

**2007 – 2010 évi OTKA jelentés
K-69098**

Vezető kutató: Brücher Ernő

**LANTANIDA(III)-DIETILÉNTRIAMIN-PENTAACETÁT SZÁRMAZÉKOKKAL
KÉPZŐDŐ KOMPLEXEK LIGANDUMCSERE REAKCIÓINAK KINETIKÁJA: A
NEMKOVALENS KÖLCSÖNHATÁSOK SZEREPE**

A pályázat keretében tervezett tudományos munka szorosan kapcsolódik a kutatócsoportunkban már hosszú ideje folyó, a ritakföldfémek (lantanidák, La, Y, és Sc) nyíltláncú és makrociklusos aminopolikarboxilát és aminoszfónát ligandumokkal képzett komplexei vizsgálatához. Az említett komplexek közül többet elterjedten alkalmaznak az orvosi diagnosztikában (Gd^{3+} alapú MRI kontrasztanyagok) ritkábban a terápiában (^{90}Y , ^{153}Sm , ^{166}Ho és ^{177}Lu izotópok komplexei), így a munkánk bár alapkutatás jellegű, de eredményei gyakorlati szempontból is érdekesek lehetnek. A gadolínium komplexek oldategyensúlyi, de főként disszociációjuk kinetikai vizsgálatának eredményei az utóbbi 3 – 4 évben különösen érdekesek lettek amióta ismertté vált egy újabb betegség, az ún. Nephrogenic Systemic Fibrozis (NSF), amit az MRI vizsgálatoknál kontrasztanyagként használt Gd^{3+} komplexekkel hoznak kapcsolatba. A súlyos vesebetegek Gd^{3+} tartalmú kontrasztanyaggal (főként $Gd(DTPA-BMA)$ -val) végzett MRI vizsgálata után kisebb részük (közelítőleg 5%) állapota romlott, mozgásképtelenné váltak és többen elhunytak. Eddig kb. 250 NSF-es esetet írtak le. A betegek és elhunytak különböző szerveiben Gd -ot mutattak ki és feltételezik, hogy az a kontrasztanyag disszociációjából származik. A betegség pontos oka, kialakulása még nem ismert, de a különböző klinikai esetek ismertetése óta a Gd^{3+} komplexek fizikai-kémiai vizsgálata iránti érdeklődése jelentősen nőtt. Ezek az események az elmúlt 2 – 3 év során komolyan befolyásolták érdeklődésünket és igyekeztünk kísérleti munkánkat a fizioiógias feltételekhez közeli körülmények mellett végezni. Ennek következtében bár a pályázatban tervezett munkának szinte valamennyi részével foglalkoztunk, de a hangsúlyok az érdeklődés változásával módosultak. Így pl. a nemkovalens kölcsönhatások szerepének vizsgálatával kapcsolatban végzett munka a tervezettnél kisebb volumenű, amiben az is szerepet játszott, hogy a kapott eredmények nem voltak eléggé biztatóak. Ugyanakkor vizsgálatainkat kiterjesztettük a vérszérumban történő reakciók tanulmányozására, a szérum összetevőinek a Gd^{3+} -komplexek disszociációja sebességére gyakorolt hatásának, a szérumfehérjék szerepének a vizsgálatára. Ezen a területen érdekes (és váratlan) új

eredményeket értünk el, amelyek publikálásához még további 3-4 hónap kísérleti munka szükséges.

