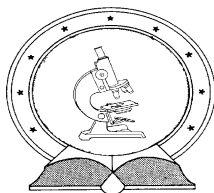


DE TTK



1949

**Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható
fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Vágner Adrienn

Témavezető: Dr. Baranyai Zsolt

Debreceni Egyetem

Természettudományi Doktori Tanács

Kémia Doktori Iskola

Debrecen 2017

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémiai Tudományok Doktori Iskola K/2 programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

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

Debrecen, 2017. június 27.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Vágner Adrienn doktorjelölt 2014- 2017. 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 javasolom.

Debrecen, 2017 . június 27.

a témavezető aláírása

**Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek
fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a kémia
tudományágban

Írta: Vágner Adrienn okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémia doktori iskolája (K/2 programja)
keretében

Témavezető: Dr. Baranyai Zsolt

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Farkas Etelka

tagok: Dr. Kiss Tamás

Dr. Lázár István

A doktori szigorlat időpontja: 2017. június 6.

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20... .

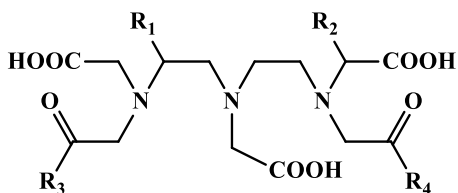
Tartalomjegyzék

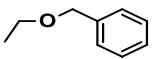
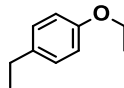
| | |
|---|-----------|
| <i>I. Bevezetés</i> | 1 |
| <i>II. Irodalmi áttekintés</i> | 4 |
| II. 1. MRI kontrasztanyagok | 4 |
| <i>II.1.1. Gd(III)-alapú MRI kontrasztanyagok</i> | 5 |
| <i>II.1.1.1. A Gd(III)-komplexek relaxivitása</i> | 7 |
| <i>II.2.1.2 A kontrasztanyagok fejlesztésének új irányai</i> | 9 |
| <i>II.1.1.3. Gd³⁺-alapú kontrasztanyagok disszociációja fízológias körülmények között</i> | 12 |
| II. 2. A gallium kémiája | 16 |
| <i>II.2.1. A gallium izotópjainak előállítása</i> | 18 |
| II.3. Nukleáris medicina | 19 |
| <i>II. 3.1. A gallium(III)-komplexek orvosdiagnosztikai felhasználása</i> | 22 |
| <i>III. Alkalmazott módszerek és kísérleti körülmények</i> | 27 |
| III.1. A CyAAZTA ligandum fémkomplexeinek egyensúlyi vizsgálata | 27 |
| III.2. A Ga(CyAAZTA)⁻ és Gd(CyAAZTA)⁻ komplexek fémioncsere reakcióinak kinetikai vizsgálata | 28 |
| III.3. A Ga(CyAAZTA)⁻ komplex ligandumcsere reakcióinak kinetikai vizsgálata | 30 |
| III.4. A Gd(CyAAZTA)⁻ komplex relaxációs sajátságainak vizsgálata | 31 |
| III.5. A CyAAZTA fémkomplexeinek szerkezeti vizsgálata | 31 |
| III.6. A kontrasztanyagok és a csont felülete között kialakuló kölcsönhatások vizsgálata | 32 |
| <i>IV. Eredmények</i> | 35 |
| IV.1. A CyAAZTA ligandum komplexképző sajátságai | 35 |
| IV. 2. A Ga³⁺- CyAAZTA rendszer ¹H- és ⁷¹Ga-NMR spektroszkópiás vizsgálata | 49 |
| IV.3. A Gd(CyAAZTA)⁻ komplex kinetikai inertségének vizsgálata | 54 |
| IV.4. A Ga(CyAAZTA)⁻ komplex Cu²⁺-ionnal lejátszódó fémioncsere reakcióinak kinetikai vizsgálata | 59 |
| IV.5. A Ga(CyAAZTA)⁻ komplex transzferinnel lejátszódó ligandum cserereakcióinak kinetikai vizsgálata | 65 |

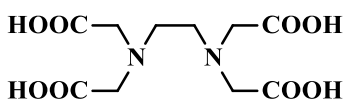
Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

| | |
|---|------------|
| IV.6. A Gd(CyAAZTA) ⁻ komplex relaxációs sajátosságai | 68 |
| IV.7. A Ca ²⁺ - és Mg ²⁺ -ionok hatása a lineáris Gd ³⁺ -alapú MRI kontrasztanyag kinetikai inertségére | 81 |
| IV.8. A kontrasztanyagok és a csont felülete között kialakuló kölcsönhatások vizsgálata..... | 97 |
| <i>V. Kísérleti rész.....</i> | <i>108</i> |
| V.1. A vizsgált ligandum előállítása és koncentrációjának meghatározása | 108 |
| V.2 A vizsgálatok során felhasznált törzsoldatok elkészítése és koncentrációjuk meghatározása | 109 |
| V.3. A CyAAZTA ligandum és fémkomplexei pH-potenciometriás vizsgálata | 111 |
| V.4 A Cu(CyAAZTA) komplex UV-látható spektrofotometriás vizsgálata | 113 |
| V.5. A Ga(CyAAZTA) ⁻ , Eu(CyAAZTA) ⁻ és Yb(CyAAZTA) ⁻ komplexek NMR spektroszkópiás vizsgálata..... | 114 |
| V.6. A Ga(CyAAZTA) ⁻ és Gd(CyAAZTA) ⁻ komplexek disszociációjának kinetikai vizsgálata | 115 |
| V.7. A Gd(CyAAZTA) ⁻ komplex relaxációs sajátosságainak vizsgálata | 117 |
| V.8. A Ca ²⁺ - és Mg ²⁺ -ionok hatása négy Gd ³⁺ -alapú, nyíltláncú MRI kontrasztanyag disszociációjának sebességére | 118 |
| V.9. A kontrasztanyagok és a csont felülete között kialakuló kölcsönhatások vizsgálata..... | 120 |
| <i>VI. Összefoglalás</i> | <i>123</i> |
| <i>VII. Summary.....</i> | <i>127</i> |
| <i>VIII. Irodalomjegyzék.....</i> | <i>132</i> |
| <i>Köszönetnyilvánítás</i> | <i>140</i> |
| <i>Függelék</i> | <i>141</i> |

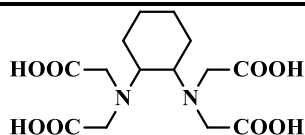
Az értekezésben szereplő ligandumok szerkezeti képletei:



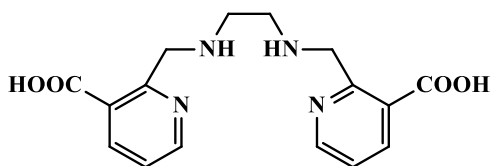
| R ₁ | R ₂ | R ₃ és R ₄ | Ligandum |
|---|---|----------------------------------|-------------------------------|
| -H | -H | -OH | H₅DTPA |
| -H | -H | -NH-Me | H₃DTPA-BMA |
| -H | -H | -NH-Et-O-Me | H₃DTPA-BMEA |
| -H |  | -OH | H₅BOPTA |
|  | -H | -OH | H₅EOB-DTPA |



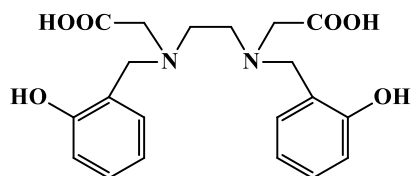
H₄EDTA



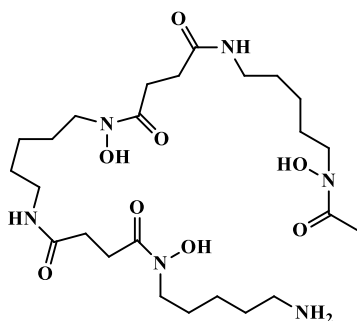
CDTA



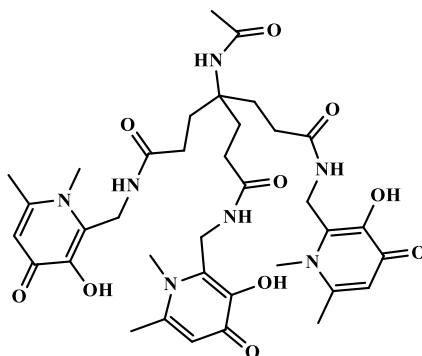
H₂dedpa



HBED

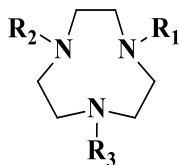


Desferroxamin

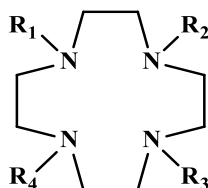


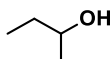
CP256

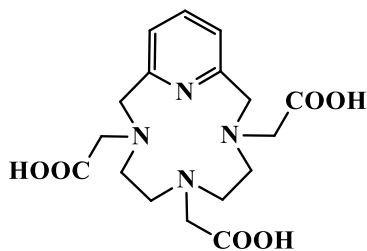
Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata



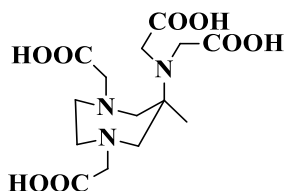
| R₁ és R₂ | R₃ | Ligandum |
|--|---|---------------------|
| -CH ₂ -COOH | -CH ₂ -COOH | H ₃ NOTA |
| -CH ₂ -PO(OH)-CH ₂ -COOH | -CH ₂ -PO(OH)-CH ₂ -COOH | TRAP-Pr |
| -CH ₂ -PO(OH)-CH ₂ -OH | -CH ₂ -PO(OH)-CH ₂ -CH ₂ -COOH | NOPO |



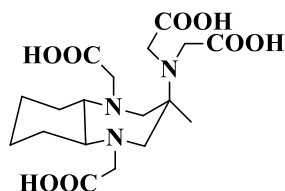
| R₁ | R₂ és R₃ | R₄ | Ligandum |
|---|---------------------------------------|------------------------|------------------------|
| -CH ₂ -COOH | -CH ₂ -COOH | -CH ₂ -COOH | H ₄ DOTA |
|  | -CH ₂ -COOH | -CH ₂ -COOH | H ₃ HP-DO3A |
| -CH ₂ -COOH | -CH ₂ -COOH | -H | H ₃ DO3A |



PCTA



AAZTA



CyAAZTA

A fontosabb ligandumok elterjedt, nem hivatalos elnevezése:

H₅DTPA: dietilén-triamin-N,N,N',N'',N'''-pentaecetsav

H₅EOB-DTPA: 4-((4'-etoxi)-benzil)-dietilén-triamin-N,N,N',N'',N'''-pentaecetsav

H₅BOPTA: 2-((benziloxi-metil)-dietilén-triamin- N,N,N',N'',N'''-pentaecetsav

H₃DTPA-BMA : dietilén-triamin-N,N,N',N'',N'''-pentaecetsav-N,N'''-bisz(metilamid)

H₃DTPA-BMEA: dietilén-triamin-N,N,N',N'',N'''-pentaecetsav-N,N'''-bisz(metoxietilamid)

H₄DOTA: 1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetraecetsav

H₃DO3A: 1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7-triecetsav

H₃HP-DO3A: 10-(2'-hidroxi-propil)-1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7-triecetsav

H₃NOTA: 1,4,7-triazaciklononán-1,4,7-triecetsav

H₄AAZTA: 6-amino-6-metilperhidro-1,4-diazepin- N,N',N'',N'''-tetraecetsav

H₄CyAAZTA: transz-3-amino-3-metildecahidro-1H-1,5-benzodiazepin-N,N',N'',N'''-tetraecetsav

H₄EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

H₄CDTA: ciklohexándiamin-tetraecetsav

H₆PCTA: 3,6,9,15-tetraazabiciklo [9.3.1] pentadeca-1(15),11, 13-trién-3,6,9-triecetsav

I. Bevezetés

A ritkaföldfém-aminopolikarboxilát komplexek egyensúlyi, kinetikai és szerkezeti sajátosságainak a vizsgálata a DE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén már közel 50 éve művelt alapkutatási téma. A kezdetekben aránylag keveseket érdeklő kutatási terület az 1980-as évektől egyre népszerűbbé vált, amikor szinte egyidejűleg kezdtek kutatni, majd alkalmazni a lantanoida(III) komplexeket az orvosi diagnosztika és terápia különböző területein. A biológiai és klinikai alkalmazások a lantanoida(III)-ionok (Ln^{3+}) különleges mágneses és optikai tulajdonságain alapultak, de néhány radioizotópjuk sugárzását is hasznosították.

A paramágneses tulajdonságokkal rendelkező Gd^{3+} -iont a **Mágneses Rezonanciás Képképzésben (MRI)** alkalmazzák kontrasztanyagként a felvételek kontrasztosságának növelése érdekében. Egyes lantanoida(III)-ionok (pl. Eu^{3+} , Sm^{3+} , Tb^{3+} , Nd^{3+} , Er^{3+} és Yb^{3+}) lumineszcenciás tulajdonságai lehetőséget nyújtanak szövetekben vagy akár sejtekben molekuláris szintű optikai képképzés megvalósítására (fluoreszcens próbák), valamint rendkívül kis (10^{-12} - 10^{-14} mol/dm³) koncentrációban jelenlévő antigének kvantitatív meghatározására (immun-analízis). A ¹⁷⁷Lu, ¹⁵³Sm és ¹⁶⁶Ho izotópokat a daganatos betegségek terápiájában, illetve csontáttétek esetén fájdalomcsillapításra alkalmazzák.

Mivel a Ln^{3+} -ionok toxikusak és fiziológiás pH-n hidrolizálnak, *in vivo* alkalmazásuk csak stabilis komplexek formájában lehetséges. A koordinációs kémiából ismert eredmények alapján a Ln^{3+} -ionok stabilis komplexeket képeznek elsősorban aminopolikarboxilát ligandumokkal, főként a 8 donoratomot tartalmazó nyíltláncú DTPA-val és az 1978-ban előállított makrociklusos DOTA-val. Az 1990-es évektől a DTPA-nak és a DOTA-nak is több származékát állították elő, amelyek komplexeit a klinikai gyakorlatban használják.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

A Ln^{3+} -ionok mellett több más 3 (+) töltésű fémion radioizotópjának alkalmazására is sor került a Nukleáris Medicinában, köztük a ritkaföldfémek csoportjába tartozó Sc^{3+} és Y^{3+} , valamint a Ga^{3+} és In^{3+} több radioizotópjának. A Pozitron Emissziós Tomográfiában (PET) vizsgálatok során jelenleg leggyakrabban alkalmazott radiofarmakonok a ^{18}F -fluorodezoxi-glükóz (FDG), ^{11}C -metionin, ^{15}O -butanol és a ^{13}N -ammónia. Ezeket a radioizotópokat ciklotronban állítják elő és a vizsgálatokban történő felhasználásuk a megfelelő molekulák jelzése után történik. Mivel ezeknek a β^+ -sugárzó izotópoknak az előállítása rendkívül költséges és a jelzési folyamat lassú szerveskémiai reakciókban valósítható meg (miközben az izotópok felezési ideje rövid), ezért az utóbbi évek során komoly érdeklődés mutatkozik az izotóp-generátorokkal könnyen előállítható radioizotópok PET vizsgálatokban történő felhasználására. A ^{68}Ga ($t_{1/2}=67,71$ perc, 90% β^+ , $E_{\text{max}}=1880$ keV) izotóp viszonylag egyszerűen előállítható $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor alkalmazásával és a jelzési folyamatok egyszerű komplexképzési reakciókban végbevihetők. Ezeket a fémionokat is többnyire aminopolikarboxilát komplexeik formájában alkalmazzák, így a Ga^{3+} - és In^{3+} -komplexek iránti érdeklődésünk a ligandumok vizsgálatán keresztül kezdődött.

Ugyanakkor a szervezetbe bejuttatott komplexek a testfolyadékokban levő Cu^{2+} -, Zn^{2+} -, Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionokkal reakcióba léphetnek, így ezek aminopolikarboxilát komplexeinek a vizsgálatára is sor került, hogy a diagnosztikai célokra használt komplexek élő szervezetben bekövetkező „sorsáról” minél több információhoz jussunk.¹ A Gd(III)-komplexek *in vivo* stabilitásának, illetve kinetikai inertségének ismerete az utóbbi években különösen fontossá vált, mivel olyan új megbetegedéseket diagnosztizáltak, amelyek a Gd^{3+} -alapú MRI kontrasztanyagok *in vivo* disszociációjához és a „szabad” Gd^{3+} -ion toxikus hatásaihoz köthetők. Ez a betegség a Nefrogén

Szisztémás Fibrózis (NSF), amely Gd^{3+} -alapú MRI kontrasztanyaggal kezelt súlyos, dialízisre szoruló vesebetegek esetében alakult ki. Az NSF kialakulásának okai jelenleg még nem ismertek, de korábban *Grobner* és *Marckman és mtsai* a $Gd(III)$ -komplexek *in vivo* disszociációjával és a felszabaduló Gd^{3+} -ionok toxikus hatásával hozták összefüggésbe.^{2,3} Az okok megismeréséhez első lépésként ismerni kell a szabadabbá váló Gd^{3+} mennyiségét és biospeciációját.

Munkám ezekhez a területekhez kapcsolódik és a következő általánosan megfogalmazható célok tűzhetők ki:

- A hét funkciós csoporttal rendelkező CyAAZTA és $Gd(III)$ -komplexének vizsgálata, amely nagyobb relaxációssebesség növelő hatással rendelkezhet, mint a jelenleg használt nyolc funkciós csoportot (donoratomot) tartalmazó ligandumok $Gd(III)$ -komplexei
- A $Ga(CyAAZTA)^-$ komplex egyensúlyi sajátságainak jellemzése, kinetikai inertségének meghatározása és szerkezeti sajátságainak felderítése, valamint a ^{68}Ga radioizotóppal történő jelzés hatékonyságának tanulmányozása
- A szabad Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok hatása a klinikai gyakorlatban alkalmazott Gd^{3+} -alapú lineáris kontrasztanyagok disszociációjának kinetikájára.
- A nyíltláncú $Gd(DTPA-BMA)$ (Omniscan) és a makrociklusos $Gd(HP-DO3A)$ (ProHance) komplexek csontszövetekben történő retenciójának vizsgálata

II. Irodalmi áttekintés

II. 1. MRI kontrasztanyagok

A Mágneses Rezonanciás Képpalkotást (MRI) az 1980-as évek közepétől eredményesen alkalmazzák, amely napjainkra a leghatékonyabb orvosdiagnosztikai képpalkotó eljárás lett. A vizsgálatok során a szervezetről kétdimenziós T_1 és T_2 térképet készítenek, amelyen az egészséges és beteg szövetek jól megkülönböztethetők egymástól eltérő víztartalmuknak (a makromolekulákhoz kötött és a szabad vízmolekulák száma különböző), ezáltal eltérő T_1 és T_2 relaxációs idejüknek köszönhetően.⁴ Az MRI vizsgálatok elterjedését és népszerűségét nagy felbontóképességének köszönheti és annak, hogy segítségével különbséget lehet tenni a lágy szövetek között is. Ez a különbség azonban elég kicsi, ezért egyes esetekben kontrasztosabb képre van szükség.⁵ A készített MRI képek kontrasztosságának növelése érdekében paramágneses kontrasztanyagokat alkalmaznak, mivel paramágneses anyagok jelenlétében a szövetekben lévő vízprotonok relaxációs viselkedése eltérő.⁶ A kialakított kontraszt alapján megkülönböztethetünk T_1 -kontrasztanyagokat, amelyek a vízprotonok longitudinális relaxációs sebességére ($1/T_1$) gyakorolnak hatást és T_2 -kontrasztanyagokat, amelyek a vízprotonok transzverzális relaxációs sebességét növelik.

A vízprotonok longitudinális relaxációs idejét (T_1) csökkentő anyagok főként paramágneses fémionok. A legnagyobb mértékű csökkenést az S alaptermű, viszonylag hosszú relaxációs idejű, párosítatlan elektronokkal rendelkező fémionok (Mn^{2+} , Fe^{3+} , Eu^{2+} , Gd^{3+}) eredményezik. Ezek közül a legnagyobb hatást Gd^{3+} -ion okozza, mivel 7 párosítatlan elektronnal, nagy mágneses momentummal és kellően hosszú elektron relaxációs idővel (10^{-9} s) rendelkezik.⁷

A vízprotonok transzverzális relaxációsebességét megnövelő anyagok közül a legjelentősebbek a különféle szuperparamágneses vas-oxid mikrorészecskék, melyeknek mára jónéhány vegyületét eredményesen alkalmazzák MRI kontrasztanyagként (Lumirem®, Abdoscan®, Endorem®).⁸⁻¹⁰ Ezeket az anyagokat kristályszerkezetük alapján a következő összegképlettel lehet leírni: $Fe_2^{III}O_3M^{II}O$, ahol M^{II} : Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} lehet. Fizikai-kémiai tulajdonságaikat azonban nem csak az összetétel befolyásolja, hanem a szemcseméret is. A nagyobb szemcseméretű (>50 nm; SPIO) vas-oxid mikrorészecskék a vízprotonok transzverzális (negatív kontraszt), míg a kisebbek (<50 nm; USPIO) a vízprotonok longitudinális (pozitív kontraszt) relaxációsebességét növelik meg jelentősebben.

A kontrasztanyagok harmadik és egyben legújabb csoportját képezik azok az anyagok, amelyek különféle labilis (főként $-NH$ és $-OH$) protonokat tartalmaznak, amik képesek a jelentős mennyiségben jelen lévő vízmolekulák protonjaival kicserélődni. Ha ez a csere lassú folyamat az NMR időskáláján, akkor 1H -NMR jelük elkülönül a vízprotonok jelétől. Nagyfrekvenciás impulzust alkalmazva abban a tartományban, ahol a labilis protonok jele található, telítés történik, ami a vízprotonokkal történő kémiai cserén keresztül megnöveli azok relaxációs sebességét. Ezek a **CEST** (Chemical Exchange Saturation Transfer) anyagok, amik magukba foglalják a szerkezet hasonló, labilis protonokkal rendelkező metabolitjait is.¹¹

II.1.1. Gd(III)-alapú MRI kontrasztanyagok

A gadolínium a lantanoida csoport eleme, elektronszerkezete $[Xe]4f^75d^16s^2$. A szervesen Gd(III)-só-oldatok nagyon toxikusak az élő szervezet számára, ($LD50=0,2-0,5$ mmol/kg)⁴, mivel a Gd^{3+} ionsugara (105 pm) hasonló a Ca^{2+} ionsugarához (114 pm), ezért a szabad Gd^{3+} számos feszültség-gátolt kalciumcsatorna szervesen blokkolója már nano- és

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

mikromólos koncentrációban is, valamint inhibitora néhány Ca^{2+} függő enzim aktivásának.¹²

A Gd^{3+} -ion komplexálása a megfelelő ligandumokkal jelentősen csökkenti annak akut toxicitását. A gyakorlatban használt komplexképzők közül a makrociklusos DOTA és a nyíltláncú DTPA ligandumok, illetve ezek származékai terjedtek el leginkább. Napjainkban kilenc Gd^{3+} -alapú kontrasztanyagot használnak a klinikai gyakorlatban. Ezek közül hat nem specifikus, extracelluláris Gd(III) -komplex (Gd(DTPA)^{2-} , Gd(DTPA-BMA) , Gd(DOTA)^- , Gd(HP-DO3A) , Gd(BT-DO3A) , Gd(DTPA-BMEA)), kettő májspecifikus kontrasztanyag (Gd(BOPTA)^{2-} és Gd(EOB-DTPA)^{2-}) és egy MR angiográfiás kontrasztanyag (MS-325). Elsőként a nyíltláncú Gd(DTPA)^{2-} (Magnevist[®]) lett bevezetve, melyben a Gd^{3+} -ionhoz öt karboxilát-O és három amino-N koordinálódik.¹³⁻¹⁵ A 9. koordinációs helyet egy vízmolekula tölti be, amely lényeges a jel növelésében a T_1 súlyozott MR kontrasztanyagok esetén.¹⁶⁻¹⁸ Később a Gd(DOTA)^- (DOTAREM[®]) került bevezetésre a klinikai gyakorlatban, amely már jóval nagyobb kinetikai inertséggel rendelkezik.¹⁹

Az MRI vizsgálatok során a komplexeket általában 0,1-0,3 mmol/testsúly kg dózisban, intravénás befecskendezéssel juttatják a szervezetbe, ami az injektálás helyén esetlegesen fájdalommal járhat a jelentős ozmotikus koncentráció-különbség miatt. Az ozmotikus terhelés további csökkentésére fejlesztették ki a Gd(DTPA)^{2-} és a Gd(DOTA)^- a töltés nélküli változatait, a Gd(DTPA-BMA) (Omniscan[®]), Gd(DTPA-BMEA) (Optimark[®]), Gd(HP-DO3A) (ProHance[®]) és Gd(DO3A-Butrol) (Gadovist[®]) komplexeket, amelyek bár lényegesen kisebb termodinamikai stabilitással rendelkeznek, de kinetikai inertségük csak kis mértékben csökkent.^{20,21} A semleges molekulákban a karboxilát csoportok száma már háromra csökken, mivel két karboxilát csoportot alkoholos hidroxil- vagy amidcsoportokra cseréltek.¹⁶

Habár az amidkarbonil atomok is közvetlenül a Gd^{3+} -ionhoz koordinálódnak, a kötődésük sokkal gyengébb, mint a karboxilátok esetén, így ezek a komplexek kisebb stabilitással rendelkeznek.^{16,18,22} Az említett kontrasztanyagok a befecskendezést követően egyenletesen oszlanak el az extracelluláris térben és kb. 1,5 órás felezési idővel a vesén keresztül ürülnek ki.

Szervspecifikusság céljából fejlesztették ki a lipofil csoportokat tartalmazó $Gd(EOB-DTPA)^{2-}$ (EOVIST[®]) és $Gd(BOPTA)^{2-}$ (Multihance[®]) komplexeket.²³ Ezek a kontrasztanyagok a májban dúsulnak, így lehetővé válik a befecskendezett kontrasztanyag mennyiségének csökkentése, ami a szervezetet ért terhelés minimalizálásának tekintetében rendkívül fontos.

II.1.1.1. A $Gd(III)$ -komplexek relaxivitása

A vízprotonok $Gd(III)$ -komplexek jelenlétében mért longitudinális relaxációsebessége ($1/T_{1obs}$) a diamágneses ($1/T_{1d}$) és paramágneses ($1/T_{1p}$) hozzájárulások összegeként adható meg:

$$\frac{1}{T_{1obs}} = \frac{1}{T_{1d}} + \frac{1}{T_{1p}} = \frac{1}{T_{1d}} + r_1[Gd] \quad II.3.1$$

ahol az r_1 a $Gd(III)$ -komplex relaxivitása, ami paramágneses anyag 1 mM-os oldata által eredményezett longitudinális relaxációssebesség ($1/T_{1p}$) növekedés.²⁴ A $Gd(III)$ -komplexek relaxivitása a komplexek belső szférás (r_{1p}^{is}) és külső szférás (r_{1p}^{os}), valamint a második koordinációs szférás (r_{1p}^{2nd}) hozzájárulásainak összegeként adható meg:²⁵

$$r_1 = r_{1p}^{is} + r_{1p}^{os} + r_{1p}^{2nd} \quad II.3.2$$

A klinikai vizsgálatokban jelenleg alkalmazott $Gd(III)$ -komplexek longitudinális relaxációsebesség növelő hatásának közelítőleg 50%-át a fémionhoz közvetlenül koordinálódó vízmolekula cserefolyamatai

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

eredményezik.²⁶ A Gd(III)-komplexek belső szférás hozzájárulását a Swift-Connick elmélet alapján az alábbi egyenlettel lehet kifejezni:

$$r_{1p}^{is} = \frac{cq}{55,55} \frac{1}{T_{1m}^H + \tau_M} \quad II.3.3$$

ahol q és τ_M a Gd^{3+} -ionhoz kötött vízmolekulák számát és átlagos tartózkodási idejét ($k_{ex}=1/\tau_M$ vízcseresebesség), míg a T_{1m}^H a koordinált vízmolekula protonok T_1 relaxációs idejét jelöli.²⁷ A II.3.3 egyenlet alapján a belső szférás relaxációs sebesség növelő hatást egyértelműen befolyásolja a vízmolekulák száma (q), a vízmolekulák átlagos tartózkodási ideje (τ_M) és belső szférás vízprotonok relaxációs ideje (T_{1m}^H). Figyelembe véve a II.3.3 egyenlet második felét megállapítható, hogy a belső szférás hozzájárulás mértékét hosszú élettartamú $Gd^{3+} - OH_2$ kötések esetén a vízmolekula átlagos tartózkodási ideje (cserekontrollált: $\tau_M \gg T_{1m}^H$), míg rövid élettartamú $Gd^{3+} - OH_2$ kötések során a koordinált vízmolekula protonok relaxációs ideje (relaxáció kontrollált: $T_{1m}^H \gg \tau_M$) határozza meg. A belső szférában található vízmolekula protonok relaxációja a Gd^{3+} -ionnal kialakított dipól-dipól kölcsönhatáson keresztül játszódik le, amelyet befolyásol $Gd^{3+} -$ proton vektor reorientációs korrelációs ideje (τ_R) - ami kisméretű Gd(III)-komplexek esetében megegyezik az egész molekula rotációs korrelációs idejével - a fémion elektron spin relaxációs ideje (τ_S), a fémionhoz koordinált vízmolekulák átlagos tartózkodási ideje (τ_m) és a Gd-H távolsága (r_{GdH}):

$$\frac{1}{T_{1m}^H} = k \frac{1}{r_{GdH}^6} f(\tau_R, \tau_S, \tau_m) \quad II.3.4$$

Kisméretű Gd(III)-komplexek esetében külső szférás folyamatok relaxációs sebesség növelő hatása (r_{1p}^{os}) akár a mért relaxivitás 50%-át is elérheti. A külső szférás hozzájárulást Freed-féle közelítéssel^{28,29} lehet

megadni, ami a paramágneses fémion elektron relaxációs idejét és a paramágneses fémkomplex közelében a vízmolekulák szabad diffúzióját veszi figyelembe elhanyagolva a vízmolekulák és a komplex karboxilát és/vagy foszfonát csoportjai között kialakuló H-kötést. Ezek a vízmolekulák egy második koordinációs szférában helyezkednek el, amelyek átlagos tartózkodási ideje lényegesen hosszabb, mint amennyit a szabad transzlációs diffúzió alapján becsülhetünk. A Gd(III)-komplexek második koordinációs szférájában elhelyezkedő vízmolekulák teljes relaxivitáshoz való hozzájárulását (r_{1p}^{2nd}) Botta és munkatársai javaslatára vezették be,³⁰ amely számos Gd(III)-komplex esetében (főként amino-polifoszfonátok és -polifoszfinátok) akár 30%-a is lehet a oldószer vízprotonok relaxációsebességre gyakorolt hatásának.³¹

II.2.1.2 A kontrasztanyagok fejlesztésének új irányai

A klinikai gyakorlatban alkalmazott kontrasztanyagokban a Gd^{3+} -ion 8 donoratomot tartalmazó ligandumokkal képez komplexet és a Gd^{3+} -ion 9. koordinációs helyét egy vízmolekula foglalja el. Az említett komplexek relaxivitása ($r_1=4-7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) egyelőre messze elmarad az elméletileg elérhető $100 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ körüli relaxivitástól, mivel a relaxivitást befolyásoló tényezők ($1/\tau_m \approx 10^6 \text{ s}^{-1}$, $1/\tau_R \approx 10^{10} \text{ s}^{-1}$, $1/\tau_S \approx 10^8 \text{ s}^{-1}$) nem optimálisak. Intenzív kutatások folynak a minimális dózis melletti maximális relaxációs sebesség növekedés elérésére, amelyet az ezt befolyásoló tényezők finomhangolásával lehet elérni²⁴. Az egyik lehetséges megoldás a donorcsoportok számának csökkentése, mivel a paramágneses komplexek belső szférás relaxivitása (r_{1p}^{is}) egyenesen arányos a belső koordinációs szférában található vízmolekulák számával. A közelmúltban számos olyan 6 és 7 donoratomot tartalmazó nyíltláncú DTPA és makrociklusos DO3A ligandum származékot állították elő, amelyek Gd(III)-komplexei két vagy három belső szférás

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

víz-molekulát tartalmaznak, de ezek termodinamikai és kinetikai sajátosságai nem teszik lehetővé *in vivo* alkalmazásukat.²⁴ Prof. Silvio Aime és munkatársai 2004-ben állították elő a 7 donoratomot tartalmazó AAZTA ligandumot és tanulmányozták a $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ relaxációs sajátosságait és endogén ligandumokkal kialakított kölcsönhatásait.³² A vizsgálatok alapján a $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplexben található két belső szférás víz-molekula nem helyettesíthető bi- és tridentát ligandumokkal. A komplex hasonló termodinamikai stabilitással bír, mint a kereskedelmi forgalomban lévő $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$, viszont lényegesen jobb kinetikai inertséggel rendelkezik.³³

Az MRI vizsgálatok során jelenleg alkalmazott kontrasztanyagok többsége nem specifikus, kivéve a $\text{Gd}(\text{BOPTA})$ és $\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})$, mint máj-specifikus kontrasztanyag és a Gadofosveset (Vasovist), mint MR angiográfiás kontrasztanyag.⁶ A szervspecifikus kontrasztanyagok jobb felbontású és kontrasztosabb MRI képek felvételét tennék lehetővé. Ezek lehetnek angiográfás vagy tumorspecifikus kontrasztanyagok. Az angiográfás kontrasztanyagok általában makromolekulák, amelyek nem diffundálnak ki a sejtközötti állományba, ezáltal hosszabb időn keresztül tartózkodnak a véráramban. Ilyenek például a liposzomális kontrasztanyagok³⁴, a polimer kontrasztanyagok³⁵ és a plazma proteinjeihez nem kovalensen kötődő $\text{Gd}(\text{III})$ -komplexek.³⁶ A tumorspecifikus kontrasztanyagok a tumoros sejtek felületén található receptorokhoz kötődnek, a szelektivitást a $\text{Gd}(\text{III})$ -komplexekhez kapcsolt fehérje fragmensekkel vagy monoklonális antitestekkel lehet elérni.³⁷

Az ún. intelligens Gd^{3+} -alapú MRI kontrasztanyagokkal (smart contrast agents) megvalósítható a pH-nak³⁸, az oxigén parciális nyomásának^{39,40}, a szövetek hőmérsékletének⁴¹, néhány endogén ligandum (pl. laktát) és fémion (pl. Ca^{2+}) koncentrációjának⁴² MRI vizsgálattal történő *in vivo*

meghatározása. Ezekkel a kontrasztanyagokkal feltérképezhetőek a betegségek és elváltozások, a vizsgált szervek és szövetek fizikai-kémiai paramétereiben okozott változásokon keresztül. A szervezet hőmérséklet-adataiból többek között a gyulladáshelyeket lehet beazonosítani. Azok a kontrasztanyagok, amelyek relaxivitása pH-függő, fiziológiai pH tartományban alkalmasak arra, hogy megkülönböztethetővé tegyék a tumoros (pH=5,5-7) és az egészséges szövetet (pH=7,4). Számos betegség során megnövekszik az esszenciális fémionok száma a szervezetben, ezért az intelligens kontrasztanyagok egy másik csoportját az ion-szenzitív komplexek adják. Ezekben a komplexekben a Gd^{3+} -ionhoz koordinált ligandum szabad koordinációs helyein képesek megkötődni az endogén fémionok, amelynek hatására a komplex relaxivitása megváltozik.

Az MRI-t más képalkotó módszerrel (komputer tomográfia(CT), pozitron emissziós tomográfia (PET)) kombinálva háromdimenziós és mozgókép is készíthető a vizsgált területről.

Kutatások folynak teragnosztikára (terápia és diagnosztika kombinációja) használható kontrasztanyagok fejlesztésére, ahol a jelenleg is használt MRI kontrasztanyagokat ($Gd(DTPA)^{2-}$, $Gd(BOPTA)^{2-}$), amelyeket tumorspecifikussá téve, a kötődést követően termikus neutronokkal sugároznak.⁴⁴ A lejátszódó magreakciókban ($^{157}Gd(n,\gamma)^{158}Gd$) keletkező γ -sugárzás (max. 7,8 MeV) és Auger-elektronok (max. 41 KeV) elpusztítják a rákos sejteket.

A Gd^{3+} -poliamino-polikarboxilát komplexek orvosdiagnosztikai felhasználása szempontjából további vizsgálataikkal a jövőben egyre hatékonyabb és biztonságosabb vegyületek fejleszthetők.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

II.1.1.3. Gd³⁺-alapú kontrasztanyagok disszociációja fiziológiai körülmények között

2006-ban egy korábban nem ismert betegséget diagnosztizáltak olyan súlyos vesebetegek esetében, akiknek az MRI vizsgálatát Gd³⁺ tartalmú kontrasztanyaggal végezték. A betegség a **Nefrogén Szisztémás Fibrózis (NSF)**, amely a bőr és kötőszövetek megvastagodását okozza, súlyosabb esetekben számos további szervet érinthet, például májat, tüdőt, szív- és vázizomzatot. A Gd³⁺ tartalmú kontrasztanyagokkal vizsgált súlyos vesebetegek esetében a Gd(III)-komplexek kiürülése a szervezetből lassú (dialízis típusától függően akár 30-40 óra is lehet). A hosszú idő alatt a Gd(III)-komplexek bizonyos része disszociálhat a szervezetben különböző fémioncsere reakciókon keresztül és a szabaddá váló Gd³⁺, mint az NSF egyik rizikófaktora hozzájárulhat annak kialakulásához.^{3,18,45} Az NSF-es betegek többségét Omniscan (Gd(DTPA-BMA)) kontrasztanyagot alkalmazva vizsgálták, amelynek stabilitása kisebb, disszociáció sebessége lényegesen nagyobb, mint amit a makrociklusos DOTA és származékai Gd(III)-komplexei esetében megállapítottak.⁴⁶ Az NSF kialakulásának pontos oka eddig nem ismert és ennek megállapításához meg kell határozni, hogy a különböző Gd³⁺ tartalmú kontrasztanyagokból milyen mennyiségben és sebességgel válik szabaddá a Gd³⁺-ion, majd az milyen formában kerül a testfolyadékokba. A legújabb vizsgálatok eredményei alapján többszöri Gd³⁺-alapú kontrasztanyaggal végzett MRI vizsgálatot követően gadolínium felhalmozódást észleltek olyan betegek agyában is, akik normális vesefunkcióval rendelkeztek.^{42,43,47} A Gd³⁺-ion élő szervezetben való felhalmozódását lényegesen befolyásolják a Gd(III)-komplexek egyensúlyi, kinetikai és farmakokinetikai sajátosságai.

Néhány évtizede még úgy tűnt, hogy a ligandumok Gd³⁺-ionnal és néhány endogén ionnal alkotott komplexeinek stabilitási állandójának ismerete

elegendő, hogy jellemezzük a kontrasztanyagokat, ám nem sokkal később kiderült, hogy a Gd(III)-komplexek kinetikai inertsége is legalább annyira fontos tényező, mint az egyensúlyi sajátságok.^{48,49} Korábban a komplexek fizikai-kémiai sajátságait a fiziológiás körülményektől távol határozták meg (egyensúlyi tulajdonságokat 25°C, 0,1 M KCl vagy (CH₃)₃NCl ionerősségek mellett^{3,18,50}, kinetikai sajátságokat 1 M sósavas közegben vagy nagy foszfátkoncentráció mellett).²⁰ A testfolyadékokban tartózkodó Gd(III)-komplexek az endogén fémionokkal, mint a Zn²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺ vagy Fe³⁺ kicserélődési reakciókba léphetnek, ekkor a Gd³⁺-ion nem ürül ki a szervezetből, különböző fehérjékkel kialakított viszonylag erősebb kölcsönhatásának és a GdPO₄, esetleg Gd(CO₃)₃ rosszul oldódó csapadék leválásának következtében. A Gd(PO₄) akkumulálódhat a csontokban a hidroxipatittal mutatott nagymértékű hasonlósága miatt. Korábbi állatkísérletek alapján a Gd(III)-komplexek kiürülése a csontszövetekből lassabb, mint a szervekből és egyéb szövetekből. White és társai a Gd(DTPA-BMA)-val kezelt, csípőműtéten átesett betegek csontjaiban 2,5-4-szer több gadolíniumot találtak, mint a Gd(HP-DO3A)-val kezelt betegek csontjaiban.⁵¹ Ellenben Darrah és társai által vizsgált csípőcsontokban a gadolínium mennyisége nagyon hasonló volt a Gd(DTPA-BMA) és a Gd(HP-DO3A) kontrasztanyaggal kezelt betegek esetében, ugyanakkor az általuk használt mérési módszerrel nem tudtak különbséget tenni a szabad és a komplexben kötött Gd³⁺ között.⁵²

Ennek ismeretében kutatócsoportunkban korábban tanulmányoztak hét, klinikai gyakorlatban használt, Gd³⁺-alapú MRI kontrasztanyag (Gd(DTPA-BMA), Gd(DTPA)²⁻, Gd(BOPTA)²⁻, Gd(EOB-DTPA)²⁻, Gd(DOTA)⁻, Gd(HP-DO3A) és Gd(BT-DO3A)) fizikai-kémiai sajátosságait fiziológiához közeli körülmények mellett (25°C és 37°C, 0,15 M NaCl). Vizsgálták a ligandumok endogén fémionokkal képzett komplexeinek és a Gd(III)-

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátságainak vizsgálata

komplexek Cu^{2+} -, Zn^{2+} - és Eu^{3+} -ionokkal lejátszódó cserereakciók sebességét kis endogén ligandumok (citrát, foszfát, karbonát, laktát és hisztidin) jelen- és távollétében. Vizsgálataik alapján az egyensúlyi sajátságok 25- és 37°C-on gyakorlatilag megegyeznek.

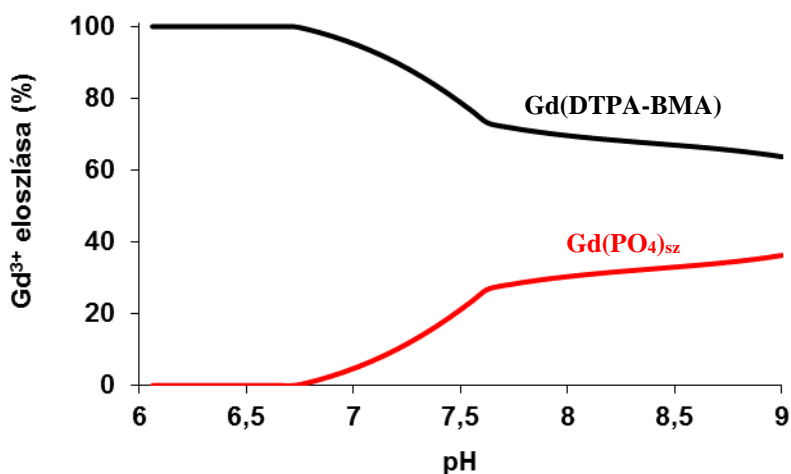
Fiziológiához közeli feltételek mellett a Gd(DTPA) származékok disszociációs reakciói döntően a kis endogén ligandumok (citrát, foszfát és karbonát) által katalizált úton, vegyes ligandumú komplexek képződésén keresztül mennek végbe.⁵³ Ezzel szemben a Gd(DOTA) származékok fémioncsere reakciói csak a komplexek savkatalizált disszociációjával játszódnak le több nagyságrenddel lassabban, mint a Gd(DTPA)²⁻ esetében. Korábbi eredményeik rámutattak, hogy súlyos veseelégtelenségben szenvedő betegek esetében a nyíltláncú Gd(DTPA) származékok disszociációjának felezési ideje (Gd(DTPA-BMA): $t_{1/2}=9,3$ óra, Gd(DTPA): $t_{1/2}=68,7$ óra) összemérhető a kiürülésük felezési idejével, míg a makrociklusos Gd(DOTA) származékok esetén a disszociáció sebessége több nagyságrenddel kisebb, mint a kiürülés sebessége.

A fontosabb endogén fémionok és ligandumok⁵⁴, valamint a Gd(III)-komplexek MR vizsgálatoknál kialakuló fiziológiás koncentrációját és az általunk meghatározott, illetve az irodalomban fellelhető⁵⁵ egyensúlyi állandókat felhasználva egy egyszerűsített plazmamodellt készítettünk (20 komponens és 350 részecske, amelyek közül 8 rosszul oldódik (pl. $\text{Gd}(\text{PO}_4)$, $\text{Gd}_2(\text{CO}_3)_3$) (II.3.1.3.1 táblázat).

II.3.1 táblázat A plazmamodellben használt komponensek koncentrációi

| Komponensek | Koncentráció (mol/dm ³) | Komponensek | Koncentráció (mol/dm ³) |
|------------------------|--|--------------------|--|
| Ca²⁺ | 2,5×10 ⁻³ | Albumin | 6,8×10 ⁻⁴ |
| Zn²⁺ | 1,0×10 ⁻⁵ | Transferrin | 3,1×10 ⁻⁵ |
| Cu²⁺ | 1,0×10 ⁻⁶ | Citrát | 1,1×10 ⁻⁴ |
| Gd³⁺ | 3,5×10 ⁻⁴ | Laktát | 1,82×10 ⁻³ |
| Alanin | 3,7×10 ⁻⁴ | Malát | 3,5×10 ⁻⁵ |
| Cisztein | 2,3×10 ⁻⁵ | Szukcinát | 4,2×10 ⁻⁵ |
| Glutamát | 4,8×10 ⁻⁵ | Karbonát | 2,5×10 ⁻² |
| Glicin | 2,43×10 ⁻⁴ | Foszfát | 1,0×10 ⁻³ |
| Hisztidin | 8,5×10 ⁻⁵ | Kelátképző | 3,5×10 ⁻⁴ |
| Lizin | 1,78×10 ⁻⁴ | | |

A részecskeeloszlásra végzett számítások szerint fiziológias pH-n csak a foszfátion képes versenyezni az amino-polikarboxilát ligandumokkal.⁵⁰ Az egyszerűsített plazmamodell felhasználásával 0,5 mM Omniscan jelenlétében az egyensúlyi részecskék eloszlására számításokat végeztünk, amely alapján a Gd(DTPA-BMA) 17%-a disszociál GdPO₄ képződése mellett.



II.3.1 ábra A Gd(DTPA-BMA) speciációja vérplazmában ([Gd(DTPA-BMA)]=0,35 mM, 0,15 M NaCl, 37°C)

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

A szabaddá váló ligandum a Ca^{2+} -ion magas koncentrációjának köszönhetően $\text{Ca}(\text{DTPA-BMA})$ komplex formájában van jelen. A $\text{Ca}(\text{DTPA-BMA})$ képződését kapilláris elektroforézissel korábban csoportunkban kimutatták.⁵⁰ Figyelembe kell azonban vennünk, hogy a részecske számolásokat egyensúlyt feltételezve végezzük, amely élő rendszer esetén nem alakul ki a kontrasztanyagok vesén keresztüli kiürülése miatt.

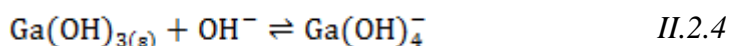
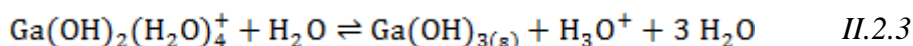
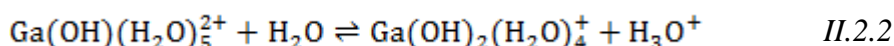
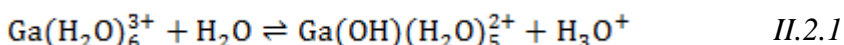
A szabad Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok koncentrációja a testfolyadékokban igen magas, összemérhető az injektált kontrasztanyagok koncentrációjával, valamint a szabad Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok kis stabilitású kétmagvú komplexeket képezhetnek a Gd(III) -komplexekkel, amely folyamat elvben a kontrasztanyag disszociációjához vezethet.

