

Mn(II)-komplexek kinetikai inertségének hangolása a ligandumok szerkezetének módosításával

TDK dolgozat

Készítette: **Garda Zoltán**

I. Vegyész MSc szakos hallgató

Témavezetők:

Dr. Tircsó Gyula, adjunktus

Dr. Kálmán Ferenc Krisztián, OTKA posztdoktor

Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar,
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Debrecen

2012

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	2
II. Célkitűzés	4
III. Irodalmi áttekintés	5
III.1. Paramágneses fémionok az orvosi diagnosztikában	5
III.2. A mangán kordinációs kémiája	7
III.3. Paramágneses fémionok relaxivitása	8
IV. Alkalmazott vizsgálati módszerek	10
IV.1 pH-potenciometria	10
IV.2 UV-látható spektrofotometria	11
IV.3 Relaxometria	11
V. Kísérleti rész	12
V.1 Egyensúlyi vizsgálatok	12
V.2 Kinetikai vizsgálatok	13
VI. Eredmények és értékelésük	14
VI.1 Egyensúlyi mérések	14
VI.2. Kinetika vizsgálatok eredményei	17
VI.3. Relaxometriás mérések	22
VII. Összefoglalás	25
VIII. Irodalom jegyzék	27

I. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a technika fejlődése nagy hatással volt az orvostudományra, ami egyre újabb és újabb módszerek megjelenését tette lehetővé az orvosi diagnosztika és terápia területén. Az egyik ilyen új módszer a mágneses rezonanciás képalkotás, az MRI. Ennek a módszernek nagy előnye a felbontóképességében rejlik, ami lehetőséget ad biológiai folyamatok vizsgálatára az élő szervezetben. A vizsgálatok során a beteget nagy mágneses térbe helyezik, és a testükben lévő protonok, főleg vízprotonok megfelelő radiofrekvenciás impulzus szekvencia hatására eredményezik a mért jelet. A jel intenzitás arányos a szövetekben lévő protonok mennyiségével. A szervezetben lévő szövetek víztartalma eltérő így a kapott relaxációs idők is eltérőek ez által alakítható ki az MRI kép. Kontrasztanyagok alkalmazásával a protonok relaxációs ideje csökkenthető, ami az MRI-kép kontrasztosságának növekedését, valamint a vizsgálat idejének csökkenését eredményezi. Kontrasztanyagként paramágneses fémionok jöhetnek szóba viszont, azonban toxicitásuk miatt csak kelátképző ligandumokkal kialakuló komplexeik formájába alkalmazhatóak. Gyakorlatban néhány esettől eltekintve a paramágneses fémionok közül gyakorlatilag csak a 7 párosítatlan elektront tartalmazó Gd(III)-iont alkalmazzák, mint kontrasztnövelő anyag.

A Gd(III)-komplexek egyeduralkodó szerepe viszont megdőlni látszik egy, a vesebetegek esetében sorozatosan kialakuló betegség, a Nefrogén Szisztémás Fibrózis (Nephrogenic Systemic Fibrosis, NSF) kapcsán, mivel az NSF betegséget kapcsolatba hozták egyes, az MRI vizsgálatok során alkalmazott, Gd(III)-komplexek (leggyakrabban a [Gd(DTPA-BMA)]-komplex, de a [Gd(DTPA)]²⁻-kompleksszel is fordultak elő megbetegedések ugyan ritkábban) szerkezetbeli disszociációjával, vagyis a szabad Gd(III)-ionok felszabadulásával a kontrasztanyagként alkalmazott komplexekből.

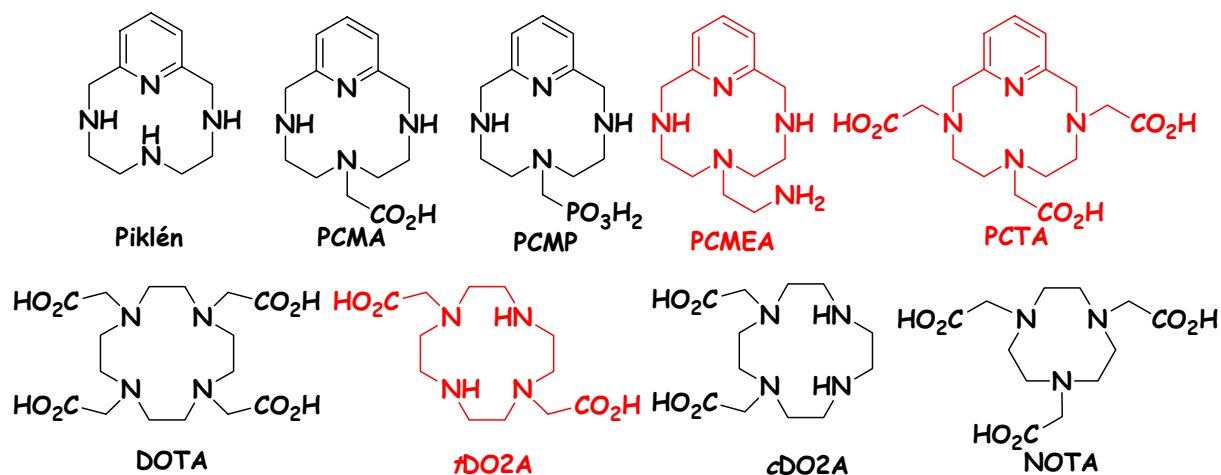
Az NSF megjelenésével párhuzamosan megnőtt az érdeklődés olyan kontrasztanyagok kifejlesztése iránt, amelyek biokompatibilisek vagyis a szervezet számára jobban tolerálhatóak. A paramágneses fémionok között ilyen lehet pl. a Mn(II)- vagy a nagyspinszámú Fe(II)- ill. Fe(III)-komplexek.^[1] A Mn(II)-ion 5 párosítatlan elektronnal rendelkező paramágneses fémion. A Gd(III)-ional összehasonlításban kisebb mágneses momentummal és rövidebb elektron relaxációs idővel rendelkezik és ez által kevésbé hatásos MRI kontrasztanyagként, mint a Gd(III)-alapú ágensek. Ezzel szemben a Mn(II) az élő szervezetben is megtalálható (endogén) fémion, így nagyobb dózisban is alkalmazható lehet, ami a fentebb felsorolt negatív sajátságok kiküszöbölhetőek. A Mn(II)-ion nagyobb

menyiségben történő alkalmazása nem feltétlenül jár plusz költséggel, mivel az MnCl_2 60-szor olcsóbb, mint a GdCl_3 (a MnCl_2 10g 12 000 forint, míg ezzel szemben a GdCl_3 5g 40 950 forintba kerül a pl. a Sigma-Aldrich vegyszergyártó és forgalmazó cégnél). A Gd(III)-komplexek termodinamikai stabilitása és kinetikai inertsége messze felülmúlja az Mn(II)-komplexekét, ami annak köszönhető, hogy az Mn(II)-komplexek esetében a kristálytér stabilizációs-energia értéke zérus, valamint a Mn(II) kisebb töltéssel rendelkezik. A kinetikai inertség nagyon fontos tulajdonsága a kontrasztanyagként alkalmazni kívánt komplexeknek, mivel a kis kinetikai inertséggel rendelkező komplexek esetében a szervezetbe való injektálás után fémcseré reakciók játszódhatnak le az endogén fémionokkal (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} és Cu^{2+}) vagy bioligandumokkal (citrát, foszfát, laktát, karbonát stb.), ami a komplexek disszociációját és a paramágneses fémion ill. az azt koordináló ligandum felszabadulásával jár (melyek toxikusak a szervezet számára).

II. Célkitűzés

Az előző fejezetekben már ismertetett, a Gd(III)-komplexek alkalmazása kapcsán felmerült problémák kiküszöbölése döntő fontosságú, ezért kutatómunkám céljául tűztük ki olyan biokompatibilis komplexek vizsgálatát, amelyek Mn(II) fémion tartalmaznak és alkalmasak lehetnek a jelenleg forgalomban lévő Gd(III) alapú kontrasztanyagok helyettesítésére az MRI vizsgálatok során, vagy olyan adatokat szolgáltatnak, melyek felhasználásával potenciális Mn(II)-tartalmú kontrasztanyagok tervezhetők. Munkám során számos makrociklusos ligandum Mn(II)-ionnal alkotott komplexének koordinációs kémiai sajátságait vizsgáltam. A kontrasztanyagként alkalmazott komplexeknek számos kitételnek kell megfelelniük, ahogy azt már korábban említettük. Ezért információt kívántunk nyerni, a ligandumok és a Mn(II)-komplexek protonálódási és stabilitási állandóiról, valamint a Mn(II)-komplexek kinetikai inertségéről. A kontrasztanyagok alkalmazásának egyik fontos követelménye a komplexek nagy relaxivitása. Ebből az okból kifolyólag meg akartuk határozni a tanulmányozott komplexek relaxivitásának értékeit is.

Az 1. ábra mutatja a dolgozatban vizsgált és említett ligandumok képleteit.

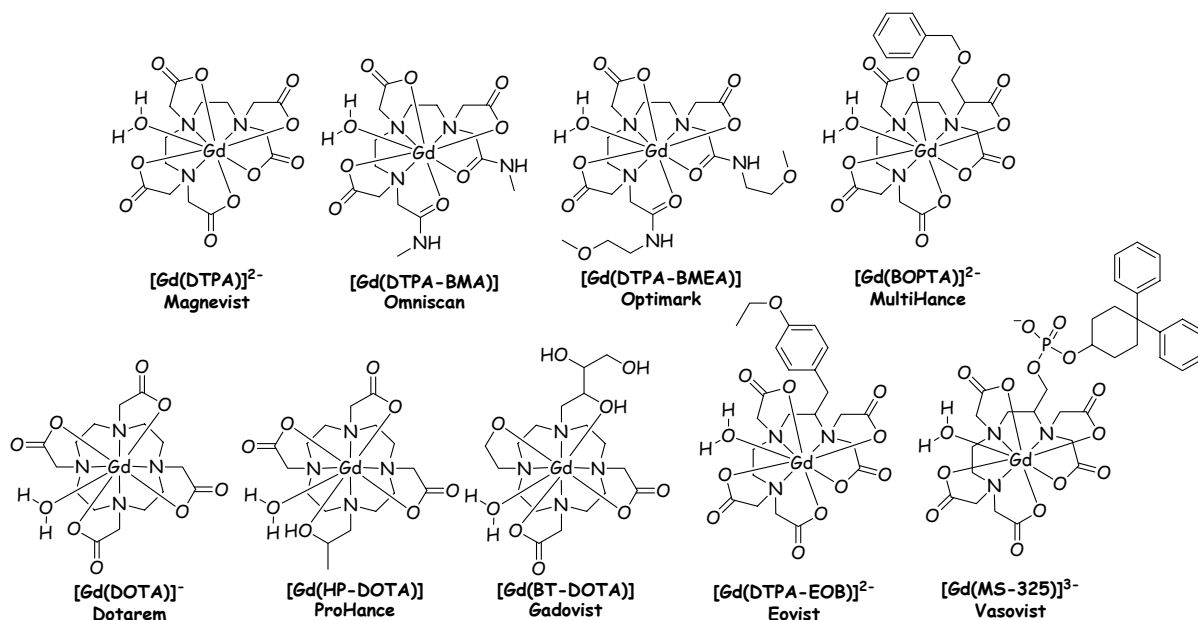


1. ábra: A dolgozatban szereplő ligandumok képlete (piros színnel az általunk vizsgált ligandumokat tüntettem fel).

III. Irodalmi áttekintés

III.1. Paramágneses fémionok az orvosi diagnosztikában:

Az elmúlt 20-25 évben az orvos diagnosztikában nagy figyelmet kaptak a paramágneses fémionok komplexei. Az MRI vizsgálatok elterjedése a módszer nagy felbontóképességének volt köszönhető^[2]. A diagnosztikai eljárások egyszerűsítése érdekében megnőtt az igény a kontrasztanyagok fejlesztésére és a szerv specifikus vagy intelligens kontrasztanyagok kifejlesztésére, amelyekkel kisebb dózisok esetén is el lehetne érni ugyanazt a kontrasztnövelő hatást, ha az adott kontrasztanyag egy adott szervben vagy szövetben dúsul (pl.: $[\text{Gd}(\text{EOB-DTPA})^{3-}]$)^[3].

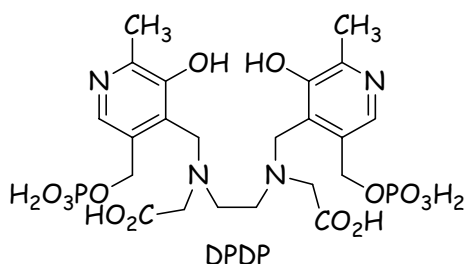


2. ábra: A klinikai gyakorlatban alkalmazott kontrasztanyagok.

A kontrasztanyagok alkalmazhatóságának leggyakrabban emlegetett paraméterei a nagy termodinamikai stabilitás, a jó vízoldhatóság, a minimális dózis melletti maximális kontrasztnövelés, kis ozmotikus koncentráció, kis toxicitás és a kinetikai inertség. Az alkalmazott kontrasztanyag mennyiségét a kontrasztnövelő hatása határozza meg. A relaxivitás a paramágneses anyag 1 mM koncentrációjú oldata által eredményezett relaxációs sebesség növekedés a diamágneses közegben mérthez képest (mértékegysége $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). Elsőként alkalmazott Gd(III) alapú kontrasztanyagok a töltéssel rendelkező $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ (Magnevist)^[4,5] majd röviddel azt követően a $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^{-}$ (Dotarem)^[6] (2. ábra) volt. A

kontrasztanyagokat intravénásan injekció formájában juttatják be a szervezetbe és ez a jelentős ozmotikus koncentráció különbség miatt fájdalommal járhat.

A fent említett probléma miatt kifejlesztették a DTPA és DOTA ligandumok Gd(III)-komplexeinek töltés nélküli származékait, így például a [Gd(DTPA-BMA)] (Omniscan), a [Gd(DTPA-BMEA)] (Optimark), a [Gd(HP-DO3A)] (Prohance) és a [Gd(DO3A-B)] (Gadovist) (2. ábra). Az alkalmazott kontrasztanyagok dózisa 0,1-0,3 mmol/testtömeg kg. A beinjektált kontrasztanyag egyenletesen oszlik el az extracelluláris térben és 1,5 óra a szervezetből való kiürülésének a felezési ideje, ami a veséken keresztül történik. A manapság alkalmazott kontrasztanyagok nagyrészt Gd(III)-tartalmúak, de van egy Mn(II) alapú kontrasztanyag is, a [Mn(DPDP)]⁴⁻ (Mangafodipir), amelyet a máj és vese MRI vizsgálatnál alkalmaznak^[7,8,9]. A [Mn(DPDP)]⁴⁻-komplex előállításához használt DPDP ligandum szerkezeti képletét a 3. ábrán tüntettem fel. Ennek a komplexnek a kontrasztanyagként való alkalmazhatósága a komplex kinetikai labilitásában rejlik, szemben a Gd(III)-alapú kontrasztanyagokkal, amelyek alkalmazhatósága a komplexek kinetikai inertségén alapszik, mivel a kontrasztanyag alkotóelemei, a Gd³⁺ ill. a szabadabbá váló ligandumok, toxikusak. A [Mn(DPDP)]⁴⁻ kontrasztnövelő hatását a felszabaduló Mn(II)-ionok eredményezik, a komplex disszociációját követően. A Mn(II)-ion egy endogén fémion így a szervezetben is megtalálható és kis mennyiségben alkalmazva toxikus hatása elhanyagolható, ugyanakkor nagyobb mennyiségben az Alzheimer kórhoz hasonló tünetekkel járó problémákat okoz.^[10,11]



3. ábra: DPDP szerkezeti képlete

A kontrasztanyag szervezetben való tartózkodása alatt a paramágneses fémion a komplexben kicserélődhet endogén fémionokkal, az így felszabaduló paramágneses fémion okozza az előzőekben már említett NSF betegséget.^[12] A szabad Gd(III)-ion a szervezet számára mérgező, LD₅₀ értéke 0,2-0,5 mmol/kg. Az NSF betegség felfedezése és a Gd-alapú kontrasztanyagokkal való összefüggésbe hozása megmutatta, hogy a kontrasztanyagként alkalmazni kívánt komplexeknél nagyon fontos követelmény a kinetikai inertség.^[13]

Az NSF-hez hasonló betegségek kiküszöbölése miatt jelenleg is folynak kutatások biokompatibilis kontrasztanyagok előállítására. Az Mn(II)-, Fe(II)- és Fe(III)-ionok komplexeinek alkalmazása megoldást jelenthetne a felmerült problémákra, úgymint a komplex disszociációja és a biodegradációja a szervezetben.^[14,15,16] Az endogén Mn(II)-, Fe(II)- és a Fe(III)-ionok alkalmazásával a kontrasztnövelő ágensként alkalmazott paramágneses fémionok toxikus hatása kiküszöbölhetővé válna. Az utóbbi években egyre több publikáció jelenik meg az irodalomban olyan DOTA és TETA származék ligandumokról, amelyek kinetikailag inert komplexet képeznek a Mn(II)- és Fe(II)-ionokkal, viszont ezeknek az anyagoknak az MRI kontrasztanyagként való alkalmazhatóságát meggátolja a komplexek pozitív töltése vagy kis relaxivitása, amely a belső koordinációs szférában lévő vízmolekula hiányából adódik.^[17]

III.2. A mangán koordinációs kémiája:

A mangán a periódusos rendszer 25-dik eleme. A mangánnak csak egy természetes izotópja van, a szerkezetét tekintve pedig 4 allotróp módosulata. A mangán oxidációs száma a vegyületeiben +2 és +7 között változik, de a +2-es állapotban a legstabilabb. A mangán nyomnyi mennyiségben előfordul számos növényben és baktériumban még az egészséges emberi szervezet is tartalmaz 10-20 mg mangánt. A mangántartalmú proteinekben és enzimekben (pl. Mn-SOD) a mangán általában +2 oxidációs állapotban fordul elő, gyakran helyettesíthető Mg(II)-ionnal az aktivitás elvesztése nélkül.

A Mn(II)-ion nem koordinálódó ligandumokkal alkotott sóinak tömény vizes oldata halvány rózsaszínű, az oldatban jelenlévő $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ aqvakomplexek miatt. A Mn(II)-ionok esetén a nagy spinszám d^5 elektronkonfiguráció miatt valamennyi d-d elektronátmenet tiltott és a kristálytér stabilizációs energia zérus. Ez utóbbiból következik az is, hogy a termodinamikai stabilitása a mangán komplexeknek kisebb lesz, mint a 3d átmenetifém komplexeké. A Mn(II)-komplexekről sokáig azt hitték, hogy azok labilisak és könnyen disszociálnak, de közel két éve *Drahoš* és munkatársai bebizonyították, hogy bizonyos makrociklusos ligandumok Mn^{2+} -komplexei inertek.^[32]

III.3. Paramágneses fémionok relaxivitása:

Az MRI vizsgálatok során jellemzően spin-echo impulzus szekvenciát alkalmaznak.

$$SI = N(H) \left[1 - e^{-\frac{TR}{T_1}} \right] e^{-\frac{TE}{T_2}} \quad (1)$$

ahol, $N(H)$ a protonspinek sűrűsége, T_1 és T_2 a spinek longitudinális és transzverzális relaxációs ideje, TE az echo késleltetési idő és TR az ismétlési idő. Az egyenletből következik, hogy a T_1 relaxációs idő csökkentése a jel intenzitás növekedését, míg T_2 relaxációs idő csökkenése a jel intenzitás csökkenését eredményezi.