1. A nemkovalens kölcsönhatások szerepe a Gd^{3+} komplexek viselkedésében

A különböző Gd^{3+} alapú MRI kontrasztanyagok és potenciális kontrasztanyagok fizikai-kémiai tulajdonságainak megismeréséhez szükséges a Gd^{3+} komplexek és a biológiai körülmények mellett a Gd^{3+} -ionnal esetleg kompetícióba lépő Zn^{2+} és Cu^{2+} komplexek stabilitási állandóinak ($\log K_{ML}$) a megállapítása. A stabilitási állandók meghatározása többnyire a koordinációs kémia igényeinek megfelelően 0,1 M Me_4NCl vagy KCl oldatban, állandó ionerősség mellett történt. A biológiai feltételekhez történő közelítés céljából a meghatározásokat a DTPA, a BOPTA és DTPA-BMA esetében elvégeztük fiziológiás, 0,15 M $NaCl$ oldatban ($25^\circ C$). A Gd^{3+} , Zn^{2+} és Cu^{2+} komplexek $\log K_{ML}$ értékei kb. 0,4 – 1,0 $\log K$ egységgel kisebbek, mint a KCl -dal vagy Me_4NCl -dal biztosított állandó ionerősség esetében.¹ Az azonos feltételek mellett kapott stabilitási állandókat használva a ligandumok gadoliniumra vonatkoztatott szelektivitása ($\log K_{GdL} - \log K_{ML}$) mind a Zn^{2+} -, mind a Cu^{2+} -ionnal szemben a $BOPTA > DTPA > DTPA-BMA$ sorrendben csökken¹, ami épp ellentétes az irodalomban korábban közölt sorrenddel.²

A Gd^{3+} komplexek relaxivitása (a paramágneses fémkomplex koncentrációjának 1,0 mM-os növelésekor a vízprotonok relaxációsebességében mérhető növekedés, $r_{1,2} = 1/T_{1,2}$) humán szérumalbumin (HSA) vagy bovine szérum albumin (BSA) jelenlétében nagyobb, mint 0,15 M $NaCl$ oldatban. A relaxitás különbségek különösen nagyok a hidrofób benzil csoportot tartalmazó $Gd(BOPTA)^{2-}$ vagy $Gd(DTPA-bBzA)$ esetében. A relaxitás növekedésben szerepe lehet a Gd^{3+} komplexek és a HSA illetve BSA közötti elektrosztatikus és nemkovalens kölcsönhatásnak. A fehérjék protonálható aminosav nitrogénjei fiziológiás pH-n nagyrészt protonálva vannak. Az elektrosztatikus kölcsönhatás mértékének a vizsgálatára pH-potenciometriás titrálásokat végeztünk BSA-val $Gd(DTPA)^{2-}$ illetve $Gd(BOPTA)^{2-}$ jelenlétében és távollétében. A BSA titrálási görbéi (pH=4 – 9) a komplexek jelenlétében és távollétében teljesen azonosak, vagyis a BSA deprotonálódása azonos mértékű, tehát az elektrosztatikus kölcsönhatásnak nincs szerepe a fehérje – Gd^{3+} komplex kölcsönhatásban.

A nem-kovalens kölcsönhatás modellezésére a β -ciklodextrin és a benzilcsoportot tartalmazó komplexek között fellépő kölcsönhatást használtuk. A β -ciklodextrin henger alakú, hidrofób üreget tartalmazó molekula, melybe az ugyancsak hidrofób benzil csoport beléphet és a „gazda-vendég” kölcsönhatás révén egy adduktum képződik, melynek relaxivitása nagyobb, mivel az adduktum a komplexnél lassabban mozog és így nő a komplex u.n. rotációs korrelációs ideje.

A Gd^{3+} komplexek és a β -ciklodextrin közötti kölcsönhatás befolyásolja a komplexek stabilitási állandóját és kinetikai viselkedését is. A $Gd(BOPTA)^{2-}$ stabilitási állandója kicsit nagyobb ötszörös β -ciklodextrin felesleg jelenlétében, míg a két benzil csoportot tartalmazó $Gd(DTPA-bBzA)$ esetében a $\log K_{GdL}$ érték növekedése 1,0 $\log K$ egység. A stabilitási állandók értékében β -ciklodextrin jelenlétében bekövetkező növekedés (amikor pl. a $Gd(DTPA-bBzA)$ kb. 50%-a lép „gazda-vendég” kölcsönhatásba), tehát nem jelentős, vagyis a komplexek nem-kovalens kölcsönhatása lényegesen nem befolyásolja (kis mértékben növeli) a stabilitási állandók értékét.