II. 2. A gallium kémiája

A gallium a periódusos rendszer 13. csoportjába tartozó nem esszenciális fémion, az elektronszerkezete $[\text{Ar}]3d^{10}4s^24p^1$. Szinte kizárólag a +3 oxidációs állapotban van jelen, de létezik +1 oxidációs állapota is, ami elemi galliummá és Ga^{3+} -ionná diszproporcionálódik. Ahogyan a 13. csoport többi tagja, úgy a gallium is erősen hard sav (kis ionsugár: Ga^{3+} : 0,62 Å; viszonylag nagy töltés), tehát ionos, nem polarizálható hard donoratomokat (N- és O-donoratomok) tartalmazó ligandumokkal alakít ki erős kötéseket. Koordinációs tulajdonságai alapján főként a karboxilát, foszfinát, fenolát, hidroxamát és amin funkciós csoportokat tartalmazó ligandumokkal képez termodinamikailag stabilis komplexeket, de a tiolok is jól koordinálódó csoportnak bizonyultak. A kis kationsugárnak köszönhetően a Ga^{3+} -ion főleg hatos koordinációjú torzult oktaéderes geometriát alakít ki. A kevésbé zsúfolt ötös (négyzetes piramis vagy trigonális bipiramisos) és négyes (tetraéderes) koordinációjú Ga(III) -komplexek elektronos és szterikus okok miatt érzékenyebbek a nukleofil támadásra, különösen fiziológiás körülmények

között.⁵⁶ A gallium általános koordinációs kémiája nagyon hasonló a Fe^{3+} -ionéhoz, emiatt jelentős affinitást mutat az élő szervezetben jelenlévő transferrinhez, illetve más vas transzporter proteinekhez. Ez azt eredményezi, hogy kis stabilitású Ga(III)-komplexek a transferrinrel lejátszódó kompetíciós reakcióban disszociálnak *in vivo* körülmények között.

A gallium hidrolitikus hajlama erős ($\text{Ga}(\text{OH})_x$ $x=1$ $\log K_1=-2.41$, $x=2$ $\log K_2=-3,51$, $x=3$ $\log K_3=-4.71$, $x=4$ $\log K_4=-6.24$).⁵⁷



Vizes oldatokban a hidratált Ga^{3+} -ion csak savas közegben stabil. A megfelelő donortomok hiányában a pH növelésével (pH~3) megindul az oldhatatlan gallium-trihidroxid csapadék képződése (II.2.1-3. egyenlet), amely amfoter jellegű, lúgos közegben (pH>7) gallium-tetrahidroxo komplexként –gallát- $[\text{Ga}(\text{OH})_4^-]$ képződése mellett oldódik. (II.2.4. egyenlet)

Napjainkban a Ga^{3+} különböző izotópjait elterjedten alkalmazzák az orvosi diagnosztika és terápia különböző területein, főként rákos sejtek kimutatására és kezelésére, valamint a Ca^{2+} -ion és a csontmetabolizmus folyamatainak nyomonkövetésére. Állatkísérletek során a szervezetbe juttatott ^{68}Ga (Ga(citrát) formájában) a rosszindulatú sejtekben halmozódott fel, amit a komplex disszociációjával és a Ga(transzferrin) képződésével, valamint utóbbi rákos sejtbe történő bejutásával értelmeztek.⁵⁸ Ezek az eredmények vezettek a ^{67}Ga (γ , $t_{1/2}=78,3$ óra) izotóp SPECT vizsgálatokban történő felhasználásához rosszindulatú daganatok rutinszerű diagnosztizálásában.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

Jelenleg 30 különböző gallium izotóp ismert, ezek közül két stabil, nem radioaktív természetes izotópja (^{69}Ga és a ^{71}Ga) van. Radioaktív izotópja a természetben nem található, valamint ezek közül csak a ^{66}Ga , ^{67}Ga és a ^{68}Ga radionuklidokat használja a nukleáris medicina.⁵⁹

II.2.1. A gallium izotópjainak előállítása

A ^{67}Ga ciklotronban állítható elő ^{68}Zn (p, 2n) – ^{67}Ga reakcióval. Besugárzása után a galliumot a megfelelő savval (pl. HCl) kioldják, majd oldószer/oldószer extrakcióval, ioncserés kromatográfiával vagy extrakciós kromatográfiával tisztítják az eluenst.⁶⁰ A ^{67}Ga izotóp tiszta γ -sugárzó és a bomlása során elektronbefogással stabil ^{67}Zn -é alakul. Számos különböző energiájú gamma fotont emittál 93 keV (36%), 185 keV (20%), 300 keV (16%) és 394 keV (5%) energiával.

A ^{68}Ga izotóp pozitron emisszió (89%) és elektron befogáson (11%) keresztül bomlik 67,7 perces felezési idővel. A rövidebb felezési időnek köszönhetően a nagyobb dózis sem jár nagyobb sugárterheléssel a betegek számára. A radioizotóp nagy energiájának ($E_{\beta^+, \text{max}}=1.89$ MeV) köszönhetően jobb felbontást biztosít, mint a leggyakrabban használt PET izotóp, a ^{18}F . Felezési ideje elegendően hosszú a komplexek gyártásához, tisztításához és a kép felvételéhez, tehát alkalmas radiofarmakológiai felhasználásra. A ^{68}Ga izotópot $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátorban ($t_{1/2}=270,8$ nap) állítják elő ionos vagy komplex formájában. A generátor általában egy kromatográfiás kolonnából és egy oldószer rendszerből áll, így végrehajtható a ^{68}Ga gyors, hatékony és szelektív elúciója. A legfontosabb szempontok az izotóp kémiai formája és a koncentrációja a generátorról történő elúciót követően, továbbá az, hogy az eluens kevés ^{68}Ge izotópot és egyéb, a generátorból származó szennyeződést tartalmazzon.

Számos különböző szerves és polimer alapú állófázisú $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor ismert.⁶¹ A szerves alapú kolonnák anyagai fém-oxidok, mint például az Al_2O_3 , TiO_2 vagy SnO_2 . Legelterjedtebben alkalmazott $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátorokban a ^{68}Ge anyaelemet ón-oxid alapú töltet hordozza, amelyről a ^{68}Ga 70-80%-a eluálható 1 M sósavval 10^{-6} - 10^{-5} %-os ^{68}Ge áttörés mellett.⁶² A napjainkban alkalmazott legújabb berendezésekben az állófázis pirogallol-formaldehid kopolimer gyanta, amiről 5,5 M sósavval eluálják az izotópot.⁶³ A jelenleg forgalomban lévő $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátorok további fejlesztésekre szorulnak, mivel az eluátum még mindig nem elhanyagolható mennyiségben tartalmazza a hosszú felezési idejű ^{68}Ge anyaelemet, amely stabil ^{68}Zn izotópra bomlik. A generátor tartalmazhat ^{71}Ge izotópot, amely elektronbefogással stabil ^{71}Ga izotóppá bomlik, amelynek mennyisége még a ^{68}Zn mennyiségét is meghaladhatja. Az eluátum egyrészt Ti(IV)- és Fe(III)-szennyezéseket is tartalmazhat, másrészt az elúcióhoz viszonylag nagy térfogatú tömény sósav szükséges, ami miatt nem alkalmazható közvetlenül jelölésre. A fent említett tényezők miatt az eluátummal további tisztítási lépéseket kell végrehajtani a különböző fémszennyezések és a savkoncentráció csökkentése érdekében.

II.3. Nukleáris medicina

A nukleáris medicina területe a radioaktív izotópokkal végzett orvosi diagnosztikai, terápiás és kutatási eljárásokat foglalja magába. Az alkalmazott radioaktív izotóppal szembeni általános követelmény, hogy az általa emittált részecskék ne nyelődjenek el a szövetekben, hanem a testből kijutva minél nagyobb számban detektálhatóak legyenek. Terápiás alkalmazás esetén ez fordított, mert a kedvező az, ha az emittált részecskék lokálisan maradéktalanul elnyelődnek.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

Napjainkban számos fémiont alkalmaznak az orvosi képalkotó eljárásoknál, hogy javítsák a diagnosztika hatékonyságát, jobban feltérképezhetőek legyenek a betegségek kóros molekuláris folyamatai, jellegzetes biokémiai változásai. A diagnosztika mellett egyre elterjedtebben alkalmazzák a különböző fémkomplexeket a rákos daganatok célzott molekuláris kezelésére. A különböző fémionok orvosi alkalmazása során azonban figyelembe kell venni azok toxicitását, illetve hidrolitikus hajlamukat, amiért nyíltláncú és makrociklusos aminopolikarboxilát kelátkomplexek formájában alkalmazzák őket. A diagnosztikában alkalmazott radioizotópoknál előnyt jelent, ha annak felezési ideje megfelelően rövid, ha tiszta gamma- illetve röntgensugárzóak, számos farmakon jelölésére alkalmasak viszonylag egyszerűen, valamint nem túl költségesek és könnyen hozzáférhetőek.

Az Egyszeres Foton-emissziós számítógépes tomográfia (Single Photon Emitted Tomography) SPECT vizsgálatok során tetszőleges metszésirányú szeletek radioizotóp-eloszlását állítják elő számítógéppel, sok irányból készült vetületi képekből. A jel létrejöttéhez egy 70 keV-nál nagyobb energiájú fotonra van szükség, mert ezeknek elég nagy hányada jut ki az élő szervezetből ahhoz, hogy detektálni lehessen őket. A képalkotás, valamint a sugárterhelés szempontjából a legkedvezőbb a 80-200 keV energiájú fotonokat emittáló radionuklidok alkalmazása. A ^{67}Ga , a ^{111}In , a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ és a ^{201}Tl γ -sugárzó izotópok, ezért használhatóak a SPECT-nél.⁶⁴ Ezeknél a vizsgálatoknál a jelöletlen farmakonok általában porampulla formájában állnak rendelkezésre és a generátorból nyert izotóppal elegyítve, megfelelő inkubációs idő után bármikor alkalmazható a szükséges radiofarmakon.

A pozitron emissziós tomográfia (PET) napjaink egyik legérzékenyebb noninvazív képalkotó eljárása, melynek segítségével egyedülálló képet kaphatunk az élő szervezetben lejátszódó biokémiai folyamatokról. A PET

vizsgálatok során a pozitronsugárzó (β^+ -sugárzó) radioizotóppal jelzett farmakon eloszlását vizsgálják. A pozitron az emissziót követően megsemmisül, és két egymással ellentétes irányban szétszálló (kb. 180°) γ -foton keletkezik, amelyet a gyűrű alakban elhelyezett detektorsereg (ún. PET-kamera) segítségével detektálnak, majd a keresztmetszeti síkok radioizotóp-eloszlását számítógéppel állítják elő.⁶⁵

Napjainkban a ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O és ^{13}N izotópokat használják a PET vizsgálatok során, közülük is a leggyakrabban a ^{18}F radioizotópot. A „biológiai” pozitron-sugárzó izotópok, mint a ^{11}C , ^{15}O és ^{13}N tökéletesek különböző biomolekulák jelölésére, mivel anélkül kapcsolódnak a molekulákhoz, hogy bármilyen kémiai változást okoznának benne. Ezek az izotópok rövid felezési idővel bírnak, ezért a klinikai vizsgálatok során a helyszínen kell előállítani őket, ami miatt a vizsgálatok rendkívül költségessé válnak. Emiatt újabban az érdeklődés olyan β^+ -sugárzó izotópokra irányul, amelyek generátorban előállíthatóak elő. Ilyen radioizotóp a ^{68}Ga , ^{82}Rb és a ^{62}Cu , amelyeket $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, $^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$ és $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ generátorokban készítik.⁶⁶ Ezek közül főleg a ^{68}Ga izotópra irányul nagy érdeklődés, köszönhetően kedvező tulajdonságainak.

A radionuklid terápia az élő szervezeten belüli szelektív anyagmegkötődésen alapul. A terápiás hatás az elemi részecskék helyi energiaátadásán múlik, elsősorban elektronokról (amik származhatnak β^- -(^{90}Y , ^{47}Sc , ^{177}Lu), vagy lágy γ -sugárzó radionuklidokból), vagy α -részecskékről (^{212}Bi , ^{225}Ac) lehet szó. A terápiás hatás a részecske energiájától, illetve az effektív felezési időtől függ.⁶⁶ Előnyük, hogy kevés mellékhatással járnak és a terápiás hatás általában hosszú időtartamú.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

II. 3.1. A gallium(III)-komplexek orvosdiagnosztikai felhasználása

Az orvosdiagnosztikában alkalmazott komplexek két csoportra oszthatóak: az egyikbe az ún. gallium esszenciális radiofarmakonok tartoznak, amelyek fémion nélkül nem tudják a komplexet a megfelelő szövetbe juttatni, a másik csoport a gallium-jelölt radiofarmakonok, azaz a bifunkciós komplexek, amelyeknél a molekula célba juttatásáért egy biológiai vektor felel.

A gallium esszenciális radiofarmakon a gallium szcintigráfiában alkalmazott ^{67}Ga -citrát, amelyet gyulladásszerű fertőzések kimutatására, szerzett immunhiányos betegségek megállapítására, ismeretlen lázas betegségben szenvedő felnőttek vizsgálatára, illetve nem utolsó sorban limfómában (Hodgkin és non-Hodgkin limfomák) szenvedő betegek vizsgálatára használják. A ^{67}Ga izotóp dúsulásának mechanizmusa még nem ismert pontosan, valószínűleg a gyulladásszerű részben jelenlévő makrofágok és granulociták által kiválasztott laktoferrin tudja megkötni, valamint Fe^{3+} szerkezeti analógnaként a transferrin receptorokon keresztül akkumulálódhat. A baktériumok által termelt sziderofór is hozzájárul a kötéshez. A beadást követően az izotóp 70%-ban plazmafehérjékhez kötődik, 30%-ban pedig a transferrinhez és a haptoglobinhoz.

A bifunkciós ligandumok tartalmaznak egy fémkötő helyet (kelátképzőt) és egy vektort (peptidet, antitestet stb.), ami a biospecifitást biztosítja és egy horgony csoporton át köthető a kelátképzőhöz.

A radiofarmakológiában a ^{68}Ga komplexálására alkalmazott kelátképzőnek több szempontnak is meg kell felelnie: termodinamikai stabilitás, kinetikai inertség, szelektivitás a Ga^{3+} -ionra, gyors és hatékony ligandumszintézis és komplexképződés. A Ga^{3+} és Fe^{3+} hasonlóságából kifolyólag az előbbi is képes a transferrinhez kötődni, ezért számolni kell a szervezetben lejátszódható ligandumcsere reakcióra a Ga(III)-komplex és a

transzferrin között. A transzferrin egy 80000 Da moláris tömegű plazmafehérje, amely két Fe^{3+} kötő résszel rendelkezik⁶⁷, és nagy az affinitása a Ga(III)-hoz is⁶⁸⁻⁷⁰. A vasionok karboxilát tartalmú anionokkal (pl. CO_3^- , oxalát, malonát vagy nitriloacetát) asszociálva kötődnek⁶⁷, mint ahogyan a galliumion is.^{3,18,30} Az átlagos vérérum bikarbonát koncentráció mellett a $\log\beta_1 = 20.3$ és $\log\beta_2 = 39.6$ a Ga(III)-ra és $\log\beta_1 = 22.8$ és $\log\beta_2 = 44.3$ a Fe(III)-ra.⁶⁸

A többfajú, makrociklusos poliamino-polikarboxilát ligandumok jelzése lassú folyamat, amely alatt végbemehet a Ga(III) gyors hidrolízise. A gallium-trihidroxid képződésének kivédésére a jelzés során gyenge komplexképző ligandumokat alkalmaznak, mint például a citrát, acetát vagy oxalát.⁷¹

A bifunkciós molekulában horgonycsoportnak általában karboxilát csoportot vagy aktivált észter csoportot, izotiocianátokat, maleimideket alkalmaznak.⁷² A konjugáltatást a hagyományos réz(I) katalizált azid-alkin Huisgen 1,3-dipoláris cikloaddíciós „click” kémiával (1,2,3-triazol gyűrű kialakítása) vagy az újabb rézmentes reakciókkal, mint az azid-alkin cikloaddíció és a Diels-Alder click reakciókkal végzik.⁷³ A legtöbb biomolekula a szervezetben a szomatosztatin receptorhoz (SSTR) kötődik. Az SSTR jelen van az egészséges szervezetben is, de felhalmozódik a különböző rákos sejtekben is főleg a neuroendokrin tumorokban például emlő- és prosztaták, rosszindulatú limfómák esetén. A legfontosabb SSTR-peptid konjugátumokban az oktreotid vagy annak származéka található.

Az utóbbi években különböző szerkezetű kelátképzőket javasoltak *in vivo* használatra. A ⁶⁸Ga és ⁶⁷Ga izotópok komplexálására a hard donoratomekat tartalmazó polidentát ligandumok a legmegfelelőbbek. A legkiemelkedőbbek a nyíltláncú ligandumok közül HBED, dedpa és a desferoxamin, míg a

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

makrociklusosok közül a DOTA és NOTA ligandumok, illetve ezek származékai.

A desferoxamin a Ga^{3+} -ionnal még stabilabb komplexet képez, mint a Fe^{3+} -ionnal, a ligandum képes a galliumot a transferrinből eltávolítani.⁷⁴ A H_2dedpa ideális a ^{68}Ga izotóphoz, a jelzés szobahőmérsékleten is kevesebb, mint 10 perc alatt lejátszódik, illetve szérumbeli stabilitása is kiváló.⁷⁵ A CP256 és annak bifunkciós változata az YM103 nyíltláncú tripodális trisz(hidroxipiridinon) ligandumok, amelyek 5 percen belül komplexet képeznek a ^{68}Ga izotóppal, valamint az állatkísérletek alapján a komplex *in vivo* tulajdonságai is kitűnőek.⁷⁶

Irodalmi adatok alapján a makrociklusos ligandumokkal alkotott Ga(III)-komplexek többnyire termodinamikailag stabilabbak és kinetikailag inertebbek⁷⁷⁻⁷⁹, mint a nyíltláncú ligandumokkal alkotott komplexek.⁸⁰ A nyíltláncú ligandumokkal alkotott komplexek viszont sokkal gyorsabban képződnek, akár szobahőmérsékleten is (15 perc), mint a makrociklusos komplexek, amelyek esetenként 60-95°C hőmérsékleten is csak 30-90 perc alatt alakulnak ki. Ennek főleg a hőmérsékletérzékeny molekulák vagy a rövid felezési idejű izotópok esetén van jelentősége. A ^{68}Ga -jelölt szomatosztatin analóggal konjugált DOTA származékokat intenzíven tanulmányozták, köszönhetően a neuroendokrin tumor képalkotásban elért jó eredményeknek. Ellenben a NOTA ligandum üregmérete sokkal ideálisabb a Ga^{3+} -ion méretéhez ($\log K_{\text{GaNOTA}}=31,0$)⁷⁸, mint a DOTA üregmérete ($\log K_{\text{GaDOTA}}=26,05$)⁷⁷, ezért intenzív kutatások folynak NOTA származékok szintetizálására és komplexeik jellemzésére.⁸¹ Napjainkban a ^{68}Ga izotóppal jelzett ^{68}Ga -DOTATOC, ^{68}Ga -DOTATATE, ^{68}Ga -DOTANOC bifunkciós komplexeket már a klinikumban alkalmazzák a neuroendokrin tumorok feltérképezéséhez, de NOTA alapú bifunkciós ligandumokat is vizsgáltak már az irodalomban. A ^{68}Ga -NOTA-RGD-vel, illetve a NOTA foszfonát

származékaival ([NOPO]-RGDFK) és [^{68}Ga]-NOPO-NOC) is folynak kutatások.

Notni és munkatársai néhány évvel ezelőtt új NOTA alapú ligandumokat fejlesztettek ki, amelyek oldalláncban foszfinát csoportot tartalmaznak.⁸²⁻⁸⁵ A triazaciklononán-trifoszfinát (TRAP) ligandum számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik, ugyanis a vizsgálatok alapján gyorsan és szelektíven köti a ^{68}Ga -ot, a képződő komplex nagy stabilitással bír, valamint a ligandum könnyen konjugálható biomolekulával. A TRAP-peptid konjugátum ^{68}Ga izotóppal történő jelzése kiválóan reprodukálható és specifikus aktivitása 10-20-szor nagyobb, mint a NOTA- és DOTA-peptideké.⁸⁴ Napjainkra már számos TRAP származékot állítottak elő és vizsgáltak meg. A TRAP-Pr ligandum ^{68}Ga jelzése szobahőmérsékleten, nagy pH tartományban (akár $\text{pH}<1$) végbemegy, ami azt jelenti, hogy a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátorról történő eluálás után a tiszta eluens közvetlen használható jelzésre.⁸² A ^{68}Ga -PCTA komplex gyors képződésének és kiváló *in vivo* stabilitásának köszönhetően, szintén remek lehetőséget nyújthat további származékok fejlesztéséhez.⁸⁷

Csoportunkban korábban vizsgálták a hétfogú szemi-makrociklusos AAZTA ligandumot, illetve annak Ga^{3+} -ionnal alkotott komplexe termodinamikai stabilitását és kinetikai inertségét.⁸⁸ Az AAZTA ligandumot nem lehet besorolni sem a nyíltláncú (pl. DTPA), sem a makrociklusos (pl. DOTA) ligandumok közé, mivel rendelkezik mindkettő előnyös tulajdonságaival, ugyanis egy viszonylag rugalmas, egyben rendkívül előszervezett koordinációs ürege van.⁸⁹ A ligandum könnyen előállítható és megfelelően nagy stabilitású komplexet képez több fémionnal is. A $\text{Ga}(\text{AAZTA})^-$ komplex kinetikai inertsége kisebb, mint a $\text{Ga}(\text{NOTA})$ vagy $\text{Ga}(\text{DOTA})$ származékoké, de a felezési ideje még így is 20-szor nagyobb ($t_{1/2}=21$ h), mint a ^{68}Ga izotóp bomlási ideje.⁸⁸ E ligandumnak már több

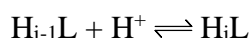
Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

származékát előállították, amelyeknél egy karboxilátcsoportot távolítottak el az exociklusos-N atomról, így kapták a DATA vegyületesaládot, amely tagjai a ^{68}Ga izotóppal képzett komplexei szintén előnyös radiofarmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek.⁹⁰ Az AAZTA származékok ^{68}Ga izotóppal alkotott komplexeinek vizsgálata viszonylag új terület, ezért a témában még kevés számú publikáció született.

III. Alkalmazott módszerek és kísérleti körülmények

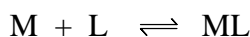
III.1. A CyAAZTA ligandum fémkomplexeinek egyensúlyi vizsgálata

Az amino-polikarboxilát ligandumokkal képződő fémkomplexek egyensúlyi sajátságainak tanulmányozására az egyik leghatékonyabb a pH-potenciometriás titrálás, mivel a komplexek képződése során a fémion és a különböző protonáltsági fokú ligandum kölcsönhatása lényegesen befolyásolja az oldat H^+ -ion koncentrációja. A fémkomplexek stabilitási állandóinak kiszámításához ismernünk kell a ligandum protonálódási állandóit, amelyeket az alábbi egyenlettel és egyensúlyi állandóval definiálunk:

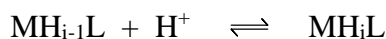


$$K_i^H = \frac{[H_iL]}{[H_{i-1}L][H^+]} \quad i=1,2,\dots \quad III.3.1$$

A szögletes zárójel a részecskék koncentrációját jelöli. A képződő fémkomplexek stabilitási és protonálódási állandóit az alábbi egyenletekkel definiáljuk:



$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad III.3.2$$



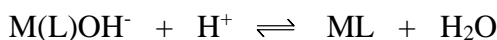
$$K_{MH_iL} = \frac{[MH_iL]}{[MH_{i-1}L][H^+]} \quad i=1,2,\dots \quad III.3.3$$

A nagyobb pH értékeknél bekövetkezhet a fémionhoz közvetlenül koordinált vízmolekula deprotonálódása vagy a gyengén koordinált donoratom OH^- -ionnal való szubsztitúciója. A képződő vegyes hidroxokomplexek stabilitását és protonálódását az alábbiak szerint definiáljuk:



Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

$$\beta_{MLH_{-1}} = \frac{[ML(OH)^{-}]}{[M][L][OH^{-}]}$$



$$K_{MLH_{-1}} = \frac{[ML]}{[M(L)OH^{-}][H^{+}]} \quad III.3.5$$

Közvetlen pH-potenciometriás titrálással csak a viszonylag gyorsan kialakuló egyensúlyi folyamatok tanulmányozhatók. Azonban számos fémkomplex képződése nagyon lassú és így közvetlen követésük nehézkes. Ezekben az esetekben a titrálási pontoknak megfelelő összetételű, 1-3 cm³ térfogatú különmintákat készítünk és az oldatok pH értékeit az egyensúly beálltát követően mérjük. A nagy stabilitású fémkomplexek képződése akár 100%-ban is lejátszódhat pH<2 tartományban, ahol a pH üvegelektroddal történő mérése meglehetősen bizonytalan. Sok esetben a fémionok és ligandumok spektrális sajátosságainak köszönhetően lehetőség van a ligandumok protonálódási és komplexképzési folyamatainak spektroszkópiás vizsgálatára.

Az UV-látható spektrofotometriás méréseket a pH>12 tartományban bekövetkező ligandum protonálódási-deprotonálódási, valamint pH<2 esetében lejátszódó komplexképződési folyamatok tanulmányozására alkalmazzuk. Az NMR aktív magok kémiai eltolódás változása alapján ezek a folyamatok NMR-spektroszkópián is követhetőek. Mindkét módszer eredményei alapján számított egyensúlyi állandók hibája lényegesen nagyobb, mint a pH-potenciometriás mérésekből származóké.

III.2. A Ga(CyAAZTA)⁻ és Gd(CyAAZTA)⁻ komplexek fémioncsere reakcióinak kinetikai vizsgálata

A fémkomplexek kinetikai inertsége fémioncsere reakciókon keresztül közvetlenül tanulmányozható. A fémioncsere reakciókat állandó pH-ra pufferolt oldatban, állandó ionerősség mellett, pszeudo-elsőrendű feltételek

megteremtése érdekében a kicserélő fémion vagy a fémkomplex nagy feleslegét alkalmazva vizsgálhatjuk. A Ga(III)- és Gd(III)-komplexek Cu²⁺-ionnal lejátszódó fémioncsere reakciói spektrofotometriásan tanulmányozhatóak a képződő Cu(II)-komplexek eltérő fényelnyelésének köszönhetően. A Gd(III)-komplexek diamágneses fémionokkal (Zn²⁺- és Ln³⁺-ionok) történő cserereakciója ¹H-NMR relaxometriás módszerrel követhető, mivel az oldószer vízprotonok relaxációs sebessége lényegesen eltér szabad és komplexben kötött Gd³⁺-ionok jelenlétében.

A Ga(III)- és Gd(III)-komplexek Cu²⁺-ionnal lejátszódó cserereakcióinak sebessége, a kicserélő fémion nagy feleslegének alkalmazásakor az alábbi sebességi egyenlettel adható meg:

$$-\frac{d[\text{ML}]_t}{dt} = k_d [\text{ML}]_t \quad (\text{M}=\text{Ga}^{3+} \text{ és } \text{Gd}^{3+}) \quad \text{III.3.6}$$

ahol k_d a pszeudo-elsőrendű sebességi állandó, $[\text{ML}]_t$ az ML (M=Ga³⁺ vagy Gd³⁺) részecskék t időpillanatbeli teljes koncentrációját jelöli. A k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandók számítása a III.3.7 egyenlettel történik az adott kísérleti módszerre jellemző adatok (abszorbancia és $1/T_1$ relaxációs sebesség mérése spektrofotometriás és ¹H-NMR relaxometriás vizsgálatokkal) különböző t időpillanatokban történő meghatározásával.

$$I_t = (I_0 - I_p)e^{-k_d t} + I_p \quad \text{III.3.7}$$

ahol I_t , I_0 és I_p a t időpillanatban, a reakció kezdetén és egyensúlyban meghatározott adatok értékét jelöli.

A fémkomplexek fiziológiáshoz közeli feltételek mellett végbemenő fémioncsere reakciói során lejátszódhat a felszabaduló és a kicserélő fémion hidrolízise, valamint a jelenlévő anionokkal rosszul oldódó vegyületek leválása. A csapadék leválás elkerülése érdekében segédligandum alkalmazására van szükség, amelynek kiválasztásakor alapvető elvárás a

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

vizsgált rendszer egyszerűsége (egyensúlyban lehetőleg két részecske legyen jelen), jól definiált összetétele és egyensúlyi sajátosságai, valamint a kicserélt és a kicserélő fémion segédligandummal képződő komplexeinek gyors képződési és disszociációs folyamatai. A felsorolt kritériumok figyelembe vételével a Ga(III)- és Gd(III)-komplexek Cu^{2+} -ionnal lejátszódó cserereakciói citrát, mint segédligandum alkalmazásával tanulmányozható fiziológiáshoz közeli feltételek mellett.⁵³ A vizsgálatok során a pszeudo-elsőrendű feltételek a Ga(III)- vagy Gd(III)-komplexek nagy feleslegének jelenlétével teremthetők meg. Az említett körülmények mellett a k_d pszeudo-elsőrendű állandót a III.2.8 egyenlettel számíthatjuk a reakcióra jellemző abszorbancia-idő adatpárokból.

$$k_d = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon_{\text{CuL}} - \epsilon_{\text{Cu(Cit)H}_{-1}}} \times \frac{1}{[\text{ML}]_t} \quad \text{M}=\text{Ga}^{3+} \text{ és } \text{Gd}^{3+} \quad \text{III.3.8}$$

ahol ΔAbs a Δt idő alatt bekövetkező abszorbancia változás, ϵ_{CuL} és $\epsilon_{\text{Cu(Cit)H}_{-1}}$ a vizsgált rendszerben képződő CuL és jelen lévő Cu(Cit)H₋₁ részecskék moláris abszorpciós koefficiense.

III.3. A Ga(CyAAZTA)-komplex ligandumcsere reakcióinak kinetikai vizsgálata

A Ga^{3+} - és Fe^{3+} -ionok nagymértékű hasonlósága miatt a Ga(III)-komplexek ligandumcsere reakcióba léphetnek humán szérum transferrinnel (sTf) *in vivo* körülmények között.^{68,114} A ligandumcsere reakciók a képződött Ga(sTf) komplex abszorpciós sávján spektrofotometriásan HCO_3^- , mint „szinergikus” ligandum jelenlétében a Ga(III)-komplex nagy feleslegét alkalmazva pszeudo-elsőrendű feltételek mellett követhetjük. A k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat az alábbi III.2.9 egyenlettel számíthatjuk a reakció kezdeti szakaszára (konverzió < 30%) jellemző abszorbancia-idő adatpárokból.:

$$k_d = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon_{Ga(sTf)}} \times \frac{1}{[GaL]_t} \quad III.3.9$$

ahol $\varepsilon_{Ga(sTf)}$ a képződő Ga(sTf) komplex moláris abszorpciós koefficiense.

III.4. A Gd(CyAAZTA)⁻ komplex relaxációs sajátosságainak vizsgálata

A Gd(III)-komplexek oldószer vízprotonok relaxációs sebesség növelő hatását befolyásoló fizikai-kémiai paramétereket leggyakrabban ¹H-NMR relaxometriás és ¹⁷O-NMR spektroszkópiás módszerekkel határozzák meg. Gd(III)-komplex jelenlétében az oldószer vízprotonok változtatott térerőn (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion, NMRD) és hőmérsékleten (VT) mért T_1 értékei alapján számolhatók a paramágneses komplex rotációját és elektron relaxációját jellemző kinetikai és aktiválási paraméterek, valamint a belső- és külső szférás folyamatok relaxivitáshoz való hozzájárulásai. A Gd(III)-komplexek belső szférás relaxációs sebességet növelő hatása ¹⁷OH₂ jelenlétében ¹⁷O-NMR spektroszkópiásan közvetlenül tanulmányozható, mivel a Gd(III)-komplexben a ¹⁷OH₂ közvetlenül koordinálódhat a paramágneses fémionhoz, ami hatással van a ¹⁷O mag relaxációs idejére és kémiai eltolódására. A Gd(III)-komplexet tartalmazó oldatokban különböző hőmérsékleten mért ¹⁷O longitudinális és transzverzális relaxációs sebességekből ($1/T_1$, $1/T_2$) és a ¹⁷O jelek eltolódásaiból ($\Delta\omega$) számíthatóak a belső szférában koordinált vízmolekula cseréjét és a Gd(III)-komplex elektron relaxációját jellemző kinetikai és aktiválási paraméterek.

III.5. A CyAAZTA fémkomplexeinek szerkezeti vizsgálata

A protonálódási egyensúlyban és a koordinációban résztvevő csoportokra, valamint a komplexek oldat fázisú szerkezetére UV-látható spektrofotometriás és multinukleáris NMR spektroszkópiás vizsgálatok eredményei alapján következtettünk. A Gd(III)-komplexek relaxációs

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

sajátosságainak vizsgálata során nyert adatokból a koordinált donoratomok számára is tudunk következtetni.

III.6. A kontrasztanyagok és a csont felülete között kialakuló kölcsönhatások vizsgálata

A Gd^{3+} -alapú MRI kontrasztanyag csontok felületén való megkötődését az ujjlenyomat tartomány rezgési sávjainak változása alapján infravörös spektroszkópiával követhetjük. A Fourier transzformációs infravörös (FT-IR) mikrospektroszkópia érzékeny és sokoldalú módszer a biomedikális szövetek biokémiai összetételére vonatkozó információk meghatározásához in situ jelzéstől és jelölőktől mentesen.⁹¹ Az FT-IR mikrospektroszkópia a vizsgált szövet teljes kémiai összetételét értékeli, de a funkciós csoportokra és a molekuláris struktúrákra vagy szimmetriákra (például a fehérjék α -hélix/ β -redő változásra⁹²) alapul, ami korlátozhatja specificitását. Mindazonáltal kémiai térképek generálhatók a kémiai mátrixban jelen lévő molekulák egyedülálló vibrációs spektrális aláírásán (ujjlenyomatokon), vagy általánosan a heterogén minták általános kémiai profilbeli különbségein alapulva. Az FT-IR mikrospektroszkópiát alkalmazhatják egy betegség felismerésére és/vagy a betegség progressziójának megfigyelésére, mivel a kóros anomáliák gyakran társulnak specifikus változásokkal a szövetek biokémiai összetételében.⁹³ Számos tényező azonban bonyolultá teszi az FT-IR mikroszkópos vizsgálatot az orvosbiológiai kutatásokban. Az egyik tényező a technika vízzel szembeni érzékenysége, ezért vagy száraz mintára van szükség, vagy nagyon óvatos minta-előkészítésre (vékony szakaszok, a víz sávjainak eltolása annak D_2O -val történő helyettesítésével, amellyel kiküszöbölhető a vízszáv átfedése a fehérjesávokkal) és/vagy kísérleti beállításra (víz vékony rétegei a transzmissziós sejtekben vagy gyengített teljes reflexiós (ATR) módszert alkalmazva). A minták természetéhez és a módszerhez közvetlenül kapcsolódó további probléma a specificusság

hiánya. Miközben a vegyületek főbb osztályai viszonylag könnyen megkülönböztethetők (pl. lipidek, fehérjék stb.), az ezekhez az osztályokhoz tartozó specifikus vegyületekhez (pl. konkrét fehérje az összes fehérjéhez képest) kötődő spektrális változások gyakran további technikákat igényelnek.

Végül a biomedikai mintákból (szövetek) származó spektrális adatok összetettsége, valamint a biodiverzitás miatt bekövetkező változások miatt kihívást jelent az adatkezelés és az értékelés is. A probléma kezelésének általános megközelítése az, hogy vagy csak előre meghatározott (célzott) kémiai változásokat (teljes kémiai profilalkotás nélkül) követünk, vagy többváltozós módszereket használunk (pl. diszkriminancia analízis technikák, mint az **Orthogonal Projections of Latent Structures** - diszkriminancia analízis, OPLS-DA⁹⁴ vagy görbe-felbontási technikák, mint a többváltozós görbe felbontása - váltakozó legkisebb négyzetek módszere, MCR-ALS.⁹⁵ A többváltozós módszerek előnye, hogy teljes spektrális profilokat tartalmaz az analízis, vagyis minden kémiai vegyületet egyszerre figyelhetünk meg, nemcsak a célzott komponenseket. Ez kizárja a minta molekuláris összetételére vagy a feltételezett változásokra vonatkozó előzetes ismeretek szükségességét, ezáltal elkerülve az előnyben részesített vegyületek monitorozásában rejlő előítéletet és információvesztést.

Az FT-IR mikrospektroszkópia alapvető előnyei közé tartozik a nagy sebesség, alacsony költség, nagy érzékenység, könnyű testreszabás, térben elkülönített (szövet vagy sejtspecifikus) kémiai információ *in situ*, jelzés vagy jelölők nélkül. Jelen munkánkban például olyan rendszert építettünk, amely utánozza a csontszövetekkel kapcsolatban lévő, véráramban keringő Gd³⁺-alapú kontrasztanyagok viselkedését. A folyamatokat "élő" módon, folyamatosan követhetjük térben és időben. A módszerrel betekintést kaphatunk a változások természetéről, valamint a folyamatok sebességéről, azaz *in situ* kinetikai információ gyűjthetünk vele. Bár az alkalmazott

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

beállításokat modellként kell tekinteni, legjobb tudomásunk szerint ez a legfrissebb kísérleti beállítás, amely tükrözi a vizsgált kontrasztanyagok sorsát meghatározó *in vivo* folyamatokat adott körülmények között.

IV. Eredmények

IV.1. A CyAAZTA ligandum komplexképző sajátosságai

A közelmúltban előállított hétfogú ligandum a 6-amino-6-metilperhidro-1,4-diazepin tetraecetsav szemi-makrociklusos ligandumnak tekinthető, mivel ötvözi a nyíltláncú ligandumokra jellemző gyors komplexképzési hajlamot a makrociklusos ligandumok fémkomplexeinek sajátos kinetikai inertségével.¹³⁰ Az AAZTA fémkomplexeinek egyedi viselkedését a ligandum flexibilitása, valamint a komplexképzéskor kialakuló koordinációs üreg és a fémion méretviszonya szabja meg. A $\text{Ln}(\text{AAZTA})^-$ komplexekben a Ln^{3+} -ionok a 4 karboxilát-O és 3 amino-N donoratomból által határolt koordinációs „*kalitkában*” helyezkednek el, míg a Ln^{3+} -ionok szabad koordinációs helyeit egy $[\text{Sc}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ és $[\text{Lu}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ ⁹⁶, illetve két vízmolekula $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ ³² foglalja el dodekaédres, valamint négyzetes-antiprizmás szerkezetet kialakítva a Ln^{3+} -ionok méretének és koordinációs számának megfelelően. A részletes ¹H- és ¹⁷O-NMR relaxometriás vizsgálatok szerint a $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplexben található két belső szférás vízmolekula gyors cserefolyamatokban vesz részt az oldószer vízmolekulákkal és nem helyettesíthetők bi- vagy tridentát ligandumokkal, mivel azok nem szomszédos pozíciókat foglalnak el a Gd^{3+} -ion környezetében.³² A $\text{Ln}(\text{AAZTA})^-$ komplexek egyensúlyi vizsgálatai alapján a $\log K_{\text{LnL}}$ értékek monoton nőnek a Ln^{3+} -ionok méretének csökkenésével ($\log K_{\text{LnL}}=17,53 - 21,85$) és összemérhetőek a megfelelő $\text{Ln}(\text{DTPA})$ stabilitási állandóival.^{33,97} A $\text{Gd}(\text{AAZTA})^-$ fémioncsere reakciói a makrociklusos $\text{Gd}(\text{DOTA})^-$ származékokhoz hasonlóan csak savkatalizált disszociációval játszódnak le, bár lényegesen gyorsabban, mint a $\text{Gd}(\text{DOTA})^-$ esetében a $\text{Gd}(\text{AAZTA})^-$ számottevően flexibilisebb szerkezete miatt.

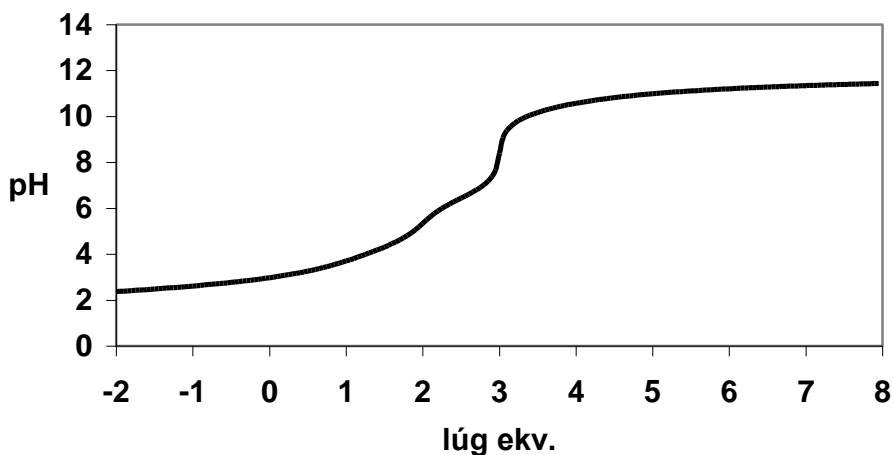
Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

Az AAZTA ligandum stabilis komplexet képez a Ga^{3+} -ionnal is. Csoportunkban részletesen tanulmányozták a $\text{Ga}(\text{AAZTA})^-$ komplex egyensúlyi, kinetikai és szerkezeti sajátosságait.⁸⁷ Megállapították, hogy a $\text{Ga}(\text{AAZTA})^-$ képződése sokkal gyorsabb, mint a klinikai gyakorlatban alkalmazott $^{68}\text{Ga}(\text{NOTA})$ és $^{68}\text{Ga}(\text{DOTA})$ komplexeké.⁹⁸ A Ga^{3+} - AAZTA rendszerben $\text{pH} > 3,5$ esetén képződik egy szokatlanul stabilis $[\text{Ga}(\text{AAZTA})\text{OH}]^-$ komplex, amelyben a 3 amino-N és 2 exociklusos karboxilát-O, valamint egy OH^- -ion koordinálódik a Ga^{3+} -ionhoz torzul oktaéderes geometriát kialakítva.⁸⁷ A $[\text{Ga}(\text{AAZTA})\text{OH}]^-$ komplex Cu^{2+} -ionnal és transferrinnel lejátszódó cserereakcióinak sebességmeghatározó lépése a $\text{Ga}(\text{III})$ -komplex spontán- és OH^- -katalizált disszociációja, amelyet a szabaddá vált Ga^{3+} -ion és AAZTA ligandum transferrinnel, illetve Cu^{2+} -ionnal végbemenő gyors reakciói követnek. A $[\text{Ga}(\text{AAZTA})\text{OH}]^-$ komplex fiziológiáshoz közeli feltételek mellett ($\text{pH}=7,4$, $0,15$ M NaCl, 25°C) lejátszódó disszociációját jellemző felezési idő ($t_{1/2}=24$ óra) lényegesen kisebb, mint a PET vizsgálatok során alkalmazott $^{68}\text{Ga}(\text{NOTA})$ és $^{68}\text{Ga}(\text{DOTA})$ komplexeké ($\text{Ga}(\text{NOTA})$: $t_{1/2} =$ néhány hét $\text{pH} > 13$,⁹⁹ $\text{Ga}(\text{DOTA})$: $t_{1/2}=6.2$ óra, $\text{pH}=10$)¹⁰⁰

Korábbi kutatások alapján a *transz*-1,2-diamino-ciklohexán csoport beépítése lényegesen növelheti a ligandum vázának merevségét, a képződő komplexek stabilitási állandóját és kinetikai inertségét.¹⁰¹ Az EDTA és DTPA esetében a ligandumok 1,2-diaminoetil vázának ciklohexil csoportra történő cseréjével, a fémkomplexek termodinamikai stabilitása és kinetikai inertsége jelentősen javult.⁵⁵ A $\text{Ln}(\text{AAZTA})^-$ és $[\text{Ga}(\text{AAZTA})\text{OH}]^-$ komplexek termodinamikai stabilitásának és kinetikai inertségének növelése érdekében, de előnyös sajátágaik megtartására törekedve előállítottuk a *transz*-1,2-diamino-ciklohexil-AAZTA (CyAAZTA) ligandumot és tanulmányoztuk az egyensúlyi, a $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ és $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$

kinetikai, a $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ relaxációs és a képződő fémkomplexek szerkezeti sajátosságait. A CyAAZTA ligandum komplexképző sajátosságainak megismerése nem csak NMR-tomográfias vagy PET kontrasztanyagkénti felhasználása szempontjából lehet érdekes, hanem a merevített szerkezetű ligandumok fémionokkal kialakított kölcsönhatásaival kapcsolatos koordinációs kémiai ismereteinket is bővítheti.

A CyAAZTA ligandum egyensúlyi sajátosságainak megismeréséhez meghatároztuk a ligandum protonálódási állandóit, több fémkomplexének stabilitási és protonálódási állandóját, amelyeket közvetlen pH-potenciometriás titrálások eredményeiből számítottunk. A ligandum titrálási görbéje a IV.1.1. ábrán látható. A számított protonálódási állandókat a IV.1.1. táblázatban foglaltuk össze, amelyeket összehasonlítottunk az AAZTA, CDTA és az EDTA megfelelő protonálódási állandóival.