A kontrasztanyagokat alapvetően két csoportba soroljuk a protonok relaxációjára gyakorolt hatásuk alapján, úgymint T_1 és T_2 kontrasztanyagok. A T_1 kontrasztanyagok a vízprotonok longitudinális relaxációs sebességére, míg a T_2 kontrasztanyagok a protonok transzverzális relaxációs sebességére vannak nagyobb hatással. A T_1 kontrasztanyagok sok párosítatlan e^- -t tartalmaznak ilyen a Gd(III) az Fe(III) és az Mn(II). Ezek közül is a legnagyobb hatást a Gd(III) okozza a nagy mágneses momentumával a 7 párosítatlan elektronjával és a 10^{-9} s-os elektron relaxációs idejével. A T_2 kontrasztanyagok közül a szuperparamágneses vasoxid mikrorészecskék (SPIO) a jelentősek. Az alábbi összegképlettel jellemezhetők $Fe_2^{III}O_3M^{II}O$ ahol az M^{II} : Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} vagy a Ni^{2+} . Ezek közül már többet is eredményesen alkalmaznak, mint MRI kontrasztanyag (Lumirem, Abdoscan, Endorem)^[18,19,20].

A vízprotonok paramágneses fémionok jelenlétében mért relaxivitása ($1/T_{1obs}$) két részből tevődik össze, a komplex diamágneses ($1/T_{1d}$) és paramágneses ($1/T_{1p}$) hozzájárulásából. Ezt az összefüggést az alábbi egyenlet adja meg.

$$\frac{1}{T_{1obs}} = \frac{1}{T_{1d}} + \frac{1}{T_{1p}} = \frac{1}{T_{1d}} + r_1[M^{n+}] \quad (2)$$

ahol az r_1 a komplex relaxivitása^[3]. A relaxitás értékét a belső-, külső- és a második koordinációs szférában lévő vízprotonok relaxációs sebességeinek összegeként adhatjuk meg.

$$r_{1p}^m = r_{1p}^{is} + r_{1p}^{os} + r_{1p}^{2nd} \quad (3)$$

A relaxációs sebességet befolyásolja továbbá a fémion belső koordinációs szférájában lévő vízmolekulának a száma (q). A belső szféra hozzájárulását a relaxivitás értékhez a Swift-Connick^[2122,23] egyenletekkel adható meg, míg a második szféra szerepét Botta^[24] tanulmányozta és írta le.

IV. Alkalmazott vizsgálati módszerek

IV.1 pH-potenciometria

A munkám során vizsgált, PCMEA, *t*DO2A és a PCTA ligandumok protonálódási és Mn(II)-vel képződő komplexeinek stabilitási és protonálódási állandóit pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg. A fémkomplexek stabilitási állandóinak meghatározásához szükséges a komplexeiket alkotó ligandumok protonálódási állandóinak ismerete. A protonálódási állandókat a következő módon definiálhatjuk:



$$K_i^H = \frac{[H_iL]}{[H_{i-1}L][H^+]} \quad i=1-4 \quad (5)$$

A protonálódási állandók meghatározása után már lehetőség nyílt a komplexek stabilitási állandóinak meghatározására is. Az eltérő összetételű komplexek általános képződési folyamatait, valamint a stabilitási szorzatokat általánosan a következőképpen definiáljuk:



$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pH_qL_r^{pn+q-rm}]}{[M^{n+}]^p [H^+]^q [L^{m-}]^r} \quad (7)$$

A képződő komplexek egyensúlyi és protonálódási állandóit a következő összefüggésekkel adhatjuk meg (a töltések jelölésétől az egyszerűség kedvéért eltekintünk):

$$K_{MnL} = \frac{[MnL]}{[Mn][L]} \quad (8)$$

$$K_{MnL}^H = \frac{[MnHL]}{[MnL][H^+]} \quad (9)$$

$$K_{MnL}^L = \frac{[MnL_2]}{[MnL][L]} \quad (10)$$

IV.2 UV-látható spektrofotometria

Különböző fényelnyeléssel rendelkező fémkomplexek átalakulásai jól vizsgálhatók spektrofotometriás módszerrel.

A PCMEA ligandum Mn(II)-komplexe esetében a disszociáció sebessége túl gyors a hagyományos spektrofotometriás vagy relaxometriás mérésekhez, ezért “stopped-flow” technikát alkalmaztunk. Ennél a technikánál az oldatokat, azok keveredését követően jutatjuk be egy átfolyó küvettába, amely a fény útjában helyezkedik el. A mérés időtartamára a folyadék áramlása megállítható és így mérhető az abszorbancia érték, ill. annak az idő függése. A felhasznált oldatokban a pH-t, az ionerőséget és a hőmérsékletet állandó értéken tartottuk.

A proton és a kicserélő fémion disszociációra gyakorolt hatásáról úgy kaphatunk információt, ha több pH-értéken és több kicserélő fémion koncentráció mellett is elvégezzük a méréseket. A Mn(II)-komplexek kinetikai inertségének vizsgálatakor pszeudo-elsőrendű körülményeket kell biztosítani, amelyet nagy kicserélő fémion felesleg alkalmazásával lehet elérni. A pszeudo-elsőrendű állandók kiszámítását a 13. egyenlet alapján lehet elvégezni.

IV.2 Relaxometria

A $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ - $[\text{Mn}(t\text{DO2A})]^-$ és a $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$ -komplexek relaxivitását 20 MHz-en működő *Bruker Minispec MQ20* relaxométeren mértük 25 °C-on, 0,15 M NaCl ionerősség mellett 0,4 cm³ oldattérfogatban. Az előbb már említett komplexekre vonatkozó kinetikai méréseket is ezen a készüléken végeztük el a disszociáció sebességét az oldószer vízprotonok longitudinális relaxációs idejének (T_1) mérésével tanulmányoztuk. A T_1 longitudinális relaxációs időket mágnesezettség inverzió módszerrel (inversion recovery impulzus szekvenciával 180°- τ -90°) határoztuk meg.

Az általunk vizsgált Mn(II)-komplexek disszociációjának kinetikája jól vizsgálható relaxometriás technikával, mert a szabad Mn(II)-ion valamint komplexeinek a vízprotonokra gyakorolt hatása különböző.

V. Kísérleti rész

V.1 Egyensúlyi vizsgálatok

A mérések során felhasznált oldatok beméréssel készültek a analitikai reagensek analitikai vízben történő oldásával. A Mn(II)- és a Zn(II)oldatok koncentrációját komplexometriásan standard Na₂H₂EDTA mérőoldat segítségével határoztam meg eriokróm fekete T indikátor (Mn(II)) és xilanolnarancs indikátor (Zn(II)) mellett hexametilén-tetramin puffer felhasználásával (pH = 5,80).

Az egyensúlyi mérések 0,15 M NaCl ionerősség mellett történtek 25 °C-on. A pH-potenciometriás titrálásokat *Methrohm 888 Titrand* és *Methrom-6.0233.100* kombinált üvegelektrod segítségével végeztük. A mérés folyamán a mintákat kevertettük és a CO₂ mintába való beoldódásának az elkerülése végett N₂ gázt buborékolattunk keresztül az oldaton. A rendszer kalibrálásához KH-ftalát (pH= 4,005) és bórax (pH= 9,180) puffereket használtunk.

A *t*DO2A és a PCTA ligandum törzsoldatok koncentrációját pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg, nagy CaCl₂ felesleg (50-szeres) jelenlétében és távollétében. A PCMEA ligandum törzs oldatok koncentrációja 2-5-szörös MnCl₂ felesleg mellett lettek meghatározva. A vizsgált ligandumok protonálódási állandóit pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg, a 2-5 mM koncentrációjú ligandum oldatok 0,2 M NaOH oldattal történő titrálási adataiból. A Mn(II)-komplexek protonálódási és a stabilitási állandóit szintén pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg 1:1 (*t*DO2A és PCTA) és 1:2 (PCMEA) fém-ligandum arányú rendszerek titrálásával, 3-5 mM ligandum teljes koncentráció mellett. A ligandumok protonálódási állandóit és a mangán komplexek protonálódási és stabilitási állandóit 80-150 V(ml)-pH adatpárból számítottuk 1,7-12 pH tartományban, de amennyiben a rendszerben csapadékkiválás volt tapasztalható a csapadék megjelenésétől kb. 0,5 pH egységgel alacsonyabb pH-nál abbahagytuk görbék értékelését.

A H⁺-ion koncentrációt a mért adatokból az *Irving* által javasolt módszerrel számítottuk ki.^[25] Az *Irving* faktor meghatározásához egy 0,01 M HCl oldatot (0,15 M NaCl) pontosan ismert koncentrációjú NaOH oldattal titráltunk és kiszámítottuk a mért és a számolt pH közötti különbséget, amit később az állandók illesztésénél a titrálási adatok korrigálásánál figyelembe is vettünk. A víz ionszorzatának meghatározása hasonló módon történt

(HCl/NaOH) 11,5-12 pH tartományban. A pH-metriás adatokat a PSEQUAD program segítségével illesztettük^[26].

V.2 Kinetikai vizsgálatok

A $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$ és a $[\text{Mn}(\text{tDO2A})]$ fémcsere reakcióit Zn^{2+} kicserélő fémionnal relaxometriás technikával vizsgáltuk egy *Bruker minispec MQ20* típusú 20 MHz-es készülékkel. A komplexek koncentrációja 2 mM volt, míg a Zn^{2+} -iont 10-40-szeres feleslegben alkalmaztuk annak érdekében, hogy biztosítsuk a pszeudo-elsőrendű körülményeket. A fémcsere reakciókat 3-6 pH tartományban követtük. A longitudinális relaxációs idő (T_1) mérését mágnesezettség inverzió módszerrel mértük (inversion recovery, 180° - τ - 90°) 10 különböző τ értéknél 25 °C-on.

