radüchel, B.; Schäfer, Equilibrium, ^1H -, ^{13}C -NMR-Spectroscopy and X-Ray Diffraction Studies on the Complexes $\text{Bi}(\text{DOTA})^-$ and $\text{Bi}(\text{DO3A-Bu})$

Inorg. Chem. **2003** 42 2342-2349

É. Csajbók, I. Bányai and E. Brücher

Dynamic NMR Properties of DOTA Ligand: Variable pH and Temperature ^1H NMR Study on $[\text{K}(\text{H}_x\text{DOTA})]^{(3-x)-}$ Species

Dalton Trans. **2004** 2152-2156

R. N. Muller, L. Vander Elst, A. Roch, J.A. Peters, É. Csajbók, P. Gillis, Y. Gossuin

Relaxation by Metal-Containing Nanosystems (review)

Adv. Inorg. Chem. (közlésre elfogadva)

2.2 Konferenciákon bemutatott előadások és poszterek

Előadások:

É. Csajbók, I. Bányai, E. Brücher:

The intramolecular motion of DOTA ligand as studied by ^1H NMR

XXXVI. Coordination Chemistry Conference, Pécs, 2001 (lecture in Hungarian)

É. Csajbók, I. Bányai, E. Brücher:

NMR studies on the dynamics of inert and labile DOTA complexes

EMT Conference, Félixfürdő, Rumania, 2001 (lecture in Hungarian)

É. Csajbók, I. Bányai, E. Brücher:

NMR structure of Ln-EOB-DTPA stereoisomers

XXXVII. Coordination Chemistry Conference, Mátraháza, 2002 (lecture in Hungarian)

É. Csajbók, E. Brücher, I. Bányai:

Dynamic NMR studies on labile complexes of DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic-acid)

9th Nordic Symposium on Coordination Chemistry, Umeå, Sweden (lecture in English)

Poszterek:

É. Csajbók, E. Brücher, I. Bányai:

Intra- and intermolecular exchange processes: the DOTA molecule as an example

„Tavaszi szél”-Meeting of Hungarian Ph.D. Students, Gödöllő, 2001 (Poster in Hungarian)

É. Csajbók, I. Bányai, J. A. Peters

Gd(III)-loaded zeolite nanoparticles as MRI contrast agents

Interdisciplinary Workshop of Marie Curie Fellows, Institute For Energy, Petten, The Netherlands, 2003 (Poster in English)

É. Csajbók, I. Bányai, J. A. Peters

Gd(III)-loaded zeolite nanoparticles as MRI contrast agents

NMR Meeting, Groningen, The Netherlands, 2003 (Poster in English)

É. Csajbók, I. Bányai

Rediscovery of ¹H NMR for studying complex systems: Lanthanides, macrocycles, polyamino-polycarboxylates

COST D18 ”Lanthanide Chemistry for Diagnosis and Therapy” Annual Workshop A Coruna, Spain, 2003 (Poster in English)

G. A. Pereira, C. F. G. C. Geraldés, D. Ananias, J. Rocha, É. Csajbók, J. A.

Peters, L. Vander Elst, R. N. Muller

Magnetic, NMR and relaxivity studies of microporous lanthanide(III) silicates

COST D18 ”Lanthanide Chemistry for Diagnosis and Therapy” Annual Workshop A Coruna, Spain, 2003 (Poster in English)