IV.1.1 ábra A CyAAZTA ligandum titrálási görbéje. ($[\text{L}]=2 \times 10^{-3}$ M; $[\text{HCl}]=4 \times 10^{-3}$ M, 0,1 M KCl, 25 °C)

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

IV.1.1 táblázat. A CyAAZTA, AAZTA, CDTA és EDTA ligandumok protonálódási állandói (25 °C)

| | H₄CyAAZTA | H₄AAZTA^[a] | H₄CDTA^[b] | H₄EDTA^[b] |
|--------------------------------------|-----------------------------|---|--|--|
| I | 0,1 M KCl | | | |
| logK₁^H | 10,48 (2) | 11,23 | 11,70 | 10,14 |
| logK₂^H | 6,43 (2) | 6,52 | 6,12 | 6,02 |
| logK₃^H | 4,23 (2) | 3,78 | 3,52 | 2,53 |
| logK₄^H | 2,76 (2) | 2,24 | 2,43 | 1,99 |
| logK₅^H | 1,68 (2) | 1,56 | – | – |
| ΣlogK_i^H | 25,58 | 25,33 | 23,77 | 20,69 |

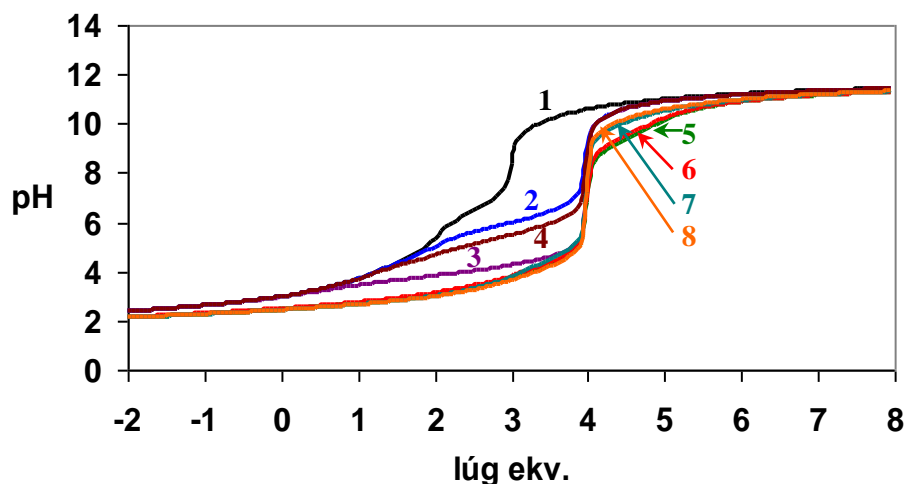
a.) Ref. 87,33; b.) Ref. 55

A CyAAZTA és AAZTA protonálódási állandóinak összehasonlítása alapján megállapítható, hogy a CyAAZTA $\log K_1$ értéke kisebb, míg a $\log K_3$ értéke közel egy fél nagyságrenddel nagyobb, mint az AAZTA megfelelő protonálódási állandói. Az AAZTA ligandum protonálódási sorrendjét korábban csoportunkban tanulmányozták ¹H-NMR spektroszkópiás vizsgálatokkal.³³ A két ligandum szerkezeti hasonlósága alapján feltételezhető, hogy protonálódási sémájuk is megegyezik. Az AAZTA első protonálódási folyamata az amino-N donoratom részvétel játszódik le (mindhárom amino-N donoratom részben protonálódik). A CyAAZTA ligandum kisebb $\log K_1$ értéke a ciklohexil csoport jelenlétével magyarázható, ami torzíthatja a héttagú gyűrűt, ezáltal csökkentve az exociklikus- és a gyűrű N donoratomok közötti kooperativitást, így a H-kötésben résztvevő donoratomok számát.⁸⁷ A CyAAZTA és AAZTA második protonálódása a gyűrű nitrogéneken történik, amikor az első proton eltolódik az exociklikus-N donoratom irányába a protonok között fellépő elektrosztatikus taszítás következtében. A ligandumokra belépő harmadik proton egy gyűrű karboxilát-O donoratomhoz kapcsolódik. A CyAAZTA lényegesen nagyobb

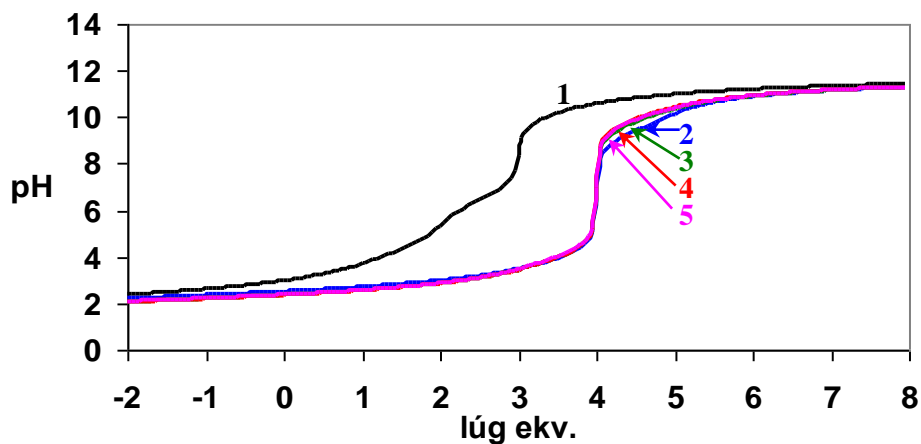
$\log K_3$ értéke a ciklohexil gyűrű elektronküldő tulajdonságának köszönhető, ami növeli a gyűrű karboxilát-O donoratomok bázicitását. A CDTA és EDTA ligandumok $\log K_3$ értékeinek összehasonlításával hasonló jelenséget figyelhetünk meg, amelyet szintén a ciklohexil gyűrű elektronküldő sajátosságaival értelmeztek.¹⁰¹ A CyAAZTA és AAZTA ligandumok negyedik és ötödik protonálódási folyamatai a nem protonált gyűrű N és karboxilát-O donoratomokon játszódik le. A CyAAZTA és AAZTA összbázicitása ($\Sigma \log K_i^H$, 1. táblázat) nagyon hasonló, amely alapján feltételezhető, hogy a megfelelő fémkomplexek stabilitási állandói is közel megegyeznek.

A CyAAZTA ligandum néhány fémiónnal képzett komplexének stabilitási és protonálódási állandóját pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg (IV.1.2 táblázat). Az CyAAZTA ligandum alkáliföldfém(II)-, átmenetifém(II)- és lantanoida(III)-ionokkal kialakuló 1:1 fém-ligandum arányú komplexeinek képződése gyors, így lehetséges volt a folyamatok közvetlen követése pH-potenciometriás titrálás alkalmazásával. Az M: CyAAZTA 1:1 fém-ligandum arányú rendszerek pH-potenciometriás titrálási görbéi a IV.1.2 és IV.1.3 ábrákon láthatóak.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátságainak vizsgálata



IV.1.2 ábra A CyAAZTA ligandum titrálási görbéje M^{2+} távollétében (1) és ekvivalens M^{2+} jelenlétében M^{2+} : Mg^{2+} (2), Ca^{2+} (3), Sr^{2+} (4), Zn^{2+} (5), Cu^{2+} (6), Pb^{2+} (7) és Cd^{2+} (8). ($[Mg^{2+}] = [Ca^{2+}] = [Sr^{2+}] = [Zn^{2+}] = [Cu^{2+}] = [Pb^{2+}] = [Cd^{2+}] = [L] = 2 \times 10^{-3}$ M; $[HCl] = 4 \times 10^{-3}$ M, 0,1 M KCl, 25 °C)



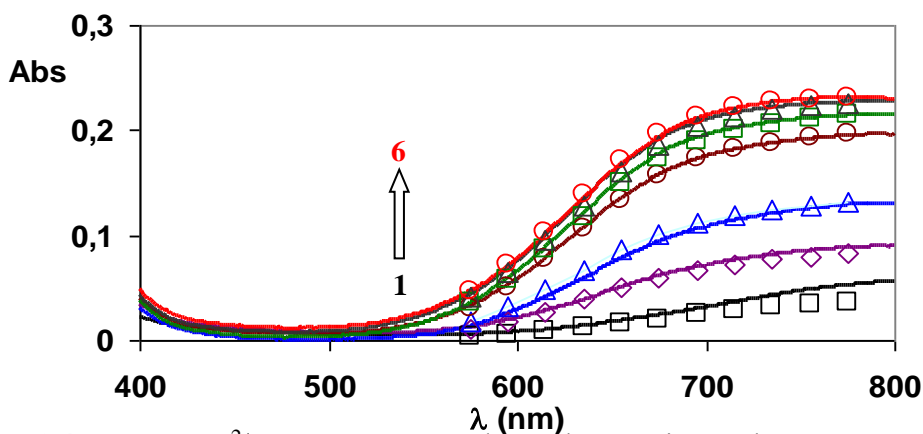
IV.1.3 ábra A CyAAZTA ligandum titrálási görbéje Ln^{3+} távollétében (1) és ekvivalens Ln^{3+} jelenlétében Ln^{3+} : La^{3+} (2), Eu^{3+} (3), Gd^{3+} (4) és Lu^{3+} (5). ($[La^{3+}] = [Eu^{3+}] = [Gd^{3+}] = [Lu^{3+}] = [L] = 2 \times 10^{-3}$ M; $[HCl] = 4 \times 10^{-3}$ M, 0,1 M KCl, 25 °C)

A $Cu(CyAAZTA)^{2-}$ komplex stabilitási állandója nagy, így a komplex képződése $pH < 2,0$ esetében közel 100%-os, ezért a $\log K_{CuL}$ pH-potenciometriás módszerrel történő meghatározása nem lehetséges. A $Cu(CyAAZTA)^{2-}$ komplex stabilitási állandóját látható spektrofotometriás

vizsgálatok eredményeiből számítottuk (IV.1.4 ábra). A vizsgálatok során a következő egyensúlyi folyamatot követtük a $\text{pH} \approx 0,0\text{--}2,0$ tartományban:



A Cu^{2+} –CyAAZTA rendszer abszorpciós spektrumai alapján megállapítható, hogy az abszorbancia értékek növekednek a savkoncentráció csökkenésével a $\lambda=550\text{--}800$ nm hullámhossz tartományban. Mivel az azonos koncentrációjú Cu^{2+} -ion abszorbiációja kicsi $\lambda=550\text{--}800$ tartományban ($\varepsilon_{\text{Cu}^{2+}}=10,38 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, $\lambda=755 \text{ nm}$), így az abszorbancia növekedés a $\text{Cu}(\text{H}_3\text{CyAAZTA})^+$ és a $\text{Cu}(\text{H}_2\text{CyAAZTA})$ komplexek képződésével magyarázható. A $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$ komplex stabilitási állandóját a IV.1.4. ábrán feltüntetett abszorpciós spektrumok 11 hullámhossznál mért abszorbancia értékeiből számítottuk. A számolások során felhasználtuk a $\text{Cu}^{2+}_{\text{aq}}$, $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$, $\text{Cu}(\text{HCyAAZTA})^-$, $\text{Cu}(\text{H}_2\text{CyAAZTA})$ és $\text{Cu}(\text{H}_3\text{CyAAZTA})^+$ komplexek adott hullámhosszra vonatkozó moláris abszorbanciáit, amelyeket 2, 4 és 6 mM-os CuCl_2 illetve Cu^{2+} –CyAAZTA=1:1 arányú rendszerek $\text{pH}=1,8\text{--}6,0$ tartományban felvett spektrumaiból számítottunk (IV.1.6. ábra).



IV.1.4. ábra A Cu^{2+} - CyAAZTA rendszer abszorpciós spektrumai (vonalak) és számított abszorbancia értékei (nyitott szimbólumok) ($[\text{H}^+]=0,01 - 1,0$ M tartományban ($[\text{H}^+] = 1,0$ M (1), 0,50 M (2), 0,30 M (3), 0,10 M (4), 0,050 M (5), 0,025 M (6) and 0,010 M (7); $[\text{Cu}^{2+}] = [\text{CyAAZTA}] = 2,0$ mM, $[\text{H}^+]+[\text{K}^+]=0,1$ M az utolsó 4 mintában, 25°C).

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

A CyAAZTA és az analóg AAZTA komplexek stabilitási és protonálódási állandóit a IV.1.2. táblázatban tüntettük fel.

IV.1.2. táblázat fémkomplexek stabilitási és protonálódási állandói

| I | CyAAZTA | | | | AAZTA ^[a] | | | |
|---------------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| | 0,1 M KCl | | | | 0,1 M KCl | | | |
| | logK _{ML} | logK _{MHL} | logK _{MH2L} | logK _{MLH-1} | logK _{ML} | logK _{MHL} | logK _{MH2L} | logK _{MLH-1} |
| Mg²⁺ | 8,19 (1) | 5,58 (6) | – | – | 8,31 | 5,24 | – | – |
| Ca²⁺ | 12,38 (2) | 4,00 (4) | – | – | 12,76 | 3,34 | – | – |
| Sr²⁺ | 9,33 (2) | 5,33 (6) | – | – | 9,88 | 4,80 | – | – |
| Zn²⁺ | 17,09 (2) | 4,17 (1) | 2,83 (1) | 9,43 (4) | 18,01 | 3,87 | 2,36 | 11,79 |
| Cu²⁺ | 20,11 (2) | 4,24 (2) | 3,08 (2) | 9,62 (2) | 22,27 ^[b] | 3,93 ^[b] | 2,68 ^[b] | 10,79 ^[b] |
| Pb²⁺ ^[c] | 16,92 (3) | 4,41 (2) | 2,59 (3) | 10,32 (5) | 19,84 | 3,22 | 2,50 | – |
| Cd²⁺ ^[c] | 17,08 (4) | 4,07 (3) | 2,53 (3) | 10,53 (2) | 17,94 | 3,25 | 2,05 | – |
| La³⁺ | 16,23 (2) | 3,67 (2) | 2,31 (3) | 9,47 (3) | 17,53 | 1,97 | – | – |
| Eu³⁺ | 18,22 (3) | 3,79 (4) | 1,90 (2) | 9,93 (5) | 19,93 | 1,91 | – | – |
| Gd³⁺ | 18,26 (2) | 3,79 (1) | 1,79 (3) | 10,12 (2) | 20,24 | 1,89 | – | – |
| Lu³⁺ | 17,67 (4) | 3,86 (4) | 1,67 (3) | 10,06 (7) | 21,85 | – | – | – |

^[a] Ref. 33; ^[b] Ref. 87, ^[c] 0,1 M KNO₃ ionerősségben

A CyAAZTA különböző fémionokkal alkotott komplexeinek stabilitási állandói rendre kisebbek, mint az analóg AAZTA komplexeké. A Mg(II)-, Ca(II)- és Sr(II)-komplexek logK_{ML} értékei csak alig, míg a Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺- és Ln³⁺-ionokkal alkotott CyAAZTA komplexek stabilitása 1-3 nagyságrenddel kisebb, mint a megfelelő AAZTA komplexeké. Az AAZTA ligandum esetében a héttagú diazepin gyűrű flexibilitása lehetővé teszi a 3 amino-N és 3 vagy 4 karboxilát-O donoratom különböző méretű és koordinációs számú (CN≥7) fémionokhoz való együttes koordinációját.³³ Az AAZTA ligandum rugalmasabb szerkezetére utal a logK_{LnL} értékek monoton növekedése a Ln³⁺-ionok méretének csökkenésével. Ezzel szemben a CyAAZTA ligandumban található ciklohexil csoport lényegesen lecsökkenti

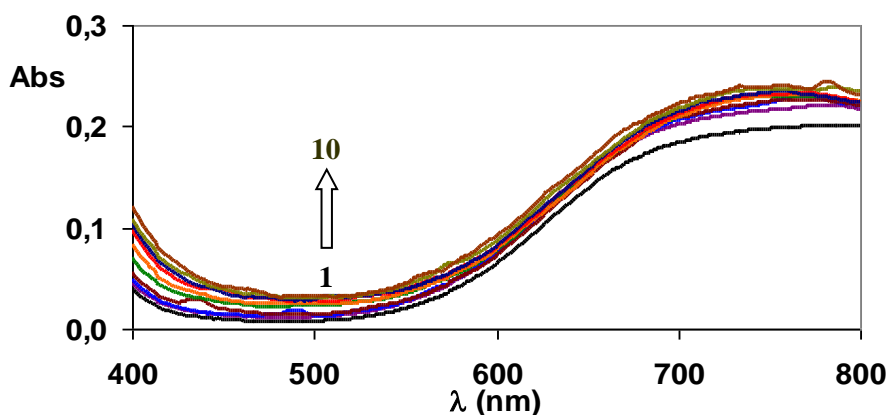
a diazepin gyűrű flexibilitását, ezáltal korlátozva a 3 amino-N és 4 karboxilát-O donoratomok térbeli elhelyezkedését és a fémionok számára optimális koordinációs geometria kialakítását, ami a fémkomplexek $\log K_{ML}$ értékeinek csökkenéséhez vezet. A CyAAZTA ligandum merev szerkezetére utal a $\log K_{LnL}$ értékek lantanida sorozaton belüli változása. A $Ln(CyAAZTA)^-$ stabilitási állandói a sorozat közepéig nőnek, majd csökkennek a Ln^{3+} -ion rendszámának növekedésével. A $\log K_{LnL}$ értékek maximum görbe szerinti változása alapján arra lehet következtetni, hogy a merev szerkezetű CyAAZTA ligandum donoratomjai által kialakított koordinációs üreg mérete a lantanida sor közepén található fémionok (Eu^{3+} és Gd^{3+}) számára kedvező. A $Ln(CyAAZTA)^-$ komplexek szerkezeti sajátosságait a paramágneses $Eu(CyAAZTA)^-$ és $Yb(CyAAZTA)^-$ komplexek 1H -NMR spektroszkópiás vizsgálataival tanulmányoztuk. Az $Eu(CyAAZTA)^-$ és $Yb(CyAAZTA)^-$ komplexek 1H -NMR spektrumai a Függelék 1. ábráján láthatóak.

Az Eu^{3+} - és Yb^{3+} -ionokat, valamint komplexeiket előszeretettel alkalmazzák, mint NMR shift reagenseket enzimek és nukleozidok konformációjának meghatározására, mivel paramágneses sajátosságaiknak köszönhetően megnövelik a közelükben lévő protonok kémiai eltolódását és relaxációs sebességét lecsökkentve az 1H -NMR jelek multiplicitását.^{102,103,104} Az F.1. ábrán feltüntetett 1H -NMR spektrumokban a jelek száma (23 rezonancia) megegyezik a $Eu(CyAAZTA)^-$ és az $Yb(CyAAZTA)^-$ komplexekben található protonok számával (2 metin és 20 metilén proton, valamint 1 metil csoport), amelyek alapján arra következtethetünk, hogy a ciklohexil csoport jelenléte megnöveli a diazepin gyűrű merevségét, lehetőséget adva az acetát és a diazepin, valamint a ciklohexil axiális és ekvatoriális helyzetű metilén és metin protonok megkülönböztetésére. Ezzel szemben az $Eu(AAZTA)^-$ és $Yb(AAZTA)^-$ 1H -NMR spektrumaiban 9 jel található, ami megegyezik az AAZTA ligandum metil és metilén

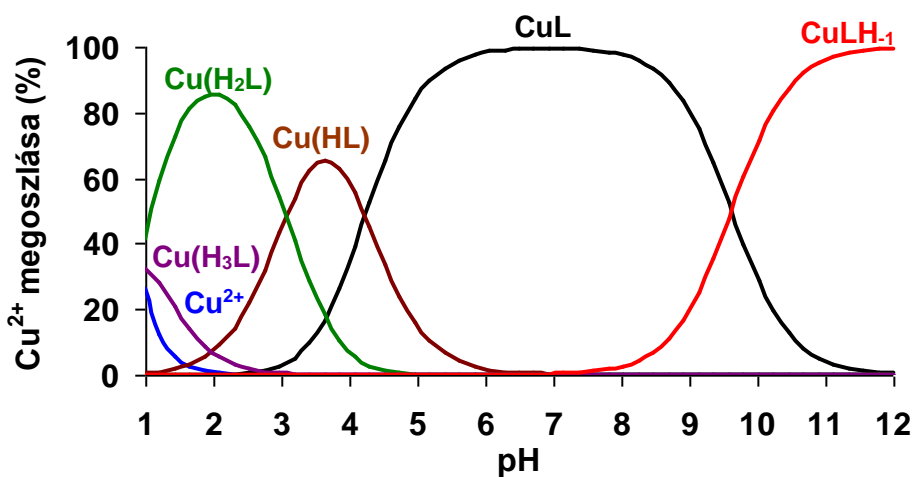
Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

csoportjainak számával utalva az $\text{Ln}(\text{AAZTA})^-$ komplexek NMR időskáláján gyors izomerizációs folyamataira.³²

Az CyAAZTA ligandum alkáliföldfém(II)-ionokkal kialakuló komplexei a megfelelő AAZTA komplexekhez hasonlóan kis pH értékeknél protonálódhatnak MHL összetételű protonált komplexeket kialakítva (IV.1.2 táblázat). A protonálódási állandók értéke alapján feltehetően egy gyengén koordinálódó karboxilát csoport protonálódik. Az átmenetifém(II)- és lantanoida(III)-ionok CyAAZTA ligandummal képződő komplexek pH-potenciometriás vizsgálatait során MH_2L összetételű protonált komplexek képződését tudtuk kimutatni a pH=2 – 3 tartományban (IV.1.2 táblázat). A Zn(II)-, Cu(II)-, Cd(II)-, Pb(II)- és Ln(III)-komplexek második protonálódási folyamatai feltételezhetően egy acetát csoporton játszódnak le. Az CyAAZTA ligandum Zn^{2+} -, Cu^{2+} -, Cd^{2+} -, Pb^{2+} - és Ln^{3+} -ionok jelenlétében kapott pH-potenciometriás titrálási görbéi alapján a pH=8 - 11 tartományban egy extra ligandum ekvivalens lúgfogyasztó folyamat játszódik le a szabad ligandumhoz képest, amely vagy egy gyengén koordinált donoratomban OH^- -ionnal való szubsztitúciójával (Zn(II), Cu(II), Cd(II), Pb(II)), vagy a fémionhoz közvetlenül koordinált vízmolekula deprotonálódásával magyarázható (Ln(III)). A képződő vegyes hidroxo-komplexek protonálódását jellemző egyensúlyi állandókat ($\log K_{\text{MLH}-1}$) a IV.1.2 táblázatban tüntettük fel. A $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$ komplex szerkezeti sajátosságait és a koordinációban résztvevő donoratombokat látható spektrofotometriás vizsgálatokkal tanulmányoztuk. A $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$ komplex pH=1,8 – 6,0 tartományban felvett abszorpciós spektrumait és a Cu^{2+} - CyAAZTA rendszer részecske eloszlási diagramját a IV.1.6 és IV.1.7 ábrákon tüntettük fel.



IV.1.5 ábra Az $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$ komplex abszorpciós spektrumai különböző pH értékeknél. (pH=1,41 (1); 1,92 (2), 2,46 (3), 3,00 (4), 3,48 (5), 3,95 (6), 4,57 (7), 5,02 (8), 5,34 (9) és 6,32 (10), $[\text{Cu}(\text{CyAAZTA})]=2,0 \times 10^{-3}$ M, 0,15 M NaCl, 25°C)



IV.1.7 ábra A Cu^{2+} -CyAAZTA rendszer eloszlási diagramja a pH függvényében. ($[\text{Cu}^{2+}]=[\text{CyAAZTA}]=2,0 \times 10^{-3}$ M, 0,1 M KCl, 25 °C)

A $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$ spektrofotometriás vizsgálatai alapján megállapítható, hogy a $\text{Cu}(\text{H}_3\text{CyAAZTA})^+$ és $\text{Cu}(\text{H}_2\text{AAZTA})$ komplexek deprotonálódásával az abszorpciós spektrum maximuma eltolódik 780 nm-ről 755 nm-re, míg a $\text{Cu}(\text{HCyAAZTA})^-$ deprotonálódása és a $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$ képződése nem befolyásolja az abszorpciós maximum hullámhosszát. A $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{AAZTA})]^+$ és

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

[Cu(H₂AAZTA)] részecskék deprotonálódásával az abszorpciós maximum 775 nm-ről eltolódik 745 nm-re.⁸⁷ A [Cu(H₂AAZTA)(H₂O)] komplex egykristályának röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálata alapján a Cu(II)-ionhoz az egyik gyűrű N, az exociklusos-N, az egyik exociklusos karboxilát-O és egy vízmolekula O donoratom ekvatoriális, míg a másik gyűrű N és az exociklusos karboxilát-O donoratomok axiális pozíciókban koordinálódnak. A [Cu(H₂AAZTA)(H₂O)] komplex két gyűrű karboxilát csoportja protonált és nem vesz részt a fémion koordinációjában.⁸⁷ Figyelembe véve a Cu²⁺ - CyAAZTA rendszer részecske eloszlását (IV.1.7 ábra), valamint a [Cu(H₂CyAAZTA)(H₂O)] és [Cu(H₂AAZTA)(H₂O)] részecskék szerkezeti analógiáját, a [Cu(H₂CyAAZTA)(H₂O)] deprotonálódása során az abszorpciós maximum helyzetében mért 25 nm-es „kék eltolódást” feltételezhetően az ekvatoriális helyzetű vízmolekula egyik deprotonálódott karboxilát csoporttal való szubsztitúciója eredményezi. Ezt a feltételezést támasztja alá a *Prenesti és munkatársai*¹⁰⁵ által kidolgozott szemiempirikus modellel a Cu(II)-komplexek abszorpciós maximuma helyzetére vonatkozó számításaink, amely alapján 23 nm-es „kék eltolódás” tapasztalható egy víz-O donoratom karboxilát-O donoratommal ekvatoriális helyzetben történő helyettesítés során (2 amino-N, 1 karboxilát-O és 1 víz O: λ_{\max} =645 nm; 2 amino-N, 2 karboxilát-O: λ_{\max} =622 nm). A Cu(HCyAAZTA)⁻ deprotonálódása feltételezhetően a koordinációban nem résztvevő és protonált gyűrű karboxilát csoporton játszódik le, ami nem eredményez változást a λ_{\max} értékében. A Cu(AAZTA)⁻ komplex látható spektrofotometriás vizsgálatai alátámasztották, hogy a pH>9 tartományban bekövetkező deprotonálódási folyamatot az axiális helyzetű karboxilát-O donoratom OH⁻-ionnal történő helyettesítése és a [Cu(AAZTA)OH]³⁻ részecske képződése eredményezi. A Cu(AAZTA)²⁻ és a Cu(CyAAZTA)²⁻ komplexek szerkezeti analógiája alapján feltételezhető, hogy a

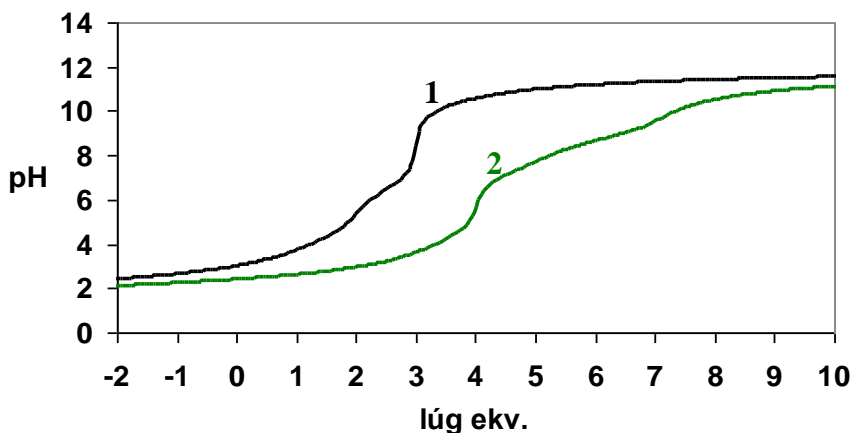
Cu(CyAAZTA)²⁻ komplex pH-potenciometriás vizsgálata során a pH>8.0 tartományban lejátszódó egy ligandum ekvivalens extra lúgfogyást szintén az axiális helyzetű karboxilát-O donoratom OH⁻-ionnal történő szubsztitúciója, a [Cu(CyAAZTA)OH]³⁻ részecske képződése eredményezi.

A Ga³⁺-ion nyíltláncú és makrociklusos amino-polikarboxilát, -polifoszfónát és -polifoszfínát ligandumokkal képzett komplexei általában nagy stabilitási állandóval rendelkeznek ($\log K_{\text{GaL}} > 22$) és képződésük alacsony pH tartományban játszódik le.¹⁰⁶ Ilyen esetekben a stabilitási állandó meghatározására segédligandumot vagy fémiont, mint kompetíciós partnert alkalmaznak a vizsgált komplex képződésének mérhető pH tartományban való követésére.¹⁰⁷ Az amino-polikarboxilát, -polifoszfónát és -polifoszfínát ligandumokkal képzett Ga(III)-komplexek stabilitási állandóinak meghatározására lehetőséget nyújt a OH⁻-ionokkal kialakuló kompetíciós reakció, amelynek eredményeként [Ga(OH)₄]⁻ komplex képződik pH>7,0 esetében.^{106,107} A Ga(III)-komplexek és OH⁻-ion között lejátszódó kompetíciós reakció pH-potenciometriás és multinukleáris NMR spektroszkópiás módszerekkel követhető.



A Ga(CyAAZTA)⁻ komplex stabilitási és protonálódási/deprotonálódási állandóit pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg figyelembe véve a Ga³⁺-ion hidrolízis állandóit (II.1 fejezet). A Ga³⁺ - CyAAZTA 1:1 fém-ligandum arányú rendszer titrálási görbáját a IV.1.8 ábra tüntettük fel.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata



IV.1.7. ábra A CyAAZTA ligandum (1) és Ga^{3+} - CyAAZTA 1:1 fém-ligandum arányú rendszer (2) titrálási görbéi ($[\text{Ga}^{3+}] = [\text{L}] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{HCl}] = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$, 0,1 M KCl, 25 °C)

A pH-potenciometriás titrálási görbe alapján megállapítható, hogy a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex képződése már $\text{pH} < 2,0$ esetében lejátszódik $\text{Ga}(\text{H}_2\text{L})^+$ és $\text{Ga}(\text{HL})$ részecskék kialakulásával. A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex a $\text{pH} = 4,0 - 6,0$ tartományban domináns, míg 6,0 feletti pH értékeknél egy ekvivalens extra lúgfogyasztó folyamat játszódik le, ami egy OH^- -ion Ga^{3+} -ionhoz való koordinációjával és a $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})(\text{OH})]^{2-}$ részecske képződésével értelmezhető. A Ga^{3+} - CyAAZTA 1:1 fém-ligandum arányú rendszer titrálási görbéjén $\text{pH} > 8,0$ tartományban újabb extra lúgfogyasztó folyamatok figyelhetők meg, amelyek már a fémion hidrolíziséhez a $(\text{Ga}(\text{OH})_3)$ és $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ részecskék képződéséhez rendelhetők. A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex pH-potenciometriás titrálás eredményeiből számított stabilitási és protonálódási állandóikat a IV.1.3 táblázatban tüntettem fel.

IV.1.3. táblázat A Ga(CyAAZTA)⁻ stabilitási és protonálódási állandói
(0,1 M KCl, 25°C)

| | Ga(CyAAZTA) | | Ga(AAZTA) ^[a] | |
|------------------------------|-------------|---|--------------------------|---|
| | pH-pot. | ¹ H- és ⁷¹ Ga-NMR | pH-pot. | ¹ H- és ⁷¹ Ga-NMR |
| logK_{GaL} | 21,39 (3) | 21,92 (8) | 22,18 | 22,36 |
| logK_{GaHL} | 4,09 (3) | | 3,05 | |
| logK_{GaH2L} | 2,32 (3) | + logK _{GaLH-1} | 0,82 | + logK _{GaLH-1} |
| logK_{GaLH-1} | 7,31 (3) | | 4,49 | |
| logβ_{GaLH-1} | 14,08 (3) | 14,61 (8) | 17,69 | 17,87 |
| pGa^[b] | 22,0 | | 22,4 | |

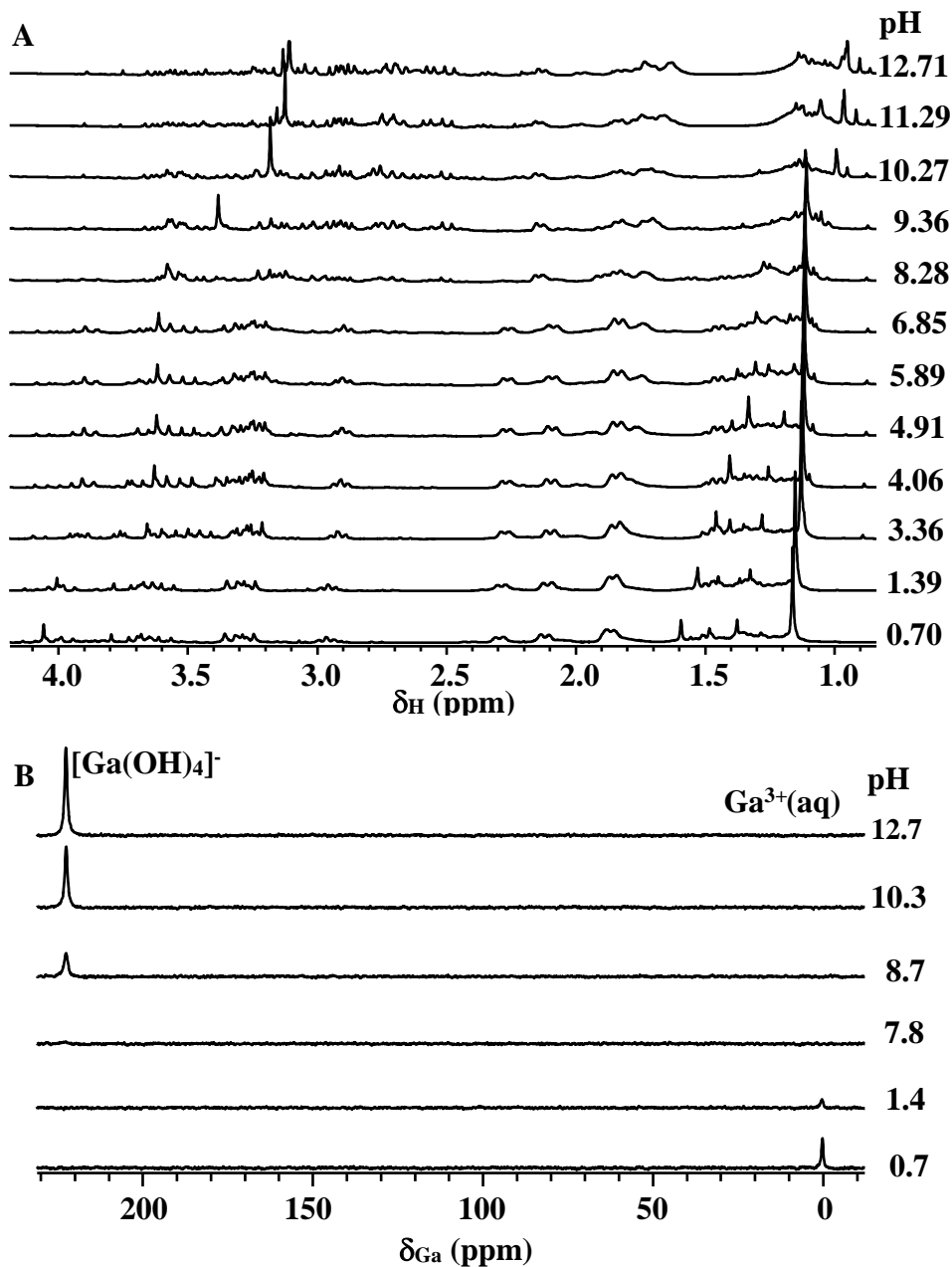
^[a] Ref. 87 ^[b] pGa=-log[Ga³⁺]_{szabad}, [Ga³⁺]_{tot}=1×10⁻⁸ M, [L]_{tot}=1×10⁻⁷ M, pH=7,4.

A Ga(CyAAZTA)⁻ stabilitási állandója közel 1 nagyságrenddel kisebb, mint a Ga(AAZTA)⁻ komplexé. A kisebb stabilitási állandó a CyAAZTA ligandum merevebb szerkezetével értelmezhető, ami nem teszi lehetővé a Ga(III)-ion számára optimális koordinációs geometria kialakítását. A IV.1.3. táblázatban feltüntetett logK_{GaLH-1} értékek alapján a [Ga(CyAAZTA)OH]²⁻ képződése lényegesen nagyobb pH-n játszódik le, mint a Ga(AAZTA)⁻ esetében. A [Ga(CyAAZTA)OH]²⁻ komplex stabilitását jellemző logβ_{GaLH-1} érték 3,5 nagyságrenddel kisebb, mint a [Ga(AAZTA)OH]²⁻ stabilitása, ami egyértelműen utal a [Ga(CyAAZTA)OH]²⁻ eltérő szerkezetére.

IV. 2. A Ga³⁺- CyAAZTA rendszer ¹H- és ⁷¹Ga-NMR spektroszkópiás vizsgálata

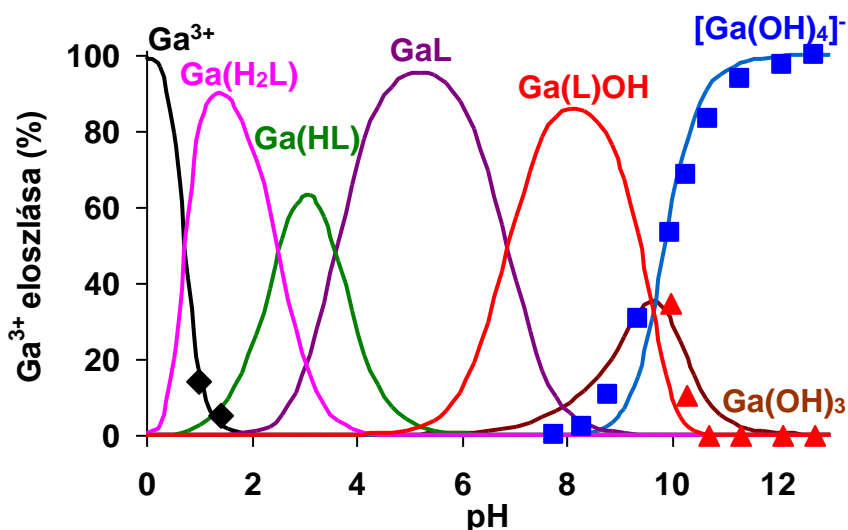
A Ga³⁺-CyAAZTA egyensúlyi rendszert ¹H- és ⁷¹Ga-NMR spektroszkópiás módszerrel is tanulmányoztuk. A Ga³⁺ és CyAAZTA ligandum 1:1 arányú rendszer pH=0,7-12,7 tartományban felvett ¹H- és ⁷¹Ga-NMR spektrumai a IV.2.1 ábrán láthatóak.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata



IV.2.1. ábra. A Ga^{3+} - CyAAZTA rendszer ^1H - (A) és ^{71}Ga -NMR (B) spektrumai a pH függvényében ($[\text{Ga}^{3+}]=[\text{CyAAZTA}]=0,015$ M, 0,1 M KCl, ^1H : 400 MHz, ^{71}Ga : 122 MHz, 25°C).

A ^{71}Ga -NMR adatokból számítottuk a $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ stabilitási állandóját ($\log\beta_{\text{GaLH-1}}$), figyelembe véve a Ga^{3+} hidrolízis állandóit (II.1 fejezet), a $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ komplex ^{71}Ga NMR jelének integrálját ($[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$: $\delta_{\text{Ga}}=223$ ppm, IV.2.1 B. ábra) és moláris integrál értékét ($[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$: $1,56 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$). A $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ komplex pH-potenciometriás ($\log\beta_{\text{GaLH-1}}=14,08(3)$) és NMR spektroszkópiás ($\log\beta_{\text{GaLH-1}}=14,61(8)$) módszerekkel meghatározott $\log\beta_{\text{GaLH-1}}$ értékei (IV.1.5 táblázat) jól egyeznek. A Ga^{3+} - CyAAZTA 1:1 arányú rendszer pH-potenciometriás módszerrel nyert egyensúlyi adatait felhasználva számított eloszlási diagramja a IV.2.2 ábrán látható, amelyen feltüntettük a Ga^{3+} , $[\text{Ga}(\text{L})\text{OH}]^-$ és $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ részecskék ^1H és ^{71}Ga -NMR spektroszkópiás vizsgálatokkal meghatározott moltörtjeit.



IV.2.2. ábra. A Ga^{3+} - CyAAZTA rendszer részecske eloszlása. A $\text{Ga}^{3+}_{\text{aq}}$ (♦), a $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ (▲) és a $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ (■) eloszlása az NMR adatok alapján. ($[\text{Ga}^{3+}] = [\text{CyAAZTA}] = 15 \text{ mM}$, $0,1 \text{ M KCl}$, 25°C).

A Ga^{3+} - CyAAZTA 1:1 arányú rendszer eloszlási diagramja és ^{71}Ga -NMR spektrumai alapján a Ga(III)-komplexek képződése $\text{pH} > 1,5$ esetén már 100%-os. A 0 ppm-nél található keskeny jel a $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ részecskéhez

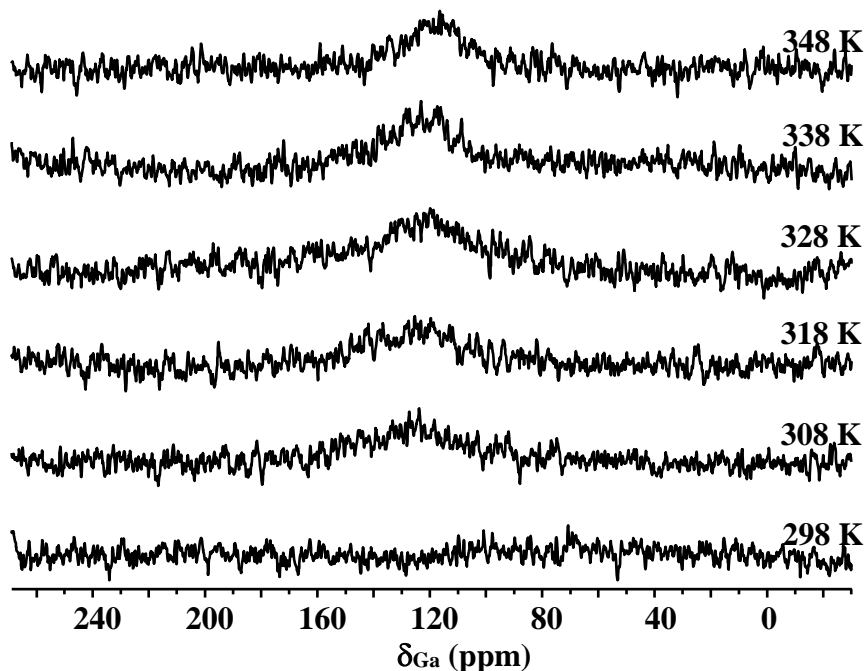
Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

rendelhető ($\nu_{1/2}=51$ Hz, pH=0,7, IV.2.1. B ábra). A pH növekedésével a $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ komplex ^{71}Ga -NMR jelének integrálja csökken a protonált $\text{Ga}(\text{H}_2\text{CyAAZTA})^+$ és a $\text{Ga}(\text{HCyAAZTA})$ részecskék képződése miatt a pH=0,7-1,4 tartományban. A különböző protonáltságú $\text{Ga}(\text{H}_x\text{CyAAZTA})$ ($x=0 - 2$) komplexek ^1H -NMR spektruma rendkívül összetett. A pH növelésének hatására a ^1H -NMR spektrumokban található összes jel a nagyobb térerő irányába tolódik, amit a $\text{Ga}(\text{H}_2\text{CyAAZTA})^+$ és $\text{Ga}(\text{HCyAAZTA})$ részecskék deprotonálódása eredményez a pH=1,4 – 5,0 tartományban (IV.2.1.A. ábra). Mivel ezek a deprotonálódási folyamatok nem befolyásolják a spektrumok szerkezetét, a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ protonálódási folyamatai valószínűleg nem vagy gyengén koordinált karboxilát csoportokon játszódnak le. A $\text{Ga}(\text{AAZTA})^-$ komplexben a Ga^{3+} -ionhoz 3 amino-N és 3 karboxilát-O donoratomban koordinálódik torzult oktaéderes geometriával (a karboxilát csoportok közül egy nem koordinálódik).⁸⁷ A $\text{Ga}(\text{AAZTA})^-$ és $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplexek analógiáját figyelembe véve a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ szerkezete is hasonló, de lényegesen torzultabb a CyAAZTA ligandum merevsége miatt. A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ szerkezeti sajátosságait növekvő hőmérsékleten felvett ^{71}Ga -NMR spektrumok segítségével tanulmányoztuk. A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ 298 – 348 K tartományban felvett ^{71}Ga -NMR spektrumai a IV.2.3 ábrán láthatóak. A ^{71}Ga mag ($I=3/2$) kvadrupólusos jellegének köszönhetően a ^{71}Ga -NMR jelek kémiai eltolódása és félérték-szélessége alapján következtethetünk a Ga(III)-komplexek szerkezetére, szimmetriájára és a koordinációban résztvevő donoratombok kémiai minőségére. *Parker és munkatársai* tanulmányozták különböző Ga(III)-komplexek ^{71}Ga -NMR spektrumait és megállapították, hogy a jelek szélessége az oktaéderes koordinációs geometria kismértékű torzulásával is már jelentősen megnövekszik (pl. Ga(NOTA): $\nu_{1/2} = 210$ Hz; Ga(DETA): $\nu_{1/2} = 2000$ Hz, DETA=1,5,8-triazaciklodekán-*N,N',N''*-

triacetsav).⁹⁹ A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex ^{71}Ga -NMR jele $\delta_{\text{Ga}}=122$ ppm-nél található (IV. 2.3. ábra), amelynek szélessége csökken a hőmérséklet növelésével (298 K: gyakorlatilag beleolvad az alapvonalba, 308K: $\nu_{1/2} = 4700$ Hz; 318 K: $\nu_{1/2} = 4200$ Hz; 328 K: $\nu_{1/2} = 3700$ Hz; 338 K: $\nu_{1/2} = 3000$ Hz; 348 K: $\nu_{1/2} = 2400$ Hz). A $\text{Ga}(\text{AAZTA})^-$ komplex ^{71}Ga -NMR jele $\delta_{\text{Ga}}=118$ ppm-nél található és lényegesen kisebb félérték-szélességgel jellemezhető ($\nu_{1/2} = 2200$ Hz 298 K). A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ és $\text{Ga}(\text{AAZTA})^-$ ^{71}Ga -NMR jeleinek hasonló kémiai eltolódása alapján a három amino-N és három karboxilát-O donortom azonos módon koordinálódik hasonló szerkezetet kialakítva, de a ^{71}Ga -NMR jelek félérték-szélességei alapján a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ lényegesen torzultabb oktaéderes geometriája feltehetően a ciklohexil gyűrű jelenléte miatt, illetve jel félérték-szélességének csökkenése a hőmérsékelt növekedésével utalhat két koordinációs izomer jelenlétére. A pH-potenciometriás titrálásnál megfigyelt extra ligandum ekvivalens lúgfogyás, valamint a ^1H -NMR spektrumokban megjelenő új jelegyüttes (IV.2.1.A ábra) egyértelműen bizonyítja a $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ részecske képződését pH>6,0 esetében. A $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ komplexben a hidroxidion közvetlenül a fémionhoz kapcsolódik egy karboxilát-O donortomot helyettesítve. A pH további növelésének hatására a ^{71}Ga -NMR spektrumokban a $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ részecske jele (IV.2.1.B ábra, $\delta_{\text{Ga}}=223$ ppm), valamint az ^1H -NMR spektrumokban a szabad CyAAZTA ligandum jelei megjelennek, ami egyértelműen utal a $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ és a hidroxidion közötti kompetíciós reakció kialakulására. A szabaddá váló Ga^{3+} -ion a hidroxidionnal $\text{Ga}(\text{OH})_3$ -ot és $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ -ot képez. A $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ komplex disszociációját és a szabad CyAAZTA ligandum deprotonálódását bizonyítja a szabad és a $\text{Ga}(\text{III})$ -komplexben kötött ligandum metilprotonjai ^1H -NMR jelének elkülönülése ($\delta_{\text{H}}=0,92$ és

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

1,12 ppm), valamint azok intenzitás és eltolódás értékeinek változása a pH=8,2 - 12,2 tartományban.



IV.2.3. ábra. A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex ^{71}Ga -NMR spektruma ([GaL]=0,02 M, 122 MHz, pH=5,0, D_2O)

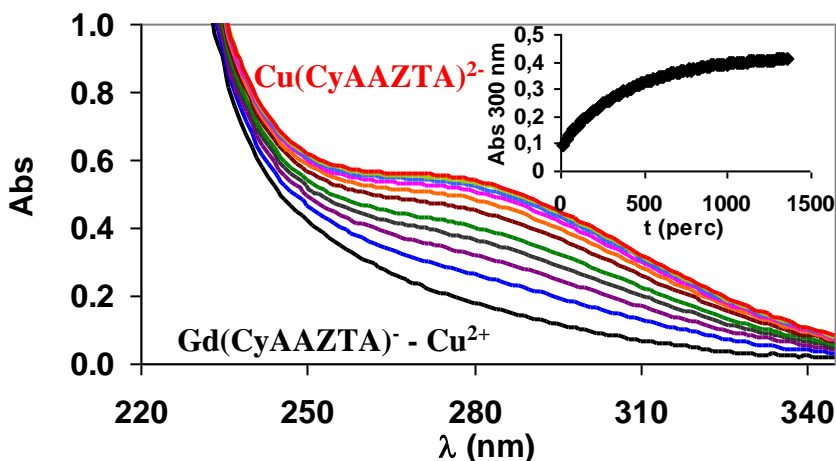
IV.3. A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex kinetikai inertségének vizsgálata

A különféle $\text{Gd}(\text{III})$ -komplexek MRI kontrasztanyagkénti alkalmazhatóságával kapcsolatban a nagy termodinamikai stabilitás mellett elengedhetetlen a nagy kinetikai inertség, mivel a disszociációjuk során felszabaduló Gd^{3+} -ionok és ligandumok rendkívül toxikusak.²⁴ A $\text{Gd}(\text{III})$ -komplexek disszociációs reakcióinak *in vivo* vizsgálata rendkívül nehéz a különféle testfolyadékok bonyolult összetétele miatt. Azonban az *in vitro* vizsgálatok eredményeiből olyan információkhoz juthatunk, amelyek alapján becsülhető a kinetikai viselkedésük fiziológiai feltételek mellett. A $\text{Gd}(\text{III})$ -

komplexek kinetika inertségét savkatalizált disszociációjuk (0,1 M HCl), vagy fémioncsere reakcióik (Cu^{2+} , Zn^{2+} és Eu^{3+}) sebességével szokták jellemezni.^{108,109} A közvetlen összehasonlítás érdekében a $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ kinetikai sajátosságait a $\text{Gd}(\text{AAZTA})^-$ fémioncsere vizsgálatai során alkalmazott módszerekkel és kísérleti körülmények mellett tanulmányoztuk.⁸⁸ A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ fémioncsere reakcióit Cu^{2+} -ion (IV.3.1 egyenlet), mint kicserélő fémion jelenlétében, a képződő CuL komplex abszorpciós sávján (300 nm) UV-látható spektrofotometriás módszerrel vizsgáltuk a pH=2,1-4,5 tartományban (25°C, 0,1 M KCl).