A $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ -komplex disszociációjának vizsgálatát UV-spektrofotometriás módszerrel végeztük egy *Applied Pphotophysics DX-17MV stopped flow* készülékkel. A disszociációs folyamatot 290 nm hullámhosszon követtük 3,3-5,0 pH tartományban (ez alatt a pH tartomány alatt a $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ -komplex termodinamikailag nem stabil és teljes mértékben disszociál). A vizsgálatához használt oldatokban a $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ koncentrációja 0,5 mM volt. A disszociációs reakciókat minden esetben 0,15 M NaCl ionerősség mellett vizsgáltuk. Az oldatok pH-ját pufferek segítségével tartottuk állandó értéken (1,4-dimetilpiperazinnal (DMP) 50 mM, 3-4,6 pH tartományban; N-etilpiperazinnal (NEP), 50 mM, 4,6-6,0 pH tartományban).

A pszeudo elsőrendű állandókat (k_{obs}) a primer adatokból a következő egyenlet alapján számítottuk:

$$X_t = (X_0 - X_e)e^{-k_p t} + X_e \quad (11)$$

ahol X_0 , X_t és X_e a megfelelő paraméter (abszorbancia, relaxivitas) a kezdeti, a t időpontban és az egyensúlyi állapotban. A kinetikai adatok illesztéséhez a a Micromath Scientist számítógépes program 2.0 verzióját használtuk (Salt Lake City, UT, USA).

VI. Eredmények és értékelésük

VI.1 Egyensúlyi mérések

A ligandumok protonálódási állandóinak ismerete nélkülözhetetlen a komplexek stabilitási állandóinak számításához. A protonálódási állandókat a fentebb már említett 5. egyenlet alapján lehet számolni.

1. táblázat: A vizsgált ligandumok protonálódási állandói és a Mn(II)-komplexeinek protonálódási és stabilitási állandói (25 °C, 0,15 M NaCl).

	Piklén	PCMEA	PCMA	PCMP	PCTA	tDO2A	NOTA	DOTA
$\log K_1^H$	10,62 ^[27] ; 10,33 ^[28]	10,15(1)	10,47 ^[29]	11,84 ^[29]	9,97(3); 10,90 ^[30]	11,36(1); 11,29 ^[31]	13,17 ^[32]	11,74 ^[33]
$\log K_2^H$	8,01 ^[27] ; 7,83 ^[28]	9,13(1)	8,71 ^[29]	9,64 ^[29]	6,73(5); 7,11 ^[30]	9,81(3); 9,84 ^[31]	5,74 ^[32]	9,67 ^[33]
$\log K_3^H$	1,73 ^[27] ; 1,27 ^[28]	7,88(1)	2,79 ^[29]	6,23 ^[29]	3,22(6); 3,88 ^[30]	4,02(5); 3,97 ^[31]	3,22 ^[32]	4,68 ^[33]
$\log K_4^H$	–	–	–	0,99 ^[29]	1,40(9); 2,27 ^[30]	2,82(4); 2,59 ^[31]	1,96 ^[32]	4,11 ^[33]
$\log K_5^H$	–	–	–	–	–	–	–	2,37 ^[33]
$\Sigma \log K_i^H$	20,36	27,16	21,97	28,7	21,32; 24,16 ^[30]	28,01; 27,69 ^[31]	24,09	32,57
$\log K_{ML}$	8,95 ^[27]	11,00(1)	11,54 ^[29]	14,06 ^[29]	16,83(1); 18,59 ^[30]	14,27(2); 14,54 ^[31]	16,30 ^[31]	19,89 ^[31]
$\log K_{ML}^H$	–	5,92(2)	4,95 ^[29]	5,35 ^[29]	1,96(1)	4,51(1); 4,25 ^[31]	2,87 ^[31]	4,26 ^[31]
$\log K_{ML}^L$	4,62 ^[27]	2,7(1)	–	–	–	–	–	2,99 ^[31]
pMn	6,30	6,93	8,1	8,3	15,1	8,85	11,5	14,2

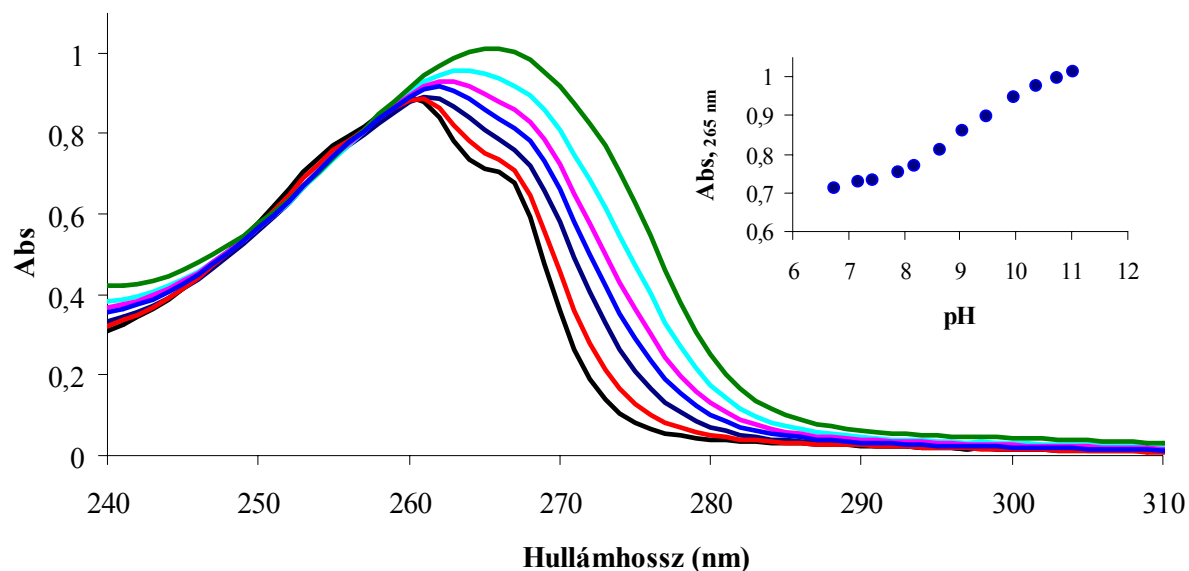
^[27]0,15 M NaCl (25 °C), ^[28]0,1 M KNO₃, ^[29]0,1 M NMe₄Cl (25 °C), ^[30]0,1 M NMe₄Cl, ^[31]0,1 M NMe₄Cl, ^[32]0,1 M NMe₄Cl, ^[33]0,1 M NMe₄Cl

Az általunk mért protonálódási állandók pH-potenciometriás módszerrel lettek meghatározva 25 °C-on és 0,15 M NaCl ionerősség mellett. A piklén, PCMEA, *t*DO2A és a PCTA ligandumok protonálódási állandóit az 1. táblázat tartalmazza (az egyes állandók standard deviációk értékeit zárójelben tüntettem fel). Összehasonlítás képen az 1. táblázat tartalmazza még a DOTA, NOTA, piklén, PCMA és a PCMP ligandumok irodalomból vett protonálódási állandóit is.

A komplexek protonálódási és stabilitási állandóit az 1:1 és 1:2 fém ligandum arányú rendszerek titrálása során nyert V(ml)-pH adatpárok illesztésével nyertem. A PCMEA ligandum esetében $[Mn(L)]$, protonált $[Mn(HL)]$ és $[Mn(L)_2]$ összetételű komplexek keletkezését, míg a *t*DO2A és a PCTA ligandumok esetében $[Mn(L)]$ és $[Mn(HL)]$ komplexek képződését feltételeztem. A komplexek protonálódási- és stabilitási-állandóit a 8-10 egyenletek alapján számoltam.

Az 1. táblázatban foglalt eredményekből látszik, hogy első két protonálódási állandója a piridint egységet tartalmazó makrociklusos ligandumoknak általában alacsonyabb, mint a *t*DO2A-nak, ami az aromás gyűrű elektronszívó hatásának és a makrociklusos gyűrű merevségének köszönhető, viszont a PCMP^[29] ligandum esetében az első protonálódási állandó értéke magasabb, mint a *t*DO2A esetében. Ez a bázicitásbeli különbség a foszfonátcsoport jelenlétének köszönhető mivel az szívesebben képez intramolekuláris hidrogénkötést a protonált amin csoporttal, ami mintegy stabilizálva a protont a nitogén atomon magasabb értékek felé tolja az állandó értékét. A *t*DO2A és PCTA ligandumok protonálódási és stabilitási állandói az irodalomban is megtalálhatók, és ezen adatokkal való összehasonlításból kiderül, hogy a ligandumok valószínűleg képeznek kis stabilitású komplexet a Na⁺-ionnal.^[28,30,31] A piklén és *t*DO2A ligandum protonálódási állandó értékei függetlenek az ionerősségtől, ami arra utal, hogy gyenge a kölcsönhatás a ligandumok, valamint az ionerősség Na⁺- és K⁺-ionjai között nem valószínűsíthető. A PCTA ligandum esetében az irodalmi érték (0,1 M Me₄NCl-ben) magasabb, mint az általunk mért érték 0,15 M NaCl oldatban, amiből következik, hogy a PCTA és a Na⁺-ion között kialakuló kölcsönhatás erősebb. A ligandumok első két protonálódási állandója a makrociklus N-donoratomjaihoz rendelhető. A PCMEA protonálódási folyamata UV-spektrofotometriával is vizsgálható volt a piridin gyűrű π - π^* átmenetének köszönhetően. Az abszorpciós spektrumokat 6,7-11-es pH tartományban elvégezve a vizsgálatokat szignifikáns változást tapasztaltunk a 8-11-es pH tartományban, ami a gyűrűben lévő két N-donoratom protonálódását mutatja (4. ábra). Persze érdemes megjegyezni, a folyamatok némiképp

átfednek, mivel a protonálódási állandó értékei között alig tapasztalható 1 log K egységnyi különbség.



4. ábra: PCMEA-ligandum spektrofotometriás görbéi (pH=6.75-11.00, $C_L=2,78 \times 10^{-4}$ M, 0.15 M NaCl, 25 °C). (pH értékek: 6,75; 7,90; 8,65; 9,05; 9,46; 9,96; 11,03)

A piridin gyűrűt tartalmazó ligandumok és a *t*DO2A Mn(II)-komplexeinek a stabilitási állandóit összehasonlítottuk a $[Mn(NOTA)]^-$ és a $[Mn(DOTA)]^{2-}$ -komplexek a stabilitási állandóival (1. táblázat). Ahogy az a táblázatban látható a $[Mn(DOTA)]^{2-}$ -komplex rendelkezik a legnagyobb stabilitással, értéke több mint egy nagyságrenddel nagyobb, mint a $[Mn(PCTA)]^-$ -komplexé hasonló mérési körülmények között. Az általunk mért stabilitási állandó érték a $[Mn(PCTA)]^-$ -komplexre két nagyságrenddel kisebb, mint az irodalomban fellelhető érték ($\log K_{MnL}=18,59$)^[30], ami a vizsgálatok során alkalmazott ionerősség különbözőségéből adódhat. A $[Mn(tDO2A)]$ -komplexre kapott stabilitási állandó jó egyezést mutat a *Bianchi* és munkatársai által mért stabilitási állandóval Me_4NCl ionerősség mellett.^[25]

A $[Mn(tDO2A)]$ - és a $[Mn(PCTA)]^-$ -komplexek protonálódási folyamata, hasonlóan a DOTA és NOTA komplexekéhez az acetátcsoporthoz rendelhető, míg a $[Mn(PCMEA)]^{2+}$ -komplex esetében a protonálódás feltételezhetően az oldallánc primer aminján következik be.

A komplexek stabilitási állandóit könnyen össze lehet hasonlítani a pMn értékeik alapján (1. táblázat), amit pH=7,4 $c_{Mn^{2+}} = 1 \times 10^{-6}$ M és $c_{Lig} = 1 \times 10^{-5}$ M körülmények és koncentrációk alkalmazásával számoltunk.^[34] Ha összehasonlítjuk a $[Mn(PCTA)]^-$ és a $[Mn(DOTA)]^{2-}$ -komplexek pMn értékeit fiziológiás pH-értéken (pH=7,4) azt tapasztaljuk,

hogy a $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$ -komplexre kapott érték a nagyobb, tehát ilyen körülmények között a PCTA ligandum Mn(II)-komplexének a látszólagos stabilitási állandója a nagyobb, mivel ez a ligandum eredményezi a kevesebb szabad fémiont fiziológiás pH-n. Ez érdekes megfigyelés, mivel a $[\text{Mn}(\text{DOTA})]^{2-}$ -komplex termodinamikai stabilitása $3 \log K$ egységgel nagyobb és valószínű a köztudatban ennek van nagyobb szerepe, amikor egy ligandum jelöltet *in vivo* alkalmazásra választanak ki.

VI.2. Kinetika vizsgálatok eredményei

A komplexek kinetikai inertségét leggyakrabban fémcseré reakcióikon keresztül tanulmányozzuk. A $[\text{Mn}(t\text{DO2A})]^-$ és a $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$ -komplexek fémcseré reakcióit (12. egyenlet) a kicserélő fémion (Zn^{2+}) 10–40-szeres feleslege mellett vizsgáltuk ezzel biztosítva a pszeudo-elsőrendű feltételt.

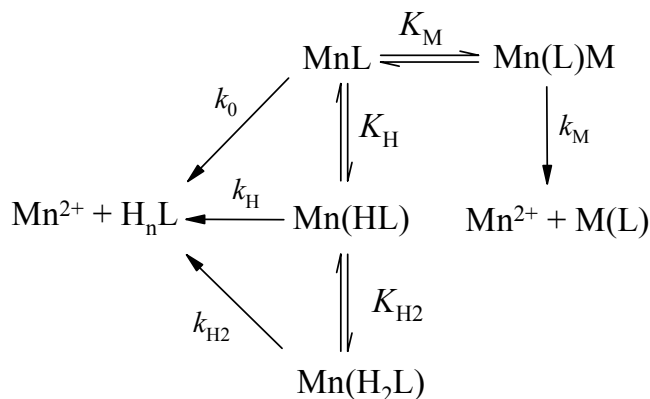


A $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ -komplex esetében nem alkalmaztunk kicserélő fémiont, mert a vizsgált pH tartományban (3,3–5,0) a komplex már termodinamikailag nem stabilis és teljes mértékben disszociál.

A pszeudo-elsőrendű reakciók disszociációjának a sebességét a 13. egyenlettel fejezzük ki, ahol k_{obs} a pszeudo elsőrendű sebességi állandó és az $[\text{MnL}]_{\text{tot}}$ a komplex teljes koncentrációját jelöli.

$$-\frac{d[\text{MnL}]_t}{dt} = k_{\text{obs}}[\text{MnL}]_{\text{tot}} \quad (13)$$

A Mn(II)-komplexek disszociációs reakciói, a Gd(III)-komplexekéhez hasonlóan^[35], lejátszódhatnak spontán, a proton- és a fém-katalizált útvonalakon, amit az 5. ábrán mutatunk be. Az ábrán a k_0 , k_H , k_{H2} és a k_M sebességi állandók jelölik a komplex spontán, proton katalizált és fém katalizált disszociációs reakcióknak útvonalait. A K_H és a K_{H2} a $[\text{Mn}(\text{HL})]$ és a $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{L})]$ komplexek protonálódási állandóit, míg a K_M a két magvú komplex $[\text{Mn}(\text{L})\text{M}]$ stabilitási állandóját jelöli.



5. ábra: A PCTA, PCMEA és a *t*DO2A Mn(II)-komplexének disszociációs útvonalai.

Ha figyelembe vesszük a különböző reakció utakat (5. ábra) és a K_H , K_{H2} és K_M egyensúlyi állandókat, akkor a pszeudo-elsőrendű sebességi állandót (k_{obs}) definiáló egyenletet (14. egyenlet) a következőképpen tudjuk megadni:

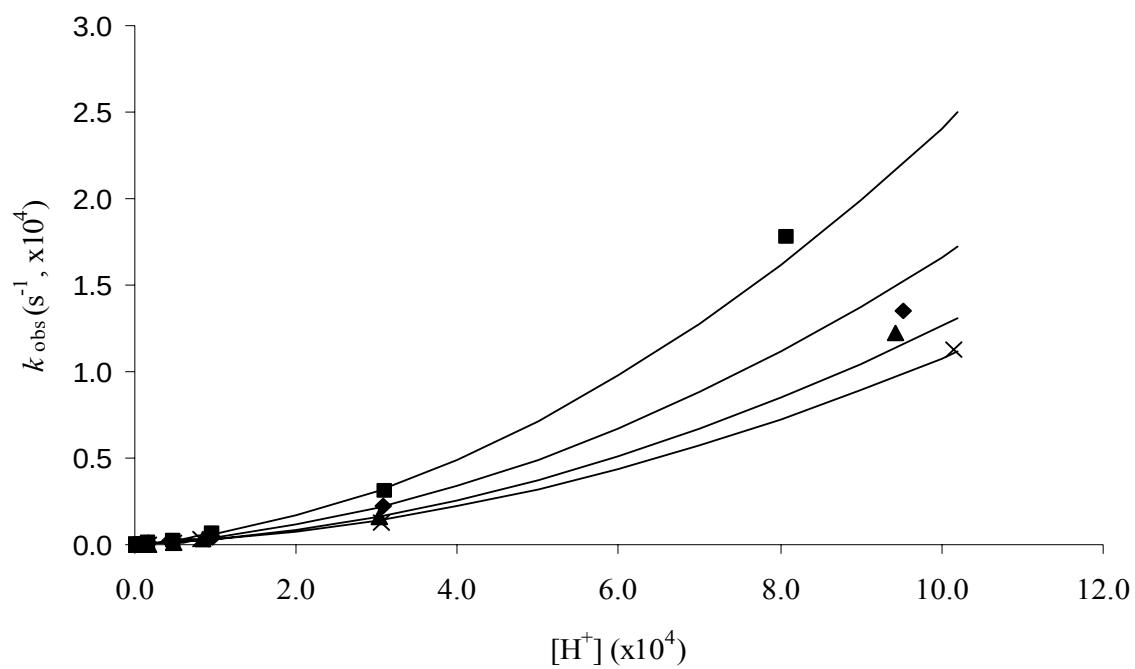
$$k_{\text{obs}} = \frac{k_0 + k_1[\text{H}^+] + k_2[\text{H}^+]^2 + k_3[\text{Zn}^{2+}]}{1 + K_H[\text{H}^+] + K_{H2}[\text{H}^+]^2 + K_M[\text{Zn}^{2+}]} \quad (14)$$

ahol, $K_H = [\text{Mn(HL)}]/[\text{Mn(L)}][\text{H}^+]$, $K_{H2} = [\text{Mn(H}_2\text{L)}]/[\text{Mn(HL)}][\text{H}^+]$, $K_M = [\text{Mn(L)M}]/[\text{Mn(L)}][\text{M}]$, $k_1 = k_H \cdot K_H$, $k_2 = k_{H2} \cdot K_H \cdot K_{H2}$ és $k_3 = k_M \cdot K_M$.

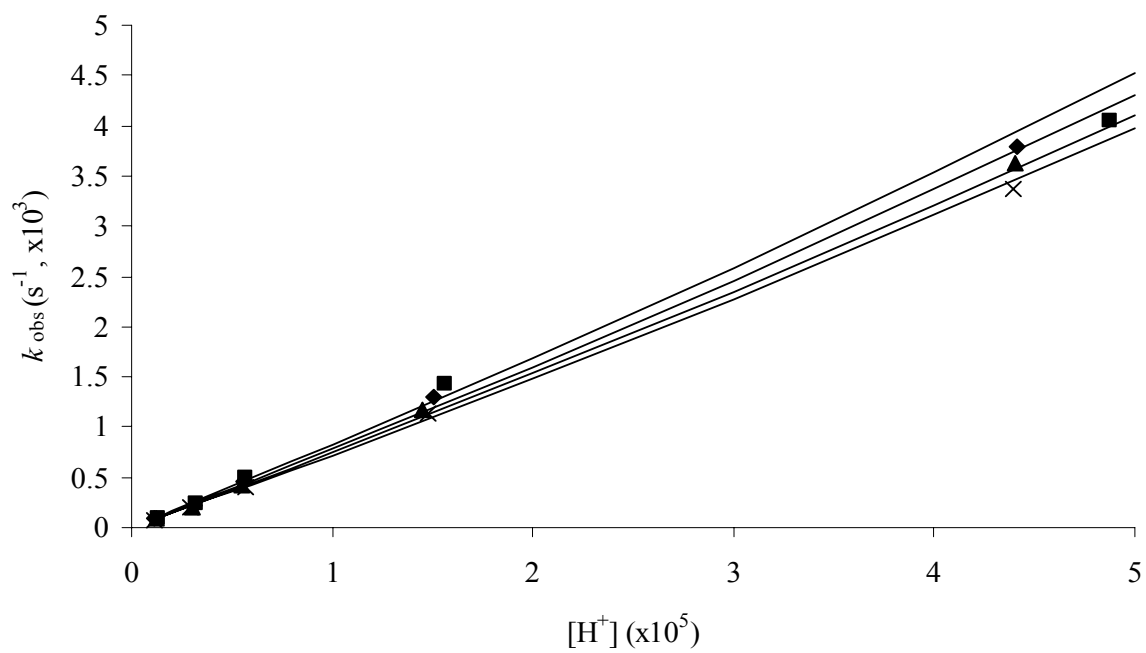
A pszeudo-elsőrendű sebességi állandók értéke nő a H^+ -ion koncentrációjának növelésével, míg a számolások azt mutatják, hogy a kicserélő fémionnak (Zn^{2+}) csak a $[\text{Mn(PCTA)}]^-$ esetén van mérhető hatása a disszociáció sebességre (k_3).

A komplexek disszociációjára kapott sebességi és a kétmagvú köztitermékek stabilitási állandóit a 2. táblázatban tüntettem fel. A 2. táblázatban összehasonlítás céljával a $[\text{Mn(NOTA)}]^-$ és a $[\text{Mn(DOTA)}]^{2-}$ -komplexek disszociációjára jellemző sebességi állandóit is feltüntettük. A komplexek disszociációnak a felezési idejét ($t_{1/2}$) pH=7,4-nél szintén kiszámítottuk mivel a radiológusoknak az ilyen információ lényegesen hasznosabb, mint a sebességi állandó adatok. A ($t_{1/2}$) kiszámítása során kicserélő fémion (Zn^{2+}) koncentrációját 1×10^{-5} M vettük, ami megegyezik a Zn^{2+} -ionok élő szerkezeten belüli koncentrációjával.

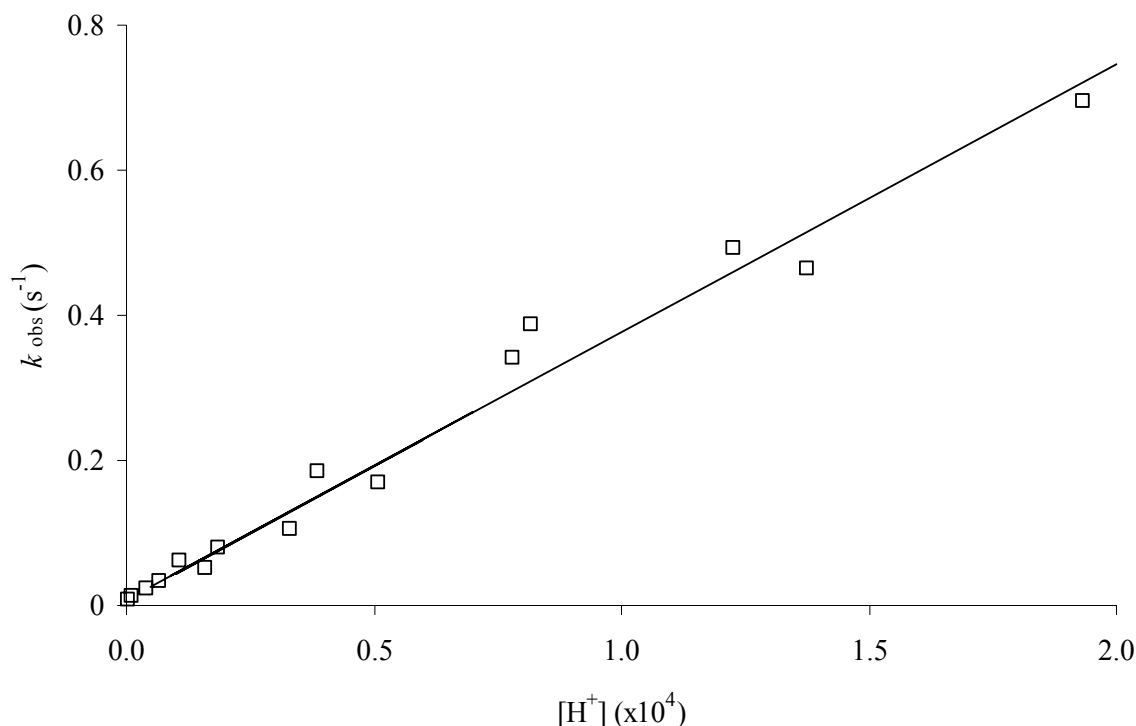
A



B



C



6. ábra: A $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$ (A), $[\text{Mn}(t\text{DO2A})]^-$ (B) és a $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ -komplexek (C) pszeudo-elsőrendű állandói (k_{obs}) a Zn^{2+} -ion és a H^+ -ion koncentráció függvényében. A kicserélő fémion koncentrációk $\times 10$ (■), $\times 20$ (◆), $\times 30$ (▲) és $\times 40$ (×) fentről lefelé haladva.

Az illesztések során a K_{H} és K_{H2} protonálódási állandók értékét nem tudtuk számolni, mivel az értékük összevethető volt hibájukkal. A komplexek spontán disszociációjához rendelhető k_0 sebességi állandót csak a $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ -komplex esetében lehetett illeszteni, amiből arra tudunk következtetni, hogy a spontán disszociáció szerepe a $[\text{Mn}(t\text{DO2A})]^-$ és a $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$ -komplexek esetében az általunk alkalmazott körülmények között elhanyagolható, ami meglepő, hiszen a $[\text{Mn}(\text{NOTA})]^-$ és a $[\text{Mn}(\text{DOTA})]^{2-}$ -komplexek esetében korábban kimutatták a spontán disszociáció szerepét a komplexek fémcseré reakcióinál.^[36] A PCMEA Mn(II)-komplexének spontán disszociációját jellemző sebességi állandó értéke több nagyságrenddel nagyobb DOTA és a NOTA Mn(II)-komplexeinél, ami feltételezhetően a PCMEA ligandum koordinációs kalitkája kevésbé zárt szerkezetének köszönhető.

2. táblázat: [Mn(PCTA)]⁻, [Mn(PCMEA)]²⁺, [Mn(PCMP)]⁻, [Mn(tDO2A)]⁻, [Mn(DOTA)]²⁻, [Mn(NOTA)]⁻-komplexek disszociációját jellemző egyensúlyi és sebességi állandók értékei.

	k_0 (s ⁻¹)	k_1 (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_2 (M ⁻² s ⁻¹)	k_3 (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_M	$t_{1/2}$ (h)
[Mn(PCTA)] ⁻	–	(8,2±0,7)×10 ⁻²	(3,5±0,4)×10 ²	(1,8±0,3)×10 ⁻⁶	38±6	5,9×10 ⁴
[Mn(PCMEA)] ²⁺	(6±1)×10 ⁻³	(3,7±0,2)×10 ³	–	–	–	3,0×10 ⁻²
¹²⁹ I[Mn(PCMA)] ⁺	–	2020	8×10 ⁷	–	–	2,4
[Mn(tDO2A)]	–	84±3	(2,2±0,7)×10 ⁵	–	2,4±0,7	58
¹³⁶ I[Mn(DOTA)] ²⁻	1,8×10 ⁻⁷	0,04	1,6×10 ³	1,5×10 ⁻⁵	68	1058
¹³⁶ I[Mn(NOTA)] ⁻	2,6×10 ⁻⁶	0,78	–	1,1×10 ⁻⁵	3,6	73

¹²⁹I 0,1 M NMe₄Cl

A [Mn(PCTA)]⁻-komplex proton-katalizált disszociációját jellemző sebességi állandó (k_1) értéke 2-szer nagyobb a [Mn(DOTA)]²⁻- és körülbelül egy nagyságrenddel kisebb a [Mn(NOTA)]⁻-komplex megfelelő értékéhez viszonyítva. A [Mn(PCMEA)]²⁺ esetében a proton-katalizált disszociáció szerepe sokkal nagyobb, ami a ligandumban jelenlevő bázikus primer amin csoport jelenlétének köszönhető. A [Mn(PCMEA)]²⁺-komplex esetében a proton-katalizált disszociáció értéke (k_1) 2-szer nagyobb, mint a [Mn(PCMA)]-komplex megfelelő értéke^[29], amely komplex esetében kétszerprotonált köztiterméken keresztül lejátszódó disszociációra (k_2) is található adat az irodalomban. A protonkatalizált disszociációs reakció során a protonálódás általában a ligandum egyik oldalláncán következik be, ahonnan aztán a proton átkerül a makrociklusos gyűrű egyik donoratomjára, miután a fémion kilép a koordinációs kalitkából. A [Mn(PCTA)]⁻ és a [Mn(tDO2A)]-komplex esetében a disszociáció lejátszódhat egy kétszerprotonált köztitermék képződésén keresztül is, amit egy másodrendű sebességi állandóval (k_2) jellemezhetünk.

A támadó fémion közbenjárásával lejátszódó disszociáció szerepe a makrociklusos ligandumok komplexei esetében általában kisebb, mint a nyíltláncú ligandumok komplexeinél.^[37] Fémkatalizált disszociáció során a kicserélő fémion direkt támadása vezet egy kétmagvú köztitermék kialakulásához [Mn(L)M], amiben a ligandum donoratomjai lépésről lépésre áttevődnek a kicserélő fémionra. A [Mn(PCTA)]⁻-komplex fémkatalizált disszociációjának sebességi állandója (k_3) egy nagyságrenddel kisebb, mint a [Mn(NOTA)]⁻ és a [Mn(DOTA)]²⁻-komplexek esetében, annak ellenére, hogy a kialakuló kétmagvú köztitermék ([Mn(PCTA)Zn]⁺) stabilitása (K_M) összemérhető a DOTA és a NOTA komplexekével. A Mn(tDO2A)]-komplex esetében azt találtuk, hogy a fémion közvetlen támadásával lefolyó reakcióút szerepe elhanyagolható, habár a kétmagvú köztitermék

stabilitási állandójának az értékét tudtuk számolni. Ezt a megfigyelést azzal tudjuk magyarázni, hogy kétmagvú köztitermék végtermékké alakulása nagyon lassú folyamat és a komplexek inkább a lényegesen gyorsabb protonkatalizált disszociációt részesítik előnyben.

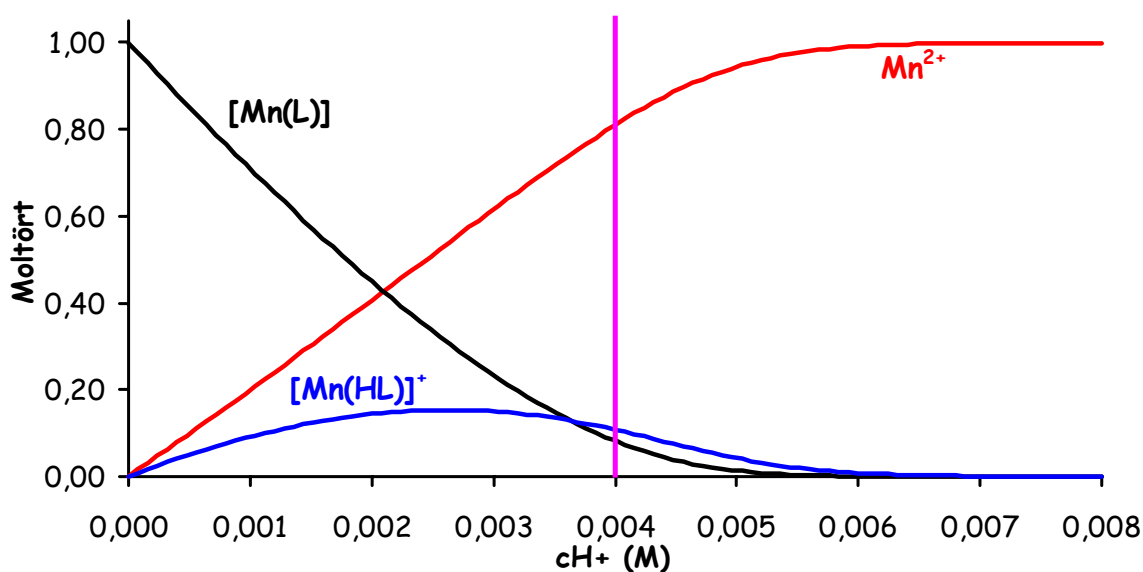
A $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$ -komplex estében azt tapasztaltuk, hogy a k_{obs} értékek csökkennek a kicserélő fémion koncentrációjának növelésével. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy a kétmagvú és a protonált köztitermékek képződése között fennálló egyensúly a kétmagvú köztitermék képződésének irányába van eltolódva (ami viszont a ligandum szerkezetéből kiindulva merev és ez által kevésbé kedvezményezett a komplex szerkezeti átalakulása), amely ez által csökkenti a reakciók sebességét.

A komplexek a kinetikai inertségét legegyszerűbben disszociációjuk adott körülményekre vonatkozó felezési idejével ($t_{1/2}$) tudjuk összehasonlítani. Ezért kiszámítottuk a disszociációs reakciók felezési idejét $\text{pH}=7,4$ és 1×10^{-5} M kicserélő Zn^{2+} koncentrációval számolva. A felezési idők összehasonlításából tisztán látszik, hogy a $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$ -komplex a legnagyobb felezési idővel rendelkező komplex, azaz a leginertebb a vizsgált komplexek között. A közelmúltban publikált DOTA és NOTA Mn(II)-komplexeinél is jobb paraméterekkel rendelkezik. Ha a $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ - és a $[\text{Mn}(\text{PCMA})]$ -komplex felezési idejét összehasonlítjuk, azt tapasztaljuk, hogy az, amin csoport acetát csoportra történő cseréjével a felezési idő értéke két nagyságrenddel nő.

VI.3. Relaxometriás mérések

A kontrasztanyag felhasználásuk tekintetében fontos paraméter a komplexek relaxivitása is. A $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$, $[\text{Mn}(\text{tDO2A})]^-$ és a $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ -komplexek relaxivitását 20 MHz-en és 25 °C-on határoztuk meg az irodalomban javasolt módszer szerint. A komplexekre kapott relaxitás értékek sorrendben a következők: 1,4, 1,6 és 1,7, ezzel szemben a Mn^{2+} -ion relaxivitása ugyan ilyen körülmények között $8,16 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (az általunk meghatározott érték jó egyezést mutat a korábban kicsivel nagyobb térről meghatározott adattal $7,4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 24 MHz-en és 25 °C-on^[38]). A alacsony relaxitás értékek azt mutatják, hogy a komplexek belső koordinációs szférájában nem található vízmolekula ($q=0$), így relaxitásuk tisztán a külső szférás relaxitásnak tulajdonítható. Itt hangsúlyozandó, hogy az irodalmi adatokban van némi ellentmondás a tDO2A ligandummal képződő Mn(II)-komplex relaxivitása ill. koordinált vizek számának tekintetében. Mivel a komplex egykristály röntgenszerkezete nem ismert így biztosat nehéz mondani a koordinált vízmolekulák

tekintetében, de a publikált relaxivitás érték, $r_1 = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (20 MHz, 37 °C), irreálisan nagyknak tűnik, mivel jobb esetben is csak egy koordinált vízmolekula lehet a potenciálisan 6 donoratomot tartalmazó ligandum Mn(II)-komplexében. Ez jó összhangban van a mi eredményünkkel, ill. azzal is, hogy a *c*DO2A esetében a ligandum 6 donoratomja koordinálódik és nem tartalmaz koordinált vízmolekulát.^[39] Érzésünk szerint *S. Wang* és munkatársai a komplexek előállításakor hibáztak, mivel a komplex előállítását úgy végezték el, hogy $\text{H}_2\text{tDO2A}$ -ból indultak ki, és bázist nem is adtak a reakcióelegyhez. Így feltehetően $[\text{Mn}(\text{tDO2A})]*2\text{HCl}$ összetételű komplexet szintetizáltak, melynek vizes oldata savas (hasonlóan a H_4DOTA -ból kiindulva $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{DOTA})]$ -komplex kristályosodott ki, amelyben a ligandum hat donoratomja koordinálódik a fémionhoz és két acetát csoport protonált formában található). Az 1. táblázatban bemutatott stabilitási állandók alapján számított koncentráció eloszlási görbe azt mutatja ($c_{\text{Mn}^{2+}} = c_{\text{Lig}} = 2 \text{ mM}$ és $c_{\text{H}^+} = 4 \text{ mM}$), hogy a fémion mindössze 20 %-a van komplex formában. Ez magyarázatot ad arra, hogy miért kaptak a szerzők a Mn^{2+} -ion relaxivitásához nagyon közeli értéket.



7. ábra: Koncentráció eloszlási görbe a Mn^{2+} - *t*DO2A – H^+ rendszerben ($c_{\text{Mn}^{2+}} = c_{\text{Lig}} = 2 \text{ mM}$ a függőleges rózsaszínű vonal a $c_{\text{H}^+} = 4 \text{ mM}$ -nak felel meg, ami modellezi a $[\text{Mn}(\text{tDO2A})]*2\text{HCl}$ összetételt).

A $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ -komplex esetében meglepő az alacsony relaxivitás érték mivel a PCMEA ligandumnak csak 5 donoratomja van, amely lehetővé tenné, legalább egy vízmolekula koordinálódjon a központi Mn(II)-ionhoz. A jelenleg folyamatban lévő CV

méréseink azonban azt mutatják, hogy ez a ligandum nem képes megvédeni pH=7,4-nél a Mn^{2+} -iont az oxidációval szemben, melynek eredményeként a relaxitás csökken (a Mn(III)-relaxációs hatása lényegesen kisebb mértékű), de ezen túl a kis relaxitás dimerek képződésével is értelmezhető lehet, amit piklén származék ligandumoknál Ln(III)-komplexek esetében a közlemúltban azonosítottak.^[43] Ennek a kérdésnek a megválaszolása irányuló vizsgálataink jelenleg is folyamatban vannak, így elfogadható magyarázattal csak később tudunk szolgálni.

VII. Összefoglalás

Az Nefrogén Szisztémás Fibrózis megjelenésével Mn^{2+} makrociklusos ligandumokkal képződő komplexeinek egyensúlyi és kinetikai vizsgálata újabb lendületet vett. Ehhez a kutatáshoz csatlakozva jelen munkánk során meghatároztuk három makrociklusos ligandum, a PCMEA, *t*DO2A és a PCTA, protonálódási ill. Mn(II)-komplexeik stabilitási állandóit. A *t*DO2A és PCTA Mn(II)-komplexeire meghatározott stabilitási állandók értékek, hasonlóak a már publikált $[\text{Mn}(\text{EDTA})]^{2-}$ ($\log \beta=13.8$, 0,1 M NaClO_4)^[40] értékéhez, de alacsonyabbak, mint azt a $[\text{Mn}(\text{DOTA})]^{2-}$ -komplex estében tapasztalták^[34]. A negatív töltésű donoratomok hiánya a $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ esetében szignifikánsan alacsonyabb termodinamikai stabilitást eredményez, mint a piklén-monoacetát (PCMA) és -mono(metilénfoszfónát) (PCMP) származékai esetébe találták.^[41]

Vizsgáltuk továbbá a $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ - a $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$ és a $[\text{Mn}(\text{tDO2A})]^-$ komplexek bomlási kinetikáját illetve a disszociációs reakciókat jellemző sebességi állandók ismeretében kiszámítottuk a komplexek disszociációját jellemző felezési időket ($t_{1/2}$) fiziológiás körülmények között (pH=7,4 és 1×10^{-5} M Zn^{2+} -ion kicserélő fémion mellett). A felezési idők összehasonlításából kiderül, hogy a $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$ -komplex kinetikai inertsége jóval nagyobb az irodalomban publikált $[\text{Mn}(\text{DOTA})]^{2-}$ - és $[\text{Mn}(\text{NOTA})]^-$ -komplexeikénél. Az $[\text{Mn}(\text{tDO2A})]^-$ -komplekre kapott felezési idő alapján azt mondhatjuk, hogy annak kinetikai inertsége összevethető a $[\text{Mn}(\text{NOTA})]^-$ -komplekével.^[36] A $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ -komplekre kapott felezési idő ugyanakkor azt mutatja, hogy a komplex inertsége nagyságrendekkel kisebb az összes általunk vizsgált és az irodalomból ismert makrociklusos Mn(II)-komplexénél. Ezek alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a piridincsoport makrociklusos gyűrűbe való fúziója növeli a Mn(II)-komplex kinetikai inertséget, viszont az acetát karok számának a csökkenése a termodinamikai stabilitás és a kinetikai inertség (és a redoxi stabilitás) csökkenéséhez vezet.

A $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$, $[\text{Mn}(\text{tDO2A})]^-$ és a $[\text{Mn}(\text{PCMEA})]^{2+}$ -komplexek esetében mért kis relaxivitás értékek nem teszik lehetővé azok kontrasztanyagként való alkalmazását. Mindazonáltal, az általunk kapott kinetika és a termodinamikai adatok arra mutatnak, hogy a komplexek kinetikai inertsége nagymértékben befolyásolható az makrociklusos poliamin (ciklén vs. piklén vagy DOTA vs. PCTA) és az oldalláncok megfelelő megválasztásával. Így, az inert komplexek szintéziséhez olyan ligandumokat kell előállítani, amelyek gyengén savas (pl. acetát, 2 metilacetát) vagy merev, előredezett (pikolinát) oldalláncokat tartalmaznak.

Kerülni kell a könnyebben protonálható, foszfonát-, ill. amin-csoportokat, mert a keletkező protonált komplex minden esetben hajlamosabb a disszociációra. Ezek az eredmények összhangban vannak a Gd^{3+} -komplexek esetében tapasztalt eredményekkel is.^[42]

VIII. Irodalom jegyzék

- [1] E. Tóth, A. E. Merbach, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, Chichester, **2001**
- [2] Jacques, V.; Desreux, J. F., *New Classes of MRI Contrast Agents*. In: Krause, W., eds., *Topics in Current Chemistry*, Vol. 221: *Contrast Agents I. Magnetic Resonance Imaging*, Berlin: Springer-Verlag, **2002**
- [3] Tóth, É.; Helm, L. and Merbach, A. E., In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, Tóth, É. and Merbach, A. E., eds., Chichester: John Wiley & Sons, **2001**.
- [4] Weinmann, H. J.; Brasch, R. C.; Press, W. R.; Webey, G. E., *Am. J. Roentgenol*, **1984**, *142*, 619.
- [5] Gries, H.; Miklautz, H., *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, **1984**, *16*, 105.
- [6] Desreux, J.; Barthélemy, P. P., *Nucl. Med Biol.*, **1988**, *15*, 9.
- [7] Rocklage, S.M., Chacheris, W. P., Quay, S. C., Hahn, F. E. and Raymond, K. N., *Inorg. Chem.*, **1989**, *28*, 477.
- [8] Elizondo, G., Fretz, C. J., Stark, D. D., Rocklage, S. M., Quay, S. C., Worah, D., Tsang, Y. M., Chen, M. C. and Ferrucci, J. T., *Radiology*, **1989**, *178*, 73.
- [9] Pomeroy, O. H., Wendland, M., Wagner, S., Derugin, N., Holt, W. W., Rocklage, S. M. Quay, S. and Higgins, C. B., *Invest. Radiol.*, **1989**, *24*, 531.
- [10] J. Crossgrove and W. Zheng, *NMR in Biomed.*, 2004, **17**, 532-543
- [11] A. C. Silva, J. H. Lee, I. Aoki and A. P. Koretsky, *NMR in Biomed.*, 2004, **17**, 532-543
- [12] Idee, J.-M. et al., *Fund. Clin. Pharmacol.*, **2006**, *20*, 563
- [13] Brücher, E., Kinetic Stabilities of Gadolinium(III)Chelates Used as MRI Contrast Agents In *Topics in Current Chemistry*, Vol. 221: *Contrast Agents I. Magnetic Resonance Imaging*. Berlin, Springer-Verlag, 2002, p. 103.
- [14] B. Drahos, Bohuslav; Lukes, Ivan; Toth, Eva, *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2012**, 1975-1986
- [15] S. J. Dorazio, J. R. Morrow, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, *12*, 2006–2014
- [16] . J. Dorazio, P. B. Tsitovich, K. E. Sifers, J. A. Sperry, J. R. Morrow, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14154–14156.]
- [17] Hubin, T. J., McCormick, J. M., Collinson, S. R., Buchalova, M., Perkins, C. M., Alcock, N. W. Kahol, P. K., Raghunathan, A. and Busch, D. H., *JACS*, **2000**, *122*, 2512-2522
- [18] Bach-Gensamo, T., *Acta Radiol.*, **1993**, *387*, 1.
- [19] Reimer, P.; Tombach, B., *Eur. Radiol.*, **1998**, *8*, 1198.
- [20] Grubnic, S.; Padhani, A. R.; Revell, P. B.; Husband, J. E., *Am. J. Roentgenol.*, **1999**, *173*, 173.
- [21] Luz, Z.; Meiboom, S., *J. Chem. Phys.*, **1964**, *40*, 1058.
- [22] Dwek, R. A.; Williams, R. J. P.; Xavier, A. V.: Application of Paramagnetic Probes in Biochemical Chemistry. *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 4., A. Sigel, H. Sigel, eds., New York: Marcel Dekker Inc, **1974**.

- [23] Freed, J. H., *J. Chem. Phys.*, **1978**, 69, 4034.
- [24] Botta, M., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2000**, 399 – 407.
- [25] H. M. Irving, M. G. Miles, L. Pettit, *Anal. Chim. Acta* **1967**, 38, 475-488.
- [26] Zékány L., Nagypál I. in “*Computational Method for Determination of Formation Constants*” Ed. Legett D J, Plenum, New York, **1985**, p. 291.
- [27] Milibák Gábor Szakdolgozata, *Makrociklusban piridincsoportot tartalmazó ligandumokkal képződő Mn(II)-komplexek egyensúlyi és kinetikai vizsgálata*, Debrecen, **2011**
- [28] J. Costa, R. Delgado, *Inor. Cem.*, **1993**, 32, 5257
- [29] Bohuslav Drahos, Jan Kotek, Ivana Císarová, Petr Hermann, Lothar Helm, Ivan Lukes and Éva Tóth, I *Inorg. Chem.*, **2011**, 50 (24), pp 12785–12801
- [30] R. Delgado; J. C. S. *Dalton Trans.*, **1996**, 55
- [31] A. Bianchi, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2001**, 917
- [32] D. Bohuslav V. Kubicek, C. S. Bonnet, P. Hermann, I. Lukes and E. Toth, *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 1945
- [33] Bianchi, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2000**, 697
- [34] M. K. Thompson, M. Botta, G. Nicolle, L. Helm, S. Aime, A. E. Merbach, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(47), 14275.
- [35] Brücher, E. and Sherry, A. D., Stability and Toxicity of Contrast Agents, in *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, Tóth, E. and Merbach, A. E. ed., Wiley, Chichester, 2001, pp. 243–280.
- [36] D. Bohuslav V. Kubicek, C. S. Bonnet, P. Hermann, I. Lukes and E. Toth, *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 1945.
- [37] Brücher E., Topics in current chemistry, Contrast agents I., Kinetic stabilities of Gadolinium(III) Chelates Used as MRI Contrast Agents **103. oldal**
- [38] Y. Ducommun, K. E. Newmann, A. E. Merbach, *Inorg. Chem.* **1980**, 19, 3696–3703.
- [39] A. Bianchi, L. Calabi, C. Giorgi, P. Losi, P. Mariani, D. Palano, P. Paoli, P. Rossi, B. Valtancoli, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 917–922.
- [40] B. Sarma and P. Ray; *J. Indian Chem. Soc.*, **1956**, 33, 841
- [41] Drahos, *Inorg chem*, **2011**, 50, 12785
- [42] E. Brücher, Zs. Baranyai and Gy. Tircsó The Future of Biomedical Imaging: Synthesis and Chemical Properties of the DTPA and DOTA Derivative Ligands and Their Complexes, Chapter 5.2 in *Biomedical Imaging: The Chemistry of Labels, Probes and Contrast Agents*, **2011**, Royal, Society of Chemistry, pp. 208-260]
- [43] Garry E. Kiefer and Mark Woods *Inorg. Chem.*, **2009**, 48 (24), pp 11767–11778

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek Dr. Tircsó Gyulának és Dr. Kálmán Ferenc Krisztiánnak szakmai irányításukat és segítségüket, amellyel lehetővé tették e TDK dolgozat megszületését.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Brücher Ernő professzor emeritusnak és Prof. Dr. Tóth Imre egyetemi tanárak, kutatócsoportunk vezetőinek, hogy lehetővé tették a Ritkafém kutatócsoportban való munkámat.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani Dr. Baranyai Zsolt tudományos munkatársnak és kutatócsoportunk többi dolgozójának: Nagy Viktória és Fodor Tamás PhD hallgatóknak, Takács Katalinnak, Milibák Gábornak és mindazoknak, akik bármilyen módon hozzájárultak dolgozatom megírásához.