A $Gd(DTPA-bBzA)$ és a Cu^{2+} -citrát közötti fémcsere reakciók sebessége spektrofotometriás vizsgálataink szerint β -ciklodextrin jelenlétében kisebb, mint annak távollétében, de a hatás nem növeli jelentékenyen a Gd^{3+} komplex kinetikai inertségét.

2. A gadolinium komplexek és a trietilén-tetramin-hexaacetát közötti ligandumcsere reakciók kinetikája.⁵

A diagnosztikai vizsgálatokban MRI kontrasztanyagként használt $Gd(DTPA)^{2-}$, $Gd(BOPTA)^{2-}$ és $Gd(DTPA-BMA)$ komplexeket (GdL) intravénásan juttatják a szervezetbe, melyek az extracelluláris térben eloszolva a vesén keresztül ürülnek kb. 1,5 órás felezési idővel (a $Gd(BOPTA)^{2-}$ 5%-a a májon keresztül ürül). Az alkalmazás feltétele, hogy a komplexek disszociációja annyira lassú legyen, hogy a kiürülés közben szabad Gd^{3+} ne keletkezzen. A komplexek kinetikai inertségét korábban a Zn^{2+} és Cu^{2+} ionokkal lejátszódó kicserélődési reakciók sebességével jellemeztük^{3,4} (A Zn^{2+} és Cu^{2+} nagyon kis koncentrációban jelen van a testfolyadékokban). A Gd^{3+} komplexek disszociációja elvben a szervezetben található ligandumok hatására is bekövetkezhet (fehérjék pl. transferrin), ezért modell reakcióként tanulmányoztuk a komplexek és a TTHA közötti ligandumcsere reakciók kinetikáját a pH=6,5 – 11 tartományban. A reakciók sebessége TTHA felesleg jelenlétében egyenesen arányos a TTHA teljes koncentrációjával, így a k_p pszeudo-első rendű sebességi állandók $k_p=k_0+k_1[TTHA]$ összefüggéssel adhatók meg. A GdL komplexek spontán disszociációja (k_0) elhanyagolhatóan lassú. A k_p értékek és a $[TTHA]$ közötti lineáris kapcsolat azt jelzi, hogy a reakciók a GdL komplexek és a TTHA közvetlen találkozásával, vegyes ligandumu közti termékek képződésén keresztül, az L ligandum donoratomjainak fokozatos kiszorításával játszódnak le. A $Gd(DTPA)^{2-}$ és $Gd(BOPTA)^{2-}$ k_1 értékei a pH függvényében minimum görbe szerint változnak, a minimum pH=8,5 körül van. A $Gd(DTPA-BMA)$ ligandumcsere reakciói sebessége (k_1) 2 - 3 nagyságrenddel nagyobb, mint a $Gd(DTPA)^{2-}$ és $Gd(BOPTA)^{2-}$

komplexeké és a pH növekedésével a k_1 értékek fokozatosan nőnek. A pH növekedésével nő a kevésbé protonált H_1TTHA részecskék koncentrációja, melyek a GdL támadásában eredményesebbek. A $Gd(DTPA)^{2-}$ és $Gd(BOPTA)^{2-}$ reakciói esetében a k_1 értékek pH=6,5 – 8,5 közötti csökkenését azzal magyaráztuk, hogy a reakció gyorsabban mehet végbe, ha a vegyesligandumú köztitermékben a támadó H_1TTHA -ról egy proton átkerül a koordinált DTPA vagy BOPTA ligandumra, vagyis érvényesül az általános savkatalízis.⁵