A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ - Cu^{2+} rendszer különböző időpontokban felvett abszorpciós spektrumait és 300 nm-en mért abszorbancia értékeit a IV.3.1 ábrán tüntettük fel.



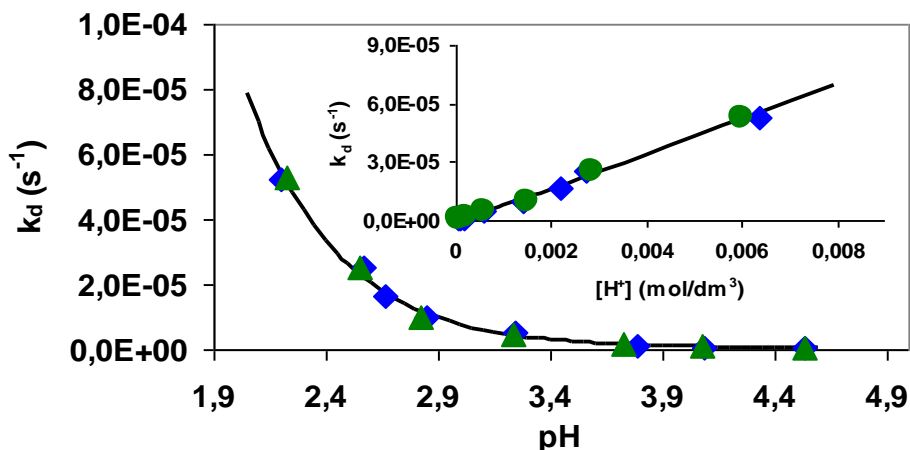
IV.3.1. ábra A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ - Cu^{2+} rendszer különböző időpontokban mért abszorpciós spektrumai és 300 nm mért abszorbancia értékei.

($[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-] = 0,2 \text{ mM}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 0,5 \text{ mM}$, [diklórecetsav] = 0,01 M, pH = 2,1, $l = 0,874 \text{ cm}$, 0,1 M KCl, 25°C)

A fémioncsere reakciók sebességét a kicserélő Cu^{2+} -ion nagy feleslegének jelenlétében tanulmányoztuk ($[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}}/[\text{GdL}]_{\text{tot}}=20, 40$) a pseudo-elsőrendű

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

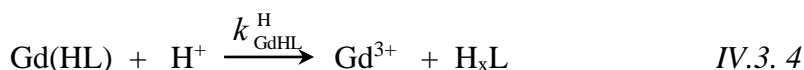
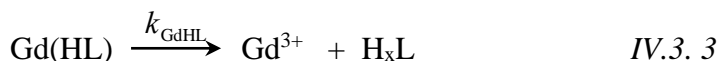
körülmények megteremtése érdekében. Ilyen feltételek mellett a reakció sebessége a III.3.6 egyenlettel adható meg, amelyben a $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ fémioncsere reakcióit jellemző k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat a 300 nm mért abszorbancia – idő adatpárokból számítottuk a III.3.7 egyenlettel. Az adott körülményekre kapott k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat a IV.3.2 ábrán tüntettük fel a pH és $[\text{H}^+]$ függvényében.



IV.3.2. ábra. A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ fémioncsere reakcióit jellemző k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandók a pH és $[\text{H}^+]$ függvényében ($[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-] = 0,2 \text{ mM}$, $[\text{Cu}^{2+}]_t = 4$ (♦) és 8 mM (●); 0,1 M KCl, 25°C)

A IV.3.2. ábrán feltüntetett k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandók alapján megállapítható, hogy a $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ fémioncsere reakcióinak sebessége nő a $[\text{H}^+]$ növekedésével és független a kicserélő Cu^{2+} -ion koncentrációjától ($[\text{Cu}^{2+}]_t$) a pH=2,1 - 4,5 tartományban. Ezeket a kísérleti tapasztalatokat figyelembe véve a reakciósebességet meghatározó lépés a $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex disszociációja, amelyet a szabadrá váló CyAAZTA ligandum és a Cu^{2+} -ion közötti pillanatszerű reakció követ. A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ fémioncsere reakciói sebességének H^+ koncentrációtól való függése a Gd(III)-komplex savkatalizált disszociációjával értelmezhető. Az egyensúlyi vizsgálatok eredményei alapján az általunk vizsgált pH tartományban a $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex GdL és monoprotonált Gd(HL)

részecskék formájában vannak jelen (IV.1.2 táblázat). Ebből adódóan a $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex fémioncsere reakciói lejátszódhatnak a GdL és a monoprotonált $\text{Gd}(\text{HL})$ részecskék spontán disszociációjával (IV.3.2. és IV.3.3 egyenletek), valamint a monoprotonált $\text{Gd}(\text{HL})$ részecske H^+ katalizált disszociációjával (IV.2.4 egyenlet)



Figyelembe véve a lehetséges reakcióutakat a $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ fémioncsere reakciójának sebessége a IV.3.5 egyenlettel fejezhető ki:

$$-\frac{[\text{GdL}]_t}{dt} = k_0[\text{GdL}] + k_{\text{GdHL}}[\text{Gd}(\text{HL})] + k_{\text{GdHL}}^{\text{H}}[\text{Gd}(\text{HL})][\text{H}^+] \quad \text{IV.3.5}$$

ahol k_0 , k_{GdHL} és $k_{\text{GdHL}}^{\text{H}}$ a $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ és monoprotonált $\text{Gd}(\text{HCyAAZTA})$ komplexek spontán és H^+ asszisztált disszociációját jellemző sebességi állandók. Figyelembe véve a $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex teljes koncentrációját ($[\text{GdL}]_{\text{tot}} = [\text{GdL}] + [\text{Gd}(\text{HL})]$) és a monoprotonált $\text{Gd}(\text{HCyAAZTA})$ képződését jellemző K_{GdHL} protonálódási állandót (III.3.3 egyenlet és IV.1.2 táblázat), a k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandó az alábbi egyenlettel adható meg:

$$k_d = \frac{k_0 + k_1[\text{H}^+] + k_2[\text{H}^+]^2}{1 + K_{\text{GdHL}}[\text{H}^+]} \quad \text{IV.3.6}$$

ahol k_0 , $k_1 = k_{\text{GdHL}} \times K_{\text{GdHL}}$ és $k_2 = k_{\text{GdHL}}^{\text{H}} \times K_{\text{GdHL}}$. A különböző fémionkoncentrációknál és pH értékeknél meghatározott k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat a IV.3.6 egyenletre illesztettük és számítottuk a $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex Cu^{2+} -ionnal lejátszódó cserereakcióit jellemző sebességi állandókat, amelyeket a IV.3.1 táblázatban tüntettük fel.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

IV.3.1. táblázat A Gd(CyAAZTA), Gd(AAZTA), Gd(DO3A) és Gd(PCTA) komplexek disszociációját jellemző sebességi (k) és protonálódási állandók (K_{GdHL}), valamint a fiziológias pH-ra vonatkozó sebességi állandók (k_d) és felezési idők ($t_{1/2}=\ln 2/k_d$) (25°C).

| | Gd(CyAAZTA) | Gd(AAZTA)^[a] | Gd(DO3A)^[b] | Gd(PCTA)^[c] |
|--|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Ionerősség | 0,1 M KCl | 1,0 M KCl | 0,1 M KCl | 1,0 M KCl |
| k_0 (s ⁻¹) | $(7 \pm 10) \times 10^{-9}$ | – | -2×10^{-9} | – |
| k_1 (M ⁻¹ s ⁻¹) | $(6,0 \pm 1,0) \times 10^{-3}$ | 1,05 | 0,023 | $1,1 \times 10^{-3}$ |
| k_2 (M ⁻² s ⁻¹) | 53 ± 4 | – | – | $6,3 \times 10^{-4}$ |
| K_{GdHL} (M ⁻¹) | 6166 (pH-pot.) | 233 | – | 1,72 |
| k_d (s ⁻¹) pH=7,4 | $2,4 \times 10^{-10}$ | $4,0 \times 10^{-8}$ | $9,2 \times 10^{-10}$ | $4,4 \times 10^{-11}$ |
| $t_{1/2}$ (óra) pH=7,4 | $8,0 \times 10^5$ | $4,3 \times 10^3$ | $2,1 \times 10^5$ | $4,4 \times 10^6$ |

^[a] Ref. 88; ^[b] Ref. 110; ^[c] Ref. 111.

Az illesztések során a k_0 sebességi állandóra nagyon kicsi értéket kaptunk, amely összemérhető hibájával, így arra következtettünk, hogy Gd(CyAAZTA)⁻ spontán disszociációja nem befolyásolja a fémioncsere reakciók sebességét. A IV.3.1 táblázatban feltüntetett k_1 sebességi állandók összehasonlításával megállapítható, hogy a Gd(CyAAZTA)⁻ proton katalizált disszociációja közel kétszázada a Gd(AAZTA)⁻ megfelelő folyamatának. A Gd(III)-komplexek savkatalizált disszociációjának feltételezett mechanizmusa alapján a protonálódás egy dekoordinálódott –COO⁻ csoporton játszódik le, amelyről a H⁺-ion intramolekuláris protoncsere folyamatokban áttevődhet a ligandum sokkal bázikusabb N-donoratomjára a Gd³⁺-iont kiszorítva a donoratomok által alkotott koordinációs üregből. Az ¹H-NMR spektroszkópiás vizsgálatok igazolták a Ln(CyAAZTA)⁻ komplexek merev szerkezetét (IV.1.5 ábra), amely lényegesen megnehezíti a protonált karboxilát csoport és a ligandum vázán található amino-N donoratomok közötti protoncsere folyamatokat, lelassítva ezzel a

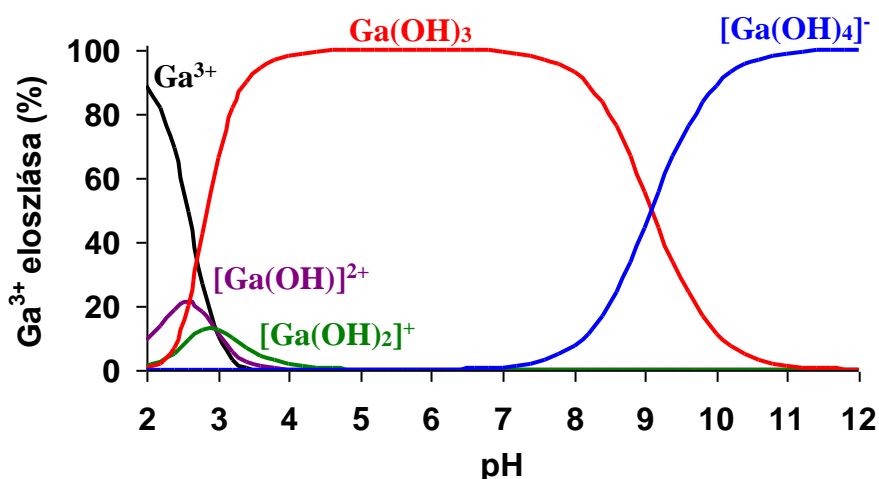
Gd(CyAAZTA)⁻ savkatalizált disszociációját. A Gd(CyAAZTA)⁻ fémioncsere reakcióinak kinetikai vizsgálatai során kapott legmeglepőbb eredmény, hogy a makrociklusos Gd(DO3A) és Gd(PCTA) komplexekhez hasonlóan a folyamatok sebességmeghatározó lépése a Gd(III)-komplex savkatalizált disszociációja, amely a Gd(CyAAZTA)⁻ esetében négyszer lassabban játszódik le, mint a makrociklusos Gd(DO3A) azonos folyamata. A fiziológiás pH-ra számított disszociációs felezési idők ($t_{1/2}$, IV.3.1 táblázat) alapján megállapítható, hogy a Gd(CyAAZTA)⁻ rendkívül nagy kinetikai inertséggel rendelkezik ($t_{1/2}=91$ év, pH =7,4, 25°C), ami kisebb, mint a Gd(PCTA) inertsége, de közel négyszerte nagyobb, mint a Gd(DO3A) komplexé. Legjobb tudomásunk szerint a Gd(CyAAZTA)⁻ kinetikai inertsége a legnagyobb az ismert két belső szférás vízmolekulát tartalmazó nem makrociklusos ligandumok által képezett Gd(III)-komplexek között.

IV.4. A Ga(CyAAZTA)⁻ komplex Cu²⁺-ionnal lejátszódó fémioncsere reakcióinak kinetikai vizsgálata

Az orvosi diagnosztikában és terápiás kezelésekben alkalmazott radioaktív fémizotópokat tartalmazó komplexek nagy kinetikai inertsége alapvető elvárás, mivel *in vivo* akkumulációjukkal előidézhetik téves diagnózis felállítást és az egészséges szövetek károsodását. A Ga(III)-komplexek kinetikai inertségét erősen savas ($[H^+]>1,0$ M) és bázikus ($[OH^-]>0,1$ M) körülmények mellett mért disszociációjuk sebességével jellemzik.^{81,99,100} Azonban a szervezetben jelenlévő endogén fémionok (Cu²⁺, Zn²⁺ és Ca²⁺) különféle cserefolyamatokba léphetnek a ⁶⁸Ga(III)-komplexekkel a ⁶⁸Ga³⁺-ion szabaddá válását eredményezve. Figyelembe véve az endogén fémionok kicserélődésre alkalmas *in vivo* koncentrációját ($[Cu^{2+}]=1$ μM, $[Zn^{2+}]=10$ μM, $[Ca^{2+}]=2,5$ mM),⁵⁴ a ⁶⁸Ga(III)-tartalmú radiofarmakonok átlagos koncentrációját ($\sim 10^{-8} - 10^{-9}$ M),¹¹² a Ga³⁺-ion hidrolízis állandóit (II.2

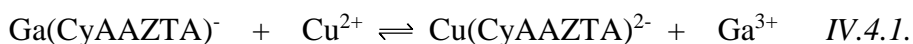
Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

fejezet), a CyAAZTA ligandum protonálódási és a képződő Ga(III)-, Cu(II)-, Zn(II)- és Ca(II)-komplexek stabilitási állandóit (IV.1.1, IV.1.2 és IV.1.3 táblázatok) modellszámításokat végeztünk, amelyek eredményei alapján lejátszódhat a Ga(CyAAZTA)⁻ komplex disszociációja a megfelelő Cu(II)-, Zn(II)- és Ca(II)-komplexek, valamint Ga(OH)₃ és [Ga(OH)₄]⁻ képződésével (IV.4.1 ábra).



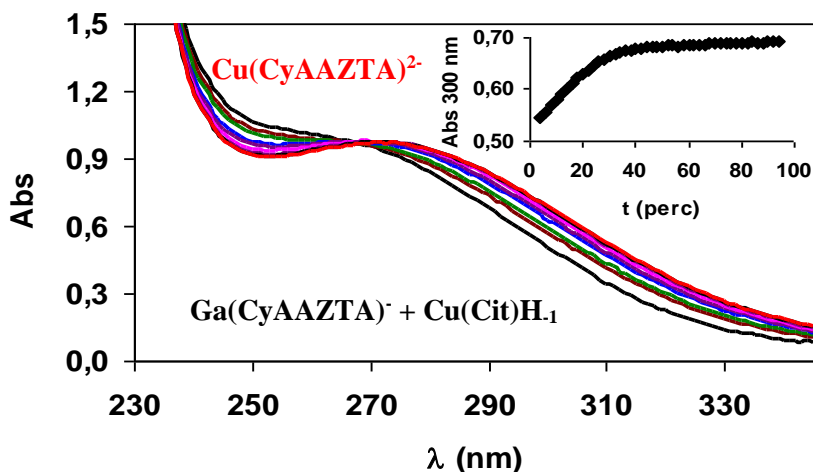
IV.4.1. ábra. A Ga³⁺ - Cu²⁺ - Zn²⁺ - Ca²⁺ - CyAAZTA rendszer részecske eloszlása. ([Ga³⁺] = [CyAAZTA] = 1 nM, [Cu²⁺] = 1 μM, [Zn²⁺] = 10 μM, [Ca²⁺] = 2,5 mM, 0,1 M KCl, 25°C).

A kinetikai sajátosságok felderítése érdekében a fiziológias feltételekhez közeledve tanulmányoztuk a Ga(CyAAZTA)⁻ és Cu²⁺-ionok közötti cserereakció (IV.4.1 egyenlet) sebességét UV-látható spektrofotometriás módszerrel (300 nm) pH=6,0 – 9,0 tartományban a felszabaduló Ga³⁺ és kicserélő Cu²⁺-ionok hidrolízisének elkerülése érdekében citrátot, mint segédligandumot alkalmazva.



A vizsgálatok során a Ga(CyAAZTA)⁻ nagy feleslegének alkalmazásával ([GaL]_{tot}/[Cu²⁺]_{tot}=5) teremtettük meg a pszeudo-elsőrendű reakció feltételeit. A citrát segédligandumot szintén nagy feleslegben alkalmaztuk ([Cit]_t=1,0 –

4,0 mM) a vizsgált reakció változatlan körülményeinek megteremtése érdekében. Ilyen feltételek mellett a kicserélő Cu^{2+} -ion $\text{Cu}(\text{Cit})\text{H}_{-1}$ részecske formájában, a felszabaduló Ga^{3+} -ion pedig $\text{Ga}(\text{Cit})\text{H}_{-1}$ és $\text{Ga}(\text{Cit})_2$ komplexek formájában van jelen.^{87,53,113} A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ - Cu^{2+} -citrát rendszer különböző időpontokban felvett abszorpciós spektrumai a IV.4.2 ábrán láthatók.

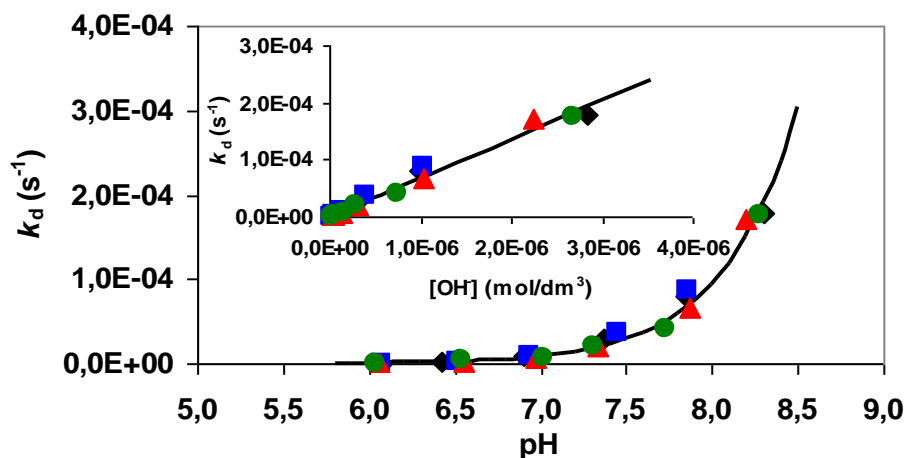


IV.4.2. ábra. A $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$ és a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ - Cu -Citrát rendszer különböző időpillanatokban felvett abszorpciós spektrumai ($[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-] = 1,0$ mM, $[\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}] = 0,3$ mM, $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 0,3$ mM, $[\text{Cit}^{3-}]_{\text{tot}} = 2,0$ mM, $[\text{HEPES}] = 0,01$ M, $\text{pH} = 7,5$ $l = 1$ cm, $0,1$ M KCl, 25°C).

Az általunk alkalmazott körülmények mellett a reakció sebessége a III.3.6 egyenlettel adható meg. A fémioncsere reakció előrehaladásával a $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$ és $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})\text{H}_{-1}$ koncentrációja nő (a $\text{Cu}(\text{CyAAZZTA})^{2-}$ deprotonálódása 8-11 között pH tartományban megy végbe), míg a $\text{Cu}(\text{Cit})\text{H}_{-1}$ koncentrációja csökken. A reakció kezdeti szakaszára jellemző $\Delta\text{Abs}/\Delta t$ adatokból számítottuk a k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat a III.3.8 egyenlettel figyelembe véve a $\text{Cu}(\text{Cit})\text{H}_{-1}$, $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$ és $[\text{Cu}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{3-}$ komplexek 300 nm-re vonatkozó moláris abszorbanciáit ($\varepsilon_{\text{Cu}(\text{Cit})\text{H}_{-1}} = 921 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{\text{Cu}(\text{CyAAZTA})} = 2435 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

$\varepsilon_{\text{Cu}(\text{CyAAZTA})\text{H-1}}=2811 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A kinetikai vizsgálatok során tanulmányoztuk a $[\text{Citrat}]_{\text{t}}$ és a pH változásának hatását a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex és Cu^{2+} -ionok között lejátszódó cserereakció sebességére. Az adott körülményekre meghatározott k_d pseudo-elsőrendű sebességi állandókat IV.4.3 ábrán tüntettük fel a pH és $[\text{OH}^-]$ függvényében.

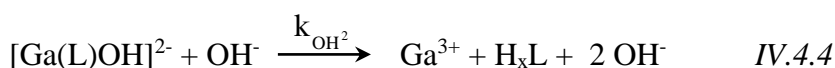
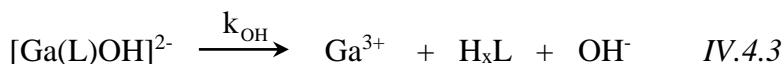


IV.4.3 ábra. A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ és Cu^{2+} rendszerre jellemző k_d pseudo-elsőrendű sebességi állandók a pH és $[\text{OH}^-]$ függvényében ($[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-] = 1,0 \text{ mM}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 0,2 \text{ mM}$, $[\text{Cit}] = 1,0 \text{ mM}$ (♦), $2,0 \text{ mM}$ (■), $3,0 \text{ mM}$ (▲), $4,0 \text{ mM}$ (●), $[\text{MES}] = [\text{HEPES}] = 0,01 \text{ M}$, $0,1 \text{ M KCl}$, 25°C).

A kapott k_d pseudo-elsőrendű sebességi állandók alapján megállapítható, hogy a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex Cu^{2+} -ionokkal lejátszódó cserereakcióinak sebessége közel lineárisan nő a $[\text{OH}^-]$ növekedésével és független a citrát és $\text{Cu}(\text{Cit})\text{H}_1$ koncentrációjától, amely alapján feltételezhető, hogy a reakció sebességmeghatározó lépés a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ disszociációja, amelyet a szabaddá váló CyAAZTA ligandum és a $\text{Cu}(\text{Cit})\text{H}_1$ közötti gyors fémioncsere követ. Az általunk vizsgált pH tartományban a k_d sebességi állandók $[\text{OH}^-]$ függése értelmezhető az egyesületi vizsgálatokból már ismert $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ részecske képződésével ($K_{\text{Ga(L)OH}}$, IV.4.2 egyenlet) és annak spontán (k_{OH} , IV.4.3 egyenlet), valamint OH^- katalizált (k_{OH}^2 , IV.4.4 egyenlet) disszociációjával.



$$K_{\text{Ga(L)OH}} = \frac{[\text{Ga(L)OH}]}{[\text{GaL}][\text{OH}^-]}$$



Figyelembe véve a lehetséges reakcióutakat a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ fémcserre reakcióinak sebessége a következőképpen adható meg:

$$-\frac{d[\text{GaL}]_t}{dt} = k_{\text{OH}}[\text{Ga(L)OH}] + k_{\text{OH}^2}[\text{Ga(L)OH}][\text{OH}^-] \quad \text{IV.4.5}$$

A komplex teljes koncentrációjának ($[\text{GaL}]_{\text{tot}} = [\text{GaL}] + [\text{Ga(L)OH}]$), a Ga(L)OH képződését jellemző egyensúlyi állandónak ($K_{\text{Ga(L)OH}}$) figyelembe vételével a k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandó a IV.4.6 egyenlettel fejezhető ki:

$$k_d = \frac{k_{\text{OH}}K_{\text{Ga(L)OH}}[\text{OH}^-] + k_{\text{OH}^2}K_{\text{Ga(L)OH}}[\text{OH}^-]^2}{1 + K_{\text{Ga(L)OH}}[\text{OH}^-]} \quad \text{IV.4.6}$$

ahol $K_{\text{Ga(L)OH}}$ a $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ komplex képződését jellemző egyensúlyi állandó, míg a k_{OH} és k_{OH^2} a $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ spontán és OH^- -asszisztált disszociációját jellemző sebességi állandók. A különböző pH értékeknél és citrát koncentrációknál meghatározott k_d értékeket a IV.4.6 egyenletre illesztve számítottuk a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex Cu^{2+} -ionokkal lejátszódó cserereakcióit jellemző egyensúlyi és sebességi állandókat, amelyek a IV.4.1 táblázatban láthatóak. A kinetikai vizsgálatok során kapott $K_{\text{Ga(L)OH}}$ egyensúlyi állandóból számítottuk a $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ komplex protonálódási állandóját (III.3.5 egyenlet, IV.1.3 táblázat) az adott körülményre vonatkozó vízionszorotot felhasználva ($K_{\text{GaLH-1}} = 1/K_w \times K_{\text{Ga(L)OH}}$, $\text{p}K_w = 13,87$, $0,1 \text{ M KCl}$, 25°C).

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

IV.4.1. táblázat A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ és $\text{Ga}(\text{AAZTA})^-$ komplexek disszociációs reakcióira jellemző sebességi (k) és egyensúlyi állandók (K), valamint disszociációjuk fiziológias pH-ra számított felezési ideje ($t_{1/2}=\ln 2/k_d$) (0,1 M KCl, 25°C)

| | $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ | $\text{Ga}(\text{AAZTA})^-$ ^[a] |
|--|--------------------------------|--|
| $k_{\text{OH}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$ | $(1,7 \pm 0,1) \times 10^{-5}$ | $3,0 \times 10^{-6}$ |
| $k_{\text{OH}^2} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$ | 68 ± 5 | 10 |
| $K_{\text{Ga(L)OH}}$ | $(3,4 \pm 0,1) \times 10^6$ | $1,4 \times 10^9$ |
| $\log K_{\text{GaLH-1}}$ | 7,34 (1) | 4,72 |
| $k_d (\text{s}^{-1})$ at pH=7,4 | $2,3 \times 10^{-5}$ | $9,2 \times 10^{-6}$ |
| $t_{1/2}$ (h) pH=7,4-en | 8,5 | 21 |

^[a]Ref. 87

A IV.4.1 táblázatban feltüntetett sebességi állandók alapján megállapítható, hogy a $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ spontán (k_{OH}) és OH^- katalizált (k_{OH^2}) disszociációját jellemző sebességi állandók 6-7szer nagyobbak, mint a $[\text{Ga}(\text{AAZTA})\text{OH}]^{2-}$ megfelelő sebességi állandói. A $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ és $[\text{Ga}(\text{AAZTA})\text{OH}]^{2-}$ spontán disszociációja feltételezhetően a Ga(III)-komplexek intramolekuláris átrendeződése során a donoratomok szimultán dekoordinációjával valósul meg a Ga^{3+} -ionok szabaddá válását eredményezve. A $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ gyorsabb spontán disszociációját feltehetően a vegyes-hidroxo-Ga(III)-komplex torzultabb szerkezete eredményezi, mivel a OH^- -ion koordinációjával gyengülhet a Ga^{3+} -ion és a két gyűrű N donoratom között kölcsönhatás a CyAAZTA merevebb szerkezete miatt. A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ és $\text{Ga}(\text{AAZTA})^-$ fiziológias pH-ra számított felezési ideje 8,5 és 21 óra, amely egyértelműen jelzi a $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ részecske kisebb kinetikai inertességét. Ezzel szemben a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ és $\text{Ga}(\text{AAZTA})^-$ disszociációjának pH=6,0-ra számított

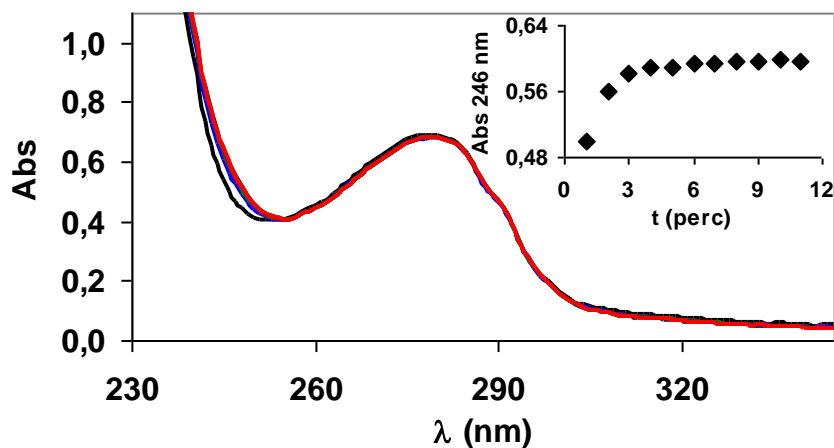
felezési ideje 234 és 64 óra, ami a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ részecske nagyobb kinetikai inertségét jelzi feltételezhetően a $\text{Ga}(\text{III})$ -komplex nagyobb konformációs merevségének köszönhetően (a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ részecske domináns $\text{pH} \leq 6,0$ esetén, IV.2.2 ábra). A $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ komplex pH-potenciometriás módszerrel meghatározott ($\log K_{\text{GaLH-1}} = 7,31$ (3)) és kinetikai adatokból ($\log K_{\text{GaLH-1}} = 7,34$ (1)) számított protonálódási állandója jó egyezést mutat.

IV.5. A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex transzferinnel lejátszódó ligandum cserereakcióinak kinetikai vizsgálata

Az élő szervezetben található transferrin molekulák szerepe a Fe^{3+} -ionok tárolása és transzportálása. Biológiai szerepüket figyelembe véve a transferrinek három csoportba sorolhatók: szérum transferrin (sTf), ovotransferrin (OTf) és laktoferritin (LTf).¹¹⁴ Minden egyes csoportba tartozó transferrin molekulák $\sim 80\text{kDa}$ moláris tömeggel jellemezhető egyláncú glikoproteinek, amelyek alegységenként egy Fe^{3+} -iont koordinálhatnak (összesen két Fe^{3+} -iont koordinálhatnak). A Fe^{3+} -ion transferrin komplexe torzult okatédes geometriával jellemezhető, amelyben egy tirozin-O és egy aszparagin-O axiális pozíciókban, még egy tirozin-O, egy hisztidin-N és két karbonát-O donoratomban ekvatoriális pozíciókban koordinálódik a Fe^{3+} -ionhoz.¹¹⁴ A CO_3^{2-} ion, mint szinergikus anion koordinálódik a Fe^{3+} -ionhoz és szerepe nélkülözhetetlen a komplex kialakulásában. A Fe^{3+} - és Ga^{3+} -ionok nagyon hasonló fizikai-kémiai sajátosságai miatt a humán szérum transferrin (sTf) és laktoferritin (LTf) nagyon stabil komplexet alakíthatnak ki Ga^{3+} -ionnal ($\log K_{\text{GaTf}} = 18,88$, $\log K_{\text{Ga2Tf}} = 17,65$), amelyben a CO_3^{2-} -ion koordinációja szintén megvalósul.⁶⁸ Mivel a humán sTf molekulák Fe^{3+} -kötőhelyei csak részben telítettek (30%), így viszonylag jelentős kapacitással bírnak más fémionok (pl. Ga^{3+}) koordinációjára.⁶⁸ Figyelembe véve a humán

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

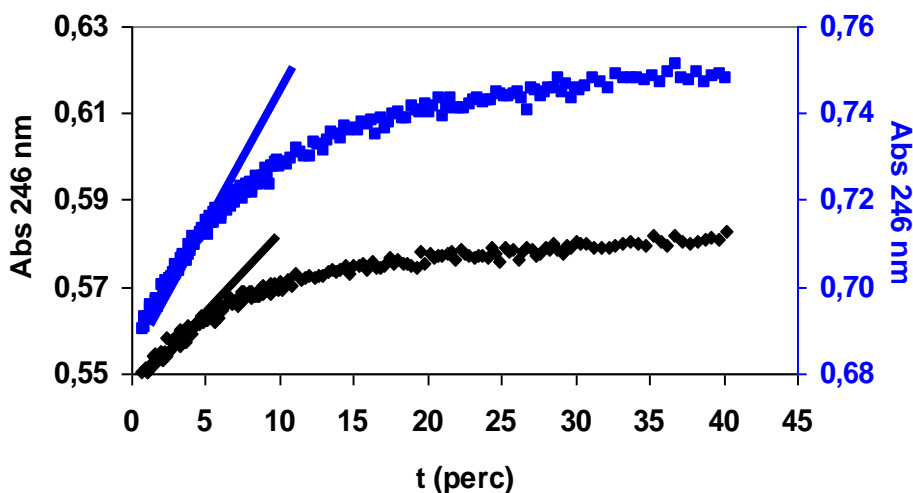
sTf *in vivo* koncentrációját ($[sTf]=31 \mu M$), szabad fémmegkötő kapacitását és Ga^{3+} -ionnal képzett komplexeinek stabilitását, a $^{68}Ga(III)$ -komplexek kompetíciós reakciót alakíthatnak ki humán sTf-el, ami a $^{68}Ga(III)$ -komplexek disszociációját és $^{68}Ga(III)$ -sTf komplexek képződését eredményezheti. A fiziológias feltételekhez közeledve tanulmányoztuk a $Ga(CyAAZTA)^-$ és humán sTf közötti ligandumcsere reakciót (IV.5.1 egyenlet) UV-látható spektrofotometriás módszerrel a képződő $Ga(sTf)$ komplexek abszorpciós sávján (240 – 250 nm), 25 mM $NaHCO_3$ jelenlétében pH=7,4 esetén (0,15 M NaCl, 25°C). A $Ga(CyAAZTA)^-$ - sTf rendszer különböző időpillanatokban felvett abszorpciós spektrumai a IV.5.1 ábrán láthatóak.



IV.5.1. ábra. A $Ga(CyAAZTA)^-$ - sTf rendszer különböző időpillanatokban felvett abszorpciós spektrumai ($[GaL] = 0,1 \text{ mM}$, $[Trf] = 10 \mu M$, $[NaHCO_3]=25 \text{ mM}$, pH = 7,4, 0,15 M NaCl, 25°C).

A ligandumcsere reakciók sebességét nagy $Ga(CyAAZTA)^-$ komplex felesleg mellett határoztuk meg ($[Ga(CyAAZTA)^-]=0,1 \text{ mM}$, $[sTf]=10$ és $15 \mu M$) a pszeudo-elsőrendű körülmény megteremtése érdekében. Ilyen körülmények mellett a ligandumcsere reakció sebessége a III.3.6 egyenlettel adható meg. A k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat a IV.5.2 ábrán

feltüntetett kinetikai görbék kezdeti szakaszára jellemző $\Delta\text{Abs}/\Delta t$ adataiból számítottuk a III.3.9 egyenlettel figyelembe véve a Ga(sTf) komplex moláris abszorpciós koefficiensét ($\epsilon_{246}=13800 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).⁸⁷



IV.5.2 ábra A Ga(CyAAZTA)⁻ - sTf rendszer különböző időpillanatokban 246 nm mért abszorbancia értékei ($[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ $[\text{sTf}] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ (◆) and $1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ (■), pH = 7,4, 0,025 M NaHCO₃, 0,15 M NaCl, 25°C).

A Ga(CyAAZTA)⁻ és sTf közötti ligandumcsere reakció 10 és 15 μM sTf koncentráció jelenlétében kapott kinetikai adataiból a III.3.9 egyenlettel számított k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandók $2,8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ és $3,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($[\text{NaHCO}_3]=0,025 \text{ M}$, pH=7,4, 0,15 M NaCl, 25°C) A Ga(CyAAZTA)⁻ sTf-nel lejátszódó ligandumcsere reakcióját jellemző k_d sebességi állandó ($k_d=2,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) és a Ga(CyAAZTA)⁻ Cu²⁺-ionnal citrát jelenlétében lejátszódó fémioncsere reakció k_d sebességi állandója ($k_d=2,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, pH=7,4, 0,1 M KCl, 25°C, IV.4.1 táblázat) gyakorlatilag megegyezik, amely alapján arra következtethetünk, hogy a humán sTf nem vesz részt a Ga(CyAAZTA)⁻ ligandumcsere reakciójának sebességmeghatározó lépésében. A Ga(CyAAZTA)⁻ ligandumcsere reakciója a fémioncsere reakcióhoz hasonlóan a $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ spontán és hidroxid katalizált

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

disszociációjával játszódik le, amelyet a Ga^{3+} és humán sTf közötti gyors reakció követ.

A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ fémioncsere és ligandumcsere reakciói alapján a fiziológias feltételekre számított disszociáció felezési ideje $t_{1/2}=8,5$ és $6,6$ óra, amely közel hétszer nagyobb, mint a ^{68}Ga radioaktív bomlás $t_{1/2}=67,71$ perc értéke. A kapott eredmények alapján a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex ígéretes Ga^{3+} -alapú radiodiagnostikumok fejlesztésére.

IV.6. A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex relaxációs sajátosságai

A MRI vizsgálatokban jelenleg alkalmazott $\text{Gd}(\text{III})$ -komplexekben a ligandumok 8 donoratómmal koordinálódnak a Gd^{3+} -ionhoz, míg a 9. koordinációs helyet egy vízmolekula tölti be. A paramágneses Gd^{3+} -ion az oldószer vízprotonok relaxációs sebességére gyakorolt hatását jelentős részben ennek a vízmolekulának a cseréjén keresztül fejt ki (belső szféra hozzájárulás - r_{1p}^{is}). Az klinikai gyakorlatban leggyakrabban alkalmazott $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ és $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ komplexek relaxivitása $4 - 5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (20 MHz, 25°C), ami lényegesen elmarad az elméletileg elérhető $120 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ értéktől.²⁴ A $\text{Gd}(\text{III})$ -komplexek relaxivitása jelentősen növelhető a Gd^{3+} -hoz közvetlenül koordinálódó vízmolekulák számának (q) növelésével (II.3.3 egyenlet). Az elmúlt két évtizedben számos $q=2$ $\text{Gd}(\text{III})$ -komplexet fejlesztettek, amelyekben található hétfogú ligandumok a jól ismert makrociklusos DO3A és származékai ($[\text{Gd}(\text{DO3A})(\text{H}_2\text{O})_2]$: $r_{1p}=6,0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $[\text{Gd}(\text{PCTA})(\text{H}_2\text{O})_2]$: $r_{1p}=7,0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 20 MHz, 25°C).¹¹⁵ A $[\text{Gd}(\text{DO3A})(\text{H}_2\text{O})_2]$ komplexek és származékaik *in vivo* alkalmazásának alapvető hátránya, hogy a testfolyadékokban található kis molekulatömegű endogén ligandumok kölcsönhatásba léphetnek a Gd^{3+} -ionnal a belső szférában található két vízmolekula helyettesítésével vegyes ligandumú komplexet képezve.¹¹⁶ *Aime és munkatársai* a közelmúltban előállították a

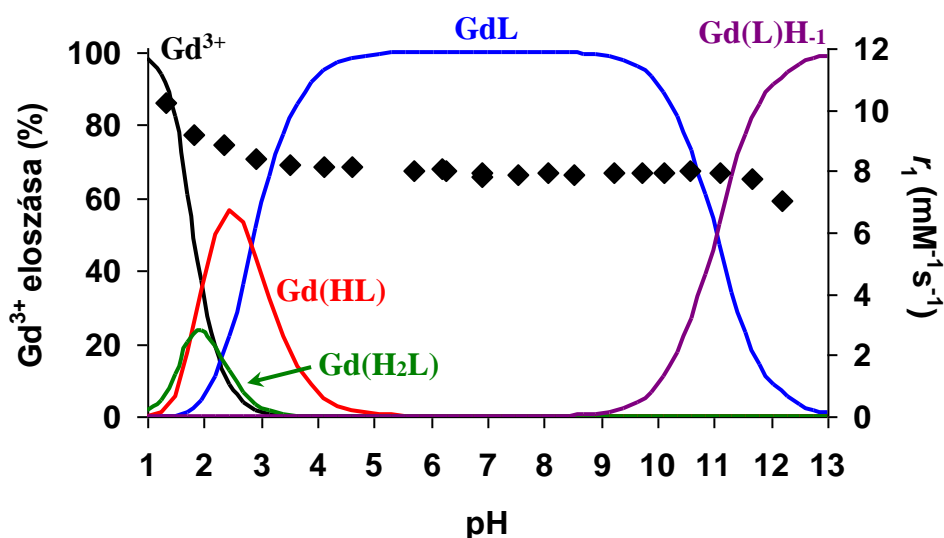
hétfogú szemi-makrociklusos AAZTA ligandumot és részletesen tanulmányozták Gd(III)-komplexének relaxációs és szerkezeti sajátosságait.^{32,88} A vizsgálatok eredményei rámutattak, hogy a $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex belső szférájában két vízmolekula található, amelyek közel négyszerte gyorsabb cserefolymatokban vesznek részt az oldószer vízmolekulákkal, mint a $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ és $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ komplexek esetében ($[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$: $k_{\text{ex}} = 11,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$: $k_{\text{ex}} = 3,3 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$: $k_{\text{ex}} = 4,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$).^{32,117} A $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ relaxációs sajátosságainak vizsgálatai során meghatározott fizikai-kémiai paramétereket felhasználva modellszámításokat végeztek makromolekuláris rendszerre jellemző hosszú rotációs korrelációs idő figyelembe vételével ($\tau_R=30 \text{ ns}$). Meglepő módon a $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ számított relaxivitása $r_{1p}=100 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ adódott (20 MHz, 25°C), ami megközelíti az elméletileg elérhető maximális relaxitás értéket ($r_{1p}=120 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 20 MHz, 25°C).³² A $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ előnyös relaxációs sajátosságai mellett fontos megemlíteni, hogy a kis méretű endogén ligandumok (laktát- és foszfátionok) nem alakítanak ki kölcsönhatást Gd^{3+} -ionnal a belső szférában található vízmolekulákat kiszorítva.³² A $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex egykristályának röntgendiffrakciós vizsgálatai $\{\text{Na}[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})]\}_2$ összetételű dimerek jelenlétét mutatták ki szilárd fázisban.⁸⁸ A $\{\text{Na}[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})]\}_2$ komplexben a Gd^{3+} -ionhoz tíz donatorom koordinálódik torzult „két sapkás” négyzetes antiprizmás szerkezetet kialakítva (az egyik gyűrű karboxilát-O donatorom híd helyzetben van, míg az egy másik karboxilát csoport mindkét donatoromjával koordinálódik a Gd^{3+} -ionhoz). A dimer szerkezetű $\{\text{Na}[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})]\}_2$ monomer egységeiben a „sapka” pozíciókat az egyik gyűrű amino-N és a híd helyzetben lévő szomszédos gyűrű karboxilát-O donatorom foglalják el, míg a négyzetes antiprizmás síkokat három

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

karboxilát-O és egy vízmolekula-O donoratomok, valamint két-két amino-N és karboxilát-O donoratomok töltik be. Oldat fázisban valószínűleg a „sapka” pozícióban lévő hídhelyzetű karboxilát-O donoratom helyét egy vízmolekula foglalja el, amely nem szomszédos a négyzetes antiprizma síkjában lévő H₂O molekulával, így a [Gd(AAZTA)(H₂O)₂]²⁻ komplexben a belső szférás vízmolekulák nem helyettesíthetők két- esetleg háromfogú ligandumokkal.

A Gd(CyAAZTA)⁻ komplex relaxációs sajátosságainak vizsgálata során arra kerestük a választ, hogy a ciklohexil csoport jelenléte hogyan befolyásolja a Gd(III)-komplex oldószer vízprotonok T₁ relaxációs idejére gyakorolt hatását meghatározó relaxációs paramétereket (*k_{ex}*, τ_R, τ_S, stb.) A Gd(CyAAZTA)⁻ belső szférás vízmolekuláinak cseresebességét, a komplex forgását és elektronrelaxációját, valamint a belső szférás vízprotonok relaxációját leíró paramétereket változtatott hőmérsékletű ¹H-NMR relaxometriás és ¹⁷O-NMR spektroszkópiás, valamint NMRD mérésekkel határoztuk meg. Tanulmányoztuk a Gd(CyAAZTA)⁻ relaxivitását különböző kis endogén ligandumok jelenlétében az esetlegesen képződő vegyes ligandumu komplexek kimutatása érdekében.

A Gd³⁺-CyAAZTA rendszer relaxitásának pH-függvényében való vizsgálata során arra kerestük a választ, hogy a komplex képződés során keletkező részecskék milyen hatással vannak az oldószer vízprotonok longitudinális relaxációs sebességére. A Gd³⁺-CyAAZTA rendszer relaxitásának pH-függése és az egyensúlyi adatokból számított részecske eloszlási diagramja a IV.6.1. ábrán látható.



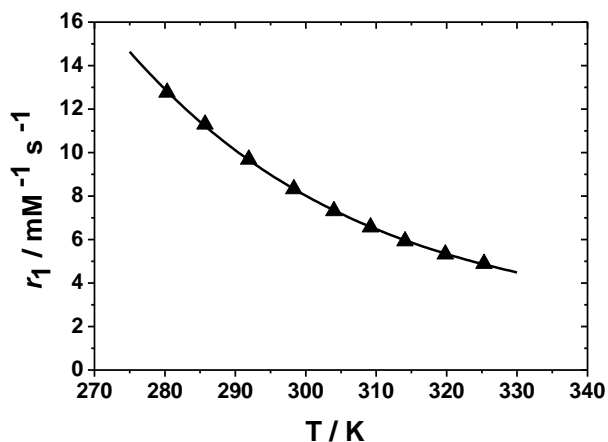
IV.6.1. ábra A Gd^{3+} - CyAAZTA rendszer részecske eloszlása. A komplex relaxivitása (\blacklozenge) a pH függvényében ($[Gd(CyAAZTA)] = 1,0$ mM, 20 MHz, 0,1 M KCl, 25°C)

A IV.6.1 ábra alapján megállapítható, hogy a $Gd(III)$ -komplex képződésével és a $[Gd(HCyAAZTA)]$ és a $[Gd(H_2CyAAZTA)]^+$ részecskék deprotonálódásával a relaxitás értékek csökkennek a $pH=1-4$ tartományban. A relaxitás értékek a pH 4-10 tartományban állandósulnak, ami $[Gd(CyAAZTA)]^-$ komplex képződésével és dominanciájával magyarázható. A relaxitás értékek $pH > 10$ esetében bekövetkező csökkenése a $[Gd(CyAAZTA)(OH)]^{2-}$ részecske képződésével magyarázható. A $Gd(CyAAZTA)^-$ relaxitása $r_{1p} = 8,3$ $mM^{-1}s^{-1}$ (20 MHz, $pH=7,4$, 25°C), kétszerese a klinikai gyakorlatban használt kontrasztanyagokénak és egyértelműen jelzi két vízmolekula jelenlétét a $Gd(III)$ -komplex belső szférájában. A $[Gd(CyAAZTA)(H_2O)_2]^-$ komplex $^{20}r_1^{298}$ értéke jól egyezik a korábban tanulmányozott hasonló molekulatömegű $q=2$ $Gd(III)$ -komplexek relaxitás értékeivel (IV.6.1 táblázat).

A $q=2$ $Gd(III)$ -komplexek relaxitásának belső szférás (r_{1p}^{is}) hozzájárulását jelentősen befolyásolja a $Gd(III)$ -ionhoz közvetlenül

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

kapcsolódó vízmolekulák cseresebessége, amelyre kvalitatív információt nyerhetünk a relaxivitas hőmérsékletfüggésének vizsgálatából. A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex relaxivitasának hőmérsékletfüggése a IV.6.2 ábrán látható.



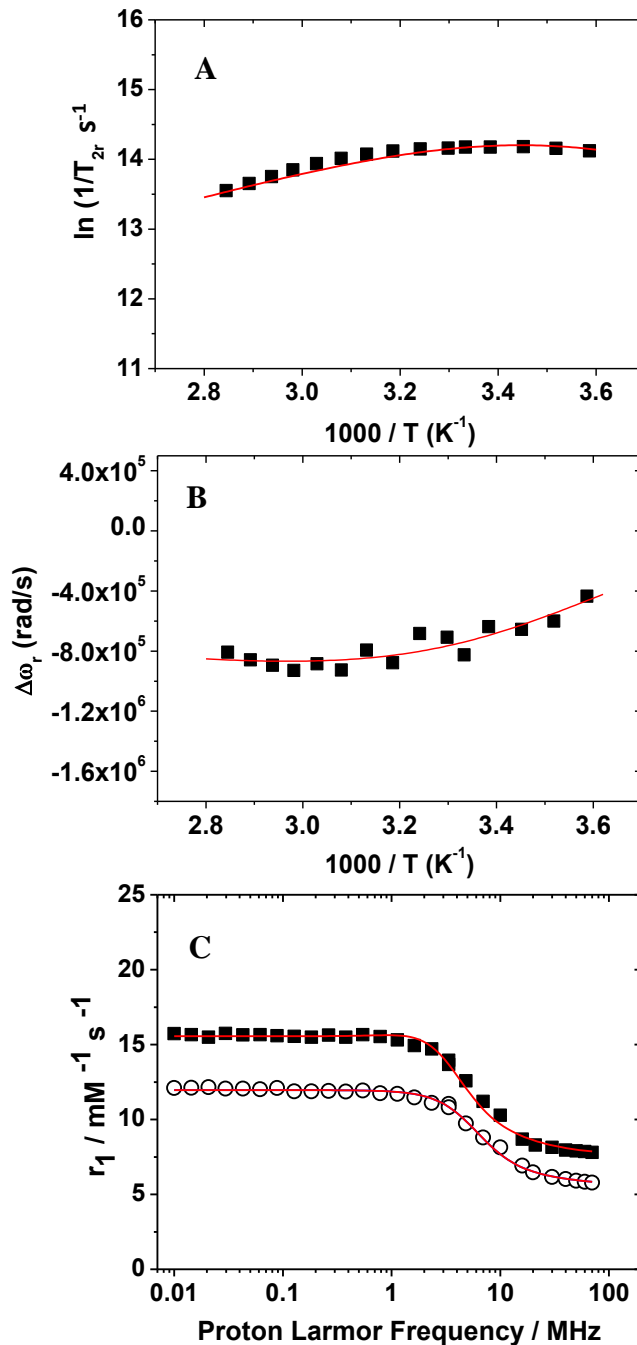
IV.6.2. ábra A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex relaxivitasának hőmérséklet függése (pH=7,0, 20 MHz)

A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ relaxivitas a gyors vízcseresebességgel rendelkező $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$, $[\text{Gd}(\text{DO3A})(\text{H}_2\text{O})_2]$ és $[\text{Gd}(\text{PCTA})(\text{H}_2\text{O})_2]$ komplexekhez hasonlóan exponenciálisan csökken a hőmérséklet növekedésével.^{32,115} A relaxivitas értékek hőmérséklet növekedésével bekövetkező monoton csökkenését a belső (r_{1p}^{is}) (csökken a vízmolekulák átlagos tartózkodási ideje a belső koordinációs szférában) és külső szférás (r_{1p}^{os}) (nő a külső szférában tartózkodó vízmolekulák transzlációs diffúziójának sebessége) hozzájárulások együttes csökkenésével értelmezik.^{32,115,118,119} Ezek alapján feltételezhető, hogy a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplexben a Gd^{3+} -ionhoz közvetlenül koordinálódó két vízmolekula átlagos tartózkodási ideje (τ_m) a belső koordinációs szférában kicsi, így a hőmérséklet növekedésével a vízcseré további gyorsulása csökkenti a Gd(III)-komplexek belső szférás hozzájárulását a teljes relaxivitáshoz.

A Gd(III)-komplexek relaxivitása belső szférás hozzájárulását a Gd(III)-ionhoz koordinált vízmolekulák száma (q), cseresebessége (k_{ex}) és a belső szférás vízprotonok relaxációs ideje (T_{1m}^H) befolyásolja (II.3.1 egyenlet). A Gd(III)-komplexek vízcsere folyamatai $^{17}\text{OH}_2$ jelenlétében ^{17}O -NMR spektroszkópiás módszerrel közvetlenül tanulmányozhatóak.

A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex esetében mért redukált relaxációssebességek logaritmusát és a kémiai eltolódás értékeit az $1/T$ függvényében, valamint a 0,01 – 70 MHz tartományban 298 és 310 K meghatározott relaxivitas értékeket IV.6.3 ábrán mutatjuk be.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátságainak vizsgálata



IV.6.3. ábra Redukált ^{17}O transzverzális relaxációs sebességek (A), redukált kémiai eltolódás értékek 11,75 T térerősségnél (B) és $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ relaxivitásának térerőfüggése 298 (■) és 310 K (○) hőmérsékleten. ($[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^- = 20 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7,0$)

A változtatott hőmérsékletű ^{17}O -NMR mérési eredményekből számolt $1/T_{2r}$ és $\Delta\omega_r$ értékeket, valamint a 298 és 310 K-en változtatott térerőnél meghatározott r_1 értékeket a függelékben feltüntetett F.1 – 13. egyenletek alapján a II.3.2 (r_{1p}^{2nd} hozzájárulása nélkül) és II.3.3 egyenletek figyelembe vételével egyidejűleg illesztettük a következő paramétereket számítva: k_{ex}^{298} , $\Delta H_M^\#$, A/\hbar , τ_R^{298} , τ_V^{298} és Δ^2 . A számítások során a belső szférás vízmolekulák számát ($q=2$), a Gd^{3+} -ion és a belső szférás vízprotonok távolságát ($r_{\text{GdH}}=3,1 \text{ \AA}$), a Gd^{3+} -ion és a külső szférás vízmolekula protonok távolságát ($a_{\text{GdH}}=4 \text{ \AA}$) és a vízmolekula 298 K és 310 K-re vonatkozó diffúziós állandóját (298K: $D=2,24 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, 310 K: $3,1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) nem illesztettük. Az illesztésekhez figyelembe kellett vennünk a ZFS változását és rotációs mozgást jellemző aktiválási entalpiákat, melyeket $\Delta H_V^\# = 1,0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ és $\Delta H_R^\#=1,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ értékekre rögzítettünk.¹¹⁷ Az illesztett görbék IV.6.3. ábrán láthatóak. A számított paramétereket a IV.6.1 táblázatban tüntettük fel.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

IV.6.1. táblázat. A ^{17}O -NMR spektroszkópiás és NMRD adatok együttes illesztése során a Gd(III)-komplexek relaxációs sajátosságait befolyásoló paraméterekre kapott értékek

| Paraméterek | Gd(CyAAZTA) | Gd(AAZTA) ^[a] | Gd(DO3A) ^[b] | Gd(PCTA) ^[b] |
|--|-------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| $^{20}r_1^{298}$ (mM ⁻¹ s ⁻¹) | 8,3 | 7,1 | 6,0 | 6,9 |
| Δ^2 (10 ¹⁹ s ⁻²) | 1,0±0,1 | 2,2 | 4,6 | 5,9 |
| τ_v^{298} (ps) | 59±4 | 31 | 14 | 15 |
| k_{ex}^{298} (10 ⁶ s ⁻¹) | 9,1±0,5 | 11,1 | 6,4 | 14,3 |
| τ_R^{298} (ps) | 97±4 | 74 | 66 | 70 |
| Q | 2* | 2 | 1,9 | 2 |
| r (Å) | 3,10* | 3,10 | 3,15 | 3,10 |
| ΔH_v (kJ/mol) | 1,0* | - | 1,7 | 3,6 |
| $\Delta H_M^\#$ (kJ/mol) | 27,8±0,6 | - | 44 | 45 |
| A/\hbar (10 ⁶ rad/s) | -3,8±0,2 | -3,8 | -3,8 | -3,8 |

^[a] Ref.32; ^[b] Ref. 115 * rögzített érték

A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex ^{17}O -NMR spektroszkópiás vizsgálatai során azt tapasztaltuk, hogy alacsony hőmérsékleteken ^{17}O transzverzális relaxációs sebességek ($1/T_{2r}$) nőnek a hőmérséklet növekedésével (IV.6.3A ábra), ami jelzi, hogy a rendszer a lassú csere tartományában van, ahol a $1/T_{2r}$ értékét a vízcseré sebesség határozza meg. Magasabb hőmérsékleteken ($1/T_{2r}$ értékek maximuma 290 K körül található) a ^{17}O transzverzális relaxációs sebességek csökkennek a hőmérséklet növekedésével, ami utal a gyors csere tartományra és a $1/T_{2m}$ értékek meghatározó szerepére. A $1/T_{2m}$ értékeket a belső szférás vízmolekulák cseresebessége ($k_{ex}=1/\tau_m$), a longitudinális elektron relaxációs idő ($1/T_{1e}$) és a hiperfinom csatolási állandó (A/\hbar) határozza meg. A A/\hbar értékét a Gd³⁺-ion spinsűrűsége adja meg a ^{17}O mag körül. A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex IV.6.1 táblázatban feltüntetett A/\hbar értéke ($A/\hbar=-3,8\times 10^6$ rad/s) jó egyezést mutat a korábban tanulmányozott $q=2$ Gd(AAZTA)⁻, Gd(PCTA) és

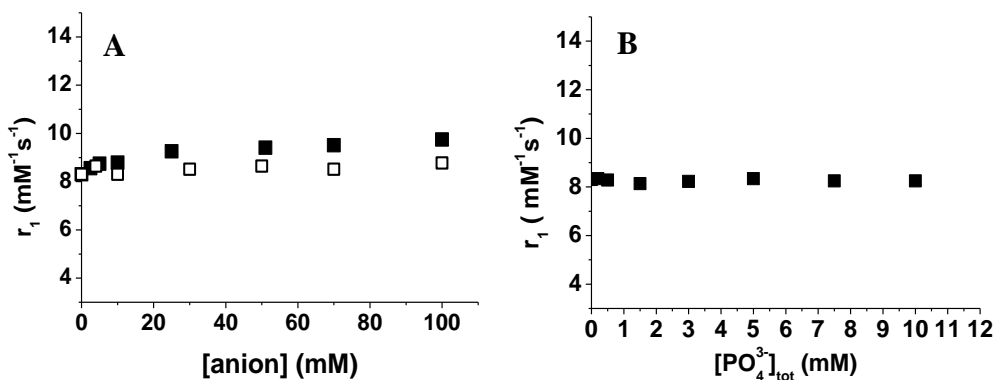
Gd(DO3A) komplexek hiperfinom csatolási állandó értékeivel. A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex belső szférás vízmolekuláinak cseresebessége ($k_{\text{ex}}=9,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) némileg kisebb, mint a $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplexé ($k_{\text{ex}}=11,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$), ami meglepő, mivel más ciklohexil csoportot tartalmazó q=2 Gd(III)-komplexek vízcseresebessége nagyobb az analóg, de ciklohexil csoportot nem tartalmazó Gd(III)-komplexekhez képest ($[\text{Gd}(\text{CyPCTA})(\text{H}_2\text{O})_2]$: $k_{\text{ex}}=29,4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, 310 K).¹²⁴ A $[\text{Gd}(\text{CyPCTA})(\text{H}_2\text{O})_2]$ gyorsabb vícsere folyamatait a Gd^{3+} -ion belső szférájának túlsúfoltságával értelmezik.¹²⁴ Ezzel szemben a ciklohexil csoport gyakorlatilag nem befolyásolja a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex vízcserefolyamatait, így megállapítható, hogy a ciklohexil gyűrű pozíciója nem változtatja meg a belső szférás vízmolekulák térbeli elhelyezkedését.

A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ 298 és 310 K-en kapott NMRD görbéi (IV.6.3C ábra) alacsony (<1 MHz) és nagyobb (>20 MHz) térerőknél plátóval rendelkeznek, míg 4 - 8 MHz közötti tartományban egy diszperzió figyelhető meg. Az NMRD görbék említett tulajdonságai tipikusak a kis molekulatömegű Gd(III)-komplexekre, amelyek rövid rotációs korrelációs idővel jellemezhetőek ($\tau_R < 0,1 \text{ ns}$).²⁴ A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ 298 K-en kapott NMRD görbéjének illesztésével számított rotációs korrelációs idő $\tau_R^{298}=97 \text{ ps}$, ami közel 30 %-kal nagyobb, mint a $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ τ_R^{298} értéke ($\tau_R^{298}=74 \text{ ps}$). A ciklohexil csoport jelenléte és CyAAZTA ligandum nagyobb molekulatömege eredményezi a Gd(III)-komplex lassabb rotációs mozgását, ami egyuttal megnöveli a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ relaxitását ($[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$: ${}^{20}r_1^{298}=8,3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$: ${}^{20}r_1^{298}=7,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ 310 K-en kapott NMRD görbéjének illesztésével számított relaxációs paraméterek: ${}^{20}r_1^{310} = 7,9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\Delta^2 = (2,6 \pm 0,2) \times 10^{19} \text{ s}^{-2}$; $\tau_V = 28 \pm 2 \text{ ps}$; $k_{\text{ex}} = (14,5 \pm 0,3) \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ és $\tau_R = 63 \pm 1 \text{ ps}$. A IV.6.1 táblázatban szereplő elektron relaxációt jellemző

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

paraméterek (Δ^2 és τ_v) kevésbé megbízhatóak, de értékeik nem térnek el jelentősen a korábban vizsgált $q=2$ Gd(III)-komplexek megfelelő értékeitől.

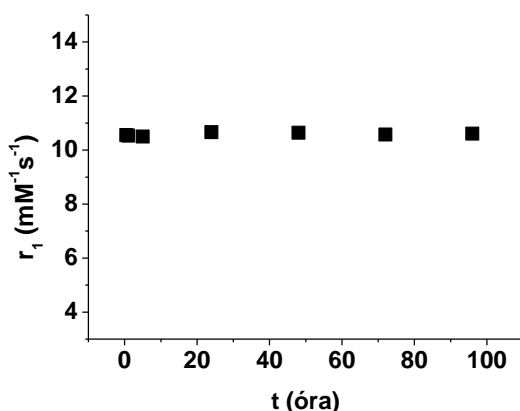
A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex kisméretű endogén ligandumokkal kialakított kölcsönhatásait laktát-, citrát- és foszfátonok jelenlétében végzett ^1H -NMR relaxometriás vizsgálatokkal tanulmányoztuk. A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ különböző koncentrációjú laktát, citrát és foszfát oldatokban mért relaxivitás értékei a IV.6.4 ábrán láthatóak.



IV.6.4. ábra A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ relaxivitása a [citrát] és [laktát] (A), valamint $[\text{PO}_4^{3-}]_{\text{tot}}$ (B) függvényében ($[\text{GdL}]=1,0$ mM, citrát (□), laktát (■), pH=7,4, 0,15 M NaCl, 25°C)

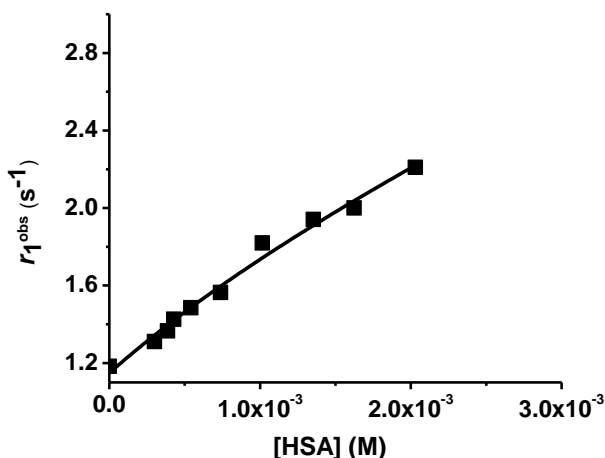
A IV.6.4. ábrán feltüntetett adatok alapján a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ relaxivitása a $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplexekhez hasonlóan változatlan marad különféle endogén ligandumok jelenlétében, amely alapján megállapítható, hogy a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ belső szférájában található két vízmolekula nem helyettesíthető különféle két és háromfogú ligandumokkal.

A fiziológias feltételekhez közeledve tanulmányoztuk a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ stabilitását SeronormTM-ban.



IV.6.5. ábra A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ különböző időközönként mért relaxivitása SeronormTM-ban (20 MHz, 298 K)

A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex SeronormTM-ban mért relaxivitása (IV.6.5. ábra) nem változik az idő elteltével, ami egyértelműen bizonyítja a Gd(III)-komplex stabilitását fiziológiához közeli feltételek mellett. Fontos megemlíteni, hogy $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ relaxivitása ${}^{20}r_1^{298}=10,5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ SeronormTM-ban, ami 25%-kal nagyobb, mint vizes oldatban (${}^{20}r_1^{298}=8,3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). A nagyobb relaxitás a Gd(III)-komplex ciklohexil csoportja és a **H**uman **S**zérum **A**lbumin (HSA) között kialakuló gyenge kölcsönhatás és a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ - HSA adduktum nagyobb relaxitásának eredménye (a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ - HSA adduktum rotációs korrelációs ideje lényegesen nagyobb $\tau_R \sim 1 \text{ ns}$). A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex és HSA közötti kölcsönhatás kimutatására tanulmányoztuk a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex relaxitását növekvő HSA koncentráció mellett.¹²⁵ A kapott relaxitás értékei a IV.6.6. ábrán láthatóak.



IV.6.6. ábra A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex HSA oldatokban mért relaxivitása ($[\text{GdL}] = 0.097 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7,4$, 20 MHz , $0,15 \text{ M NaCl}$, 25°C)

A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex relaxitás értékei telítési görbe szerint nőnek a HSA koncentrációs növekedésével a képződő $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ - HSA adduktum nagyobb relaxivitása miatt. Az adduktum képződése a következő egyensúlyi folyamattal és egyensúlyi állandóval jellemezhető:



$$K_a = \frac{[\text{GdL-HSA}]}{[\text{GdL}][\text{HSA}]}$$

Figyelembe véve a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ és a HSA teljes koncentrációját ($[\text{GdL}]_t = [\text{GdL}] + [\text{GdL-HSA}]$, és $[\text{HSA}]_t = [\text{HSA}] + [\text{GdL-HSA}]$), a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ - HSA adduktum koncentrációja a következő egyenlettel fejezhető ki:

$$[\text{GdL-HSA}] = \frac{K_a[\text{GdL}]_t + K_a[\text{HSA}]_t + 1 - \sqrt{(K_a[\text{GdL}]_t + K_a[\text{HSA}]_t + 1)^2 - 4K_a^2[\text{GdL}]_t[\text{HSA}]_t}}{2K_a} \quad \text{IV.6.15}$$

Adott HSA koncentrációnál a mért relaxitás moláris értékei megadhatók a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex, $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ - HSA adduktum és a diamágneses hozzájárulások összegeként:

$$r_1^{\text{obs}} = r_{1b}[\text{GdL-HSA}] \times 1000 + r_1[\text{GdL}] \times 1000 + r_1^{\text{HSA}} \quad \text{IV.6.16}$$

ahol r_1 , r_{1b} és r_1^{HSA} a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex, $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ - HSA adduktum és HSA oldat relaxivitása. Az r_1^{HSA} értékeket a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex távollétében azonos koncentrációjú HSA oldat relaxitásának mérésével határoztuk meg. A IV.6.15. és a IV.6.16. egyenletek egyesítésével a IV.6.17. egyenletet kapjuk, amelyre illesztve a $r_1^{\text{obs}} - [\text{HSA}]$ adatpárokat számítottuk a r_{1b} és K_a paramétereket (számítások során a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ komplex relaxitását rögzítettük, $r_1 = 8.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ - HSA rendszer illesztett görbéje a IV.6.6. ábrán látható.

$$r_1^{\text{obs}} = \frac{K_a[\text{GdL}]_t + K_a[\text{HSA}]_t + 1 - \sqrt{(K_a[\text{GdL}]_t + K_a[\text{HSA}]_t + 1)^2 - 4K_a^2[\text{GdL}]_t[\text{HSA}]_t}}{2K_a} \times \text{IV.6.17} \\ \times (r_{1b} - r_1) \times 1000 + r_1 \times [\text{GdL}]_t \times 1000 + r_1^{\text{HSA}}$$

A számítások során a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ - HSA adduktum relaxitására és stabilitási állandójára kapott értékek: $r_{1b} = 18 \pm 2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $K_a = 400 \pm 100 \text{ M}^{-1}$. A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ - HSA adduktum stabilitási állandójára kapott érték $K_a = 420 \pm 100 \text{ M}^{-1}$ közel megegyezik az aromás oldalláncot tartalmazó $\text{Gd}(\text{BOPTA})^{2-}$ és $\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})^{2-}$ komplexek HSA-val alkotott adduktumainak stabilitási állandóival ($\text{Gd}(\text{BOPTA})^{2-}$: $K_a = 400 \text{ M}^{-1}$, és $\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})^{2-}$: $K_a = 240 \text{ M}^{-1}$).³⁸

IV.7. A Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok hatása a lineáris Gd^{3+} -alapú MRI kontrasztanyag kinetikai inertségére

Az utóbbi években az NSF megbetegedések felismerése tette szükségessé a Gd^{3+} -alapú MRI kontrasztanyagok alkalmazása és az NSF kialakulása közötti kapcsolat felderítését. A legújabb vizsgálatok eredményei szerint többszöri Gd^{3+} -alapú kontrasztanyaggal végzett MRI vizsgálatot követően

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

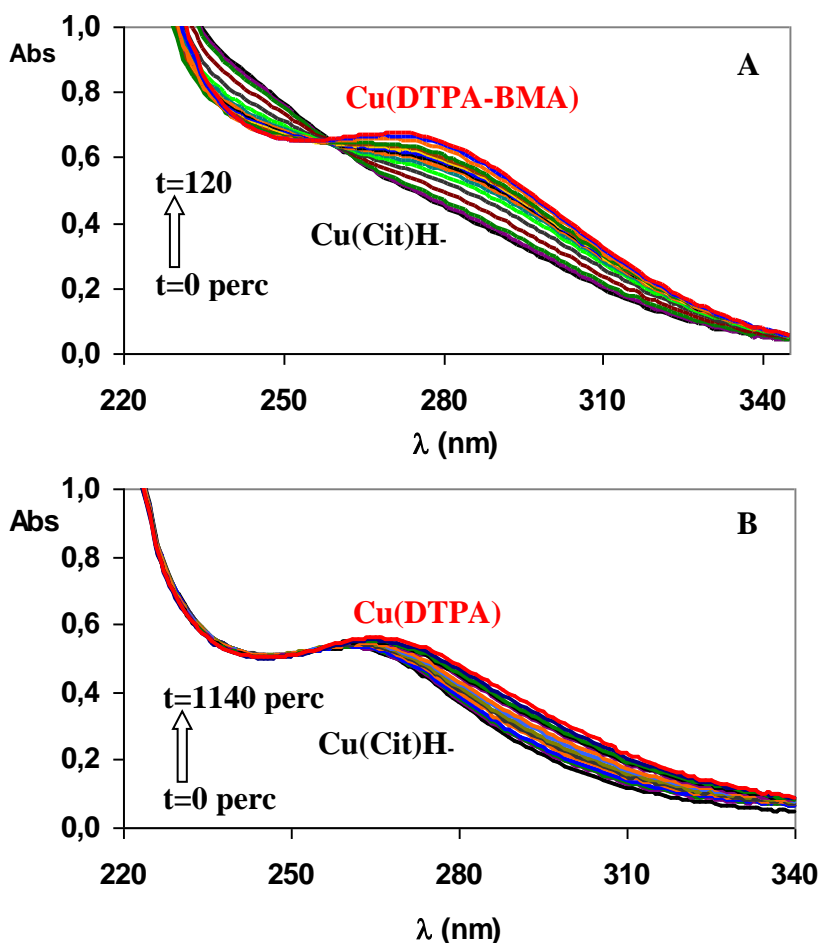
gadolinium felhalmozódást észleltek olyan betegek csontjaiban, szervezetében és agyában is, akik normális vesefunkcióval rendelkeztek.¹²⁶ A Gd^{3+} -ion élő szervezetben való felhalmozódását lényegesen befolyásolják a Gd(III)-komplexek *in vivo* fizikai-kémiai és farmakokinetikai sajátosságai. Csoportunkban részletesen tanulmányozták hét klinikai gyakorlatban alkalmazott MRI kontrasztanyag egyensúlyi és kinetikai sajátosságait fiziológiához közeli feltételek mellett (0.15 M NaCl, 37°C).^{53,50} A meghatározott egyensúlyi adatokkal egy egyszerűsített plazma modell felhasználásával számolt egyensúlyi részecske eloszlás szerint bekövetkezhet a Gd(III)-komplexek disszociációja főként a $Gd(PO_4)$ csapadék nagyon kis oldékonysága miatt (25°C: $\log K_{sp} = -20,96$; 37°C: $\log K_{sp} = -20,53$),⁵⁰ míg a felszabaduló aminopolikarboxilát ligandumok Zn(II)-, Cu(II)- és Ca(II)-komplexeket képeznek. A számítások eredményei egyensúlyi rendszerekre vonatkoztak, de az MRI vizsgálatok során az élő szervezetben általában nincs lehetőség az egyensúly beállítására a Gd(III)-komplexek vesén keresztüli gyors kiürülése miatt.^{127,128} Ezzel szemben, ha a Gd(III)-komplexek disszociációs reakcióinak sebessége összemérhető a kiürülés sebességével, akkor a Gd(III)-komplexek disszociációja számottevő mértékben lejátszódhat a Gd^{3+} -ionok egyensúlyhoz közeli mennyiségének felszabadulásával. A testfolyadékok nagyon komplex összetétele miatt a Gd(III)-komplexek különféle ligandum és fémioncsere reakciókban vehetnek részt endogén ligandumokkal (aminosavak, peptidek, fehérjék, stb.) és fémionokkal (Zn^{2+} , Cu^{2+} és Fe^{3+}). Fiziológiához közeli feltételek mellett a $Gd(DTPA)^{2-}$ származékok ligandum és fémioncsere reakciói a Gd(III)-komplexek sav és a kis endogén ligandumok (citrát, foszfát és karbonát) által katalizált disszociációs reakcióival játszódnak le, döntően vegyes ligandumú komplexek ($Gd(DTPA)X$: $X = Cit^{3-}$, $HCit^{2-}$, $H_2PO_4^-$, HCO_3^- , CO_3^{2-}) képződésén keresztül.^{53,50} Mivel a különféle testfolyadékokban található

szabad Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok koncentrációja viszonylag nagy ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{szabad}}=1.2$ mM, $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{szabad}}=0,5$ mM)⁵⁴ a $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$ és származékaik kis stabilitású kétmagvú komplexeket képezhetnek a Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionokkal, amelyek befolyásolhatják a $\text{Gd}(\text{III})$ -komplexek disszociációs sebességét. Ezért tanulmányoztuk a $\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})$, $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$, $\text{Gd}(\text{BOPTA})^{2-}$ és $\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})^{2-}$ komplexek Cu^{2+} -ionokkal lejátszódó fémioncsere reakcióit (IV.7.1 egyenlet) Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok jelenlétében UV-látható spektrofotometriás módszerrel a képződő $\text{Cu}(\text{II})$ -komplexek abszorpciós sávján (300 nm) fiziológiához közeli feltételek mellett (pH=7,0 és 7,5, 0,15 M NaCl, 25 és 37°C). A méréseket citrát, mint segédligandum alkalmazása mellett végeztük a kicserélő Cu^{2+} és a felszabaduló Gd^{3+} -ionok hidrolízisének elkerülése érdekében. A $\text{Gd}(\text{DTPA-BMA}) - \text{Cu}(\text{Cit})$ és $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-} - \text{Cu}(\text{Cit})$ rendszerek különböző időközönként felvett abszorpciós spektrumai a IV.7.1 ábrán láthatóak. A fémioncsere reakciók az alábbi általános egyenlettel adhatók meg:



ahol $\text{M}^{2+}=\text{Ca}^{2+}$ vagy Mg^{2+} , $\text{L}=\text{DTPA-BMA}$, DTPA , BOPTA és EOB-DTPA . Az alkalmazott kísérleti körülmények mellett a Cu^{2+} -ionok $\text{Cu}(\text{Cit})\text{H}_{-1}$, míg a Gd^{3+} -ionok $\text{Gd}(\text{Cit})\text{H}_{-1}$ és $\text{Gd}(\text{Cit})_2$ komplexek formájában vannak jelen ($[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}}=0.2$ mM, $[\text{Cit}]_{\text{tot}}=0.5$ mM, pH=7 és 7,5, 0.15 M NaCl, 25 és 37°C).⁵⁵

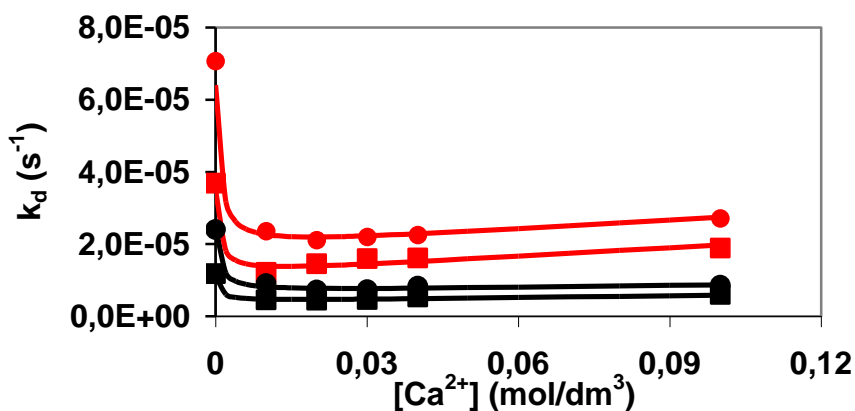
Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata



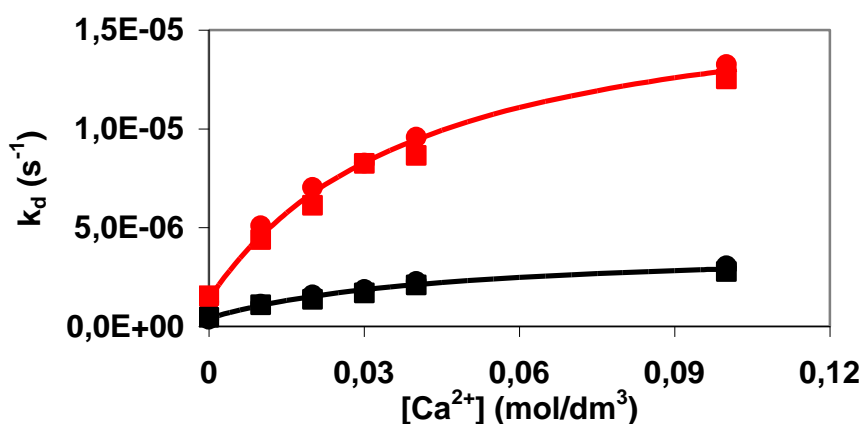
IV.7.1. ábra A $\text{Gd(DTPA-BMA)} - \text{Cu(Cit)}$ (A) és a $\text{Gd(DTPA)}^{2-} - \text{Cu(Cit)}$ (B) rendszerek különböző időközönként felvett abszorpciós spektrumai ($[\text{Gd(DTPA-BMA)}] = [\text{Gd(DTPA)}^{2-}] = 2,0 \text{ mM}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 0,2 \text{ mM}$, $[\text{Cit}] = 0,5 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7,0$, $0,15 \text{ M NaCl}$, 25°C)

A kicserélődési reakciók sebességét pszeudo-elsőrendű körülmények között tanulmányoztuk, amelyet a GdL komplex feleslegének alkalmazásával értük el ($[\text{GdL}]_{\text{tot}}/[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 10$). Ilyen feltételek mellett a fémioncsere reakciók sebessége a III.3.6. egyenlettel adható meg. A fémioncsere reakciókra jellemző k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat a III.3.8 egyenlettel számítottuk, figyelembe véve a Cu(Cit)H- , Cu(DTPA-BMA)^- , Cu(DTPA)^{3-} , Cu(BOPTA)^{3-} és Cu(EOB-DTPA)^{3-} komplexek 300 nm-re

vonatkozó moláris abszorbanciáit ($\varepsilon_{\text{Cu}(\text{Cit})\text{H-1}}=921 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{\text{Cu}(\text{DTPA-BMA})}=3293 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{\text{Cu}(\text{DTPA})}=3969 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{\text{Cu}(\text{BOPTA})}=3797 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{\text{Cu}(\text{EOB-DTPA})}=4121 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Előzetes vizsgálataink alapján a $\text{Cu}(\text{Cit})\text{H-1}$, $\text{Cu}(\text{DTPA-BMA})^-$, $\text{Cu}(\text{DTPA})^{3-}$ és $\text{Cu}(\text{BOPTA})^{3-}$ komplexek moláris abszorbanciái 25 és 37°C-on megegyeznek. Az adott körülményekre meghatározott k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat IV.7.2 - 5 ábrákon tüntettük fel a $[\text{Ca}^{2+}]$ függvényében.

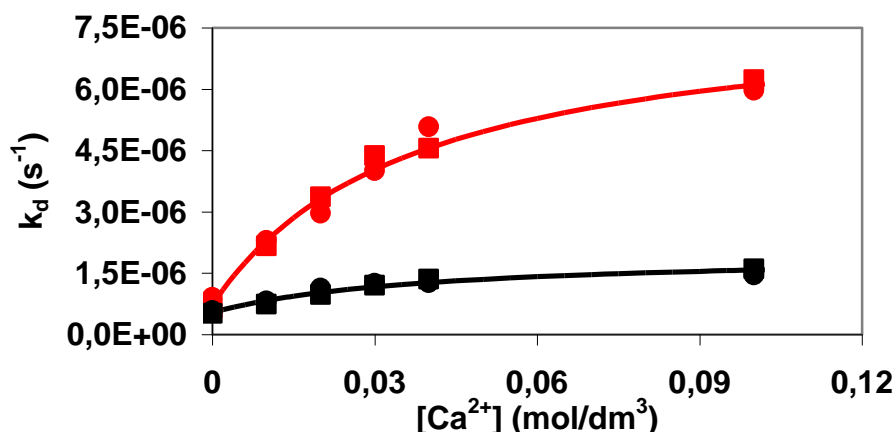


IV.7.2. ábra. A Ca^{2+} -ionok hatása a $\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})$ disszociációjának sebességére (k_d) ($[\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})]=2,0 \text{ mM}$, $[\text{Cu}^{2+}]=0,2 \text{ mM}$, $[\text{Cit}]=0,5 \text{ mM}$, $\text{pH}=7,0$ (●,●) és $7,5$ (■,■), 25°C és 37°C -on, $0,15 \text{ M NaCl}$)

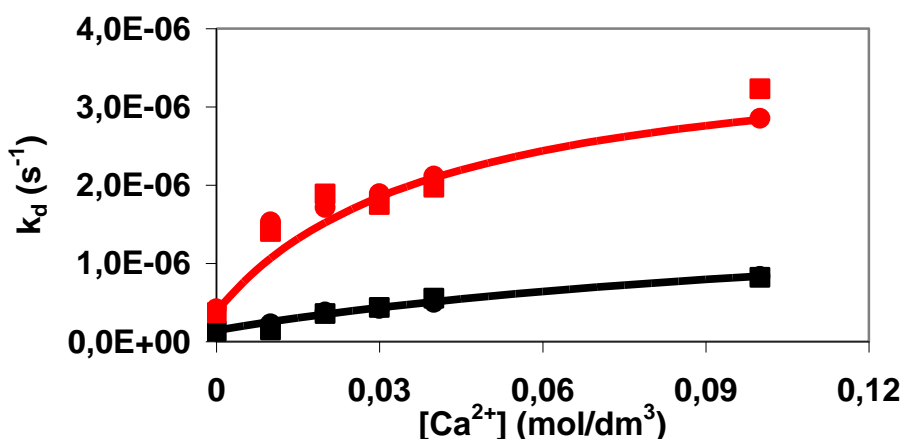


IV.7.3. ábra. A Ca^{2+} -ionok hatása a $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$ disszociációjának sebességére (k_d) ($[\text{Gd}(\text{DTPA})]=2,0 \text{ mM}$, $[\text{Cu}^{2+}]=0,2 \text{ mM}$, $[\text{Cit}]=0,5 \text{ mM}$, $\text{pH}=7,0$ (●,●) és $7,5$ (■,■), 25°C és 37°C -on, $0,15 \text{ M NaCl}$)

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata



IV.7.4. ábra. A Ca²⁺-ionok hatása a Gd(BOPTA)²⁻ disszociációjának sebességére (k_d) ([Gd(BOPTA)]=2,0 mM, [Cu²⁺]=0,2 mM, [Cit]=0,5 mM, pH=7,0 (●,●) és 7,5 (■,■), 25°C és 37°C-on, 0,15 M NaCl)



IV.7.5. ábra. A Ca²⁺-ionok hatása a Gd(EOB-DTPA)²⁻ disszociációjának sebességére (k_d) ([Gd(BOPTA)]=2,0 mM, [Cu²⁺]=0,2 mM, [Cit]=0,5 mM, pH=7,0 (●,●) és 7,5 (■,■), 25°C és 37°C-on, 0,15 M NaCl)

A Gd(DTPA-BMA) és Cu²⁺-ionok közötti cserereakció sebessége csak kis mértékben növekszik a Ca²⁺ koncentrációjának növekedésével a [Ca²⁺]=0,01 – 1,0 M tartományban (IV.7.2 ábra), amely alapján megállapíthatjuk, hogy a Ca²⁺ gyakorlatilag nem befolyásolja a fémioncsere reakciók sebességét a Gd(DTPA-BMA) esetében. A Ca²⁺-ionok távollétében meghatározott k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandók nagyobbak, mivel Ca(Cit) komplex ($\log K_{Ca(Cit)}=4,91$)⁵⁵ képződik a jelen lévő citráttal csökkentve annak szabad

mennyiségét, ezáltal a Gd(DTPA-BMA) komplex Cit³⁻ és HCit²⁻ asszisztált disszociáció mértékét (IV.7.2 ábra). A kinetikai vizsgálatok során pH=7,0 esetén a k_d sebességi állandók valamelyest nagyobbak, mint a pH=7,5-ön kapottak, mivel pH=7,0-en a [H⁺] és [HCit²⁻] értékek nagyobbak, így a Gd(DTPA-BMA) komplex sav és HCit²⁻ katalizált disszociációja gyorsabban játszódik le.

A Gd(DTPA)²⁻, Gd(BOPTA)²⁻ és Gd(EOB-DTPA)²⁻ komplexek disszociációjának sebessége a [Ca²⁺] növekedésével nő (IV.7.3 - IV.7.5. ábrák). A disszociáció sebességét jellemző k_d állandók telítési görbe szerint változnak a [Ca²⁺] függvényében. Ca²⁺-ionok távollétében a Gd(DTPA)²⁻, Gd(BOPTA)²⁻ és a Gd(EOB-DTPA)²⁻ komplexek disszociációja H⁺, Cit³⁻ és HCit²⁻ katalizált úton játszódik le, míg k_d sebességi állandók Ca²⁺-ionok jelenlétében történő növekedése arra utal, hogy a disszociáció megvalósulhat Ca²⁺ katalizált úton is. Figyelembe véve a komplexek H⁺ ($k_1[\text{GdL}]$), Cit³⁻ ($k_{\text{Cit}}[\text{GdL}]$), HCit²⁻ ($k_{\text{HCit}}[\text{GdL}]$) és Ca²⁺ ($k_3^{\text{Ca}}[\text{GdL}]$) asszisztált disszociációját jellemző reakcióutakat, a Gd(III)-komplexek disszociációjának sebessége citrát és Ca²⁺-ionok jelenlétében a következő egyenlettel adható meg:

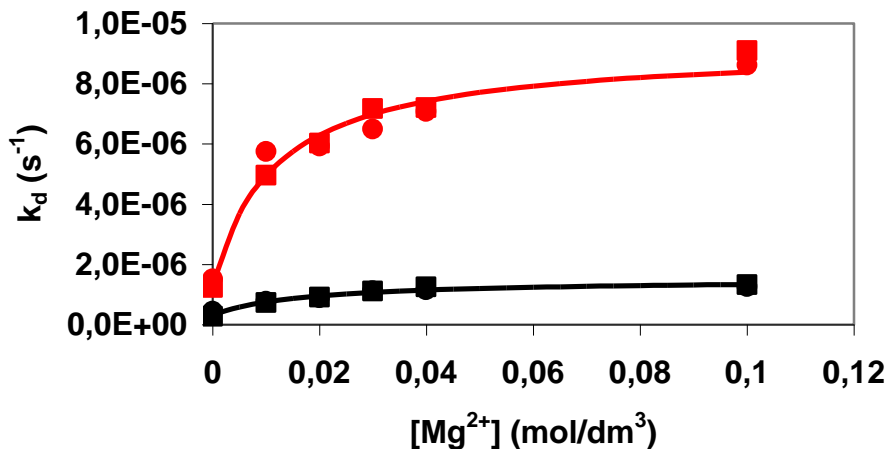
$$-\frac{d[\text{GdL}]_t}{dt} = (k_1[\text{H}^+] + k_{\text{Cit}}[\text{Cit}^{3-}] + k_{\text{HCit}}[\text{HCit}^{2-}] + k_3^{\text{Ca}}[\text{Ca}^{2+}])[\text{GdL}] \quad \text{IV.7.1}$$

ahol k_1 , k_{Cit} , k_{HCit} és k_3^{Ca} a Gd(III)-komplexek H⁺, Cit³⁻, HCit²⁻ és Ca²⁺ által katalizált disszociációját jellemző sebességi állandók.

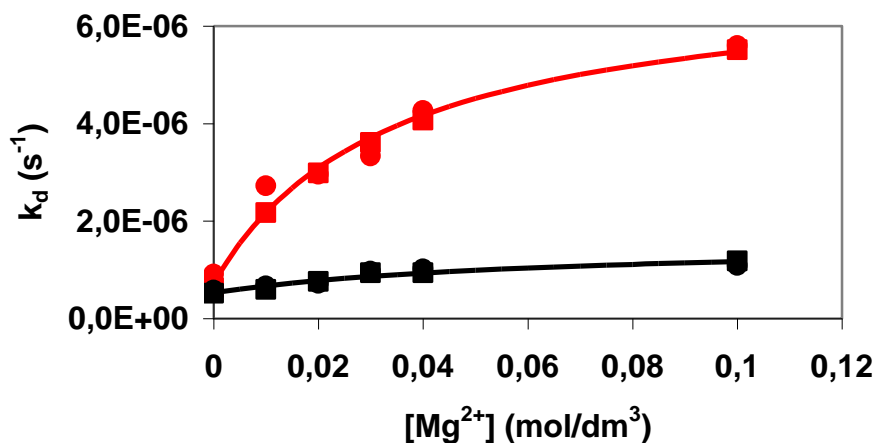
A Mg²⁺-ion hatását a Gd³⁺-komplexek Cu²⁺-ionnal lejátszódó cserereakciói sebességére Ca²⁺-ionéhoz hasonló módon tanulmányoztuk. Előkísérleteink alapján a Gd(DTPA-BMA) és a Cu²⁺ között citrát jelenlétében lejátszódó cserereakció sebességére a Ca²⁺-hoz hasonlóan a Mg²⁺-ionoknak nincs hatása. A Gd(DTPA)²⁻, Gd(BOPTA)²⁻ és Gd(EOB-DTPA)²⁻ komplexek Cu²⁺-ionnal citrát és Mg²⁺-ionok jelenlétében lejátszódó cserereakcióit jellemző k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat az UV-

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

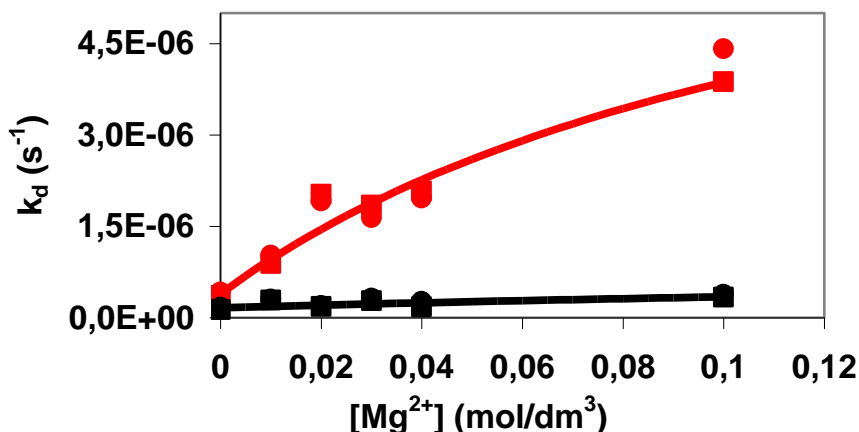
látható spektrofotometriás adatokból a III.3.8 egyenlettel számítottuk. A meghatározott k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat IV.7.6 - 8 ábrákon tüntettük fel a $[Mg^{2+}]$ függvényében.