A H_1TTHA részecskék GdL komplexeken történő támadásának eredményessége a koordinált L ligandum intramolekuláris mozgásának sebességétől függ, ami szabad koordinációs helyek átmeneti megjelenését eredményezi. Az intramolekuláris átalakulás sebessége NMR vizsgálatok szerint gyorsabb a $Ln(DTPA-BMA)$ komplexekben, mivel az amid O-Gd kötés gyengébb az acetát O-Gd kötésnél. A koordinált ligandumok intramolekuláris átalakulásainak sebessége NMR vizsgálataink szerint ligandum felesleg jelenlétében is nagyobb ($La(DTPA-BMA) - DTPA-BMA$ és $Eu(DTPA) - DTPA$ rendszerek), így várhatóan a TTHA jelenlétében is nagyobb. Az intramolekuláris átalakulások sebességének a DTPA-BMA komplexekben más ligandumok jelenlétében tapasztalt nagyobb mértékű növekedése eredményezi a $Gd(DTPA-BMA)$ kisebb kinetikai inertségét.

A testfolyadékokban jelenlévő citrát, foszfát és karbonát ligandumok a GdL komplexek és a TTHA közötti ligandumcsere reakciók sebességének növekedését eredményezik. A hatás a $Gd(DTPA-BMA)$ esetében a legnagyobb. Fiziológiás feltételek mellett gyakorlatilag csak a karbonát ionok sebesség növelő hatása érvényesül, mivel a karbonát koncentráció aránylag nagy. Az NMR vizsgálataink szerint a citrát, foszfát és karbonát ionok ugyancsak megnövelik a koordinált L ligandumok intramolekuláris átalakulásának sebességét, ami a ligandumcsere reakciók sebességének növekedését eredményezi.

3. A $Gd(DTPA)^{2-}$, $Gd(BOPTA)^{2-}$ és $Gd(DTPA-BMA)$ komplexek és a Zn^{2+} és Cu^{2+} közötti fémcsere reakciók kinetikája citrát, foszfát, karbonát és hisztidinát jelenlétében.

A $Gd(DTPA)^{2-}$, $Gd(BOPTA)^{2-}$ és $Gd(DTPA-BMA)$ komplexek és a Zn^{2+} - valamint Cu^{2+} -ionok közötti fémioncsere reakciók 1,0 M KCl oldatban 4 – 6 pH tartományban döntően a fémionok közvetlen támadásával folynak le. A cserereakciók sebessége a három komplex esetében „tisztá”rendszerekben közelítőleg azonos.

Az endogén citrát, foszfát, karbonát és hisztidinát ionok jelenléte jelentékenyen módosítja a cserereakciók sebességét és lefolyását. A foszfát, karbonát és hisztidinát hatásának vizsgálatát citrát jelenlétében végeztük, mivel a Gd^{3+} - citrát aránylag nagy

stabilitása elősegítette a reakciók lefolyását és a Gd^{3+} oldatban tartását. A GdL és a Cu^{2+} komplexek közötti reakciókat spektrofotometriás, a Zn^{2+} komplexekkel végbemenő reakciókat relaxometriás módszerrel követtük. A részletes kinetikai vizsgálatok alapján megállapítottuk azokat a reakcióutakat, melyeken a fémioncsere reakciók lefolynak. A vizsgált (és a valódi biológiai) rendszerekben a szabad Zn^{2+} vagy Cu^{2+} ionok koncentrációja rendkívül kicsi, de a Cu^{2+} -hisztidinát, vagy Zn^{2+} -citrát komplexeknek sincs közvetlen szerepe a reakciók lefolyásában. A szabaddá váló DTPA, BOPTA vagy DTPA-BMA ligandumok a Cu^{2+} illetve Zn^{2+} -vel képeznek komplexet, míg a Gd^{3+} Gd^{3+} -citrát formában van jelen.