IV.7.6. ábra. A Mg^{2+} -ionok hatása a $Gd(DTPA)^{2-}$ disszociációjának sebességére (k_d) ($[Gd(DTPA)] = 2,0$ mM, $[Cu^{2+}] = 0,2$ mM, $[Cit] = 0,5$ mM, pH=7,0 (●, ●) és 7,5 (■, ■), 25°C és 37°C-on, 0,15 M NaCl)



IV.7.7. ábra. A Mg^{2+} -ionok hatása a $Gd(BOPTA)^{2-}$ disszociációjának sebességére (k_d) ($[Gd(BOPTA)] = 2,0$ mM, $[Cu^{2+}] = 0,2$ mM, $[Cit] = 0,5$ mM, pH=7,0 (●, ●) és 7,5 (■, ■), 25°C és 37°C-on, 0,15 M NaCl)

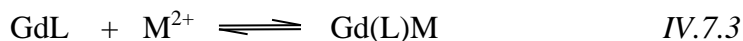


IV.7.8. ábra. A Mg²⁺-ionok hatása a Gd(BOPTA)²⁻ disszociációjának sebességére (k_d) ([Gd(BOPTA)]=2,0 mM, [Cu²⁺]=0,2 mM, [Cit]=0,5 mM, pH=7,0 (●,●) és 7,5 (■,■), 25°C és 37°C-on, 0,15 M NaCl)

A Gd(DTPA)²⁻, Gd(BOPTA)²⁻ és Gd(EOB-DTPA)²⁻ komplexek Cu²⁺-ionokkal citrát- és Mg²⁺-ionok jelenlétében lejátszódó cserereakcióik sebessége a Ca²⁺ jelenlétében tapasztaltakhoz hasonlóan telítési görbe szerint nő a [Mg²⁺] növekedésével. Figyelembe véve a Gd(III)-komplexek Mg²⁺-ionok által katalizált disszociációját jellemző reakciót ($k_3^{\text{Mg}}[\text{GdL}]$), a komplexek disszociációjának sebessége citrát és Mg²⁺-ionok jelenlétében a következő egyenlettel adható meg:

$$-\frac{d[\text{GdL}]_t}{dt} = (k_1[\text{H}^+] + k_{\text{cit}}[\text{Cit}^{3-}] + k_{\text{HCit}}[\text{HCit}^{2-}] + k_3^{\text{Mg}}[\text{Mg}^{2+}])[\text{GdL}] \quad \text{IV.7.2}$$

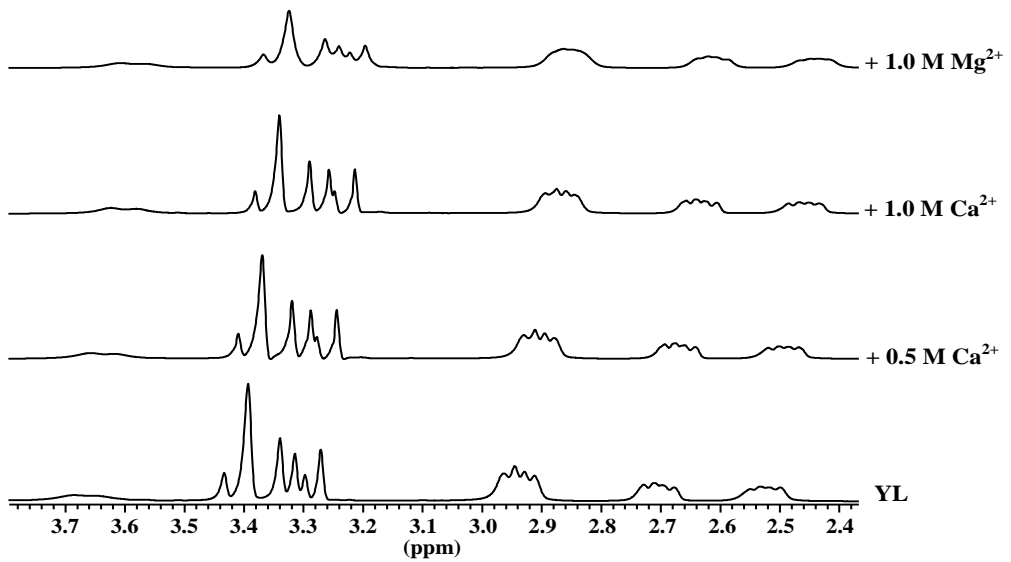
ahol k_3^{Mg} a Gd(DTPA)²⁻, Gd(BOPTA)²⁻ és Gd(EOB-DTPA)²⁻ komplexek Mg²⁺ által katalizált disszociációját jellemző sebességi állandó. A Gd(III)-komplexek Ca²⁺- és Mg²⁺-ionok jelenlétében lejátszódó disszociációja feltételezhetően egy vegyes, kétmagvú Gd(L)M komplex (M= Ca(II) és Mg(II)) képződésén keresztül játszódik le. A kétmagvú komplex stabilitása a IV.7.3 egyenlettel adható meg:



Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

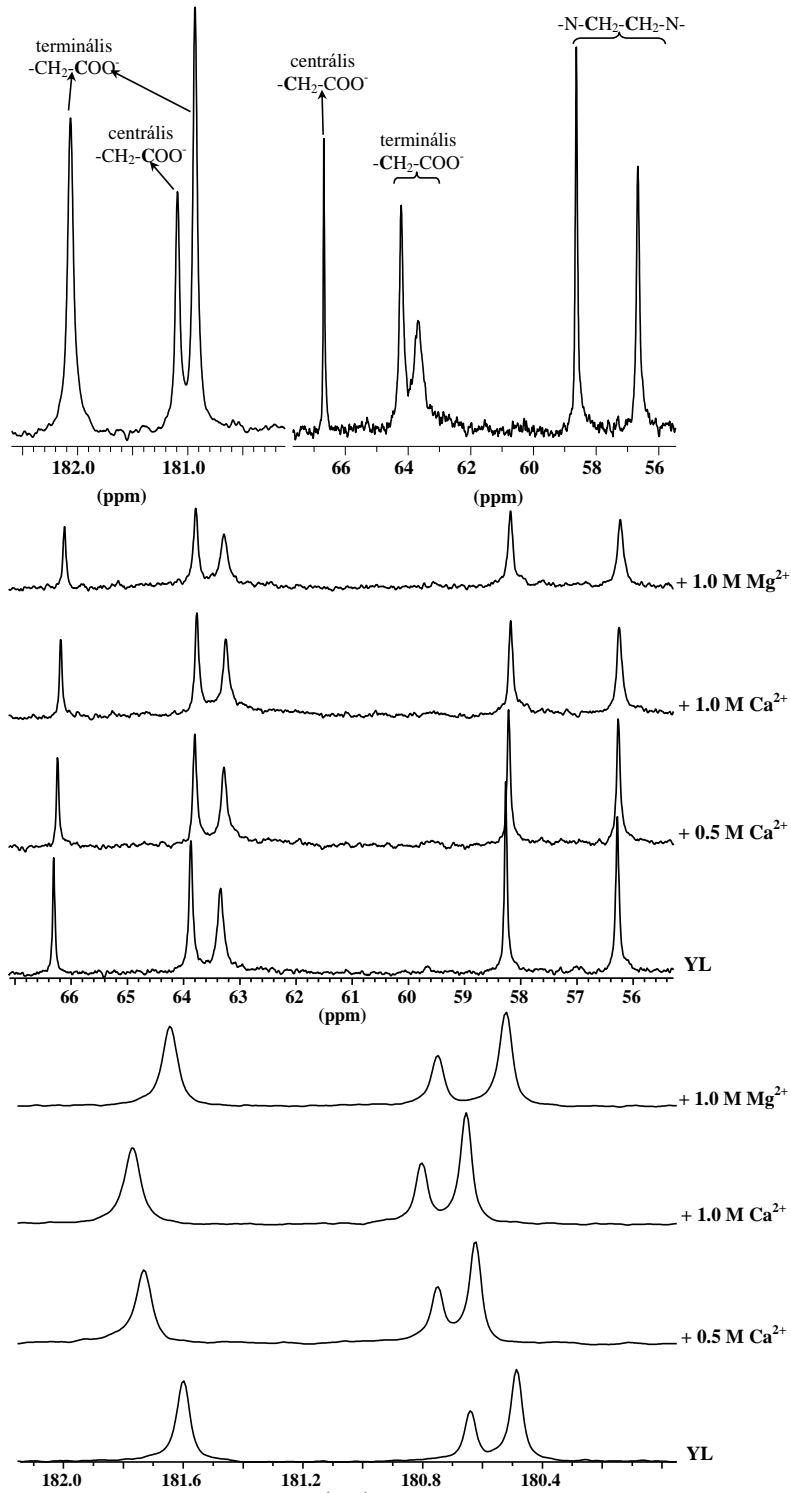
$$K_{\text{Gd(L)M}} = \frac{[\text{Gd(L)M}]}{[\text{GdL}][\text{M}^{2+}]} \quad \text{M}=(\text{Ca(II)} \text{ és } \text{Mg(II)})$$

A kétmagvú komplexek valószínűleg a Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok és a Gd^{3+} -ionhoz koordinálódott ligandum egyik karboxilát csoportja közötti kölcsönhatással képződnek. ^1H - és ^{13}C -NMR vizsgálatok igazolták, hogy a $\text{Ln}(\text{DTPA})^{2-}$ komplexek intramolekuláris átrendeződése szobahőmérsékleten gyors folyamat, a Ln^{3+} -ion és a koordinált karboxilát oxigének közötti kötés élettartama elég rövid.^{129,130} A Gd(L)M összetételű kétmagvú komplexben a DTPA ligandum és a Gd^{3+} -ion közötti kölcsönhatás gyengébb, mint a GdL komplexben, aminek köszönhetően a Gd(L)M komplex disszociációja valószínűbb. A Gd(L)M kétmagvú komplex képződésében nagy szerepe lehet a komplexek 2(-) töltésének. A $\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})$ komplex Cu^{2+} -ionokkal lejátszódó cserereakciói függetlenek a Ca^{2+} -ion koncentrációjától, valószínűleg azért, mert a semleges $\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})$ nem képez kétmagvú komplexet a Ca^{2+} -ionnal. A Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionokkal képződő vegyes kétmagvú Gd(L)M komplexek kialakulását igazolandó, tanulmányoztuk a $\text{Y}(\text{DTPA})^{2-}$ komplex ^1H - és ^{13}C -NMR spektrumát Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok jelenlétében. Az $\text{Y}(\text{DTPA})^{2-}$ komplex spektrumai IV.7.7 és IV.7.8 ábrán láthatóak.



IV.7.9. Az Y(DTPA) komplex $^1\text{H-NMR}$ spektruma Ca^{2+} és Mg^{2+} -ionok jelen- és távollétében ($[\text{YL}]=0,1 \text{ M}$, $\text{pH}=7,4$, 310 K)

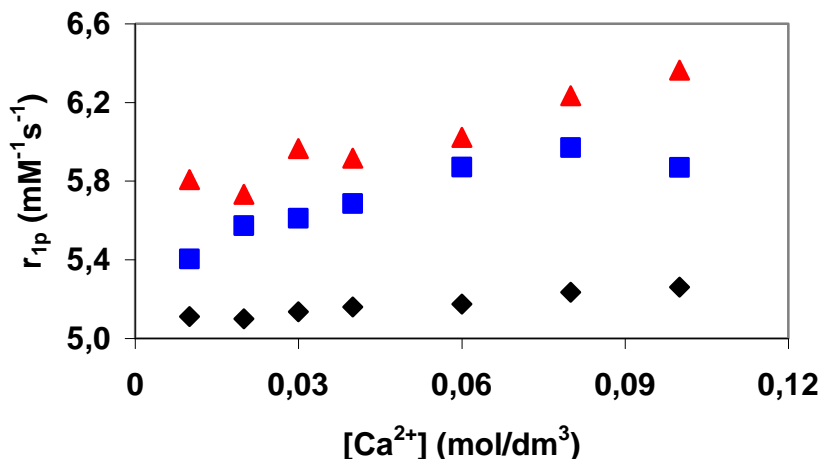
Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata



IV.7.10. Az Y(DTPA) komplex ^{13}C NMR spektruma Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok jelen- és távollétében ($[\text{YL}]=0,1 \text{ M}$, $\text{pH}=7,4$, 310 K)

Az $Y(DTPA)^{2-}$ komplex 1H - és ^{13}C -NMR spektrumában található jelek Ca^{2+} -és Mg^{2+} -ionok jelenlétében kiszélesednek és eltolódnak, ami utal az $Y(DTPA)^{2-}$ komplex, valamint a Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok közötti közvetlen kölcsönhatás kialakulására és az $Y(L)M$ összetételű kétmagvú komplexek képződésére. Mivel a legnagyobb szélesedés és eltolódás a karboxilát csoportok karbonil ^{13}C -NMR jelén figyelhető meg, így felételezhető, hogy az $Y(DTPA)^{2-}$ karboxilát csoportjai vesznek részt a Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok koordinációjában.

A $Gd(DTPA)^{2-}$, $Gd(BOPTA)^{2-}$ és $Gd(EOB-DTPA)^{2-}$ komplexek és Ca^{2+} - illetve Mg^{2+} -ionok között kialakuló kölcsönhatás befolyásolhatja a $Gd(III)$ -komplexek oldószer vízprotonok relaxációs sebességére gyakorolt hatását. A kétmagvú komplexek képződését és annak az oldószer vízprotonok T_1 relaxációs sebességére gyakorolt hatását 1H -NMR relaxometriás vizsgálatokkal tanulmányoztuk. A $Gd(DTPA-BMA)$, $Gd(DTPA)^{2-}$, $Gd(BOPTA)^{2-}$ és $Gd(EOB-DTPA)^{2-}$ komplexek Ca^{2+} -ionok jelenlétében mért relaxivitás értékei a IV.7.9. ábrán láthatóak.



IV.7.11. ábra A $Gd(DTPA-BMA)$ (◆), a $Gd(DTPA)^{2-}$ (■) és a $Gd(BOPTA)^{2-}$ (▲) Ca^{2+} -ionok jelenlétében mért relaxivitás értékei ([GdL]=1,0 mM, pH=7,0, 0,15 M NaCl, 25°C)

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

A IV.7.9. ábrán feltüntetett relaxivitás értékek alapján megállapítható, hogy a Gd(DTPA-BMA) relaxivitását gyakorlatilag nem befolyásolja a Ca^{2+} -ionok jelenléte, míg a $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$, $\text{Gd}(\text{BOPTA})^{2-}$ és $\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})^{2-}$ esetében nőnek az r_{1p} értékek a $[\text{Ca}^{2+}]$ növekedésével. A $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$ származékok relaxitásának $[\text{Ca}^{2+}]$ függése alapján a Gd(DTPA-BMA) és Ca^{2+} -ionok közötti kölcsönhatás elhanyagolható, míg a $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$, $\text{Gd}(\text{BOPTA})^{2-}$ és $\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})^{2-}$ esetében a Ca^{2+} -ionok valószínűleg a ligandum egyik karboxilát-O donoratomjához koordinálódnak, ami hatással van a Gd(III)-komplex belső szférájában lévő vízmolekulák számára (q) és rotációs korrelációs idejére (τ_R). A IV.6 fejezetben bemutatott összefüggések alapján a q és a τ_R értékeinek növekedése jelentősen növeli a Gd(III)-komplexek oldószer vízprotonok relaxációs sebességére gyakorolt hatását.

A $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$ származékok Ca^{2+} - és Mg^{2+} -asszisztált disszociációját jellemző sebességi állandók (k_3^{Ca} és k_3^{Mg}) számításához figyelembe kell vennünk Gd(III)-komplexek eloszlását. A vizsgált körülmények mellett a $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$ származékok teljes koncentrációja ($[\text{GdL}]_t$) megadható a szabad GdL, a protonált Gd(HL), a vegyes ligandumú Gd(L)Cit és a kétmagvú Gd(L)Ca komplexek koncentrációinak összegeként. Korábbi vizsgálatok alapján fiziológiás pH tartományban (pH=7,0 – 7,5) a protonált komplexek koncentrációja elhanyagolható és a vegyesligandumú komplexek koncentrációja is nagyon kicsi.⁵³ Ennek megfelelően a $\text{Gd}(\text{DTPA})$ származékok teljes koncentrációja az alábbi egyenlettel adható meg:

$$[\text{GdL}]_t = [\text{GdL}] + [\text{Gd(L)M}] \quad \text{M}=(\text{Ca(II)} \text{ és } \text{Mg(II)}) \quad \text{IV.7.4}$$

Figyelembe véve a lehetséges reakcióutakat, a IV.7.1 és IV.7.2 egyenleteket, valamint a Gd(L)M kétmagvú komplexek stabilitási állandóját (IV.7.3. egyenlet), a k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandó a IV.7.5 egyenlettel fejezhető ki:

$$k_d = \frac{k_1[\text{H}^+] + k_{\text{Cit}^{3-}}[\text{Cit}^{3-}] + k_{\text{HCit}^{2-}}[\text{HCit}^{2-}] + k_3^{\text{M}}[\text{M}^{2+}]}{1 + K_{\text{Gd(L)M}}[\text{M}^{2+}]} \quad \text{IV.7.5}$$

Különböző Ca^{2+} és Mg^{2+} koncentrációknál, valamint hőmérséklet és pH értékeknél meghatározott k_d sebességi állandókat (IV.7.2 – IV.7.6. ábrák) a IV.7.5 egyenletre illesztve számítottuk a k_3^{Ca} és $K_{\text{Gd(L)Ca}}$, valamint a k_3^{Mg} és $K_{\text{Gd(L)Mg}}$ értékeket figyelembe véve a $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$ és származékai H^+ , Cit^{3-} és HCit^{2-} katalizált disszociációját jellemző k_1 , k_{Cit} és k_{HCit} sebességi állandóit, amelyeket csoportunkban korábban meghatároztak.^{50,53} A $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$ származékok citrát, Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok jelenlétében lejátszódó disszociációját jellemző kinetikai paramétereket IV.7.1 táblázatban tüntettük fel.

IV.2.1 táblázat A Gd(DTPA) származékok Cu²⁺-ionnal lejátszódó cserereakcióinak paraméterei

| | Gd(DTPA-BMA) | | Gd(DTPA) | | Gd(BOPTA) | | Gd(EOB-DTPA) | |
|---|----------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| | 25 ^[a] | 37 ^[b] | 25 ^[c] | 37 | 25 ^[d] | 37 | 25 | 37 |
| T (°C) | | | | | | | | |
| <i>k</i>₁ (M⁻¹s⁻¹) | 12,7 | 35 | 0,58 | 3,0 ± 0,6 | 0,41 | 2,7 ± 0,2 | 0,17 ± 0,03 | 1,5 ± 0,2 |
| <i>k</i>_{cit} (M⁻¹s⁻¹) | 5,6×10 ⁻³ | 1,4×10 ⁻² | 4,4×10 ⁻⁵ | 2,5×10 ⁻⁴ | 6,5×10 ⁻⁵ | 1,8×10 ⁻⁴ | 1,4×10 ⁻⁵ | 2,2×10 ⁻⁵ |
| <i>k</i>_{Hcit} (M⁻¹s⁻¹) | 1,14 | 2,4 | 7,7×10 ⁻³ | 1,2×10 ⁻² | 9,2×10 ⁻³ | 1,3×10 ⁻² | 2,2×10 ⁻³ | 2,3×10 ⁻³ |
| <i>k</i>_{3^{Mg}} (M⁻¹s⁻¹) | – | – | (7 ± 1)×10 ⁻⁵ | (7 ± 1)×10 ⁻⁴ | (2,5 ± 0,7)×10 ⁻⁵ | (2,0 ± 0,4)×10 ⁻⁴ | (2 ± 2)×10 ⁻⁶ | (6 ± 1)×10 ⁻⁵ |
| <i>k</i>_{3^{Ca}} (M⁻¹s⁻¹) | (1,7±0,3)×10 ⁻⁵ | (7,9±0,7)×10 ⁻⁵ | (9 ± 1)×10 ⁻⁵ | (4,4 ± 0,5)×10 ⁻⁴ | (5,0 ± 0,6)×10 ⁻⁵ | (2,2 ± 0,4)×10 ⁻⁴ | (1,2 ± 0,2)×10 ⁻⁵ | (9 ± 1)×10 ⁻⁵ |
| <i>K</i>_{GdHL} (M⁻¹) | – | – | 50 ± 10 | 80 ± 15 | 16 ± 3 | 30 ± 5 | 2 ± 2 | 8 ± 3 |
| <i>K</i>_{GdLMg} (M⁻¹) | – | – | 22 ± 4 | 25 ± 5 | 25 ± 6 | 27 ± 6 | 7 ± 2 | 25 ± 10 |
| <i>K</i>_{GdLCa} (M⁻¹) | 12,7 | 35 | 0,58 | 3,0 ± 0,6 | 0,41 | 2,7 ± 0,2 | 0,17 ± 0,03 | 1,5 ± 0,2 |
| <i>k</i>_{3^{Mg}}[Mg²⁺]^[e] | – | – | 3,5×10 ⁻⁸ | 3,5×10 ⁻⁷ | 1,25×10 ⁻⁸ | 1,0×10 ⁻⁷ | 1,0×10 ⁻⁹ | 3,0×10 ⁻⁸ |
| <i>k</i>_{3^{Ca}}[Ca²⁺]^[f] | 2,13×10 ⁻⁸ | 9,88×10 ⁻⁸ | 1,13×10 ⁻⁷ | 5,5×10 ⁻⁷ | 6,25×10 ⁻⁸ | 2,75×10 ⁻⁷ | 1,5×10 ⁻⁸ | 1,1×10 ⁻⁷ |
| <i>k</i>_d (s⁻¹)^[g] | 3,9×10 ⁻⁶ | 2,1×10 ⁻⁵ | 6,3×10 ⁻⁷ | 2,9×10 ⁻⁶ | 6,3×10 ⁻⁷ | 1,4×10 ⁻⁶ | 1,5×10 ⁻⁷ | 3,9×10 ⁻⁷ |

^[a] Ref. 109 b., ^[b] Ref. 51 ^[c] Ref. 109 c., ^[d] Ref. 1 ^[e,f] Mg²⁺- és Ca²⁺-ionok hozzájárulása a Gd(DTPA) származékok disszociációjához ([Mg²⁺]=0,5 mM, [Ca²⁺]=1,25 mM). ^[g] A Gd(DTPA) származékok disszociációját jellemző sebességi állandó fiziológiai feltételek mellett.

A k_3^M sebességi állandók összehasonlítása alapján a Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok a töltéssel rendelkező $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$, $\text{Gd}(\text{BOPTA})^{2-}$ és $\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})^{2-}$ komplexek disszociáció sebességét jelentősen növelik, míg a semleges $\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})$ disszociációját lényegében nem befolyásolják. Meglepő módon a Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok által asszisztált reakcióutak hozzájárulása a $\text{Gd}(\text{III})$ -komplexek disszociációjához fiziológiához közeli feltételek mellett (IV.7.1. táblázat) viszonylag nagy. A $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$, $\text{Gd}(\text{BOPTA})^{2-}$ és $\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})^{2-}$ komplexek H^+ -, Cit^{3-} -, HCit^{2-} -, H_2PO_4^- -, HCO_3^- - és CO_3^{2-} -ionok által asszisztált disszociáció sebessége rendre 24%-, 21%- és 26%-kal nő $[\text{Ca}^{2+}]_t=1,25$ mM és $[\text{Mg}^{2+}]_t=0,5$ mM jelenlétében 37°C -on ($[\text{Cit}]_t=0,11$ mM, $[\text{PO}_4^{3-}]_t=1,0$ mM, $[\text{CO}_3^{2-}]_t=25$ mM, $\text{pH}=7,4$). Ezen adatok alapján megállapítható, hogy a töltéssel rendelkező $\text{Gd}(\text{DTPA})$ származékok szabad Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok által katalizált disszociációja jelentősen hozzájárulhat a Gd^{3+} -ionok *in vivo* felszabadulásához.

IV.8. A kontrasztanyagok és a csont felülete között kialakuló kölcsönhatások vizsgálata

A Gd^{3+} alapú kontrasztanyagokkal kapcsolatba hozható Nefrogén Szisztémás Fibrózisos (NSF) betegek többségét a nagyobb disszociáció sebességű Omniscan ($\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})$) kontrasztanyagot alkalmazva vizsgálták. Vizsgálataink alapján a $\text{Gd}(\text{III})$ -komplexek a szervezetben található endogén fémionokkal (Zn^{2+} , Ca^{2+} és Cu^{2+}) kicserélődési reakciókba léphetnek és az így szabaddá váló Gd^{3+} -ion a különböző fehérjékkel (pl. albumin) kialakított viszonylag erősebb kölcsönhatásainak és a rosszul oldódó GdPO_4 , esetleg $\text{Gd}_2(\text{CO}_3)_3$ csapadékok leválásának köszönhetően nem ürül ki a szervezetből. Az NSF kialakulásának okai eddig nem ismertek, azok felderítéséhez elengedhetetlen a különböző Gd^{3+} tartalmú kontrasztanyagok disszociációjának részletes vizsgálata és a felszabaduló Gd^{3+} -ion mennyiségének, valamint akkumulálódott formájának ismerete.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

Korábbi *in vivo* vizsgálatok eredményei alapján az NSF kialakulását a szabaddá vált Gd^{3+} -ionnak PO_4^{3-} -ionnal képzett $GdPO_4$ rosszul oldódó csapadék megjelenése eredményez, amely a $Ca_5(PO_4)_3OH$ -val mutatott nagymértékű hasonlósága miatt felhalmozódhat a csontokban. A Gd(III)-komplexek kiürülése a csontszövetekből lassabb, mint a szervekből és egyéb szövetekből. *White és társai* olyan csípőműtéten átesett betegeket vizsgáltak, akik a műtét előtt Gd(DTPA-BMA) vagy Gd(HP-DO3A) kontrasztanyagokat kaptak. Az Omniscan (Gd(DTPA-BMA)) kontrasztanyagot kapott betegek eltávolított csípőcsontjaiban 2,5-4-szer több gadolíniumot találtak, mint a ProHance-szal (Gd(HP-DO3A)) kezelt betegek csontjaiban. Ez a két kontrasztanyag eltérő tulajdonságaival magyarázható, ugyanis a nyíltláncú Gd(DTPA-BMA) sokkal gyorsabban disszociál, mint a makrociklusos Gd(HP-DO3A).⁵¹ Később azonban egy másik kutatócsoport azt találta, hogy a gadolínium mennyisége nagyon hasonló volt, mind a Gd(DTPA-BMA), mind a Gd(HP-DO3A) kontrasztanyaggal kezelt betegek esetében, ugyanakkor az általuk használt mérési módszerrel nem tudtak különbséget tenni a szabad és a komplexben kötött Gd^{3+} között.⁵² A $GdPO_4$ és esetleg a Gd^{3+} -alapú MRI kontrasztanyag csontok felületén való megkötődését közvetlenül infravörös spektroszkópiával (IR) követhetjük, ezért célunk volt, hogy a Gd(III)-komplexek disszociációját és a képződő $GdPO_4$ csont felületen való megkötődését infravörös spektroszkópiás vizsgálatokkal tanulmányozzuk.

Előkísérleteink során a kontrasztanyagok vizes oldatát cseppentettük fel a csont felületére, majd vízzel mostuk azt. Célunk az volt, hogy megismerjük a kontrasztanyagok és a csont ásványi, illetve fehérjedús részei közötti kölcsönhatást. Az előkísérletek során kétféle technikát alkalmaztunk: i) a kontrasztanyag teljes koncentrációjának egyszeri felvitele a csontra, majd annak mosása (felvitel + mosás; modell: akut nagymennyiségű

kontrasztanyag bevitel és kiürülés); ii) a kontrasztanyag teljes koncentrációjának három lépésben történő felvitele, majd annak egyszeri mosása (felvitel + felvitel + felvitel + mosás; modell: többlépéses kontrasztanyag-bevitel, megfelelő kiürülési idő biztosítása nélkül a bevitel között).

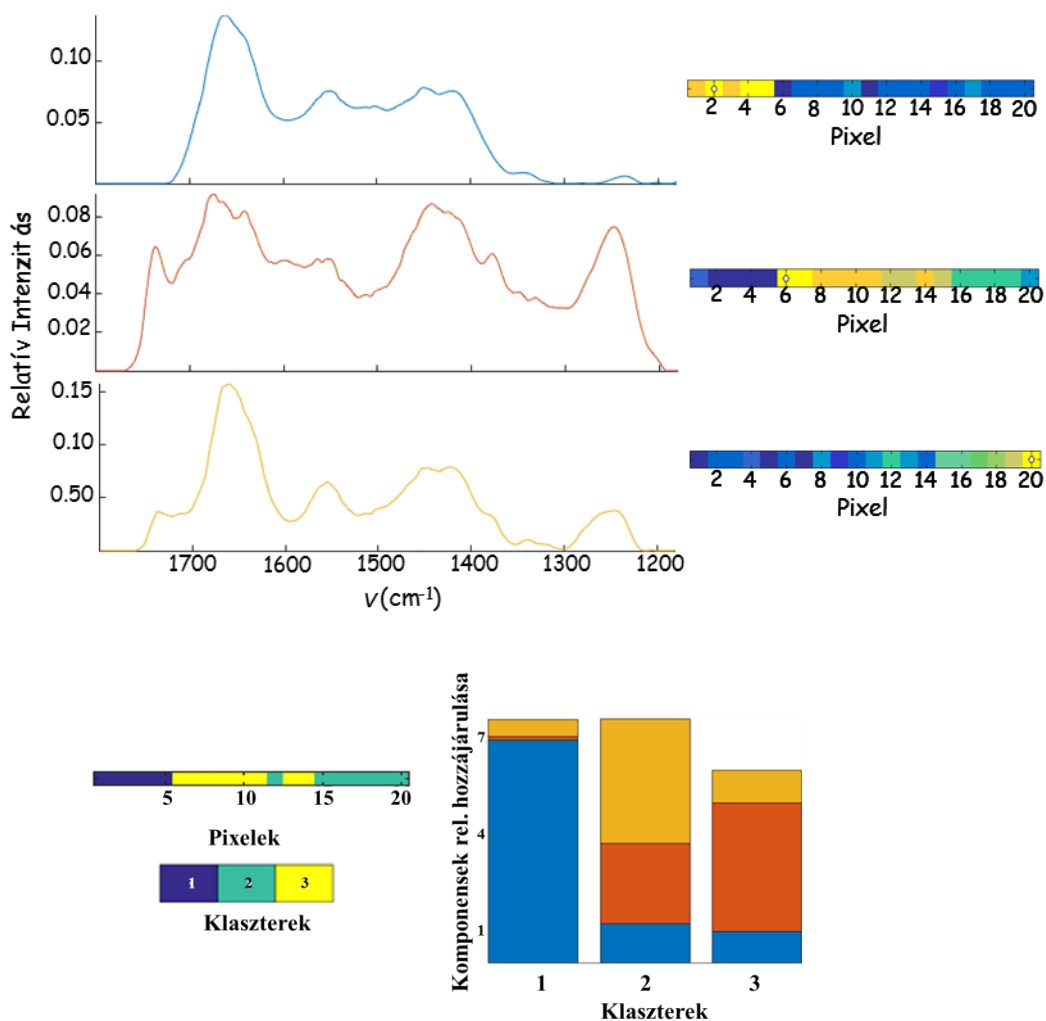
A cseppentéses kísérleteink eredményei rámutattak, hogy az Omniscan esetében a kontrasztanyag alapvető változásokat okozott a csont ásványi részének morfológiájában és szerkezetében. Sajnos a kollagénben dús részek kiértékelését nem tudtuk elvégezni, ugyanis a kísérlet során azok teljesen elroncsolódtak. A kapott infravörös képeket többváltozós görbefelbontás – váltakozó legkisebb négyzetek módszerével (MCR-ALS) értékeltük ki. A program segítségével számítottuk a kísérletre jellemző komponensek számát, illetve azok infravörös spektrumát. Ezután azt vizsgáltuk, hogyan változik a komponensek aránya az egyes spektrumokon, ami alapján osztályokba tudtuk azokat sorolni.

Az első kísérletben a csont felületre először Omnischant vittünk fel, majd vízzel mostuk két lépésben. A különböző lépések során felvett spektrumokon jól látható, hogy irreverzibilis változások történtek a csont szerkezetében, amelyek az Omniscan kontrasztanyaghoz köthetőek. Sajnos a felvett spektrumoknak csak 1180-1800 cm^{-1} tartománya volt értékelhető, ugyanis 1200 cm^{-1} a foszfát rezgési sávjának túl nagy intenzitása miatt kvalitatív információ kinyerése nem volt lehetséges. 1800 cm^{-1} felett pedig nem jelentek meg jelek, kivéve a hidroxil-ionok széles 3600-2800 cm^{-1} közötti jelét, ahol jelen esetben a víz jelei dominálnak. Az MCR-ALS programmal történő kiértékelés során három lehetséges komponenszt talált a program (szinguláris érték felbontás alapján), amelyeknek számított infravörös spektrumai a IV.8.1 ábrán láthatóak. A kísérlet során gyűjtött spektrumokat három osztályba sorolhatjuk a k -értékek szerinti klaszterezés használatával.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

Jól látható, hogy az első osztályban főleg a késsel jelölt spektrum dominál, amely a csont ásványi részének eredeti spektruma. A második osztályban az első komponens dominanciája nagyon lecsökken, a spektrumokra főleg a 2. és 3. komponens a jellemző. Míg a harmadik osztályban egyértelműen a 3. komponens aránya a legnagyobb. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a 2. komponens valamilyen módon a kontrasztanyaghoz és a víz hatásához rendelhető, míg a 3. komponens a csont megváltozott ásványi részéhez.

A csont felületének spektrumán 1650 cm^{-1} közötti nagy intenzitású csúcsához az amid I CONH csoportjának CO nyújtási rezgése kapcsolható, az 1550 cm^{-1} körül lévő jel az amid II fehérje CONH csoportjának NH deformációs és CN nyújtási jele, $1500\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ körül jelennek meg a CH_2 deformációs, aszimmetrikus és szimmetrikus rezgésének jelei, valamint a karbonátok CO rezgési sávjai, illetve 1240 cm^{-1} körül az amid III CONH rezgési sávjai láthatóak.¹³¹ A kontrasztanyag felcseppentése után 1750 cm^{-1} körül új jel jelenik meg a spektrumon, amely a kontrasztanyaghoz közvetlenül nem kapcsolható, viszont a szabad DTPA-BMA ligandumban és a GdPO_4 részecskében is jelen van. Ez tehát mindenképpen a kontrasztanyag disszociációjához rendelhető. Az 1725 cm^{-1} -nél megjelenő váll szintén a szabad DTPA-BMA ligandumhoz kapcsolható. 1650 és 1600 cm^{-1} között több egyéb jel is megjelenik, amelyeknek azonosítása nehéz, több komponenshez is köthetőek: egyrészt származhatnak a szabad DTPA-BMA ligandum és a GdPO_4 vagy GdCl_3 vegyületektől, de a kontrasztanyag spektrumán is megjelenik egy nagy jel ebben a tartományban. Az $1500\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ között megjelenő új jelcsoport egyértelműen a karbonátokhoz köthető, míg az $1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ között megjelenő jelek feltehetően a szabad ligandumhoz tartoznak. A csontfelület vízzel történő mosása után az 1750 cm^{-1} -nél, $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, 1550 cm^{-1} $1480\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ és $1250\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ -nél megjelenő jelek alkotják a spektrumot.

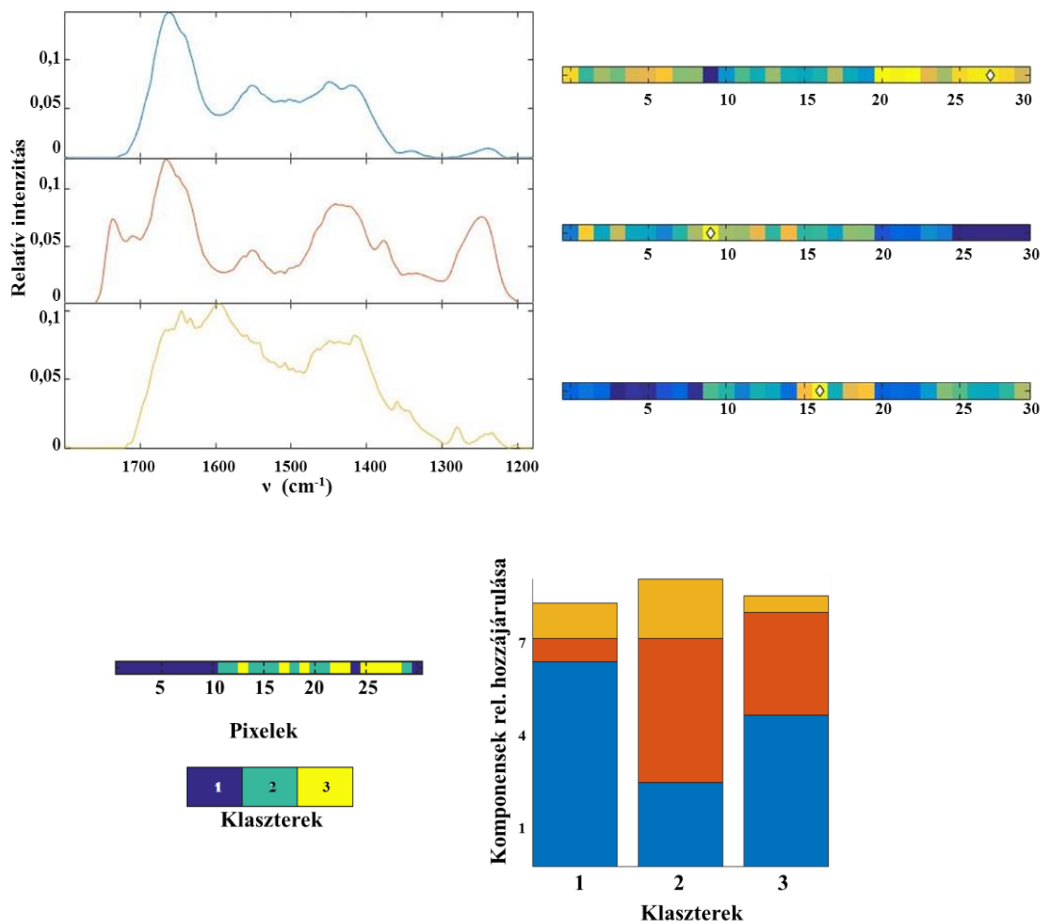


IV.8.1.ábra Az egy lépéses technika során felvett spektrumok kiértékelése a csont Omniscan-nal történő kezelése esetén (1-5: csont spektrumai; 6-10: 1 mM Omniscan felvitele; 11-15: vízzel mosás; 16-20: újabb mosás)

A kapott eredmények alapján feltételezhetjük, hogy az Omniscan a csont felületével kapcsolatba lépve disszociál, majd a szabaddá váló Gd³⁺-ion GdPO₄ formájában beépül a csont szerkezetébe. Ezt bizonyítja az 1750 cm⁻¹ megjelenő, a GdPO₄-hoz köthető jel, illetve az 1500-1350 cm⁻¹ között

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

megjelenő jelegyüttes, amely feltehetően a csont ásványi részéből származó CaCO_3 jele. A második kísérlet esetében az 1 mM-os Gd(DTPA-BMA) kontrasztanyag felvitele 3 lépésben történt, ezt követően vízzel mostuk a mintát.



IV.8.2 ábra Az egylépéses technika során felvett spektrumok kiértékelése a csont Omniscan-nal történő kezelése esetén (1-5: csont spektrumai; 6-10: 0,33 mM Omniscan felvitele; 11-15: 0,33 mM Omniscan felvitele; 16-20: 0,33 mM Omniscan felvitele; 21-25: vízzel mosás; 26-30: újabb mosás)

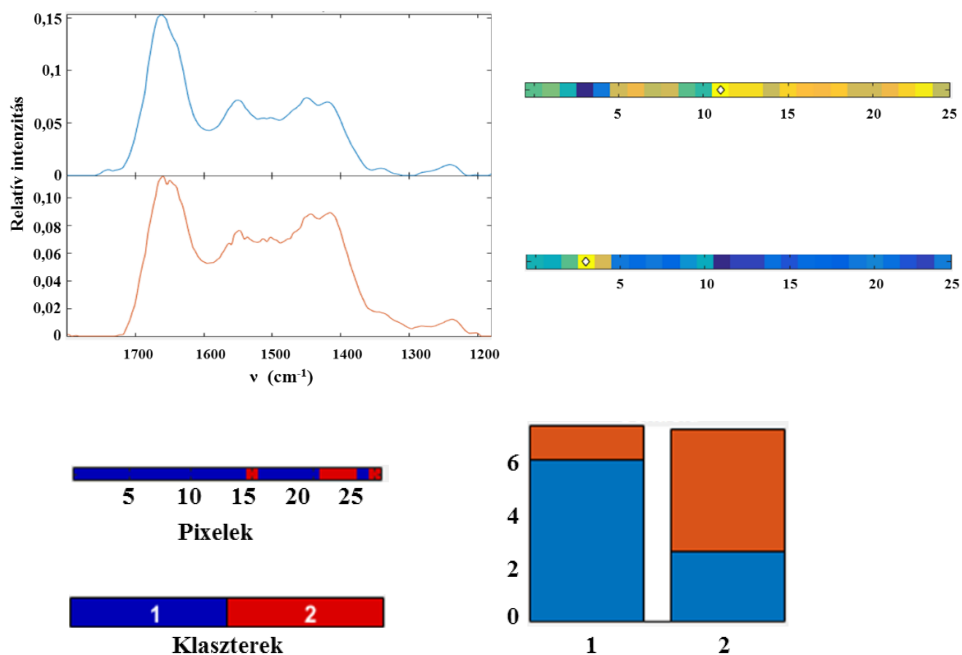
A többlépéses módszernél szintén 3 komponens volt megfigyelhető, az első és második spektruma megegyezik az első kísérlet során kapott komponensek spektrumával, tehát megkülönböztethető a csont és a

disszociált kontrasztanyag spektruma, viszont a harmadik komponens egyértelműen a vízhez rendelhető (IV.8.2 ábra).

Az első osztályban ennél a kísérletnél is az első komponens (a csont ásványi része) dominál, azonban másik két komponensnek is nagyobb az aránya, mint az 1) kísérleti technika esetében. Ennek egyik lehetséges magyarázataként nem zárhatjuk ki, hogy a két csontlemez alap morfológiája eltérő volt. A második és harmadik osztályban megnövekedik a 2. és 3. komponens aránya az elsőhöz képest, és inkább a 2. komponens dominál, ami a kontrasztanyag disszociációjához rendelhető. A második komponens dominanciája még vizes mosás után is megmarad (2. osztály). Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy a kontrasztanyag ebben az esetben is irreverzibilis változást okozott a csont ásványi részének összetételében.

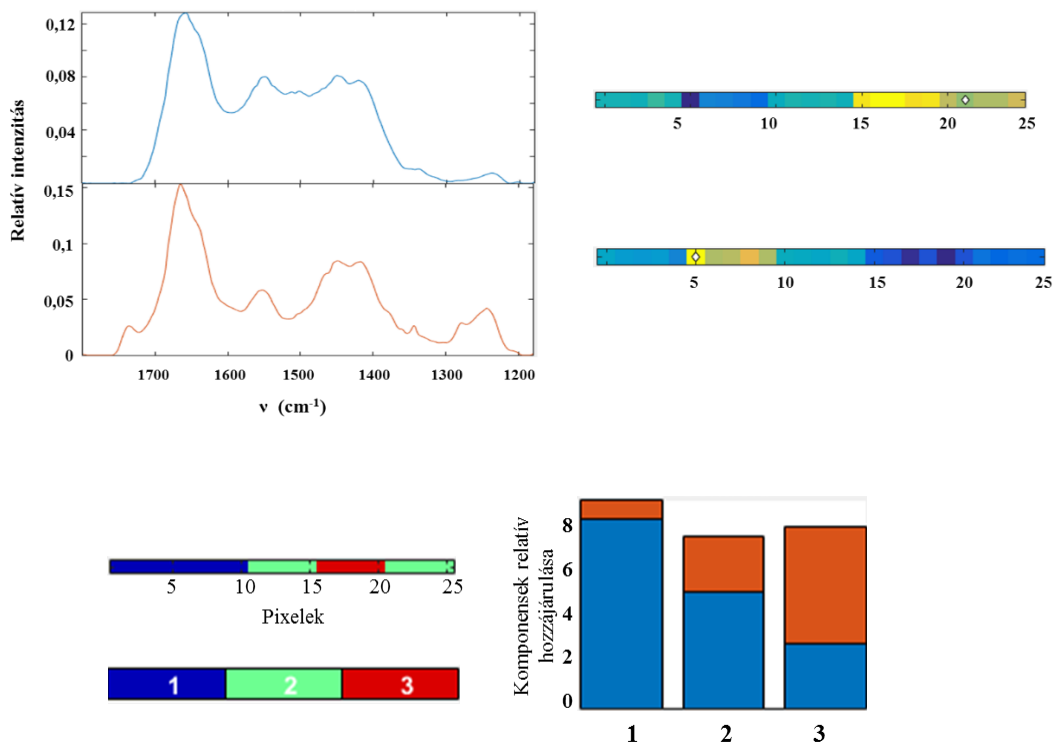
A fent említett előkísérleteket a Gd(HP-DO3A) (ProHance) kontrasztanyaggal is elvégeztük (IV.8.3. ábra). Ebben az esetben a kísérletek során felvett infraspektrumokra két komponens jellemző, amelyek között nincs szignifikáns különbség. Az első komponens, hasonlóan a többi kísérlethez, a csont ásványi anyagban gazdag részének a spektruma, ahol az első kísérletben leírt részek jellemző jelei jelennek meg. Lényegében az 1600-1400 cm^{-1} közötti régióban található jelek intenzitása növekszik, amelyek nem rendelhetők egyértelműen sem a kontrasztanyaghoz, sem komplex esetleges disszociációja során szabaddá váló ligandumhoz vagy fémionhoz, valószínűleg a vizes mosás okozta változások jelennek meg a spektrumokon. Ezt a megállapítást alátámasztja az is, hogy a 2. komponens aránya főleg az utolsó lépésben (2. vízzel történő mosás) növekszik meg, ahol feltételezhetően a kontrasztanyag már nem érintkezik a csont felületével.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata



IV.8.3. ábra Az egylépéses technika során felvett spektrumok kiértékelése a csont ProHance-szal történő kezelése esetén (1-5: csont spektrumai; 6-10: 1 mM ProHance felvitele; 11-15: vízzel mosás; 16-20: újabb mosás; 21-25: újabb mosás)

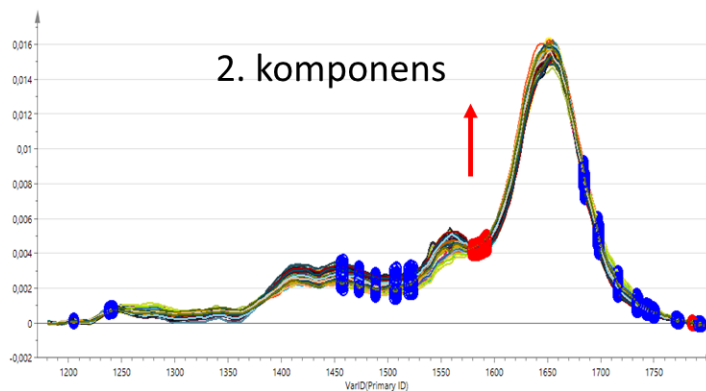
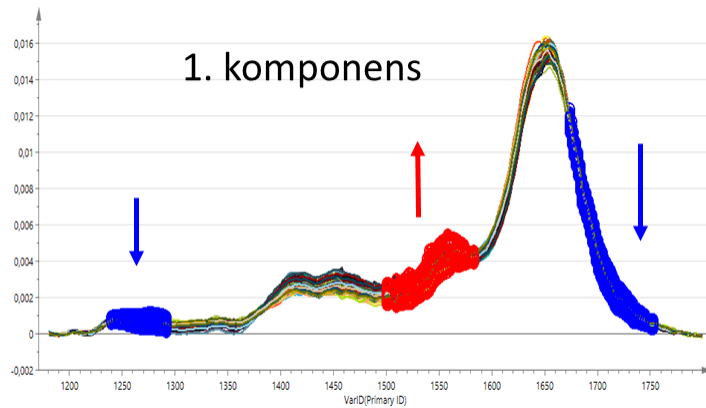
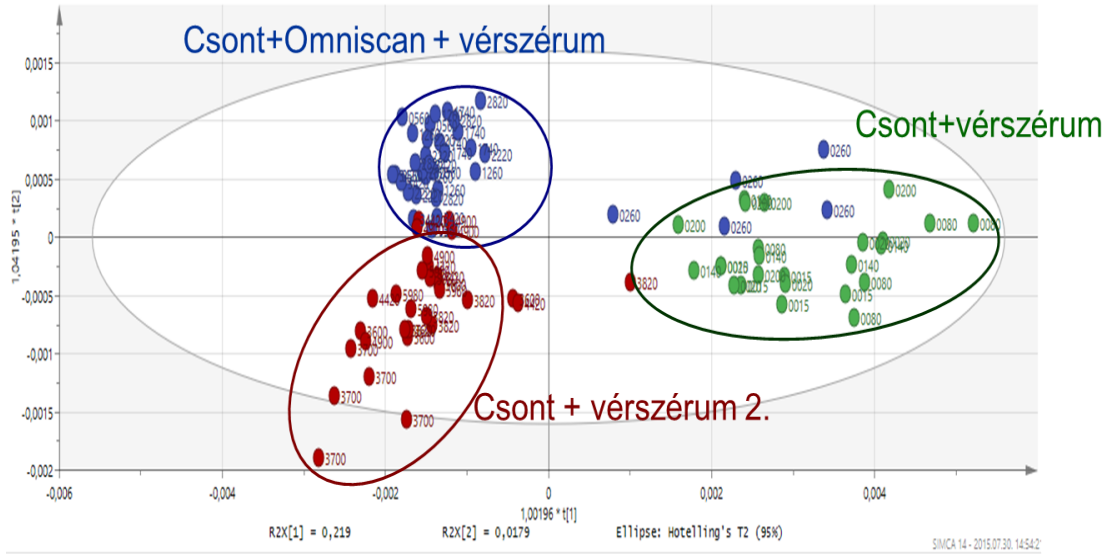
A többlépéses technika esetében szintén két komponensre bontottuk a spektrumokat, itt viszont már jelentősebb különbség volt a két komponens között (IV.8.4. ábra). Új csúcsok jelennek meg a 1750 cm^{-1} -nél, 1350 cm^{-1} és $1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ között, amelyek valószínűleg a komplexhez rendelhetőek. Változik továbbá 1550 cm^{-1} -nél az amid II sáv struktúrája, amely utalhat egy enyhe kölcsönhatásra a komplex illetve a csont kollagénes része között. A kontrasztanyaghoz rendelhető komponens aránya az utolsó kontrasztanyag csepp felvitelét követően a legnagyobb, majd vizes mosás hatására csökkenni kezd. Ez azt jelzi, hogy a kontrasztanyag csak ráakódott a csont felületére, de abban alapvető változásokat nem okozott. Eredményeinket jobban alátámasztotta volna, ha a csont felületét többszöri vizes mosással tudtuk volna kezelni, de sajnos a csont eróziója miatt ez nem volt lehetséges.



IV.8.4. ábra Az többlépéses technika során felvett spektrumok kiértékelése a csont ProHance-szal történő kezelése esetén (1-5: csont spektrumai; 6-10: 0,33 mM ProHance felvitele; 11-15: 0,33 mM ProHance felvitele; 16-20: 0,33 mM ProHance felvitele; 21-25: vízzel mosás)

Az előkísérleteink után az Omniscan esetében a vérszérum és a kontrasztanyag folyamatos cirkulációja mellett készítettünk infravörös felvételeket a csont felületéről azért, hogy követni tudjuk a kontrasztanyag csontba történő beépülését. A kapott eredményeket OPLS-DA (**O**rtogonal **P**rojections to **L**atent **S**tructures – **D**iscriminant Analysis) kemometriai eljárással értékeltük ki. A IV.8.5 ábrán láthatóak a felvett spektrumok diszkriminancia analízisének eredményei.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata



IV. 8.5. ábra A folyamatos cirkuláció alatt készült spektrumok osztályba sorolása (A) és a spektrumok változása a kontrasztanyag keringtetése alatt (B), valamint az utókéndicionálás alatt (C)

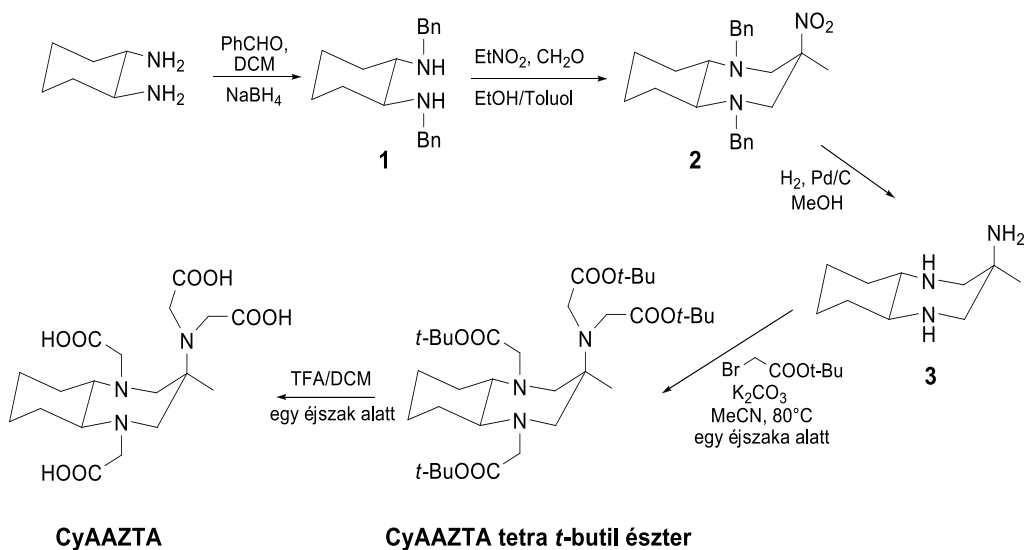
A csont és a felette áramoltatott vérszérum spektrumai (zöld) folyamatosan változnak, de jól elkülöníthetők a kontrasztanyag hozzáadása utáni spektrumoktól (kék), viszont az utókondicionálási szakasz spektrumait (piros) és a kontrasztanyag áramoltatása közben készült spektrumok (kék) közötti különbség jelentősen kisebb. A IV.8.5 B. és C. ábrán láthatóak a kísérlet közben a spektrumban bekövetkező változások. A spektrumok 1500-1600 cm^{-1} közötti régiójában, ami az amid II sávnak felel meg, a relatív jelintenzitás nőtt, míg az 1250-1300 cm^{-1} (amid I) és az 1700-1750 cm^{-1} (amid III) régióban csökkent a relatív jelintenzitás. Az utókondicionálás során a jelekben szignifikáns változás nem történt. A jelek azonosítása rendkívül bonyolult és nehéz ebben az esetben, mivel a szérum jelei szinte mindent elfednek. Mindenesre ezek az eredmények is alátámasztják, hogy az Omniscan a kísérlet közben irreverzibilis változásokat okozott a csont szerkezetében.

A cseppentéses és cirkulációs kísérletekben kapott eredmények alapján tehát elmondható, hogy az Omniscan feltehetően disszociált a csont felületén, majd a szabaddá váló Gd^{3+} beépült a csont ásványi részébe GdPO_4 formájában, ahonnan így kalcium- és karbonátionokat szabadított fel. A szabad ligandum feltehetőleg a (felszabadult és a vérszérumban lévő szabad) Ca^{2+} -ionokkal komplexet képez. Ezzel ellentétben a ProHance nem disszociál a csont felületén, a csont szerkezetében nem okoz változásokat.

V. Kísérleti rész

V.1. A vizsgált ligandum előállítása és koncentrációjának meghatározása

A H₄CyAAZTA ligandumot Prof. Lorenzo Tei az Alessandriai “A. Avogadro” Egyetem, Természettudományi és Technológiai Tanszékének docense állította elő és bocsátotta rendelkezésünkre.



V.1.1 ábra A CyAAZTA ligandum előállításának sémája

A CyAAZTA ligandum előállítása során elsőként a (±) transz-1,2-dibenzilaminociklohexánt (**1**) állították elő a (±) transz-1,2-diaminociklohexán benzaldehyddel történő redukív aminálásával. A héttagú gyűrű kialakítását az **1** vegyület, a nitroetán és paraformaldehid között lejátszódó dupla nitro-Mannich reakcióval valósították meg. A **2** vegyület *N*-benzil védőcsoportjának eltávolítása és nitrocsoportjának redukciója Pd/C katalizátorral végzett katalitikus hidrogénezéssel történt. A **3** vegyületet terc-butilbromacetáttal alkilezték acetonitrilben K₂CO₃ bázis jelenlétében. Végül

TFA és diklórmétán 1:1 arányú keverékével eltávolították a terc-butil észtereket.

¹H-NMR: D₂O 500 MHz: δ 1.08-1.13 (b, CH₂, 4H), 1.42 (b, CH₃, 3H), 1.64 (b, CH₂, 4H), 2.39-2.47 (b, CH₂, 4H), 2.80-2.98 (m, CH, 2H), 3.4-3.5 (m, CH₂, 8H);

¹³C-NMR: D₂O 125 MHz: δ 14.2 (CH₃), 22.6 (CH₂), 25.7 (CH₂), 51.4 (CH₂), 60.3 (CH₂), 61.9 (CH), 69.4 (C), 172.7 (C=O);

ESI⁺-MS: 640.45 [M+H⁺], Számított MW: C₃₄H₆₁N₃O₈ = 639.86.

A kereskedelmi forgalomban lévő Gd(DTPA-BMA) (Omniscan[®]), Gd(DTPA) (Magnevist[®]) és Gd(BOPTA) (Multihance[®]) komplexeket a GE Healthcare, Bayer Schering Pharma és a Bracco Imaging cégektől szereztük be.

Az anyagokat, melyek legalább 99%-os tisztaságúak voltak, további tisztítás nélkül használtuk vizsgálatokhoz. A H₄CyAAZTA ligandumból készített törzsoldat koncentrációját pH-potenciometriás módszerrel, 50-szeres Ca²⁺-felesleg jelen- és távollétében kapott titrálási görbékből számítottuk, figyelembe véve a protonálódási lépcsőknek megfelelő ekvivalens lúgmennyiségeket. A Ca²⁺-felesleg jelenlétében végzett mérések során a ligandumról leszorúl az összes disszociábilis proton a komplex képződéssel párhuzamosan, ami alapján meghatározható a ligandumhoz tartozó teljes protonkoncentráció. A Ca²⁺ felesleg jelenléte ezeket a méréseket nem zavarja, mivel hidrolízise számottevő mértékben csak egészen nagy pH-n következik be.

V.2 A vizsgálatok során felhasznált törzsoldatok elkészítése és koncentrációjuk meghatározása

A ritkaföldfém(III)-klorid törzsoldatokat 99,9% tisztaságú (*Fluka*) ritkaföldfém-oxidokból készítettük, 1:1 hígítású (~6 M) sósavban való

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

oldással. A sósavfelesleget vízfürdőn végzett óvatos bepárlással távolítottuk el. A ritkaföldfém(III)-klorid törzsoldatok koncentrációját komplexometriás titrálással, standardizált $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ mérőoldattal, hexametilén-tetraamin puffer jelenlétében ($\text{pH}=5,8-6$), xilenolnarancs indikátor alkalmazásával határoztunk meg. Az alkáliföldfém- és átmenetifém-klorid és -nitrát törzsoldatok analitikai tisztaságú szilárd alkáliföldfém- és átmenetifém-kloridokból és -nitrátokból (*Sigma*) készültek kétszer desztillált vízben való oldással. A törzsoldatok koncentrációinak meghatározása szintén komplexometriásan történt $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ mérőoldattal. A $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ törzsoldatot 99,9% tisztaságú Ga_2O_3 -ból (*Fluka*) készítettük, 1:1 hígítású (~ 6 M) HNO_3 való oldással. A savfelesleget vízfürdőn végzett óvatos bepárlással távolítottuk el és a visszamaradó $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ -ot 0,1 M HNO_3 -al oldottuk vissza. A $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ törzsoldat koncentrációjának meghatározása során a titrált mintához feleslegben $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ mérőoldatot adtunk és a $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ felesleget standardizált ZnCl_2 oldattal határoztuk meg visszatitrálással hexametilén-tetraamin puffer jelenlétében ($\text{pH}=5,8-6$), xilenolnarancs indikátor alkalmazásával.¹³² A $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ törzsoldat H^+ koncentrációját $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ felesleg jelenlétében végzett pH-potenciometriás titrálással határoztuk meg. Az ionerősség állításához és pufferként használt oldatok alt. minőségű vagy átkristályosított vegyszerekből készültek közvetlen beméréssel. A kinetikai vizsgálatoknál használt citrát törzsoldat $\text{H}_3\text{Citrát}$ (*Sigma*) szilárd vegyszerből készült tömegbeméréssel, amelynek koncentrációját pH-potenciometriás titrálással határoztuk meg. A transferrin oldatot liofilizált humán transferrinből (sTf, részben szaturálva Fe^{3+} -ionnal, *Sigma*) tömegbeméréssel készítettük. A sTf törzsoldat koncentrációját UV-spektrofotometriásan 280 nm-en mért abszorbancia érték alapján számítottuk figyelembe véve a transferrin 280 nm-re vonatkozó moláris abszorbanciáját ($\epsilon_{280}=91200 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).¹³³ A

relaxometriás mérésekhez liofilizált humán szérum albumint (HSA, Sigma Chemical Co.) használtunk, melynek fehérje tartalma 96-99% (Fraction V) volt. A HSA oldatokat tömegbeméréssel készítettük. A stabilitás vizsgálatokhoz Liofilizált vérszérumot használtunk (SerormTM, Sero AS).

V.3. A CyAAZTA ligandum és fémkomplexei pH-potenciometriás vizsgálata

A pH-potenciometriás titrálások során *Metrohm 785 DMP Titrino* titráló berendezést és *Metrohm-6.0233.100* kombinált üvegelektrodot használtunk. A titrálásokat 6 cm³-es oldattérfogatban, állandó kevertetés és termosztálás (25±0,2 °C), valamint 0,1 M (KCl, KNO₃) ionerősségek mellett 0,2 M KOH-oldattal végeztük, amelynek koncentrációját ismert koncentrációjú KH-ftalát pufferoldat titrálásával határoztuk meg. A mérések előtt és alatt a karbonátosodás elkerülése érdekében N₂- vagy Ar-gázt buborékolattunk át a rendszeren.

A pH-mérő két pontos kalibrációjára KH-ftalát puffer 0,0500 M oldatát (pH =4,005), valamint bórax puffer szén-dioxidtól elzárt, N₂-atmoszféra alatt tartott 0,0100 M oldatát (pH=9,180) használtuk.

A minták állandó ionerősségű oldata és a referencia elektród telített kálium-klorid-oldata között kialakuló potenciálkülönbség nem egyezik meg a pH-mérő beállítására használt KH-ftalát, illetve bórax-oldatok és a referencia elektród KCl-oldata között kialakuló diffúziós potenciálkülönbséggel. Az eltéréstől származó hibát az *Irving* és munkatársai által kidolgozott módszerrel vettük figyelembe,¹³⁴ amelynek megfelelően 0,0100 M HCl- vagy HNO₃ oldatot az adott ionerősség mellett lúgoldattal titrálva meghatároztuk a mért (pH_{read}) és a számított (-log[H⁺]) pH különbségét (*A*) a pH=1,70-2,50 tartományban. Vizsgálataink során ezt az értéket (*A*) használtuk fel a H⁺-ion-koncentrációnak a leolvasott pH értékekből történő kiszámítására. A számításokhoz meg kellett határozni a sztöchiometriai víziószorzat (*pK_w*)

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

adott körülményekre (0,1 M KCl vagy KNO₃, 25°C) vonatkozó értékét, ezt a fent említett titrálási görbe pH=10,5-11,5 intervallumból tehetjük meg.

A ligandumok protonálódási állandóinak meghatározása során ismert mennyiségű és pontos koncentrációjú HCl-oldattal a ligandumok 0,002 M oldatainak pH értékeit 1,7-1,8 körülire állítottuk és állandó ionerősség mellett (0,1 M KCl vagy KNO₃) 0,2 M KOH-oldattal titráltuk pH=11,5-ig. A $\log K_i^H$ értékeket mindegyik ligandum esetében 150-200 $V_{\text{lúg-pH}}$ adatpár felhasználásával számítottuk.

Az alkálifölfémekkel, átmenetifémekkel és lantanoidákkal képződő CyAAZTA komplexek stabilitási és protonálódási állandóinak meghatározásakor gyakorlatilag 1:1 fém-ligandum arányt állítottunk be úgy, hogy kb. 0,5% ligandumfelesleget alkalmaztunk. A pH-potenciometriás titrálásokat 0,002 M fém és ligandum koncentrációjú oldatokban az 1,8-11,5 pH tartományban végeztük. A komplexek stabilitási és protonálódási állandóinak számítása az 1,8-7,0 pH tartományban meghatározott 80-100 $V_{\text{lúg-pH}}$ adatpárokból történtek. Azokban az esetekben, ahol a pH>7 tartományban további deprotonálódási folyamatok következtek be (Cu(II)-, Zn(II)-, Pb(II)-, Cd(II)-, Ga(III)- és Ln(CyAAZTA)) az egyensúlyi állandókat ($\log K_{MLH-1}$) további 60-90 $V_{\text{lúg-pH}}$ adatpárokból számítottuk. A Ga(CyAAZTA)⁻ komplex stabilitási és protonálódási állandóit 1,7 – 12,0 pH tartományban meghatározott 200 $V_{\text{lúg-pH}}$ adatpárból számítottuk, figyelembe véve a Ga(CyAAZTA)H₋₁ és OH⁻-ionok közötti kompetíciós reakcióban képződő [Ga(OH)_x] (x=3,4) részecskék egyensúlyi állandóit (II.2. fejezet).

Az egyensúlyi állandókat a pH-potenciometriás titrálások adataiból a PSEQUAD számítógépes program segítségével számítottuk.¹³⁵

V.4 A Cu(CyAAZTA) komplex UV-látható spektrofotometriás vizsgálata

A Cu(CyAAZTA)²⁻ komplex képződése már pH=2,0 esetén közel 100%-os, így stabilitási állandóját pH-potenciometriás titrálással csak nagy bizonytalansággal tudtuk volna meghatározni. A Cu(CyAAZTA)²⁻ komplex stabilitási állandójának meghatározása érdekében spektrofotometriás vizsgálatokat végeztünk, melynek során a Cu(CyAAZTA)²⁻ komplex képződését követtük a Cu²⁺-ion d-d átmenetéhez tartozó abszorpciós sávján, pH~0,0-2,0 tartományban, Cary 1E spektrofotométerrel, 25 °C-on és 1 cm-es kvarcküvetta alkalmazásával. A vizsgálatokhoz hét különmintát készítettünk, amelyekben a kívánt [H⁺] eléréséhez számított mennyiségű 2,0 M HCl oldatot adtunk ([H⁺]=0,010, 0,025, 0,050, 0,100, 0,300, 0,500, 1,000 M, [CyAAZTA]=[Cu²⁺]= 2×10⁻³ M, Ionérősség: [HCl]+[KCl]=0,1 M [H⁺]≤0,1 M). A mintákat 7 napon keresztül 25°C-on tartottuk és az egyensúly beálltát követően mértük az abszorbancia értékeket 11 hullámhosszon (575, 595, 615, 635, 655, 675, 715, 735, 755 és 775 nm) 25°C-on, 1,000 cm fényúthosszú küvetákban. Az egyensúlyi számításokhoz figyelembe vettük a Cu²⁺, Cu(CyAAZTA)²⁻, Cu(HCyAAZTA)⁻, Cu(H₂CyAAZTA), Cu(H₃CyAAZTA)⁺ és Cu(CyAAZTA)H₁ részecskék moláris abszorbanciáját, amelyeket különböző koncentrációjú Cu²⁺-CyAAZTA 1:1 arányú rendszerek különböző pH-n felvett spektrumai alapján számítottuk ([Cu²⁺]=[CyAAZTA]=0,001, 0,002 és 0,003 M). A Cu(CyAAZTA)²⁻, Cu(HCyAAZTA)⁻, Cu(H₂CyAAZTA), Cu(H₃CyAAZTA)⁺ és Cu(CyAAZTA)H₁ komplexek moláris abszorbancia értékeinek meghatározása során felhasználtuk a Cu(CyAAZTA)²⁻ komplex protonálódási állandóit, amelyeket a pH-potenciometriás és látható spektrofotometriás titrálások eredményeiből számítottunk. Az UV-látható spektrofotometriás vizsgálatok spektrális paramétereit a V.4.1 táblázatban tüntettük fel. A pH-értékek mérése *Metrohm 827 pH Lab* pH-mérővel és *Metrohm 6.0234.100* kombinált elektróddal

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

történt. A pH mérő kétpontos kalibrációja során $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (0,0250-0,0250 M) puffert (pH=6,865), valamint a KH-ftalát (0,0500 M) puffert (pH=4,005) használtunk. A minták pH értékeit cc. HCl-val és szilárd KOH-dal állítottuk be. A Cu^{2+} , $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$, $\text{Cu}(\text{HCyAAZTA})^-$, $\text{Cu}(\text{H}_2\text{CyAAZTA})$, $\text{Cu}(\text{H}_3\text{CyAAZTA})^+$ és $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})\text{H}_{-1}$ részecskék moláris abszorbancia értékeit a pH-abszorbancia adatpárok illesztésével a SCIENTIST[®] program segítségével számítottuk.

V.4.1 táblázat A spektrofotometriás mérések paraméterei.

| Paraméterek | Cu^{2+} | |
|-------------------------------------|------------------|--|
| Hullámhossz (nm) | 400-800 | 210-340 |
| Küvetta hossz (cm) | 1,000 | 1,000 |
| Koncentráció (mol/dm ³) | 0,001 – 0.003 | 1×10^{-4} - 3×10^{-4} |
| Spektrális sáv szélesség (nm) | 2,0 | 2,0 |
| Adatköz (nm) | 0.5 | 0,250 |
| Átlagolási idő (s) | 0,1 | 0,3 |
| Felvételi sebesség (nm/perc) | 200 | 50 |

V.5. A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$, $\text{Eu}(\text{CyAAZTA})^-$ és $\text{Yb}(\text{CyAAZTA})^-$ komplexek NMR spektroszkópiás vizsgálata

Az $\text{Eu}(\text{CyAAZTA})^-$ és $\text{Yb}(\text{CyAAZTA})^-$ komplexeket és a Ga^{3+} -CyAAZTA rendszerben a komplexek képződését és protonálódását ¹H-, és ⁷¹Ga-NMR spektroszkópiás módszerrel tanulmányoztuk, amelyet *Bruker DRX 400* spektrométerrel végeztünk el (BB inverz z gradiens 5 mm fej). A ⁷¹Ga-NMR spektrumokat álló mintával vettük fel (512 scan) 122,02 MHz-en 50000 Hz-es ablakban, 90°-os impulzust (7 μs), 10 ms akvizíciós időt alkalmazva. A minták hőmérsékletét *Bruker VT-1000* hőmérsékletszabályozó egység tartotta állandó 298K értéken. A Ga^{3+} -CyAAZTA rendszer NMR

spektroszkópiás vizsgálatok titrálást végeztünk, amelynek során felvettük a 0,0150 M Ga^{3+} - $\text{H}_4\text{CyAAZTA}$ különböző pH-jú oldatainak ^1H - és ^{71}Ga -NMR spektrumait D_2O -t tartalmazó kapilláris alkalmazása mellett. A minták pH értékeinek beállítását és mérését a $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$ komplex UV-látható spektrofotometriás vizsgálatainál leírt módon végeztük. Az egyensúlyi számítások során $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ $\log\beta_{\text{GaLH-1}}$ értékét a $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ komplex ^{71}Ga -NMR jelének abszolút integrálja alapján számítottuk. A $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ komplex ^{71}Ga -NMR jelének moláris integrál értékeit 0,01, 0,015, 0,02 és 0,025 M $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ oldatok ^{71}Ga -NMR spektrumából számítottuk (pH=12,5, 0,1 M KCl, 25°C).

Az $\text{Eu}(\text{CyAAZTA})^-$ és $\text{Yb}(\text{CyAAZTA})^-$ komplexek ^1H -NMR spektroszkópiás vizsgálatai D_2O -val készült oldataikban szintén *Bruker DRX 400* spektrométerrel történtek. A vizsgált minták 0.01 M koncentrációjúak voltak a komplexekre nézve. A szabad ligandum zavaró proton jeleinek elkerülése végett 5%-os fémion-felesleget alkalmaztunk. A D_2O -os minták pD értékeit cc. DCl- és 2 M NaOD-oldatokkal állítottuk be (pD=pH_{mért}+0,4).¹³⁶ A vizes oldatok pH értékeinek beállítása, a pH-mérő kalibrálása és a minták pH mérése a V.4 részben leírtak alapján történt. A spektrumok kiértékelését a Bruker Winnmr[®] szoftvercsomaggal végeztük.

V.6. A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ és $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplexek disszociációjának kinetikai vizsgálata

A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ és $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplexek kinetikai inertségét Cu^{2+} -ionnal és transzferinnel lejátszódó cserereakciójukon keresztül UV-látható spektrofotometriás módszerrel Cary 1E spektrofotométerrel tanulmányoztuk a képződő $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$, illetve $\text{Ga}(\text{sTf})$ komplexek elnyelésén követve 25°C-on, 1,000 cm-es kvarcküvetta alkalmazásával. A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex fémioncsere reakcióját citrát jelenlétében végeztük

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

a Cu^{2+} - és a Ga^{3+} -ionok hidrolízisének elkerülése érdekében ($[\text{Cit}]=1,0\text{-}4,0$ mM). A pseudo-elsőrendű körülményeket a $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex nagy feleslegének alkalmazásával értük el ($[\text{Cu}^{2+}]=0,2$ mM; $[\text{GaL}]=1,0$ mM). A vizsgálatokat 6,0-9,0 pH tartományban végeztük, a pH állandó értéken tartására a minták MES (pH=6,0-7,0), HEPES (pH=7,0-8,5) és piperazin (pH=8,5-9,0) puffereket tartalmaztak (0,01 M). Az adott H^+ - és OH^- -koncentrációkhoz tartozó k_d pseudo-elsőrendű sebességi állandókat legalább 3 mérés átlagolásával kapott abszorbancia-idő görbék meredekségéből a III.3.8 egyenlettel számítottuk. A számításokhoz felhasználtuk a $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}$, $\text{Cu}(\text{CyAAZTA})\text{H}_{-1}$ és $\text{Cu}(\text{Cit})\text{H}_{-1}$ részecskék moláris abszorpciós koefficiensét, amelyeket különböző koncentrációjú oldataik 5 - 10 pH tartományban felvett abszorpciós spektrumaik 300 nm-en mért abszorbanciáiból számítottunk ($[\text{Cu}(\text{CyAAZTA})^{2-}]=0,1 - 0,3$ mM, $[\text{Cu}(\text{Cit})]=0,1 - 0,3$ mM, 0,1 M KCl, 25°C).

A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex kinetikai sajátosságait Cu^{2+} -ionokkal lejátszódó cserereakcióin keresztül tanulmányoztuk 0,1 M KCl ionerősség jelenlétében. A pseudo-elsőrendű körülményeket a kicserélő Cu^{2+} -ionok nagy feleslegének alkalmazásával értük el ($[\text{GdL}]=0,2$ mM, $[\text{Cu}^{2+}]=20 - 40$ mM). A vizsgálatokat a 2,1-4,5 pH tartományban végeztük, a pH állandó értéken tartására a minták diklórecetsavat (pH=2,1-2,5), monoklórecetsavat (pH=2,5-3,2), 1,4-dimetilpiperazint (pH=3,1-4,1) és N-metilpiperazin puffereket tartalmaztak (0,01 M). Az adott H^+ és kicserélő fémion koncentrációknál kapott abszorbancia-idő adatpárok III.3.7 egyenletre történő illesztésével számítottuk a k_d pseudo-elsőrendű sebességi állandókat.

A $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ és humán szérum transferrin között lejátszódó ligandumkcsere reakciókat pH=7,4, 0,025 M NaHCO_3 jelenlétében, 25°C-on 0,15 M NaCl ionerősség mellett tanulmányoztuk. A reakciókat 246 nm-en követtük. A pseudo-elsőrendű körülmények megteremtése érdekében a

$\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ komplexet nagy feleslegben alkalmaztuk ($[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-]=0,100 \text{ mM}$, $[\text{sTf}]=0,010$ és $0,015 \text{ mM}$). A kapott abszorbancia-idő adatpárok III.3.9 egyenletre történő illesztésével számítottuk a k_d pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat, figyelembe véve a $\text{Ga}(\text{sTf})$ komplex 246 nm-re vonatkozó moláris abszorpciós koefficiensét ($\epsilon_{246}=13800 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).⁸⁷ A számításokat a Micromath Scientist (Salt Lake City, UT, USA) számítógépes program segítségével végeztük.

V.7. A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex relaxációs sajátosságainak vizsgálata

A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ relaxációs sajátosságainak vizsgálatát Prof. Lorenzo Tei az Alessandriai "A. Avogadro" Egyetem, Természettudományi és Technológiai Tanszékének docensével közösen végeztük. A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex oldószer vízprotonok relaxációs sebességére gyakorolt hatását Bruker MQ-20-as típusú NMR spektrométerrel, 20 MHz protonrezonancia frekvencián, $0,4 \text{ cm}^3$ oldattérfogatban az oldószer vízprotonok longitudinális relaxációs idejének (T_1) mérésével tanulmányoztuk ($[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-]=0,001 \text{ M}$). Az oldószer vízprotonok longitudinális relaxációs idejét mágneszettség inverzió módszerrel (*inversion recovery* impulzus szekvenciával $180^\circ-\tau-90^\circ$) határoztuk meg. Egy-egy mérés során 12 különböző késleltetési időt (τ) alkalmaztunk, amit a készülék automatikusan állít be és egy adott késleltetési időnél 5-8 érték átlagolásával számoltuk az adott T_1 értéket. A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex $0,001 \text{ M}$ koncentrációjú oldatát 1% ligandum felesleg alkalmazásával állítottuk elő, melynek pH-ját cc. HCl-val és szilárd KOH-dal állítottuk be pH=7,0 körüli értékre. A vizsgált oldatok pH mérése és a pH-mérő kalibrálása a V.4 részben leírtak alapján történt. A hőmérséklet állandóságát SCANVAC SHC 2000 típusú termosztáttal biztosítottuk ($25\pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$). A Gd^{3+} - CyAAZTA rendszer relaxivitásának **pH-függése** vizsgálatokor a fém-ligandum 1:1 arányú rendszer oldatának pH

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

értékeit 2,0 és 12,5 között változtattuk cc. HCl és szilárd KOH felhasználásával ($[Gd^{3+}] = [CyAAZTA] = 0,001$ M, 0,1 M KCl). Az oldatok elkészítésekor puffert nem alkalmaztunk és a pH beállítása mindig közvetlenül a mérés előtt történt. A vizsgálatokat 25 °C fokon végeztük. A $Gd(CyAAZTA)^-$ komplex oldószer vízprotonok relaxáció sebességére gyakorolt hatásának **hőmérsékletfüggésénél** a minták hőmérsékletét 280 – 325 K közötti tartományban változtattuk 5 K-es lépésközökkel (pH=7,0).

A $Gd(CyAAZTA)^-$ relaxivitásának **térerő függését** nem-deuterált vizes közegben Stelar SmarTracer relaxométerrel (Stelar s.r.l., Mede (PV), Italy) tanulmányoztuk 0,00024 - 0,25000 T tartományban (Proton Larmor Frekvencia= 0,01-10 MHz). A $Gd(CyAAZTA)^-$ komplex 15 – 80 MHz proton Larmor frekvenciákhoz tartozó relaxitás értékeit *Bruker WP80 NMR* elektromágnessel kombinált Stelar Relaxométerrel határoztuk meg. A hőmérséklet Stelar VTC-91 termosztáttal temperált levegő befúvatásával tartottuk állandó értéken és mértük kalibrált réz termoelemmel ($\pm 0,1$ °C).

A változó hőmérsékletű ^{17}O NMR méréseket 5 mm fejjel és standard hőmérsékletszabályozó egységgel felszerelt Bruker Avance III spektrométerrel végeztük (11,74 T, 67,8 MHz ^{17}O -NMR). A $Gd(CyAAZTA)^-$ komplex vizes oldata 1,0 % $^{17}OH_2$ vizet (Cambridge Isotope) tartalmazott ($[Gd(CyAAZTA)^-] = 20$ mM, pH=7,0). A mért transzverzális relaxációs sebességeket ($R_2^{obs} = 1/T_2^{obs}$) a kapott jel félértékszélességéből számítottuk ($R_2^{obs} = \pi \Delta\nu_{1/2}$).

V.8. A Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok hatása négy Gd^{3+} -alapú, nyíltláncú MRI kontrasztanyag disszociációjának sebességére

A Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok hatását a $Gd(DTPA-BMA)$, $Gd(DTPA)^{2-}$, $Gd(BOPTA)^{2-}$ és $Gd(EOB-DTPA)^{2-}$ komplexek Cu^{2+} -ionokkal lejátszódó cserereakciói sebességére UV-látható spektrofotometriás módszerrel tanulmányoztuk a képződő $Cu(II)$ -komplexek abszorpciós sávján. A

vizsgálatokat Cary 100 Bio spektrofotométerrel, 0,874 cm-es tandemküvetében 25°C és 37°C-on végeztük. A fémioncsere reakciókat a képződő CuL komplex elnyelési maximumán, 300 nm-en követtük 0,15 M NaCl ionerősség mellett. A kicserélő Cu²⁺ és a felszabaduló Gd³⁺-ionok hidrolízisének elkerülése érdekében citrát felesleget alkalmaztunk ([Cit]_t=0,5 mM). A fémioncsere reakciók sebességét a Gd(III)-komplexek nagy feleslegének alkalmazásával pszeudo-elsőrendű körülmények mellett tanulmányoztuk, amit ([GdL]=2,0 mM, [Cu²⁺]=0,2 mM). A Ca²⁺- vagy Mg²⁺-ionok koncentrációját 0 – 100 mM tartományban változtattuk ([Ca²⁺] vagy [Mg²⁺]=0, 10, 20, 30, 40, 100 mM). A méréseket pH=7,0 és 7,5-ön végeztük 0,01 M HEPES puffert alkalmazva. A reakciósebesség [Cu²⁺] függését nem vizsgáltuk, mivel korábbi vizsgálatok alapján a reakciók sebessége független a Cu²⁺-ion koncentrációjától citrát jelenlétében.^{50,53} A Gd(III)-komplexek Cu²⁺-ionnal lejátszódó cserereakciói *k_d* pszeudo-elsőrendű sebességi állandóit az abszorbancia-ido adatpárok III.3.8 egyenletre történő illesztésével számítottuk. A számításokhoz szükséges moláris abszorpciós koefficienseiket az alábbi táblázatban foglaltunk össze. A számításokat a Micromath Scientist (Salt Lake City, UT, USA) számítógépes program segítségével végeztük.

V.8.1 táblázat. Cu(II)-komplexek moláris abszorpciós koefficiense 300 nm-en (25 és 37°C, 0,15 M NaCl)

| | Cu(DTPA-BMA) | Cu(DTPA) | Cu(BOPTA) | Cu(EOB-DTPA) | Cu(Cit)H ₁ |
|--|--------------|----------|-----------|--------------|-----------------------|
| $\epsilon_{300\text{nm}}$ (M ⁻¹ cm ⁻¹) | 3293 | 3969 | 3797 | 4121 | 921 |

A kétmagvú komplexek képződését ¹H-NMR, ¹³C-NMR spektroszkópiás módszerekkel pH=7,4-en, 310 K-en, 0,15 M NaCl ionerősség mellett ([Y(DTPA)²⁻]=0,1 M, [Ca²⁺]= 0,5 és 1,0 M, [Mg²⁺]=1,0 M]) és ¹H-NMR relaxometrián 0 – 100 mM Ca²⁺ vagy Mg²⁺-ion koncentráció mellett 25°C-

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátságainak vizsgálata

on ($[\text{GdL}]=1 \text{ mM}$, $[\text{Ca}^{2+}]$ vagy $[\text{Mg}^{2+}]= 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 \text{ mM}$) vizsgáltuk.

V.9. A kontrasztanyagok és a csont felülete között kialakuló kölcsönhatások vizsgálata

A Gd^{3+} -alapú MRI kontrasztanyag disszociációja során képződő GdPO_4 csontok felületén való esetleges megkötődését infravörös spektroszkópiával vizsgáltuk. Az Omniscan és a ProHance kontrasztanyagok és a csont felülete között kialakuló kölcsönhatásokat FT-IR spektroszkópiával, Raman spektroszkópiával és a mikrospektroszkópiával vizsgáltuk. A kontrasztanyagok viselkedését többféle kísérleti technika alkalmazásával tanulmányoztuk: *i*) a kontrasztanyag csont felületére történő felcseppentése (cseppentéses módszer); *ii*) a kontrasztanyag csont felületén való folyamatos cirkulációja (cirkulációs módszer). A vizsgálatokat vízben és szérumban végeztük, mindkét technika esetében. A vizsgálatokhoz elengedhetetlen az alkalmazott anyagok és oldatok referencia spektrumainak ismerete. A szilárd anyagok spektrumát KBr-dal eldörzsölve diffúz reflexiós infravörös spektroszkópiás módszerrel vettük fel egy IFS 66v/S FT-IR spektrométerrel. A folyadékmintákat pedig, szárítás után gyengített teljes reflexiós módszerrel egy VERTEX 80 típusú FT-IR spektrométerrel vizsgáltuk. Az Omniscan és a ProHance kontrasztanyagok csont felületén való megkötődését FT-IR mikrospektroszkópiával (Tensor 27 FT-IR spektrofotométer Hyperion 3000 FPA (focal plane array) detektorral $\text{pH}=7,4$ -en és 25°C -on követtük. A kontrasztanyagok teljes koncentrációja a cseppentéses technika során 1 mM , míg a cirkulációs technika során 10 mM volt. A mintákról 15-szörös nagyítású infraképek készültek. A cirkulációs vizsgálatok során a vérszérumot egy Watson Marlow 520Di/L perisztaltikus pumpa segítségével áramoltattuk. A csontszeleteket és a marha vérszérumot az Umeå Centre for Molecular Medicine (UCMM) munkatársai bocsátották rendelkezésünkre. A

vizsgálatokhoz használt csontokat 8 hetes egerek (B6 törzs) lábszárcsontjainak fagyasztásos metszéssel nyerték (8 μm).

A kontrasztanyag csont felületére történő felcseppentése 3 módszerrel történt, amelyeknek lépéseit a V.9.1. táblázat tartalmazza. Az o12 technika esetében a kontrasztanyag 1 mM-ját egyszerre vittük fel, míg az m32 módszer esetében 3 lépésben (3x0,33 mM). Mivel az infravörös spektroszkópia különösen érzékeny a víz rezgési sávjaira, ezért minden vizes oldat felcseppentése után a mintát levegőn szárítottuk. A csontszeletekről CaF_2 tárgylemezen készítettünk infraképeket.

III.9.1 táblázat A cseppentéses módszerek sémája

| | o12 | m32 |
|-------|--------------|--------------|
| 1.nap | CA felvitele | CA felvitele |
| 2.nap | Vizes mosás | CA felvitele |
| 3.nap | Vizes mosás | CA felvitele |
| 4.nap | - | Vizes mosás |
| 5.nap | - | Vizes mosás |
| 6.nap | - | - |

A cirkulációs módszer esetében a csontszeleten folyamatosan áramoltattuk a marha vérszérumot körülbelül 94 órán keresztül. Először kondicionálás céljából csak a vérszérumot áramoltattuk (kb. 4,5 óra), majd a szérumhoz olyan mennyiségű MRI kontrasztanyagot adtunk, hogy annak koncentrációja a rendszerben 10 mM legyen. A Gd(III)-komplexet tartalmazó vérszérumot 41 órán keresztül áramoltattuk a csontszelet felett, majd 49 órán keresztül ismét csak vérszérumot áramoltattunk mosás céljából (a kontrasztanyagok kb. 40 óra alatt ürülnek ki az emberi szervezetből). A kísérlet közben kb. 2 óránként készítettünk infraképeket. A kapott adatokat MCR-ALS (**M**ultivariate **C**urve

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

Resolution-Alternating Least Squares) és **OPLS-DA (Orthogonal Projections to Latent Structures – Discriminant Analysis)** programokkal értékeltük ki. Az **MCR-ALS** program főkomponens analízisre épül, így bonyolultabb rendszerek (pl. folyamatos cirkuláció alatt készült felvételek) leírására önmagában nem mindig elegendő. A folyamatos cirkuláció során kapott spektrumokat diszkrimináns analízissel értékeltük ki (**SIMCA-P**, Umetrics AB). A spektrumok alapvonal korrekcióját és normalizációját (teljes csúcsterület) ingyenes, szabad forráskódú Matlab szkripttel végeztük (<http://www.kbc.umu.se/english/visp/download-visp/>).

VI. Összefoglalás

Munkám során tanulmányoztam a CyAAZTA ligandum néhány alkáliföldfém(II)-, átmenetifém(II)- és lantanida(III)-ionokkal alkotott komplexeinek egyensúlyi és szerkezeti, valamint a gallium(III)- és gadolinium(III)-komplexek kinetikai, illetve a Gd(CyAAZTA) relaxációs sajátosságait. A vizsgálatok eredményei bővíthetik a merevített ligandumok fémkomplexeivel kapcsolatos koordinációs kémiai ismereteinket, de hasznosak lehetnek a Gd(III)-, illetve Ga(III)-komplexek MRI kontrasztanyagként, illetve radiofarmakonként történő alkalmazása szempontjából is. A Gd³⁺-alapú MRI kontrasztanyagoknak, illetve a disszociációjukkal képződő szabad Gd³⁺-nak a Nefrogén Szisztémás Fibrózis (NSF) megbetegedés kialakulásában feltételezett szerepe a mai napig nem tisztázott. Az endogén fémionok cserereakciókon keresztül elődizézhettek a Gd(III)-komplexek disszociációját, ezért vizsgáltam a testfolyadékokban viszonylag nagy koncentrációban jelenlévő Ca²⁺- és Mg²⁺-ionok négy, a klinikai gyakorlatban használt nyíltláncú kontrasztanyag kinetikai tulajdonságaira gyakorolt hatását. Az MRI kontrasztanyagok *in vivo* viselkedésének mélyebb megértése céljából tanulmányoztam a nyíltláncú Gd(DTPA-BMA) és a makrociklusos Gd(HP-DO3A) csontszövetekkel kialakított kölcsönhatásait a megkötődő Gd³⁺-ion mennyiségének és minőségének a meghatározásával.

Az elért új tudományos eredmények a következőkben foglalhatók össze:

A CyAAZTA ligandum fémkomplexeinek stabilitási állandói 1-2 nagyságrenddel kisebbek, mint az analóg AAZTA komplexeké, mivel a ciklohexil csoport jelentősen növeli a ligandum merevségét, torzítva a ligandum gyűrű szerkezetét, lecsökkentve az amino-N donoratomok bázicitását. A Ln(CyAAZTA) komplexek stabilitási állandói a La³⁺-tól Gd³⁺-ig nőnek, majd a sorozat második felében csökkennek. A CyAAZTA

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

koordinációs „kalitkájának” mérete jól „illik” a Gd^{3+} -ionhoz, bár a komplex stabilitási állandója még így is kisebb, mint az analóg $Gd(AAZTA)$ -é az $AAZTA$ ligandum flexibilitása miatt. A $Ln(CyAAZTA)$ komplexek szerkezeti merevségét a paramágneses Eu - és $Yb(CyAAZTA)$ komplexek 1H -NMR spektrumai is megerősítették. A $Ga(CyAAZTA)$ komplex stabilitási állandója is kisebb, mint a $Ga(AAZTA)$ -é, ami feltehetően a $CyAAZTA$ donoratomjai által a Ga^{3+} -ion számára kialakított koordinációs üreg kevésbé optimális szerkezetével értelmezhető. A vegyes-hidroxo $[Ga(CyAAZTA)OH]^{2-}$ komplex $pH > 6,0$ esetén közel három egységgel nagyobb pH -nál képződik, mint a $[Ga(AAZTA)OH]^{2-}$. 1H - és ^{71}Ga -NMR vizsgálataink szerint a $[Ga(CyAAZTA)OH]^{2-}$ komplexben a hidroxidion közvetlenül a fémionhoz koordinálódik, míg két gyűrű karboxilát-O donoratom nem vesz részt a Ga^{3+} koordinációjában. A $Ga(CyAAZTA)^-$ ^{71}Ga -NMR jele $pH=5,0$ értéken, szobahőmérsékleten lényegesen szélesebb, mint $pH=3,5$ esetén a $Ga(AAZTA)^-$ jele, ami egyértelműen utal a Ga^{3+} -ion aszimmetrikusabb koordinációs környezetére a $CyAAZTA$ ligandum merev szerkezete miatt.

A $Ga(CyAAZTA)$ kinetikai inertségét Cu^{2+} -ionnal és transzferinnel lejátszódó cserereakcióin keresztül tanulmányoztuk. Fiziológiához közeli feltételek mellett a cserereakciók a $[Ga(CyAAZTA)OH]^{2-}$ spontán és OH^- -katalizált disszociációjával játszódnak le. A spontán disszociáció feltételezhetően intramolekuláris átrendeződéssel a donoratomok szimultán dekoordinációjával, a Ga^{3+} -ion szabaddá válásával megy végbe és ez gyorsabb, mint a $[Ga(AAZTA)OH]^{2-}$ hasonló folyamata, ami a Ga^{3+} -ion és az amino-N donoratomok közötti gyengébb kölcsönhatással értelmezhető. A $Ga(CyAAZTA)$ disszociációjának fiziológias feltételekre számított felezési ideje harmada a $Ga(AAZTA)^-$ komplexének. Ugyanakkor ez a felezési idő még hétszer nagyobb, mint a ^{68}Ga radioaktív bomlásának felezési ideje

($t_{1/2}=67,71$ perc), ezért a komplex ígéretes lehet PET radiofarmakonok fejlesztésére.

A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ Cu^{2+} -ionnal lejátszódó fémioncsere reakciói a $\text{Gd}(\text{III})$ -komplex protonkatalizált disszociációjával játszódnak le több, mint két nagyságrenddel lassabban, mint a $\text{Gd}(\text{AAZTA})^-$ esetében. A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ meglepően nagy kinetikai inertséggel rendelkezik, bár stabilitási állandója kisebb, mint a $\text{Gd}(\text{AAZTA})^-$ -é. A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ $\text{pH}=7,4$ -re számított felezési ideje 91 év (25°C), amely vetekszik néhány makrociklusos $\text{Gd}(\text{III})$ -komplex disszociációjának felezési idejével, ami tudomásunk szerint a legnagyobb az ismert nem makrociklusos, két belsőszférás vízmolekulát tartalmazó $\text{Gd}(\text{III})$ -komplexek között.

A $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ komplex relaxivitása $r_{1p}= 8,3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (20 MHz , $\text{pH}=7,4$, 25°C), ami egyértelműen utal két vízmolekula jelenlétére a Gd^{3+} -ion belső koordinációs szférájában. A ^1H - és ^{17}O -NMR relaxometriás vizsgálatok alapján a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ relaxációs sajátosságai nagyon hasonlóak a $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ komplexéhez. A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ valamivel nagyobb relaxitását a komplex lassabb rotációs mozgása eredményezi. Endogén ligandumok jelenlétében a $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ belső szférájában található két vízmolekula nem helyettesíthető laktát, citrát- és foszfáttal. A $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ ciklohexil csoportja Humán Szérum Albuminnal nem kovalens kölcsönhatást alakíthat ki, amely a komplex nagyobb *in vivo* relaxitását eredményezi.

A töltéssel rendelkező $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$, a $\text{Gd}(\text{BOPTA})^{2-}$ és a $\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})^{2-}$ komplexek Cu^{2+} -ionnal citrát jelenlétében lejátszódó cserereakciói sebességét a Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok jelentősen növelik, míg a semleges $\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})$ komplex fémioncsere folyamataira lényegében nincsenek hatással. Ezzel szemben a két negatív töltésű $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$, a $\text{Gd}(\text{BOPTA})^{2-}$ és a $\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})^{2-}$ disszociációjának sebessége fiziológiás koncentrációjú

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionok jelenlétében közelítőleg 25%-kal nagyobb, így a komplexek Ca^{2+} - és Mg^{2+} -asszisztált disszociációja meghaladhatja a citrát- vagy foszfácionok által katalizált disszociációjuk sebességét. ^1H - és ^{13}C -NMR és relaxometriás vizsgálataink szerint a Gd(DTPA) származékok Ca^{2+} és Mg^{2+} hatására lejátszódó disszociációja vegyes kétmagvú $[\text{Gd}(\text{L})\text{M}]$ komplex ($\text{M}=\text{Ca}^{2+}$ vagy Mg^{2+}) képződésén keresztül történik, amely lényegesen labilisabb, mint a GdL komplex, így disszociációja valószínűbb.

A Gd(DTPA-BMA) és Gd(HP-DO3A) komplexek egércsontok felületével kialakított kölcsönhatása infravörös spektroszkópiás (IR) vizsgálataink szerint a két komplex esetében eltérő. A Gd(DTPA-BMA) a csont szerkezetében alapvető, irreverzibilis változásokat okozott, amit feltételezhetően a Gd(III)-komplex disszociációja során képződő GdPO_4 csontokba történő beépülése eredményezi a $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ -hoz való hasonlósága miatt. A Gd(HP-DO3A) csontok felületén intakt állapotban reverzibilisen kötődik, ami a csontokban található szerves alkotók és a Gd(III)-komplex közötti gyenge kölcsönhatás kialakulásával értelmezhető. A kapott adatok azt bizonyítják, hogy a makrociklusos Gd(HP-DO3A) a testfolyadékokban nem disszociál, míg a nyíltláncú Gd(DTPA-BMA) disszociációja bekövetkezik. Az IR vizsgálatok eredményei figyelemre méltóak és számos korábbi *in vivo* vizsgálat eredményét értelmezhetik.

VII. Summary

In this work the equilibrium and structural behaviours of the alkaline earth metal(II)-, transition metal(II)- and lanthanide(III)-complexes formed with CyAAZTA ligand, the kinetic properties of Ga(CyAAZTA) and Gd(CyAAZTA), as well as relaxation behaviour of Gd(CyAAZTA)⁻ have been examined in detail. The results obtained may increase our coordination chemical knowledge on the interactions between the metal ions and rigidified ligands, besides can be useful for the development of Gd³⁺ based MRI contrast agents (GdBCAs) and ⁶⁸Ga³⁺ containing radiopharmaceuticals for PET examinations. The role of GdBCAs in the development of the disease called Nephrogenic Systemic Fibrosis (NSF) is unclear up to now. The onset of NSF is generally linked to the *in vivo* dissociation of GdBCAs through transmetallation reactions and the deposition of Gd³⁺ in tissues as e.g. Gd(PO₄) precipitate. Endogenous metal ions like Cu²⁺, Zn²⁺ and Ca²⁺ can participate in these transmetallation reactions of Gd(III) complexes resulting in the release of Gd³⁺ ion and the formation of the related Cu(II)-, Zn(II)- and Ca(II)-complexes. In spite of the high *in vivo* concentrations, the effect of the Ca²⁺ and Mg²⁺ ions on the rate of the transmetallation reactions of linear GdBCAs has not been investigated. Thus the effect of the Ca²⁺ and Mg²⁺ ions on the kinetic properties of 4 clinically used linear GdBCAs was also studied near to physiological condition. To better understand the *in vivo* behavior of GdBCAs, the interactions between the linear Gd(DTPA-BMA), the macrocyclic Gd(HP-DO3A) and bone tissues were explored by determining the quality and quantity of the Gd³⁺ ion interacting with the components of the bone tissues. The new scientific results are summarized as follows:

The stability constants of metal complexes of CyAAZTA ligand were found to be 1-2 orders of magnitude lower than those of the corresponding AAZTA complexes. The lower stability can be explained by the presence of

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

the cyclohexyl group that results in the distortion of the ligand structure and the lower basicity of the amino-N donor atoms. The stability constants of Ln(CyAAZTA) complexes increase from the La³⁺ to Gd³⁺ and then decrease in the second half of the Ln³⁺ series. The coordination cavity of the CyAAZTA is favourable for the Gd³⁺ ion, although the stability of its complex is lower than that of the analogous Gd(AAZTA) due to the flexibility of the AAZTA ligand. The structural rigidity of Ln(CyAAZTA) complexes has been confirmed by the ¹H NMR spectra of paramagnetic Eu(III)- and Yb(CyAAZTA) complexes. The stability constant of Ga(CyAAZTA) is also lower than that of Ga(AAZTA), which was interpreted by the less optimal coordination cage formed by the donor atoms of CyAAZTA for the Ga³⁺ ion. The mixed hydroxo- [Ga(CyAAZTA)OH]²⁻ complex is formed at pH>6.0, close to three pH units higher than the [Ga(AAZTA)OH]²⁻, which indicates the significantly lower stability of the [Ga(CyAAZTA)OH]²⁻ species. Based on the ¹H and ⁷¹NMR studies, the hydroxide ion is directly bound to the metal ion in the [Ga(CyAAZTA)OH]²⁻, while two ring carboxylate-O donor atoms do not participate in coordination of Ga³⁺ ion. The ⁷¹Ga-NMR signal of Ga(CyAAZTA)⁻ at pH=5.0 at room temperature is considerably broader than the signal of Ga(AAZTA)⁻ at pH=3.5, which might be interpreted by the asymmetric coordination environment of the Ga³⁺ ion or by the presence of coordination isomers due to the rigid structure of the CyAAZTA ligand.

The kinetic inertness of Ga(CyAAZTA) have been studied by following the exchanging reactions with Cu²⁺ and transferrin. Near to physiological conditions the exchange reactions take place by the spontaneous and OH⁻-catalyzed dissociation of [Ga(CyAAZTA)OH]²⁻ followed by the fast reaction of the free Ga³⁺ ion or CyAAZTA ligand with transferrin or Cu²⁺-ion, respectively. The spontaneous dissociation of [Ga(CyAAZTA)OH]²⁻

presumably occurs through the intramolecular rearrangement of the complex with the simultaneous decoordination of all donor atoms leading to the release of Ga^{3+} ion. Because of the slower spontaneous dissociation of $[\text{Ga}(\text{AAZTA})\text{OH}]^{2-}$, it can be assumed that the interactions between the Ga^{3+} ion and the amino-N donor atoms in $[\text{Ga}(\text{CyAAZTA})\text{OH}]^{2-}$ are weaker. The dissociation half-life of $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ at physiological conditions is one third that of the $\text{Ga}(\text{AAZTA})^-$ complex, but even this dissociation half-life is seven times higher than the half-life of radioactive decay of ^{68}Ga isotope ($t_{1/2} = 67.71$ min), so the $\text{Ga}(\text{CyAAZTA})^-$ complex can be regarded as a good candidate for the development of ^{68}Ga based PET radiopharmaceuticals.

The transmetallation reaction of $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ with Cu^{2+} takes place by the proton assisted dissociation of the Gd(III)-complex, which is more than 200 times slower than that of $\text{Gd}(\text{AAZTA})^-$. $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ has surprisingly high kinetic inertness although its stability constant is lower than that of $\text{Gd}(\text{AAZTA})^-$. The half-life of dissociation of the $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ complex was found to be 91 years (pH 7.4 and 25°C), which is higher than that of several Gd(III) complexes formed with macrocyclic ligands. To the best of our knowledge, the kinetic inertness of $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ is the highest among the known non-macrocyclic Gd(III) complexes, containing two inner sphere water molecules.

The relaxivity of the $\text{Gd}(\text{CyAAZTA})^-$ complex is $r_{1p} = 8.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (20 MHz, pH 7.4 and 25°C), which clearly indicates the presence of two water molecules in the inner coordination sphere of the Gd^{3+} ion. Based on the ^1H - and ^{17}O -NMR studies, the relaxation parameters (k_{ex}^{298} , Δ^2 , τ_V^{298} and $\Delta H_M^\#$) governing the inner- and outer-sphere relaxation enhancement of $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ are very similar to those of $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$. The higher relaxivity of $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ resulted in by the slower rotation of the Gd(III)-complex ($\tau_R^{298} = 97.4$ ps). Based on the relaxivity

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

values obtained in the presence of endogenous ligands, the two inner-sphere water molecules of the $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ can not be substituted by lactate, citrate and phosphate ions. The relaxivity of $[\text{Gd}(\text{CyAAZTA})(\text{H}_2\text{O})]$ is higher in the presence of Human Serum Albumin (HSA) due to the non-covalent interaction between the cyclohexil moiety and HSA.

The rate of exchange reactions between the charged $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$, $\text{Gd}(\text{BOPTA})^{2-}$ and $\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})^{2-}$ complexes and Cu^{2+} ion in the presence of citrate significantly increases with growing concentration of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions, while the rates of transmetallation reactions of the neutral $\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})$ complex are not affected. In the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions, the dissociation rates of the negatively charged $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$, $\text{Gd}(\text{BOPTA})^{2-}$ and $\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})^{2-}$ complexes increase by approximately 25%, which exceed the effect of citrate or phosphate ion assisted dissociation rate of these $\text{Gd}(\text{III})$ -complexes at physiological condition. Relaxometric, ^1H - and ^{13}C -NMR studies show that the transmetallation of $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$ derivatives in the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions occur through the formation of mixed binuclear $[\text{Gd}(\text{L})\text{M}]$ complexes ($\text{M} = \text{Ca}^{2+}$ or Mg^{2+}), which are considerably more labile than the GdL complex, so its dissociation is more probable.

The interactions between $\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})$ and $\text{Gd}(\text{HP-DO3A})$ complexes and the bone tissues of mouse have been investigated by Infrared Spectroscopy (IR). $\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})$ caused radical and irreversible changes in the structure of the bone, which may be interpreted by the incorporation of GdPO_4 (formed with the released Gd^{3+} ion by the dissociation of $\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})$) because of the similar nature of GdPO_4 and $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. The interaction between $\text{Gd}(\text{HP-DO3A})$ and bone tissues is reversible which might be interpreted by the weak interaction between the organic components of the bones and the intact $\text{Gd}(\text{III})$ complex. These results confirm that

macrocyclic the Gd(HP-DO3A) does not dissociate in body fluids, whereas the dissociation of linear Gd(DTPA-BMA) might occur. The results of IR studies are remarkable and interpret the outcome of several previous *in vivo* studies.

VIII. Irodalomjegyzék

1. Zs. Baranyai, Z. Pálkás, F. Uggeri, E. Brücher; *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2010**, *13*, 1948-1956
2. T. Grobner, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **2006**, *21* (4), 1104 – 1108.
3. P. Marckmann, L. Skov, K. Rossen, A. Dupont, M. B. Damholt, J. G. Heaf, H. S. Thomsen, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2006**, *17* (9), 2359 –2362.
4. R.B. Lauffer: *Chem. Rev.*, **1987**, *87*, 901.
5. V. Jacques, J. F. Desreux, *New Classes of MRI Contrast Agents*. In: W. Krause,eds., *Topics in Current Chemistry*, Vol. 221: *Contrast Agents I. Magnetic Resonance Imaging*, **2002**, Berlin: Springer-Verlag,
6. P. C. Lauterbur, M. H. Mendoca Dias, A. M. Rudin. In: P. L. Dutton, L. S. Leigh, A. Scarpa, editors, *Frontier of Biological Energetics*, **1978**, New York: Academic P.
7. P. Caravan, J.J. Ellison, T.J. McMurry, R.B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293.
8. T. Bach-Gensamo, *Acta Radiol.*, **1993**, *387*, 1.
9. P. Reimer, Tombach, *Eur. Radiol.*, **1998**, *8*, 1198
10. S. Grubnic, A. R. Padhani, P. B. Revell, J. E. Husband, *Am. J. Roentgenol.*, **1999**, *173*, 173.
11. K. M. Ward, A. H. Aletas, R. S. Balaban, *J. Magn. Reson.* **2000**, *143*, 79.
12. A. Oskendal, P. Hals, *J Magn Reson Imaging* **1993**, *3*, 157–165.
13. T. Moller, L.C. Thompson, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1962**, *24*, 499.
14. H. J. Weinmann, R. C. Brasch, W. R. Press and G. E. Webey, *Am. J. Roentgenol*, **1984**, *142*, 619.
15. H. Gries and H. Miklautz, *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, **1984**, *16*, 105.
16. P. Dawson, *Gadolinium chelates: chemistry*. In: P. Dawson, D. O. Cosgrove, R.G. Grainger, editors, *Textbook of contrast media*. **1999**. Oxford: Isis Medical Media; 291–296.
17. J. F. Desreux, D. Gilsoul, *Chemical synthesis of paramagnetic complexes*. In: Thomsen HS, Muller RN, Mattrey, editors, *Trends in contrast media*. **1999**. Heidelberg: Springer Verlag; 161–169
18. S. K. Morcos, *Br J Radiol* **2007**, *80*, 73–76.
19. J. Desreux, P.P. Barthélemy, *Nucl. Med. Biol.*, **1988**, *15*, 9.
20. W.P. Cacheris, S. C. Quay, S. M. Rocklage, *Mag. Reson. Imaging*, **1990**, *8*, 467.
21. K. Kumar, C. A. Chang, M. F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, **1993**, *32*, 587.
22. E. Brücher, A.D. Sherry, *Stability and toxicity of contrast agents* In: A. E. Merbach, É. Tóth, editors. *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*. **2001**, Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.; 249–257

23. M. Port, J. M. Idee, C. Medina, C. Robic, M. Sabaton, C. Corot, *Biomaterials*, **2008**, *21*, 469.
24. É. Tóth, L. Helm, A. Merbach, *Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Theory and Mechanism*, In: A. E. Merbach, L. Helm, É. Tóth editors, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; 2nd Edition, **2013**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 25-82
25. S. Aime, M. Botta, S. G. Crich, G. B. Giovenzana, R. Pagliarin, M. Piccinini, M. Sisti, E. Terreno, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1997**, *2*, 470.
26. D. Parker, A. A. G. Williams, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1996**, 3613.
27. T. J. Swift, R. E. Connick, *J. Chem. Phys.*, **1962**, *37*, 307
28. L. Hwang, J. H. Freed, *J. Chem. Phys.*, **1975**, *63*, 4017.
29. J. H. Freed, *J. Chem. Phys.*, **1978**, *69*, 4034.
30. M. Botta, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, *3*, 399
31. J. W. Chen, R. L. Belford, R. B. Clarkson, *J. Phys. Chem. A.*, **1998**, *102*, 2117.
32. S. Aime, L. Calabi, C. Cavallotti, E. Gianolio, G. B. Giovenzana, P. Losi, A. Maiocchi, G. Palmisano, M. Sisti, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 7588
33. Zs. Baranyai, F. Uggeri, G. B. Giovenzana, A. Bényei, E. Brücher, S. Aime; *Chemistry - A European Journal*, **2009**, *15*, 1696-1705
34. R. B. Lauffer, D. J. Parmelee, S. U. Dunham, H. S. Ouellet, R. P. Dolan, S. Witte, T. J. McMurphy, R. C. Walovitch, *Radiology* **1998**, *207*, 529-538
35. a.) E. C. Unger, T. Fritz, G. Wu et al. *J. Liposome Res.*, **1994**, *4*, 811. b.) S. Paeuser, R. Reszka, S. Wagner, K. J. Wolf, H. J. Buhr and G. Berger, *Anti-Cancer Drug Des.*, **1997**, *12*, 125. c.) S. L. Fossheim, J. M. Collet, S. Mansson, A. K. Fahlvik, R. N. Muller and J. Klaveness, *Invest. Radiol.*, **1998**, *33*, 810.
36. a.) R. Rebizak, M. Schaefer and E. Dellacherie, *Bioconjugate Chem.*, **1998**, *9*, 94. b.) É. Tóth, L. Helm, K. E. Kellar and A. E. Merbach, *Chem. Eur. J.*, **1999**, *5*, 1202. c.) D. L. Ladd, R. Hollister, X. Peng, D. Wei, D. Delecki, R. A. Snow, J. L. Toner, K. Kellar, J. E. Vinay, C. Desay, G. Raymond, L. B. Kinter, T. S. Desser, D. L. Rubi, *Bioconjugate Chem.*, **1999**, *10*, 361.
37. D. J. Parmelee, R. C. Walovitch, S. Ouellet-Hillori and R. B. Lauffer, *Invest. Radiol.*, **1977**, *32*, 741.
38. a.) S. Aime, M. Botta, M. Fasano, E. Terreno, P. Kinches, L. Calabi and L. Paleari, *Magn. Reson. Med.*, **1996**, *35*, 648. b.) S. L. Fossheim, K. A. Il'yasov, J. Hennig and A. Bjornerud, *Acta Radiol.*, **2000**, *7*, 1107.
39. a.) S. Zhang, K. Wu and A. D. Sherry, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 3192.
40. b.) J. Hall, R. Häner, S. Aime, M. Botta, S. Faulkner, D. Parker and A. S. de Sausa, *New. J. Chem.*, **1998**, *6*, 627.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

41. C. Curbet, F. Maton, T. Havet, M. Slinkin, A. Mishra, J. F. Chatel and R. N. Muller, *Invest. Radiol.*, **1998**, 33, 752.
42. a.) S. Aime, M. Botta, E. Gianolio and E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 747. b.) S. Aime, P. Ascenzi, E. Comoglio, M. Fasano and S. Paoletti, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 9365.
43. W. Li, S. E. Fraser and T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1413.
44. a.) F. Shikata, H. Tokumitsu, H. Ichikawa, Y. Fukumori, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2002**, 53, 57. b.) A. Matsumara, T. Zhang, T. Yamamoto et al., *Anticancer Research*, **2003**, 23(3B), 2451.
45. E. Brücher, Zs. Baranyai, Gy. Tircsó, *The Future of Biomedical Imaging: Synthesis and Chemical Properties of tgg DTPA and DOTA Derivative Ligands and Their Complexes* In: M. Braddock editor, *Biomedical Imaging: The Chemistry of Labels, Probes and Contrast Agents*, **2012**, Royal Society of Chemistry, 208-260,
46. M. F. Tweedle, P. Wedeking and K. Kumar, *Investigative Radiology* **1995**, 30, 372-380.
47. Zang, K. Wu, A. D. Sherry, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 3192.
48. E. Brücher, *Top. Curr. Chem.*, **2002**, 221, 103 – 122.
49. S. Laurent, L. V. Elst, F. Copoix and R. N. Muller, *Invest. Radiol.* **2001**, 36, 115-122.
50. Z. Baranyai, E. Brucher, F. Uggeri, A. Maiocchi, I. Toth, M. Andradi, A. Gaspar, L. Zekany and S. Aime, *Chemistry-a European Journal* **2015**, 21, 4789-4799.
51. G. W. White, W. A. Gibby, M. F. Tweedle, *Invest. Radiol.*, **2006**, 41, 272.
52. T. H. Darrah, J.J. Prutsman-Pfeiffer, R. J. Poreda, C. M. Ellen, P. V. Hauschka, R. E. Hannigan, *Metallomics*, **2009**, 1(6), 479-488.
53. Zs. Baranyai, Z. Pálkás, F. Uggeri, A. Maiocchi, S. Aime, E. Brücher, *Chemistry - A European Journal*, **2012**, 18, 16426–16435.
54. P. M. May, D. R. Williams, P. W. Linder, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1977**, 588.
55. A. E. Martell, R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, Vol. 4., **1974**, Plenum Press, New York,
56. G. Bandoli, A. Dolmella, F. Tisato, M. Porchia, F. Refosco, *Coord. Chem. Rev.*, **2009**, 253, 56-77
57. C. F. Baes, R. E. Mesmer, *The Hydrolysis of Cations*, Wiley, New York, **1976**.
58. C. R. Chitambar, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, 7, 2337-2361.
59. G. Audi, O. Bersillon, J.A. Blachot, A.H. Wapstra, *Nucl. Phys. A.*, **2003**, A729, 3.
60. H.B. Hupf, J. E. Beaver, J. E. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1970**, 21, 75.

61. M. Fani, J. P. André, H. R. Maecke, *Contrast Media Mol. Imaging* **2008**, 3, 53–63
62. C. Loc'h, B. Maziere, D. Comar, *J. Nucl. Med.* **1980**, 21, 171-273
63. J. Schumacher, W. Maier-Borst, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1981**, 32, 31-36
64. Környei József *A nukleáris medicina fizikai-kémiai alapjai*, **1997**, Debrecen: KLTE
65. J. M. Ollinger, J. A. Fessler, Positron emission tomography, *IEEE Signal Processing Magazine*, **1997**, 14 (1):43-55,
66. S. V. Gudkov, N. Y. Shilyagina, V. A. Vodeneev, A. V. Zvyagin, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 33
67. a.) N. D. Chasteen, *Coord. Chem. Rev.* **1977**, 22: 1-36; b.) M. Llinas, *Structure and Bonding* **1973**, 17: 135-220;
68. Harris, W. R.; Pecoraro, V. L. *Biochemistry*, **1983**, 22, 292.
69. a.) W. P. Bradley, P. O. Alderson, W. C. Eckelman, R. G. Hamilton. Weiss. J. F. *J. Nucl. Med.*, **1978**, 19, 204-209; b.) M. Raiszadel, J. F. Harwig, W. Wolf, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1981**, 18, 167-169.
70. M. D. Bartholoma, A. S. Louie, J. F. Valliant, J. Zubieta, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2903-2920
71. a) C. F. Ramogida, C. Orvig, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 4720–4739. b) B. M. Zeglis, J. S. Lewis, *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 6168–6195.
72. D. Zeng, B. M. Zeglis, J. S. Lewis, C. J. Anderson, *J. Nucl. Med.*, **2013**, 54, 829–832.
73. R. E. Weiner, M. L. Thakur, M. Goodman, P. B. Hoffer, In: Radiopharmaceutical IL Proc. 2nd. Int. Syrup. Radiopharmaceuticals, Seattle, **1979**, 331. (Sou. Nucl. Med., New York. NY, 1979).
74. a) E. Boros, C. L. Ferreira, J. F. Cawthray, E. W. Price, B. O. Patrick, D. W. Wester, M. J. Adam, C. Orvig, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 15726–15733. b) E. Boros, C. L. Ferreira, D. T. T. Yapp, R. K. Gill, E. W. Price, M. J. Adam, C. Orvig, *Nucl. Med. Biol.*, **2012**, 39, 785–794. c) E. Boros, C. L. Ferreira, B. O. Patrick, M. J. Adam, C. Orvig, *Nucl. Med. Biol.*, **2011**, 38, 1165–1174.
75. D. J. Berry, Y. Ma, J. R. Ballinger, R. Tavaré, A. Koers, K. Sunassee, T. Zhou, S. Nawaz, G. E. D. Mullen, R. C. Hider and P. J. Blower, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 7068–7070.
76. Clarke, E. T.; Martell, A. E. *Inorg. Chim. Acta* **1991**, 181, 273–280.
77. Clarke, E. T.; Martell, A. E. *Inorg. Chim. Acta* **1991**, 190, 37–46.
78. H. Kubíček, J. Havlíčková, J. Kotek, G. Tircsó, P. Hermann, É. Tóth, I. Lukeš, *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 10960–10969.
79. a.) L. Wei, X. Zhang, F. Gallazzi, Y. Miao, X. Jin, M. W. Brechbiel, H. Xu, T. Clifford, M. J. Welch, J. S. Lewis, T. P. Quinn, *Nucl. Med. Biol.* **2009**, 36, 345–354. b.) J. Li, H. Vanbilloen, P. Vermaelen, E. Devos, L.

- Mortelmans, G. Bormans, Y. Ni, A. Verbruggen, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5274–5281.
80. a.) K.-P. Eisenwiener, M. I. M. Prata, I. Buschmann, H.-W. Zhang, A. C. Santos, S. Wenger, J. C. Reubi, H. R. Mäcke, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 530–541. b.) P. J. Riss,; C. Kroll, V. Nagel, F. Rösch, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5364–5367. c.) T. J. McMurry, M. W. Brechbiel, C. Wu, O. A. Gansow, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 236–245. d.) M.W. Brechbiel, T. J. McMurry, O. A. Gansow, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3691–3694. e.) M. Fellner, P. Riss, N. Loktionova, K. Zhernosekov, O. Thews, C. F. G. C. Geraldes, Z. Kovács, I. Lukeš, F. Rösch, *Radiochim. Acta* **2011**, *99*, 43–51.
81. J. Notni, P. Hermann, J. Havlockova, J. Kotek, V. Kubicek, J. Plutnar, N. Loktionova, P. J. Riss, F. Rösch, I. Lukes, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7174 – 7185
82. Notni J, Plutnar J, Wester HJ.. *EJNMMI Res.* 2012, 2(13)
83. J. Notni, K. Pohle, H.-J. Wester, *EJNMMI Res.* **2012**, 2(28)
84. J. Simecek, M. Schulz, J. Notni, J. Plutnar, V. Kubicek, J. Havlickova, P. Hermann *Inorg Chem.* **2012**; *51*, 577–590.
85. J. Simecek, O. Zemek, P. Hermann, H.-J. Wester, J. Notni, *Chem.Med.Chem.* **2012**, *7*, 1375–1378.
86. a.) C. L. Ferreira, E. Lamsa, M. Woods, Y. Duan, P. Fernando, C. Bensimon, M. Kordos, K. Guenther, P. Jurek, G. E. Kiefer, *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*, 531–536. b.) C. L. Ferreira, D. T. T. Yapp, D. Mandel, R. K. Gill, E. Boros, M. Q. Wong, P. Jurek, G. E. Kiefer, *Bioconjugate Chem.*, **2012**, *23*, 2239–2246.
87. Z. Baranyai, F. Uggeri, A. Maiocchi, G. B. Govrnzana, C. Cavalotti, A. Takács, I. Tóth, I. Bányai, A. Bényei, E. Brücher, S. Aime, **2013**, *Eur. J. Inorg. Chem.*, *1*, 147-162
88. Aime, S., Bombieri, G., Cavallotti, C. et al. **2008**, *Inorg. Chim. Acta*, 361, 1534.
89. a.) D. Parker, B. P. Waldron, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 2827–2838. b.) D. Parker, B. P. Waldron and D. S. Yufit, *Dalton Trans.*, **2013**, *42*, 8001–8008.
90. B. P. Waldron, D. Parker, C. Burchardt, D. S. Yufit, M. Zimny and F. Roesch, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 579–581.
91. J. X. Cheng, X. S. Xie, *Science* **2015**, *350*, 8870
92. A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1767* (9), 1073-1101
93. C. Kraft, G. Steiner, C. Beleites, R. Salzer, *J. Biophotonics*, **2009**, *2*, 13-28
94. M. Bylesjö, M. Rantalainen, O. Cloarec, J. K. Nicholson, E. Holmes, J. Trygg, *J. of Chemometrics* **2006**, *20*, 341-351 b.) H. Stenlund, A. Gorzsas, P. Persson, B. Sundberg, J. Trygg, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6898-

- 6906 c.) A. Gorzsas, H. Stenlund, P. Persson, J. Trygg, B. Sundberg, *Plant J.*, **2011**, 66, 903-914
95. a.) J. Felten, H. Hall, J. Jaumot, R. Tauler, A. de Juan, A. Gorzsás, *Nat Protoc* **2015**, 10, 217-240 b.) J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2005**, 76 (1), 101-110
96. G. Nagy, D. Szikra, G. Trencsényi, A. Fekete, I. Garai, A. M. Giani, R. Negri, N. Masciocchi, A. Maiocchi, F. Uggeri, I. Tóth, S. Aime, G. B. Giovenzana, Z. Baranyai *Angewandte Chemie*, **2017**, 56, 8, 2118–2122
97. Cacheris, W. P.; Nickle, S. K.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem.* **1987**, 26, 958.
98. K. D. Mjos, C. Orvig, *Chem. Rev.*, **2014**, 114 (8), 4540–4563
99. C. J. Broan, J. P. L. Cox, A. S. Craig, R. Kataki, D. Parker, A. Harrison, A. M. Randall, G. Ferguson, *J. Chem. Soc. PerkinTrans.* **1991**, 2, 87–99.
100. V. Kubicek, J. Havlivkova, J. Kotek, Gy. Tircsó, P. Hermann, É. Tóth, I. Lukes, *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 10960–10969.
101. G. A. Nyssen, D. W. Margerum, *Inorg. Chem.* **1970**, 9 (8), 1814-1820
102. J.-C.G. Bünzli, G.R. Choppin (Eds): *Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences*, **1989**, Elsevier, Amsterdam,
103. J. Reuben, *Prog. NMR Spectroscopy*, **1973**, 9, 1;
104. J.A. Peters, J. Huskens and D.J. Raber, *Prog. NMR Spectroscopy*, **1996**, 28, 283
105. E. Prenesti, P. G. Daniele, S. Berto, S. Toso, *Polyhedron* **2006**, 25, 2815–2823.
106. a.) W. R. Harris, A. E. Martell, *Inorg. Chem.*, **1976**, 15, 713-720. b.) R. J. Motekaitis, A. E. Martell, *Inorg. Chem.*, **1980**, 19, 1646-1651.
107. a.) R. Delgado, Y. Sun, R. J. Motekaitis, A. E. Martell, *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 3320 – 3326. B.) C. F. G. C. Geraldés, R. Delgado, A. M. Urbano, J. Costa, F. Jasanada, F. Nepveu, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1995**, 327 – 335.
108. A. P. Wedeking, K. Kumar, M. F. Tweedle, *Magn. Reson. Imaging*, **1992**, 10, 641.
109. a.) L. Sarka, L. Burai, E. Brucher, *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 719., b.) L. Sarka, L. Burai, R. Kiraly, L. Zekany, E. Brucher, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 91, 320
110. G. Tircsó, Z. Kovács and A. D. Sherry, *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, 9269.
111. L. Sarka, L. Burai and E. Brucher, *Chem. – Eur. J.*, **2000**, 6, 719.
112. T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2858-2902
113. G. E. Jackson, M. J. Byrne, *J. Nucl. Med.* **1996**, 37, 379.
114. Y. Li, B. Liu, Z. Ge, B. Yang, *J. Photochem. and Photobiol. B: Biology*, **2008**, 91, 137 – 142.

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

- 115.S. Aime, M. Botta, S. Geninatti Crich, G. B. Giovenzana, R. Pagliarin, M. Sisti, E. Terreno, *Magn. Reson. Chem.*, **1998**, *36*, S200.
- 116.S. Aime, E. Gianolio, D. Corpillo, C. Cavallotti, G. Palmisano, M. Sisti, G. B. Giovenzana, R. Pagliari, *Helv. Chim. Acta*, **2003**, *86*, 615
- 117.D. H. Powell, O. M. Ni Dhubhghaill, D. Pubanz, D. *et al.* (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, *118*, 9333–9346.
- 118.R. V. Southwood-Jones, W. L. Earl, K. E. Newman, A. E. Merbach, *J. Chem. Phys.*, **1980**, *73*, 5909.;
- 119.K. Micskei, D. H. Powell, L. Helm., E. Brücher, A. E. Merbach, *Magn. Reson. Chem.*, **1993**, *31*, 1011.
- 120.K. Micskei, L. Helm, E. Brücher, A. E. Merbach, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 3844.
- 121.N. Bloembergen, E. M. Purcell, R. V. Pound, *Phys. Rev.*, **1948** *73*, 679–712., I. Solomon, *Phys. Rev.*, **1955** *99*, 559–565., I. Solomon, N. Bloembergen, *Chem. Phys.*, **1956**, *25*, 261–266., N. Bloembergen, *J. Chem. Phys.*, **1957** *27*, 572–573., N. Bloembergen, L. O. Morgan, *J. Chem. Phys.*, **1961** *34*, 842–850., R. E. Connick, D. Fiat, *J. Chem. Phys.*, **1966**, *44*, 4103–4107.
- 122.a.) A. D. McLachlan, *Proc. R. Soc. London, A* **1964**, *280*, 271, b.) D. H. Powell, A. E. Merbach, G. González, E. Brücher, K. Micskei, M. F. Ottaviani, K. Köhler, A. von Zelewsky, O. Y. Grinberg, Y. S. Lebedev *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 2129
- 123.L.P. Hwang and J. H. Freed, *J. Chem. Phys.* **1975**, *63*, 4017
- 124.M. Port, I. Raynal, L. Vander Elst, R. N. Muller, F. Dioury, C. Ferroud, A. Guy, *Contrast Med. Mol. Imaging* **2006**, *1*, 121.
- 125.A. de Sa, C. S. Bonnet, C. F. G. C. Geraldés, É. Tóth, P. M. T. Ferreira, J. P. Andre, *Dalton Trans.*, **2013**, *42*, 4522.
- 126.T. Kanda, T. Fukusato, M. Matsuda, K. Toyoda, H. Oba, J. Kotoku, T. Haruyama, K. Kitajima, S. Furui, *Radiology* **2015**, *276*, 228-232, R. J. McDonald, J. S. McDonald, D. F. Kallmes, M. E. Jentoft, D. L. Murray, K. R. Thielen, E. E. Williamson, L. J. Eckel, *Radiology* **2015**, *275*, 772–782, E. Kanal, M. F. Tweedle, *Radiology* **2015**, *275*, 630–634
- 127.H. J. Weinmann, M. Laniado and W. Mutzel, *Physiol Chem Phys Med NMR* **1984**, *16*, 167-172. M. Van Wagoner, D. Worah, *Invest. Radiol.* **1993**, *28*, S44-S48.
- 128.A. Spinazzi, V. Lorusso, G. Pirovano and M. Kirchin, *Academic Radiology* **1999**, *6*, 282-291.
- 129.B. G. Jenkins, R. B. Lauffer, *Inorg. Chem.*, **1988**, *24*, 4730 – 4738.
- 130.S. Aime, M. Botta, *Inorg. Chim. Acta*, **1990**, *177*, 101 – 105
- 131.H. Furedi, A. G. Walton, *Applied Spectroscopy*, **1968**, *22* (1), 23-26
- 132.I. Sajó, *Komplexometria*, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, **1973**.
- 133.H. N. Takahashi, E. Doi, M. Hirose, *J. Biochem*, **1989**, *106*, 858 – 863

134.H. M. Irving, M. G. Miles, L. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, **1967**, 28, 475.

135.L. Zékány, I. Nagypál, in *Computational Methods for Determination of Formation Constants*, ed. D. J. Legett, Plenum, New York, **1985**, p.291.

136.P. K. Glasoe, F. A. Long, *J. Phys. Chem.*, **1960**, 64, 188.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretném megköszönni elsősorban témavezetőmnek, Dr. Baranyai Zsolt egyetemi adjunktusnak munkám során nyújtott szakmai segítségét, támogatását és türelmét.

Szeretném megköszönni Dr. Brücher Ernő professzornak emeritus, aki tapasztalatával segítette munkámat az értekezés elkészítése során. Dr. Tóth Imre professor emeritusnak is szeretnék köszönetet mondani a szakmai támogatásáért. Köszönöm Dr. Tircsó Gyulának és Dr. Kálmán Ferenc Krisztiánnak munkám során nyújtott segítségükért.

Hálás vagyok Dr. Gorzsás Andrásnak a tartalmas három hónapért Umeåban.

Köszönöm barátaimnak Babinszkiné Farkas Editnek és Garda Zoltánnak a támogatásukat a szakmai munkámban és a magánéletben egyaránt.

Hálás vagyok Takács Katalin tanszéki technikusnak a munkám során nyújtott segítségéért.

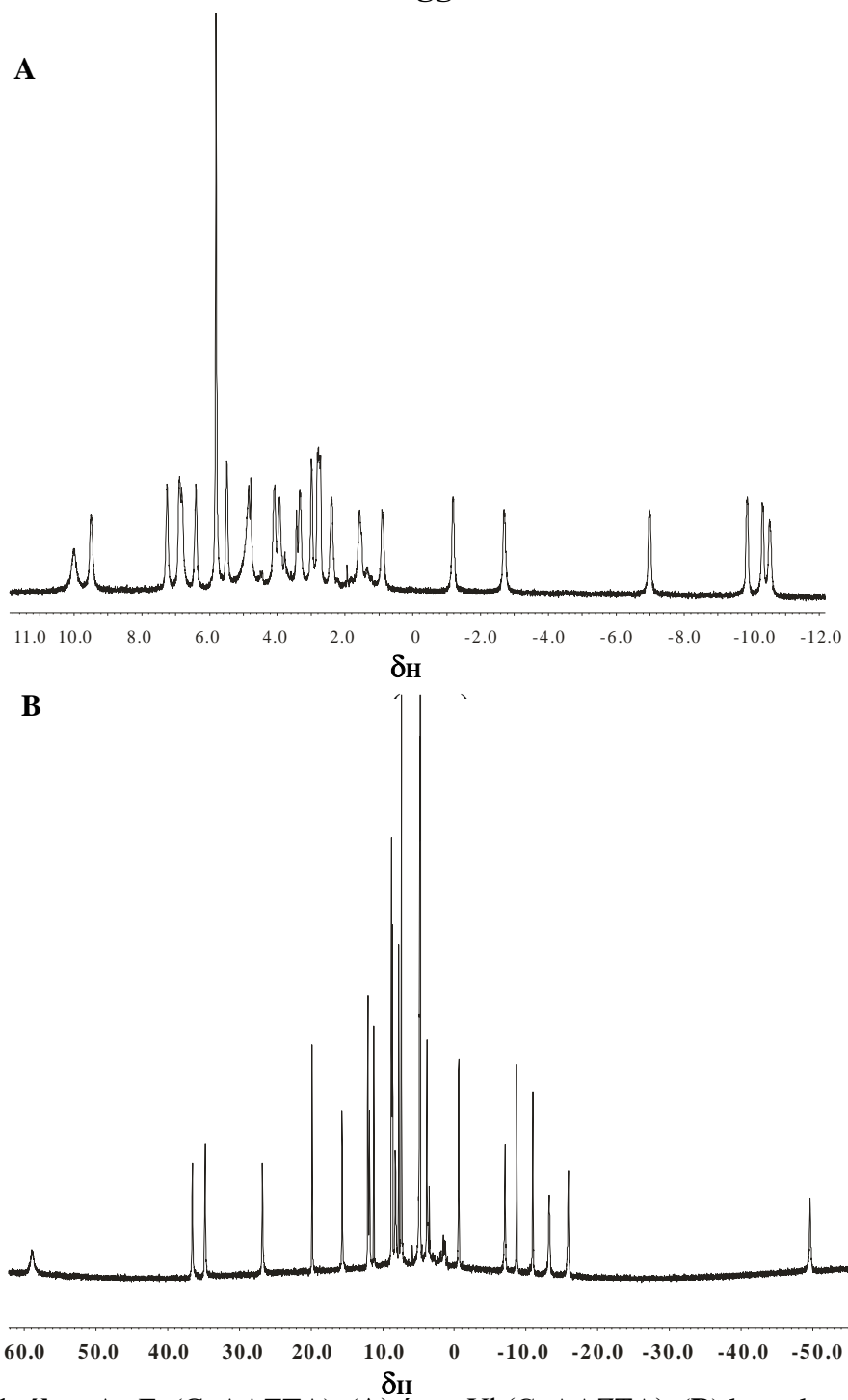
Köszönettel tartozom kollegáimnak és ismerőseimnek, akik támogattak és segítettek munkám elvégzésében.

Köszönettel tartozom páromnak, Garda Tamásnak a dolgozatom megírása alatt tanúsított végtelen türelméért és szeretetéért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak, hogy mindvégig támogattak.

A kutatás a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Függelék



F.1. ábra Az $\text{Eu}(\text{CyAAZTA})^-$ (A) és az $\text{Yb}(\text{CyAAZTA})^-$ (B) komplexek 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spektrumai (pH=7,0, 298K)

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

Paramágneses iont tartalmazó oldatokban mért ^{17}O -NMR relaxációsebességekből ($1/T_1$, $1/T_2$) és a $^{17}\text{OH}_2$ jel eltolódásából (ω), valamint a paramágneses iont nem tartalmazó, diamágneses minta azonos paramétereiből ($1/T_{1A}$, $1/T_{2A}$, ω_A) a Swift-Connick elmélet alapján a Függelék F. 1.-2. egyenletekkel számíthatók a redukált relaxációsebességek ($1/T_{1r}$, $1/T_{2r}$) és a kémiai eltolódás ($\Delta\omega_r$). Diamágneses külső standardként ^{17}O -ban dúsított HClO_4 oldatot használtunk (pH=3,0). A redukált relaxációsebesség:

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

Az ^{17}O jel kémiai eltolódása:

$$\Delta\omega_r = \frac{1}{P_m} (\omega - \omega_A) = \frac{\Delta\omega_m}{(1 + \tau_m T_{2m}^{-1})^2 + \tau_m^2 \Delta\omega_m^2} + \Delta\omega_{os} \quad F.2$$

ahol a $1/T_{2m}$ a paramágneses ion belső koordinációs szférájában kötött vízmolekula transzvezális relaxációsebessége, $\Delta\omega_m$ a kötött és a paramágneses ion hatását már nem érző vízmolekulák kémiai eltolódásának különbsége, P_m a belső koordinációs szférában levő vízmolekulák móltörtje és τ_m a belső koordinációs szférában levő vízmolekulának az átlagos élettartama. Az $1/T_{2os}$ és $\Delta\omega_{os}$ a külső szféra hozzájárulását jellemzi a redukált relaxációsebességekhez és kémiai eltolódáshoz. Korábban kimutatták, hogy a külső szférás folyamatok ($1/T_{2os}$, $\Delta\omega_{os}$) ^{17}O mag relaxációjához és kémiai eltolódásához való hozzájárulása elhanyagolható.¹²⁰ A $\Delta\omega_m$ értékét a hiperfinom, vagy más néven skaláris csatolási állandó (A/\hbar) határozza meg:

$$\Delta\omega_m = \frac{g_L \mu_B S(S+1) B}{3k_B T} \frac{A}{\hbar} \quad F.3$$

ahol B a mágneses tér, S az elektron spin ($S=7/2$), a g_L az izotóp Landé g-faktor és μ_B a Bohr magneton.

A ^{17}O mag transzverzális relaxációsebességét ($1/T_{2m}$) a skaláris hozzájárulás ($1/T_{2sc}$) (kötéseken keresztüli kölcsönhatás) határozza meg:

$$\frac{1}{T_{2m}} \cong \frac{1}{T_{2sc}} = \frac{S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{\hbar} \right)^2 \tau_{s1} \quad F.4$$

ahol az $1/\tau_{s1}$ a vízcseresebesség ($k_{ex}=1/\tau_m$) és az elektron-spin relaxációsebesség ($1/T_{1e}$) összege:

$$\frac{1}{\tau_{s1}} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{T_{1e}} \quad F.5$$

A vízcseres folyamatokat jellemző sebességi állandó (k_{ex}) hőmérsékletfüggését az Eyring egyenlettel adhatjuk meg:

$$\frac{1}{\tau_m} = k_{ex} = \frac{k_b T}{h} \exp \left\{ \frac{\Delta S_m^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H_m^\ddagger}{R} \right\} = \frac{k_{ex}^{298} T}{298.15} \exp \left\{ \frac{\Delta H_m^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T} \right) \right\} \quad F.6$$

ahol ΔS_m^\ddagger és ΔH_m^\ddagger a vízcseres folyamatra jellemző aktiválási entrópia és entalpia értékek, valamint a k_{ex}^{298} , a vízcseresebesség 298,15 K hőmérsékleten.

A Gd(III)-ionhoz közvetlenül koordinálódó vízmolekula protonok longitudinális relaxációs idejét (T_{1m}^H) a protonok mágneses momentuma és a Gd $^{3+}$ elektron spinjei között létrejövő dipol-dipol kölcsönhatás befolyásolja főként. A belső szférás vízmolekula protonok mágneses momentuma és a Gd $^{3+}$ elektron spinjei között létrejövő skaláris csatolás elhanyagolható a Gd $^{3+}$ - OH $_2$ kötés ionos jellegének és a Gd $^{3+}$ - OH $_2$ nagy távolságának köszönhetően. A Gd(III)-komplexek belső szférás vízmolekula protonok longitudinális relaxációs ideje az egyesített Solomon-Bloemberg-Morgan elmélet alapján az alábbi egyenlettel adható meg, amely leírja a T_{1m}^H mágneses térerőfüggését: ¹²¹

$$\frac{1}{T_{1m}^H} = \frac{2}{15} \left(\frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r_{GdH}^6} \right) S(S+1) \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \left(7 \frac{\tau_{c2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{c2}^2} + 3 \frac{\tau_{c1}}{1 + \omega_I^2 \tau_{c1}^2} \right) \quad F.7$$

Orvosi diagnosztikában és terápiában alkalmazható fémkomplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálata

ahol γ_I , g , μ_B , r_{GdH} , S , μ_0 , ω_I és ω_S a proton mag giromágneses hányadosa ($\gamma_I = 2,675 \times 10^8 \text{ rads}^{-1}\text{T}^{-1}$), az electron Landé g -faktora (2.0023), Bohr magneton, az effektív távolság a párosítatlan elektronok töltése és a belső szférában található vízprotonok között, az elektron spin (Gd^{3+} esetében $7/2$), a vákuum permeabilitás, a proton és az elektron Larmor frekvenciája ($\omega_S = 658.21\omega_I$). A F.8. egyenletben található τ_{ci} ($i=1, 2$) korrelációs idő, amely jellemzi a belső szférás vízprotonok relaxációs folyamatait az alábbi egyenlettel fejezhető ki:

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{T_{ie}} + \frac{1}{\tau_M} \quad i=1, 2 \quad F.8$$

ahol τ_R , T_{1e} és T_{2e} a Gd^{3+} – proton vector reorientációs korrelációs ideje (kisméretű Gd(III) -komplexek esetében megegyezik az egész molekula rotációs korrelációs idejével), a Gd^{3+} -ion longitudinális és transverzális electron-spin relaxációs ideje. Paramágneses fémkomplexekben a fémionok ($S > 1/2$) párosítatlan elektronjainak a relaxációsebességét ($1/T_{ie}$, $i=1, 2$) elsősorban a zérus-tér felhasadás határozza meg (ZFS),¹²² amelyet a következő egyenletekkel fejezhetünk ki:

$$\left(\frac{1}{T_{1e}}\right)^{\text{ZFS}} = \frac{1}{25} \Delta^2 \tau_v [4S(S+1) - 3] \left(\frac{1}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{4}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} \right) \quad F.9$$

$$\left(\frac{1}{T_{2e}}\right)^{\text{ZFS}} = \frac{1}{50} \Delta^2 \tau_v [4S(S+1) - 3] \left(3 + \frac{5}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{2}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} \right) \quad F.10$$

ahol Δ^2 a zérus-tér felhasadás tenzorának a jele, τ_v a ZFS változásának korrelációs ideje, ami a komplex állandó torzulásából vagy a rotációjából adódhat és ω_S az elektron-spin Larmor frekvenciája. τ_v és τ_R hőmérsékletfüggését az Eyring egyenlettel adhatjuk meg, ahol $\Delta H_v^\#$ és $\Delta H_R^\#$ a ZFS változás és rotációs mozgás aktiválási entalpiája:

$$\frac{1}{\tau_j} = \frac{(\tau_j^{-1})^{298} T}{298.15} \exp\left\{\frac{\Delta H_j^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T}\right)\right\} \quad (j = v, R) \quad F.11$$

A Gd(III)-komplexek relaxivitása külső szférás hozzájárulását (r_l^{os}) Hwang és Freed féle elmélettel¹²³ lehet kifejezni figyelembe véve a paramágneses fémkomplex elektron relaxációs idejét ($T_{1,2e}$) és a közelében lévő vízmolekulák szabad translációs diffúzióját:

$$r_{1os} = \frac{32N_A \pi}{405} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_S^2 \gamma_I^2}{a_{GdH} D_{GdH}} S(S+1) [3J_{os}(\omega_H; T_{1e}) + 7J_{os}(\omega_S; T_{2e})] \quad F.12$$

ahol N_A , a_{GdH} , D_{GdH} az Avogadro állandó, a Gd^{3+} -ion és a külső szférában található vízmolekula protonok távolsága és az adott körülményekre vonatkozó diffúziós állandó, míg J_{os} megadja a külső szférás hozzájárulás elektron relaxációs időtől való függését nem-Lorenzian spektrális sűrűség függvényvel.