A fémioncsere reakciók a GdL komplexek disszociációjával mennek végbe, melyben a spontán disszociációnak rendkívül kicsi, de a proton katalizált disszociációnak is kicsi a szerepe. Fiziológiai pH-n gyakorlatilag a hisztidinnek sincs hatása. Jelentősen növelik a GdL komplexek disszociáció sebességét a protonált $HCit^-$, HCO_3^- és $H_2PO_4^-$ ligandumok. Kisebb vagy elhanyagolható a disszociáció sebességét növelő hatása a deprotonált ligandumoknak (Cit^{3-} , CO_3^{2-} és HPO_4^{2-}). Ilyen tapasztalatok alapján azt kell feltételeznünk, hogy az endogén ligandumok hatása a képződő vegyes ligandumú köztitermékekben a koordinált L ligandumra történő protonátvitellel kapcsolatos.

Az endogén ligandumok jelenlétében a $Gd(DTPA)^{2-}$ és $Gd(BOPTA)^{2-}$ fémioncsere reakciói valamivel lassabban folynak le, mint az endogén ligandumok távollétében. Ugyanakkor a $Gd(DTPA-BMA)$ komplex reakciói az endogén ligandumok hatására 1 – 2 nagyságrenddel nagyobb sebességgel mennek végbe, mint „tisztán” (1,0 M KCl) rendszerekben. Ezek az eredmények jelzik, hogy a $Gd(DTPA-BMA)$ disszociációja biológiai rendszerekben is gyorsabban játszódik le, ami magyarázhatja, hogy az NSF gyakrabban fordul elő a $Gd(DTPA-BMA)$ (Omniscan) kontrasztanyagként való alkalmazásakor.

4. A BCAED és BCAEP ligandumok komplexképző sajátosságai⁶

A lantanida(III)-ionok többfunkciós, flexibilis ligandumokkal képződő komplexeinek stabilitási állandói a rendszám növekedésével általában nőnek. Két etiliminodiacetát csoportnak az 1,4-diazepán illetve, piperazin ciklusos diaminokhoz történő kapcsolásával előállított H_4BCAED és H_4BCAEP ligandum esetében a $\log K_{LnL}$ értékek növekedése a La^{3+} -tól a Lu^{3+} -ig 8,22 és 5,66 $\log K$ egység. Így a BCAED ligandum az eddig ismert ligandumok közül a legnagyobb szelektivitást mutatja a nehéz lantanidákra. A relaxivitás mérések, de röntgendiffrakciós vizsgálatok alapján is – a $Gd(BCAED)^-$ illetve $Gd(BCAEP)^-$ komplexek a belső koordinációs szférában nem tartalmaznak vízmolekulát, ami azt jelzi, hogy a ligandumok egy merev koordinációs „kalitkát” alakítanak ki, melyben a legkedvezőbb „méret

megfelelés” a Lu^{3+} -ion esetében jön létre. A Lu^{3+} komplexekben koordinált BCAED ligandum merev szerkezetét ^{13}C - and ^1H -NMR-es mérések is igazolták.

5. A nyíltláncú EDTMP és makrociklusos DO2A2P ligandumok komplexképző sajátosságai

Az EDTA analóg, négy metilénfoszfónát csoportot tartalmazó EDTMP ligandum ^{153}Sm és ^{166}Ho radioaktív izotópokkal képződő komplexeit csontáttétes daganatos betegek fájdalmainak csökkentésére használják. A $\text{Sm}(\text{EDTMP})^{5-}$ és $\text{Ho}(\text{EDTMP})^{5-}$ komplexek stabilitási állandóira az irodalomban rendkívül eltérő értékeket közöltek. pH-potenciometriás módszerrel meghatároztuk a $\text{Cu}(\text{EDTMP})^{6-}$ és $\text{Ca}(\text{EDTMP})^{6-}$ komplexek stabilitási állandóit, majd Cu^{2+} -ionokkal kompetíciós reakcióban spektrofotometriás módszerrel a $\text{Sm}(\text{EDTMP})^{5-}$ és $\text{Ho}(\text{EDTMP})^{5-}$ $\log K_{LnL}$ értékeit. Stopped-flow módszerrel vizsgáltuk a $\text{Sm}(\text{EDTMP})^{5-}$ és $\text{Ho}(\text{EDTMP})^{5-}$ komplexek és a Cu^{2+} -citrát közötti fémcsere reakciók kinetikáját a pH 7 – 9 tartományban. A cserereakciók a komplexek protonkatalizált disszociációját követően aránylag gyorsan folynak le (a protonált komplexek nagy koncentrációban vannak jelen), így a csontokba valószínűleg nem az intakt komplexek, hanem a disszociált szabad ligandum és a fémionok épülnek be.⁷

Tanulmányoztuk a ciklén alapú két – két transz-helyzetű acetát és metilénfoszfónát funkciós csoportot tartalmazó $\text{H}_6\text{DO2A2P}$ ligandum komplexképző sajátosságait. A Ca^{2+} , Cu^{2+} és Zn^{2+} komplexek stabilitási állandóit pH-potenciometriás titrálással, míg a Ln^{3+} -komplexekét a lassú képződés miatt külön-mintás pH-potenciometriás módon határoztuk meg. A $\text{Ln}(\text{DO2A2P})^{3-}$ komplexek stabilitási állandói nagyobbak a DOTA, de kisebbek a DOTP komplexekénél. Relaxometriás és ^{17}O -NMR-es vizsgálataink szerint a $\text{Gd}(\text{DO2A2P})^{3-}$ belső koordinációs szférájában nincs vízmolekula. A Ln^{3+} -komplexek képződése lassú és egy kétszerprotonált stabilis köztitermék képződésével, annak OH^- -katalizált átalakulásával, illetve spontán módon, egy protonnak a nitrogén atomról egy foszfónát csoportra történő átvitelével mehet végbe. A komplexképződés sebességének sorrendje $\text{DOTA} > \text{DO2A2P} > \text{DOTP}$. A Ln^{3+} -komplexek protonkatalizált disszociációjának sorrendje fordított: $\text{DOTP} > \text{DO2A2P} > \text{DOTA}$. ^{13}C - és ^1H -NMR spektroszkópiával az $\text{Eu}(\text{DO2A2P})$ esetében egy négyzetes antiprizmás és egy torzult-négyzetes antiprizmás izomer jelenlétét mutattuk ki. Az izomerek átalakulásának aktiválási energiája kisebb, mint az $\text{Eu}(\text{DOTP})$ esetében.⁸

Irodalomjegyzék

- ¹ Zs. Baranyai, Z. Pálinkás, F. Uggeri, E. Brücher; *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2010**, 1948–1956.
- ² W. P. Cacheris, S. C. Quay, S. M. Rocklage, *Magn. Reson. Imaging*, **1990**, 8, 467.
- ³ L. Sarka, L. Burai, E. Brücher, *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 719.
- ⁴ L. Sarka, L. Burai, R. Király, L. Zékány, E. Brücher, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 21, 320.
- ⁵ Z. Pálinkás, Zs. Baranyai, E. Brücher, B. Rózsa, *Inorg. Chem.*, (közlésre beküldve, kisebb módosításokat javasoló bírálatok után)
- ⁶ L. Tei, Zs. Baranyai, E. Brücher, C. Cassino, F. Demicheli, N. Masciocchi, G. B. Giovenzana, M. Botta; *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 616–625.
- ⁷ F. K. Kálmán, R. Király, E. Brücher, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 4719 – 4727.
- ⁸ F. K. Kálmán, Zs. Baranyai, I. Tóth, I. Bányai, R. Király, E. Brücher, S. Aime, X. Sun, A.D. Sherry, Z. Kovács; *Inorg. Chem.*, **2008**, 47, 3851-3862.

A ligandumok szerkezeti képletei:

