

**ŚRODKI KONTRASTOWE DO OBRAZOWANIA
MAGNETYCZNO-REZONANSOWEGO NA
PRZYKŁADZIE ZWIĄZKÓW KOMPLEKSOWYCH
ŻELAZA**

MAGNETIC RESONANCE IMAGING CONTRAST
AGENTS EXEMPLIFIED BY IRON COMPLEXES

Nikodem Kuźnik*, Marzena Wyskocka

*Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny,
Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii,
ul. B. Krzywoustego 4, 44-100 Gliwice
e-mail: Nikodem.Kuznik@polsl.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Krótki rys historyczny
2. Podział środków kontrastowych
3. Mechanizm działania środków kontrastowych
4. Projektowanie środków kontrastowych
5. Środki kontrastowe T_1 oparte na związkach kompleksowych żelaza
 - 5.1. Związki kompleksowe żelaza(III)
 - 5.2. Związki kompleksowe żelaza(II)

Uwagi końcowe

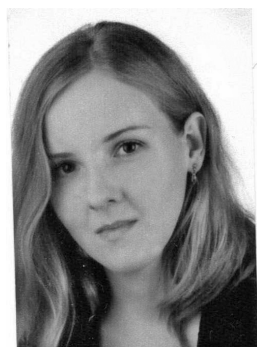
Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane



Dr inż. Nikodem Kuźnik urodził się w Rybniku w 1977 roku. Dyplom magistra inżyniera (2001), a następnie doktora (2005) uzyskał na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej. Przed uzyskaniem stopnia odbył 3-miesięczne praktyki na Uniwersytecie Yale (USA) oraz Uniwersytecie w Lund (Szwecja), natomiast w latach 2007-2008 wyjechał na staż podoktorski do Ecole Normale Supérieure w Lyonie (Francja). Obecnie jest adiunktem na swojej macierzystej uczelni. Jego zainteresowania naukowe oscylują wokół syntezy ligandów azotowo-tlenowych, ich chemii koordynacyjnej, a przede wszystkim

ich zastosowań w rezonansie magnetycznym, rolnictwie i katalizie.



Mgr inż. Marzena Wyskocka urodziła się w Tychach w 1988 roku. Dyplom inżyniera (2011) a następnie magistra (2012) uzyskała na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej na kierunku: Chemia w specjalności: Chemia bioorganiczna.

Obecnie w trakcie studiów doktoranckich rozwija zainteresowania i badania głównie nad syntezą pentadentatnych ligandów amino-fenolanowych oraz syntezą kompleksów z jonami żelaza.

M. Wyskocka jest stypendystą w ramach projektu DoktoRIS – Program stypendialny na rzecz innowacyjnego Śląska współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

ABSTRACT

Nuclear magnetic resonance is already a broadly exploited phenomenon both in chemistry and medicine. Magnetic resonance imaging is a routine technique in medical diagnosis readily applied for soft tissues like brain, cardiovascular system or gastrointestinal tract. Contrast agents stepped into the field and enabled better recognition of a lesion in the early stage of a disease.

The authors present an introductory description of a fascinating history, classification of contrast agents followed by the mechanisms of their action. Classes of positive and negative contrast agents are described. Further discussion is focused on the T_1 (positive) molecular species. The mechanism was divided into (1) inner sphere, where both direct coordination of water molecule and its presence in second sphere is considered (Fig. 1) [1] and (2) an outer sphere mechanism which is assumed for the water molecules diffusing into the surrounding of the paramagnet [21, 28]. Further, the most important requirements for medical applications are given. Those are: high relaxivity, charge-osmolality, stability, toxicity *via* potential transmetallation of redox activity [42]. Molecular examples are quoted based on previously investigated iron complexes. Majority of them are iron(III) species [68], however, some iron(II) compounds like activable, self-immolative or ParaCEST systems have recently appeared [86, 89]. Iron compounds as positive contrast agents may soon accompany classic gadolinium complexes.

Keywords: magnetic resonance imaging, contrast agents, iron, relaxation

Słowa kluczowe: obrazowanie magnetyczno-rezonansowe, środki kontrastowe, żelazo, relaksacja

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

CA	– środek kontrastowy (ang. <i>contrast agent</i>)
CDTA	– kwas 1,2-diaminocykloheksano- <i>N,N,N',N'</i> -tetraoctowy (ang. <i>1,2-cyclohexylenedinitrilotetraacetic acid</i>)
DF	– deferoksamina (ang. <i>desferrioxamine</i>)
DO3A	– 1,4,7-tris(karboksymetylo)-1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekan-10-azaacetyloamid (ang. <i>1,4,7-tris(carboxymethylaza)cyclododecane-10-azaacetylamine</i>)
DOTA	– kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctowy (ang. <i>1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid</i>)
DTPA	– kwas dietylenotriaminopentaoctowy (ang. <i>dietylenotriaminepentacetic acid</i>)
EDTA	– kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EHBG	– kwas <i>N,N'</i> -bis(2-hydroksyfenylometylo)etylenodiamino- <i>N,N'</i> -dioctowy (ang. <i>N,N'</i> -bis(2-hydroxyphenylmethyl)ethylenediamine- <i>N,N'</i> -diacetic acid)
EHPG	– <i>N,N'</i> -etylenobis-[2-(<i>o</i> -hydroksyfenylo)glicyna] (ang. <i>N,N'</i> -ethylenebis[(2-(<i>o</i> -hydroxyphenyl)glycine)])
EOB-DTPA	– kwas (4 <i>S</i>)-4-(4-etoksybenzylo)-3,6,9-tris(karboksymetylo)-3,6,9-triazaundekanowy (ang. (4 <i>S</i>)-4-(4-ethoxybenzyl)-3,6,9-tris(carboxylatomethyl)-3,6,9-triazaundecanoic acid)
FAC	– cytrynian amonu i żelaza(III) (ang. <i>ferric ammonium citrate</i>)
HSA	– surowicza albumina ludzka (ang. <i>human serum albumin</i>)
IDA	– kwas iminodioctowy (ang. <i>iminodiacetic acid</i>)
MRI	– obrazowanie magnetyczno-rezonansowe (ang. <i>magnetic resonance imaging</i>)
NMR	– jądrowy rezonans magnetyczny (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NSF	– nerkopochodne zwłóknienie układowe (ang. <i>nephrogenic systemic fibrosis</i>)
NTA	– kwas nitrylotrioctowy (ang. <i>nitrilotriacetic acid</i>)
ParaCEST	– przeniesienie nasycenia poprzez wymianę chemiczną indukowane działaniem paramagnetyku (ang. <i>paramagnetic chemical exchange saturation transfer</i>)
PBS	– buforowany fizjologiczny roztwór soli (ang. <i>phosphate buffered saline</i>)

PRE	- wzrost relaksacyjności poprzez oddziaływanie środka kontrastowego z makrocząsteczką (ang. <i>proton relaxation enhancement</i>)
RF	- impuls o częstotliwości radiowej wykorzystywany w technice NMR (ang. <i>radio frequency</i>)
T ₁	- czas relaksacji podłużnej lub inaczej czas relaksacji spin-sieć (ang. longitudinal or spin-lattice relaxation time)
T ₂	- czas relaksacji poprzecznej lub inaczej czas relaksacji spin-spin (ang.) transverse or spin-spin relaxation time
TACN	- 1,4,7-triazacyklononan (ang. 1,4,7-triazacyclononane)

WPROWADZENIE

Minęło już ponad pół wieku od odkrycia przez Blocha i Purcella zjawiska rezonansu jądrowego. Od tamtego czasu metody wykorzystujące to zjawisko zyskały ugruntowaną pozycję zarówno w badaniach chemicznych, w badaniach z pogranicza biologii molekularnej, jak i w diagnostyce medycznej. Obrazowanie magnetyczno-rezonansowe (MRI) jest obecnie klasyczną techniką stosowaną w rutynowych badaniach klinicznych. Szczególną zaletą tej techniki jest bez wątpienia bezinwazyjność, gdyż nie stwierdzono dotąd negatywnego działania pola magnetycznego na ciało ludzkie. Dlatego też w uzasadnionych przypadkach wykonuje się takie badania nawet u kobiet w ciąży czy u małych dzieci. Pewna grupa podwyższonego ryzyka dotyczy pacjentów z metalowymi implantami lub z rozrusznikami serca czy innymi elektronicznymi urządzeniami trwale wszczepionymi. Nie mniej jednak komplementarność tej techniki w stosunku do innych, szeroko stosowanych np. tomografii komputerowej, umożliwia ocenę ewentualnych zmian chorobowych w tkankach miękkich, tj. w mózgu, w przewodzie pokarmowym, układzie krwionośnym oraz wybranych stawach. Dodatkowo wysoka rozdzielczość przestrzenna sięgająca 0,1 μm oraz możliwość zastosowania tej techniki nie tylko do oceny stanu zdrowia, ale również do dynamicznego obrazowania układu krwionośnego (angiografia) sprawiły, że spektrometry MRI są coraz bardziej powszechne i stosunkowo łatwo dostępne dla pacjentów [1]. Co więcej, możliwość zastosowania środków kontrastowych CA (zwanych także cieniującymi) rozszerza pole zastosowań, a przede wszystkim umożliwia lepszą diagnostykę już we wczesnych stadiach chorób. Dzisiaj blisko 50% badań obrazowania magnetyczno-rezonansowego przeprowadza się z użyciem środków kontrastowych. Cel ich stosowania jest jeden – zwiększenie kontrastu obrazu badanej tkanki w celu lepszego uwidocznienia zmian chorobowych np. guzów czy przerwanej bariery krew–mózg. Substancje te wykazują jednak różne cechy (np. struktura, ładunek jednostki koordynacyjnej, powinowactwo do określonych obszarów ciała) z uwagi na specyfikę zastosowań. Mechanizm ich działania na poziomie molekularnym i związana z tym budowa tych substancji wpisuje się w trend współczesnych badań. Co więcej, rozwijane obecnie tzw. inteligentne środki kontrastowe (ang. *smart contrast agents*) stanowią kamień milowy w możliwości śledzenia zmian wybranych bodźców *in vivo* [2]. Związki te z grupy tzw. sond molekularnych uaktywnione pod wpływem lokalnych zmian kwasowości [3, 4], stężenia niektórych jonów [5] czy wzmożonej aktywności enzymów [6–8] przekształcane są w formę aktywną, co w efekcie jest uwidocznione w obrazach MRI.

Niniejsza praca przeglądowa przedstawia specyfikę budowy i działania stosowanych i badanych środków kontrastowych w kontekście najważniejszych wymagań stawianych tym substancjom do zastosowań medycznych. Z uwagi na zainteresowania badawcze autorów przedstawiono także przegląd środków – kandydatów, opartych na związkach kompleksowych żelaza. Stanowi to uzupełnienie dostępnej literatury opisującej najczęściej stosowane i najszerzej badane związki gadolinowe. Z drugiej strony negatywne środki kontrastowe, a więc nanocząsteczki żelaza wykra-

czają również poza zakres tej pracy. Intencją autorów było także wypełnienie pewnej luki w literaturze polskojęzycznej na temat środków kontrastowych do obrazowania rezonansowo-magnetycznego w ujęciu na poziomie molekularnym. Istnieje szereg solidnych opracowań i podręczników medycznych [9–12] skierowanych do przyszłych radiologów i innych specjalistów z zakresu diagnostyki, natomiast brak jest aktualnej literatury opisującej budowę oraz mechanizm działania tych substancji.

1. KRÓTKI RYS HISTORYCZNY

Intensywne badania środków kontrastowych rozpoczęła pionierska praca Blocha z 1948 roku, w której wykazano, że paramagnetyczny azotan(V) żelaza(III) przyspiesza relaksację wody [13]. Nieco później Bloembergen i Salomon opracowali teorię relaksacji cząsteczek otaczających paramagnetyki [14, 15]. Dzisiaj ich równania, w nieco zmodyfikowanej formie, są stosowane do projektowania nowych środków kontrastowych i analizy ich zachowania. Interesujące, że już w 1961 roku Eisinger, Shulman i Blumberg przewidzieli efekt PRE – zwiększenia efektywności działania środków kontrastowych na skutek związania ich z dużymi białkami (np. DNA) [16]. Przełomowy pomysł Lauterbura zastosowania gradientów pola magnetycznego, umożliwiających rozróżnienie obiektów w przestrzeni, znalazł szybko zastosowanie do tomografii ciała ludzkiego [17]. Niedługo potem Young zastosował paramagnetyczny FeCl_3 do obrazowania układu pokarmowego [18]. Carr wprowadził dożylnie gadolin w postaci $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$, który zagościł trwale w medycynie, gdyż został pierwszym zarejestrowanym CA [19].

2. PODZIAŁ ŚRODKÓW KONTRASTOWYCH

Środki kontrastowe są stosowane w celu zintensyfikowania wybranych elementów obrazu, co umożliwia lepszą analizę, a w konsekwencji dokładniejszą diagnozę medyczną. Środki takie są stosowane zarówno w technikach rentgenowskich, np. w tomografii komputerowej oraz w technikach magnetycznych. Środki do MRI nie są jednak bezpośrednio widoczne na uzyskanych obrazach. Obserwuje się natomiast efekt ich działania poprzez skrócenie czasów relaksacji protonów cząsteczek wody. Dzięki temu możliwe jest zarejestrowanie większej liczby skanów i uzyskanie lepszego stosunku sygnału do szumów. Ponieważ środki kontrastowe przyspieszające czas relaksacji T_1 powodują rozjaśnienie obrazów w miejscach ich kumulacji – grupę tę określa się jako środki pozytywne [20]. Te stosuje się najczęściej i do nich zalicza się zarejestrowane związki gadolinu [21–23] oraz kompleksowe związki żelaza opisane w dalszej części niniejszej pracy. Z drugiej strony środki skracające czas relaksacji poprzecznej T_2 nazywane są środkami negatywnymi z uwagi na zaciemnienie fragmentu obrazu na skutek ich działania. Dominującą grupę wśród nich

stanowią nanocząsteczki żelaza [24, 25]. Osobną pulę stanowią hiperspolaryzowane gazy, tj. ^3He , ^{129}Xe [26], których omówienie wykracza jednak poza zakres tej pracy.

Pierwsze środki kontrastowe oparte na liniowych chelatach DTPA zawierających gadolin, figurujące pod nazwami *Magnevist*[®], *Omniscan*[®], *Dotarem*[®] i *Prohance*[®], jako stosunkowo niskocząsteczkowe kompleksy, nie są specyficzne a półokres ich wydalania przez nerki, wynoszący ok. 100 min [27] pozwala na badania ogólnoustrojowe [28]. Związki te ulegają dystrybucji do płynu zewnątrzkomórkowego i są usuwane na drodze filtracji kłębuszkowej. Ich relatywnie szybkie wydalanie jest niewątpliwie zaletą, uniemożliwia jednak śledzenie przepływu krwi w układzie krwionośnym. Stosowane w angiografii środki cieniujące muszą być związane z krwią bardziej skutecznie w czasie badania. Można to osiągnąć poprzez trzy strategie [29–32]: (1) kowalencyjne związanie z makrocząsteczkami takimi jak polimery, dendrymery lub białka; (2) niekowalencyjne oddziaływania z biomakrocząsteczkami np. z surowiczą albuminą ludzką HSA; (3) stworzenie makrocyclicznych chelatów rzędu kilku kDa. Z drugiej strony wprowadzenie lipofilowych podstawników do szkieletu DTPA zwiększa ich powinowactwo do hepatocytów, umożliwiając diagnostykę zmian chorobowych w wątrobie (preparaty *Multihance*[®] oraz *Eovist*[®]). Osobnym zagadnieniem są związki skutecznie penetrujące barierę krew–mózg [33, 34] oraz przeznaczone do badania układu pokarmowego [35].

Niezwykle interesującą grupę stanowią tzw. „inteligentne środki kontrastowe”, które są aktualnie przedmiotem intensywnie rozwijanych badań [5, 36–38]. Ten nurt idzie w parze z badaniami nad wewnątrzkomórkowymi środkami [39–41]. Wykorzystanie sond molekularnych tego typu umożliwi w niedalekiej przyszłości bezinwazyjne śledzenie *in vivo* istotnych parametrów, których charakterystyczne zmiany są symptomami rodzących się zmian patologicznych danej tkanki czy organu.

3. MECHANIZM DZIAŁANIA ŚRODKÓW KONTRASTOWYCH

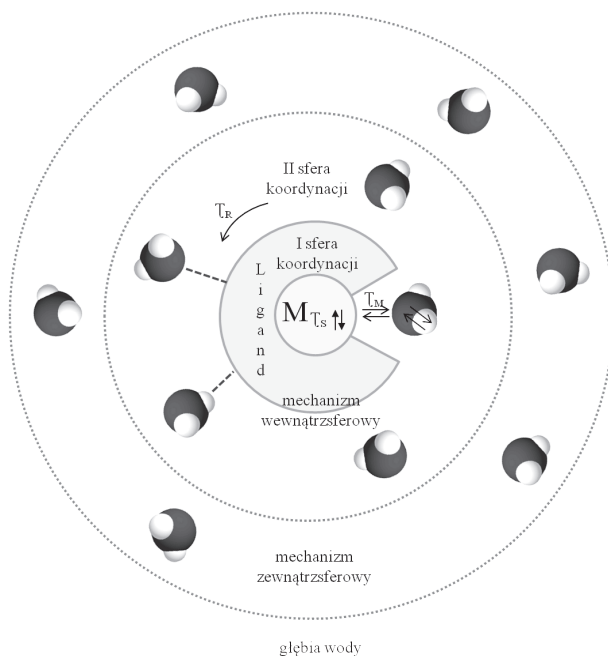
Obrazowanie magnetyczno-rezonansowe opiera się na zjawisku rezonansu magnetycznego atomów wodoru zawartych głównie w cząsteczkach wody, w silnym polu magnetycznym [9]. Obrazy, uzyskiwane w tomografii MRI, mogą być funkcją gęstości protonów lub odpowiednich czasów relaksacji T_1 czy T_2 (tzw. obrazy T_1 lub T_2 -zależne), przy czym obrazy zależne od T_1 są najczęściej rejestrowane. Relaksacja podłużna T_1 odpowiada utracie energii wzbudzonych spinów na drodze dyssypacji boltzmanowskiej, natomiast relaksacja w orientacji poprzecznej T_2 wynika z niejednorodności pola magnetycznego. Podstawą uwidocznienia odpowiednich organów są różne czasy relaksacji zależne w dużej mierze od ruchliwości cząsteczek wody w tych ośrodkach. Wprowadzenie substancji para- lub superparamagnetycznej dodatkowo skraca najczęściej oba czasy relaksacji, choć każdy z różną skutecznością. W przypadku środków kontrastowych używanych do obrazów T_1 zależnych, paramagnetyki pełnią rolę bardzo efektywnego akceptora energii poprzez niezwykle szybką relaksację swoich spinów elektronowych. Mogą to czynić z różną sku-

tecznością. Aby zwymiarować efektywność przyspieszania odpowiednich relaksacji poprzez działanie środków kontrastowych, wprowadzono pojęcie relaksacyjności¹ r_1 i r_2 (ang. *relaxivity*).

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,diam}} + r_i[M] \quad i = 1,2 \quad (1)$$

Jest to krotność zmniejszenia czasu relaksacji $T_{1,obs}$ lub $T_{2,obs}$ (a więc odpowiednio r_1 lub r_2) dla jednostkowego stężenia paramagnetyku [M]. Przyrost ten dodaje się do czasu relaksacji w ośrodku diamagnetycznym ($T_{i,diam}$). Najczęściej operuje się stężeniami rzędu milimoli, a więc jednostką relaksacyjności jest $\text{dm}^3 \text{mmol}^{-1} \text{s}^{-1}$. Wielkość ta jest ponadto zależna od wielkości pola magnetycznego i od temperatury. Dla stosowanych obecnie związków r_1 mieści się w granicach $4\text{--}10 \text{dm}^3 \text{mmol}^{-1} \text{s}^{-1}$ [22].

Opis teoretyczny mechanizmu bezpośredniego wpływu substancji paramagnetycznej na relaksację protonów cząsteczki wody został podzielony na dwa poziomy (Rys. 1) [1, 42].



Rysunek 1. Mechanizm działania paramagnetyków jako substancji zmieniających czas relaksacji atomów wodoru cząsteczki wody

Figure 1. The mechanism of paramagnetic acceleration of aqueous proton relaxation

1 W skromnej literaturze polskojęzycznej omawiającej ten temat stosuje się także określenie „relaksatywność”

Mechanizm wewnątrzsferowy dotyczy zarówno możliwości bezpośredniej koordynacji cząsteczki wody przez atom centralny, czyli pierwszej sfery koordynacji, ale także drugiej sfery. W tym drugim przypadku cząsteczki wody mogą oddziaływać z ligandem tworząc między innymi wiązania wodorowe czy słabsze oddziaływania poprzez elektrony π liganda. Natomiast mechanizm zewnątrzsferowy oparty jest na dyfuzji cząsteczek wody w pobliże substancji paramagnetycznej. W ten sposób liczne cząsteczki wody „czują” pole magnetyczne paramagnetyku, lecz nie tworzą z nim żadnych wiązań chemicznych.

MECHANIZM WEWNĄTRZSFEROWY

Uproszczając teorię Salomona-Bloembergena-Morgana opisującą mechanizm wewnątrzsferowy, relaksacyjność r_1 dla niskocząsteczkowych związków kompleksowych można wyrazić równaniem 2 [33, 43].

$$r_1 = C_q \mu_{eff}^2 \tau_c r^{-6} \quad (2)$$

Wiąże ono relaksacyjność r_1 z liczbą cząsteczek wody w wewnętrznej sferze koordynacyjnej q , efektywnym momentem magnetycznym μ_{eff} czasem korelacyjnym τ_c oraz promieniem – odległością pomiędzy atomem paramagnetycznym a atomem wodoru cząsteczki wody r , C jest pewną stałą. Największy udział w równaniu 2 ma moment magnetyczny, dlatego też do zastosowań w rezonansie magnetycznym wybiera się jony o silnych właściwościach magnetycznych oraz o maksymalnej możliwej liczbie niesparowanych elektronów (stany wysokospinowe). Do tej grupy zalicza się przede wszystkim jony Gd(III), Fe(III) i Mn(II) oraz wybrane, inne lantanowce. Drugim istotnym czynnikiem jest liczba bezpośrednio skoordynowanych cząsteczek wody w pierwszej sferze koordynacyjnej. Dla gadolinu jest to jedna, rzadziej dwie cząsteczki wody. Dla paramagnetyków, które nie wiążą bezpośrednio cząsteczek wody, tj. większości kompleksów żelaza i manganu, bierze się pod uwagę większą liczbę cząsteczek wody skoordynowanych w drugiej sferze koordynacyjnej, jednak ich odległość r od paramagnetycznego jonu jest znacznie większa. Jedną ze strategii, która dominuje w obecnych badaniach nad środkami kontrastowymi, jest zwiększenie czasu korelacji τ_c . Jest on zależny od czasu relaksacji spinów elektronowych paramagnetyku τ_s , czasu przebywania cząsteczek wody w sferze wewnętrznej τ_M oraz czasu rotacji cząsteczki τ_R – Równanie 3.

$$\frac{1}{\tau_T} = \frac{1}{\tau_S} + \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{\tau_R} \quad (3)$$

Stwierdzono, że optymalny czas relaksacji elektronów τ_s odpowiada odwrotności częstotliwości precesji larmorowskiej protonu, która z kolei zależy od natężenia zewnętrznego pola magnetycznego. Dla stosowanych spektrometrów wartość ta

powinna być rzędu nanosekund. Czas τ_s charakteryzuje przede wszystkim rodzaj atomu centralnego i można go w niewielkim zakresie modyfikować poprzez dobór odpowiedniej symetrii jednostki koordynacyjnej, jak i rodzaj ligandów. Dla najpopularniejszych kompleksów gadolinu czas ten jest krótszy od oczekiwanego, tj. około 0,1 ns, a dla jonów żelaza jest on jeszcze krótszy i mieści się w przedziale 0,1–0,001 ns. Czas przebywania cząsteczek wody w sferze koordynacyjnej obejmuje zarówno całą jej cząsteczkę, jak i możliwość dysocjacji samego protonu ze skoordynowanej cząsteczki wody. Stwierdzono jednak, że ten drugi czynnik jest mniej istotny w ogólnym ujęciu, dlatego najczęściej analizuje się czas wymiany kompletnej cząsteczki ze znakowanym atomem tlenu $H_2^{17}O$. Czas ten mieści się w szerokim zakresie 1– 10^4 ns [42]. Dla typowych związków gadolinu stosowanych w rezonansie magnetycznym jest on na poziomie nanosekund, podczas gdy dla akwajonów żelaza z klasycznymi chelatami – ok. 10^3 ns. W ciągu ostatniej dekady najwięcej uwagi skupiono jednak na ograniczeniu ruchliwości cząsteczek substancji kontrastowych, wpływając w znaczny sposób na czas rotacji τ_R . Pierwotnie wprowadzano rozbudowane, przestrzenne grupy węglowe, następnie wiązano szkielet chelatu paramagnetyku z makrocząsteczkami na sposób kowalencyjny, wreszcie zaprojektowano cząsteczki ligandów o dużym powinowactwie do białek jak np. HSA. Pojawiły się także pomysły zbudowania dendrymerycznych substancji lub wtopienia ich w różne nanocząstki [44]. W rezultacie osiągnięto spektakularne wartości relaksacyjności r_1 dochodzące do $50 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [28].

MECHANIZM ZEWNĄTRZSFEROWY

Skalarne oddziaływanie cząsteczek wody z centrum paramagnetycznym, poprzez dyfuzję w jego sąsiedztwo, określane jest jako mechanizm zewnątrzsferyowy. Odpowiada on za ok. 40% całkowitego przyspieszenia relaksacji protonów wody. Z jednej strony duża liczba cząsteczek wody ma możliwość znalezienia się w polu magnetycznym paramagnetyku poprzez tę dyfuzję. Z drugiej jednak strony zasięg tego pola jest stosunkowo niewielki. Nie wnikając szczegółowo w matematyczny opis [1, 45], czynnik relaksacyjności pochodzący od mechanizmu zewnątrzsferyowego jest w głównej mierze zależny od współczynnika dyfuzji ośrodka oraz odległości dyfundującej cząsteczki od atomu centralnego. W przypadku zastosowań biologicznych żaden z tych czynników nie może być praktycznie wzmagany zmianami w strukturze chelatu. Dlatego też główna uwaga jest jednak skupiona na polepszaniu relaksacji na poziomie wewnątrzsferyowym.

4. PROJEKTOWANIE ŚRODKÓW KONTRASTOWYCH

Substancje, które mają służyć jako środki kontrastowe, a więc mają zostać podane pacjentowi, muszą spełniać szereg wymagań. Do tych najbardziej trywialnych należy wysoka relaksacyjność, możliwa specyficzność do wybranych komórek badanego organu oraz dobra rozpuszczalność w płynach ustrojowych. Można postawić sobie pytanie: dlaczego nie stosuje się wolnych, nieskompleksowanych jonów paramagnetycznych Gd^{3+} , Fe^{3+} czy Mn^{2+} . Wynika to ze stosunkowo dużej toksyczności niezwiązanych form tych jonów. Przykładowo, dla szczura dawka letalna oscyluje wokół 1 mmol/kg w zależności od drogi wprowadzenia. Toksyczność wymienionych jonów wynika z możliwości wymiany innych mikroelementów, takich jak cynk lub miedź. Proces ten poważnie zaburza prawidłową fizjologię. Dlatego też podaje się te jony w postaci bardzo trwałych chelatów, aby zminimalizować ich uwalnianie lub ewentualne podstawienie – transmetalację [46, 47]. Co więcej, związanie wprowadzonych jonów metali paramagnetycznych w postaci kompleksów, ogranicza dodatkowo ich aktywność w niepożądanych reakcjach redoks, np. w reakcji typu Fentona z wytworzeniem bardzo aktywnych rodników. Następnie ważnym parametrem związku chemicznego będącego substancją aktywną takiego środka jest jego ładunek. Związki o charakterze jonowym w wyniku dysocjacji tworzą szereg jonów, które mają niebagatelne znaczenie we krwi, w płynie międzykomórkowym, itp. Osmolalność bądź osmolarność to parametr, który opisuje wpływ jonowego charakteru wprowadzonych indywidualów na homeostazę płynów w organizmie z uwzględnieniem zjawiska osmozy. Najbezpieczniejszym rozwiązaniem dla organizmu jest wprowadzenie doń substancji kontrastowej, pozbawionej ładunku. Substancje takie są jednak często słabo rozpuszczalne w wodzie i nie mogą prawidłowo działać *in vivo*. Problem ładunku jednostki koordynacyjnej jest również istotny z tego względu, że naładowane dodatnio jednostki mogą uczestniczyć w niepożądanych procesach wewnątrzustrojowych. Znane są prace, w których wykazano, że kompleksy kationowe, jako kwasy Lewisa, są w stanie rozcinać wiązania peptydowe białek a nawet DNA i RNA [48–53]. Z tych względów współcześnie dąży się do otrzymania skutecznych środków, zawierających ładunek ujemny w jednostce koordynacyjnej lub cząsteczek obojętnych.

5. ŚRODKI KONTRASTOWE T_1 OPARTE NA ZWIĄZKACH KOMPLEKSOWYCH ŻELAZA

Na obecnym etapie rozwoju środków kontrastowych stosowanych w diagnostyce medycznej, z wykorzystaniem obrazowania magnetyczno-rezonansowego, bezsprzecznie dominują związki gadolinu. Jest to podyktowane wyjątkowo sprzyjającymi właściwościami tych jonów, tj. siedmioma niesparowanymi elektronami, co w rezultacie prowadzi do dużego momentu magnetycznego oraz odpowiednim czasem relaksacji elektronów tego pierwiastka. Nie bez znaczenia jest liczba koordy-

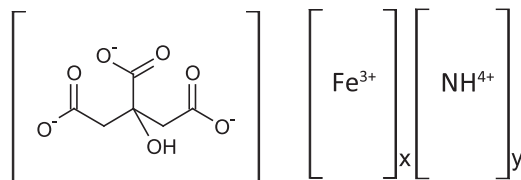
nacyjna gadolinu 8–9, która umożliwi tworzenie bardzo trwałych i funkcjonalnych kompleksów. Z drugiej jednak strony jest to pierwiastek całkowicie obcy organizmom żywym o nieznannej i nieprzewidywalnej fizjologii. Już teraz obserwuje się, że w przypadku dysfunkcji nerek, gadolinowe środki kontrastowe są znacznie wolniej wydalane i rodzą duże zagrożenie rozwinienia się nerkopochodnego włóknienia układowego (NSF) [54, 55]. Niepokoi także dalszy los tych związków w środowisku [56]. Ich wysoka cena, z uwagi na bardzo małe rozpowszechnienie gadolinu w przyrodzie, rodzi zainteresowanie alternatywnymi związkami. Z wyżej wymienionych względów podjęto poszukiwania chelatów opartych na endogennych pierwiastkach takich jak mangan i żelazo [57, 58]. Ich dobrze poznana fizjologia umożliwia przewidywanie zachowania się w organizmie, a nawet więcej – celowanie ich zastosowań w określone obszary ich naturalnej aktywności [57, 59]. Zwięzły przegląd wybranych klas związków koordynacyjnych żelaza pod kątem możliwości ich zastosowania w obrazowaniu rezonansowo-magnetycznym przedstawiono poniżej.

5.1. ZWIĄZKI KOMPLEKSOWE ŻELAZA(III)

Obecnie w diagnostyce medycznej jako środek kontrastowy do MRI wykorzystywany jest tylko jeden związek oparty na żelazie(III). Jednak grupa ta jest przedmiotem wielu badań. W tym rozdziale przedstawiono główne grupy ligandów opisywane w literaturze i wykorzystywane do syntezy kontrastów żelaza(III).

Cytrynian amonu i żelaza(III)

Stosowanym środkiem kontrastowym opartym na paramagnetycznym żelazie jest cytrynian amonu i żelaza(III) – FAC o wartości $r_1 = 1,6 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Rys. 2).



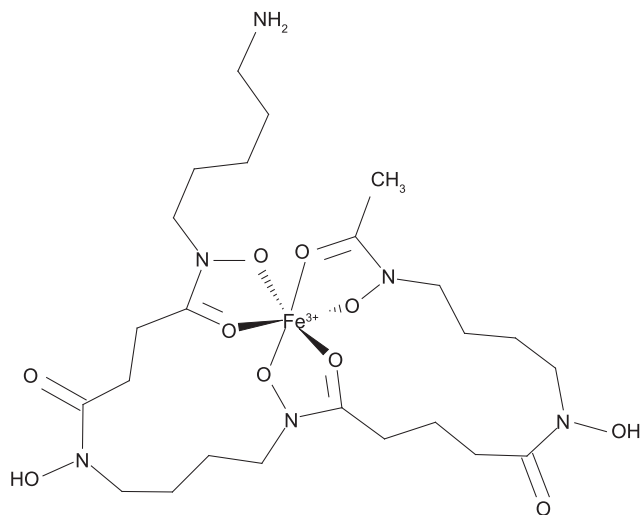
Rysunek 2. Cytrynian amonu i żelaza(III)-FAC

Figure 2. Ferric ammonium citrate – FAC

Jest to doustnie podawany preparat, wykorzystywany w obrazowaniu układu pokarmowego, głównie górnego odcinka przewodu pokarmowego i jelita grubego. Dostępny jest pod handlową nazwą *FerriSaltz*[®] lub *Gritol*[®] [60]. Pasta FAC-celuloza wykorzystywana jest do obrazowania przełyku [61]. Doustne środki kontrastowe działające w przewodzie pokarmowym klasyfikuje się według tego, czy zwiększają one sygnał światła jelita (pozytywne środki kontrastowe) czy zmniejszają intensywność.

ność sygnału znajdując się w świetle jelita (negatywne środki kontrastowe). Cytrynian amonu żelaza(III) jest pozytywnym środkiem kontrastowym, który zmniejsza czas relaksacji T_1 , a tym samym zwiększa selektywnie intensywność sygnału. Na obrazach T_1 -zależnych (hiperintensywnych) umożliwia to rozróżnienie prawidłowych struktur wewnątrz jamy brzusznej od nieprawidłowych zmian patologicznych, które w większości wykazują niskie intensywności sygnału. Problemy związane z magnetycznym rezonansem brzucha wynikają z ciągłej perystaltyki jelit. Prowadzi to do powstawania na obrazie zaburzeń (artefaktów), a przez to utrudnia rozróżnienie sygnału zdrowych narządów wewnątrz jamy brzusznej od zmian patologicznych. Bezpieczeństwo stosowania FAC zostało potwierdzone w II i III fazie badań klinicznych, które wykazały jedynie niewielkie działania niepożądane. Ustalono także efektywną dawkę kontrastu. Pacjentom podano FAC w dwóch dawkach po 1200 mg i 2400 mg. Badania dowiodły, że korzystniejsza jest mniejsza dawka, ze względu na lepszy stosunek korzyści do ryzyka. Większa dawka wykazała tendencję do lepszych wyników przetwarzania obrazu, niestety powodując przy tym częstsze działania niepożądane. Najlepsze wyniki uzyskuje się podczas obrazowania pojedynczych organów układu pokarmowego, gdyż po podaniu FAC w obrazach T_1 -zależnych występuje najmniejsza liczba artefaktów i najlepszy kontrast [62].

Deferoksamina (DF) i jej pochodne



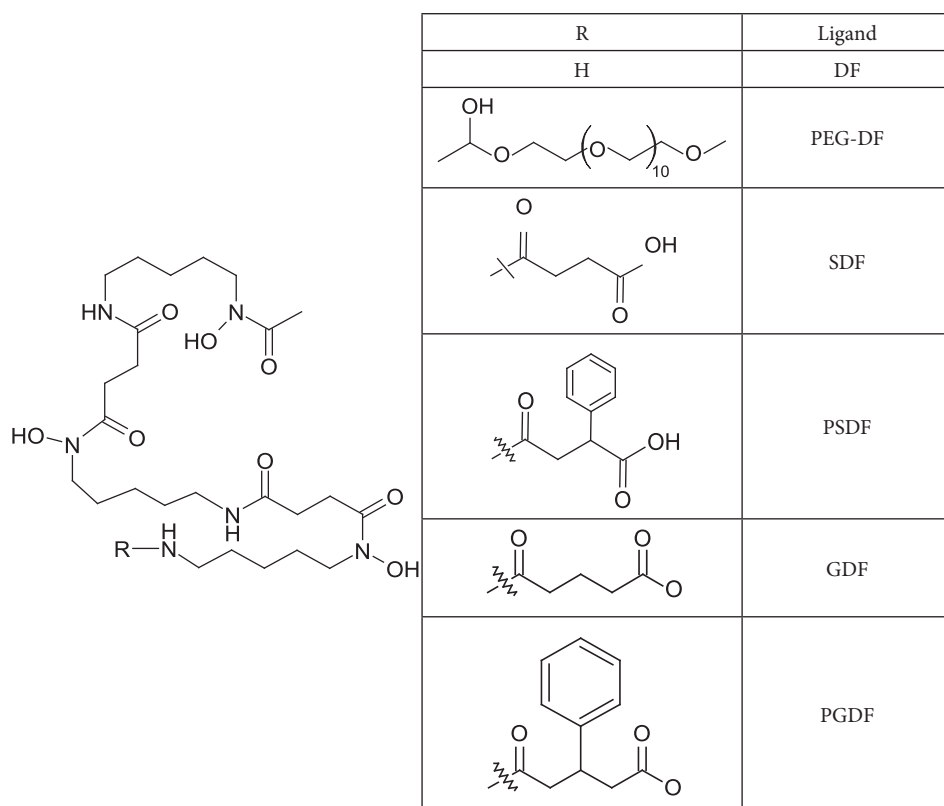
Rysunek 3. Feroksamina (Deferoksamina skompleksowana z jonami Fe^{3+})

Figure 3. Ferrioxamine (Desferrioxamine coordinated with Fe^{3+})

Deferoksamina (mezylan deferoksaminy B, DF, *Dasferal*[®]) jest to związek naturalny, siderofor bakteryjny, produkowany przez *Streptomyces*. W 1962 roku przed-

stawiony został jako lek wykazujący skuteczność w chelatacji żelaza i usuwaniu nadmiaru tego pierwiastka z organizmu, stosowany w leczeniu talasemii i hemochromatozy [63]. Jedna cząsteczka deferoksaminy wiąże jeden atom żelaza przez trzy grupy hydroksamowe, tworząc oktaedryczny kompleks – feroksaminę (Rys. 3), która jest stabilna, dobrze rozpuszczalna w wodzie i wydalana przez nerki szybko, w ciągu kilku godzin [64].

Feroksamina mogłaby zostać wykorzystana jako środek kontrastowy w MRI, jednak szybkie wstrzyknięcie tego związku powoduje nagłe obniżenie ciśnienia krwi. Dlatego zaprojektowano i badano nowe pochodne liganda DF (Rys. 4), który został sprzężony z glikolem polietylenowym. Otrzymana pochodna kompleksu Fe(III)-PEG-DF wykazuje podobne wartości relaksacji jak wyjściowa feroksamina Fe(III)-DF, $r_1 = 1,35 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a $r_2 = 1,67 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (przy 20 MHz i 37°C).



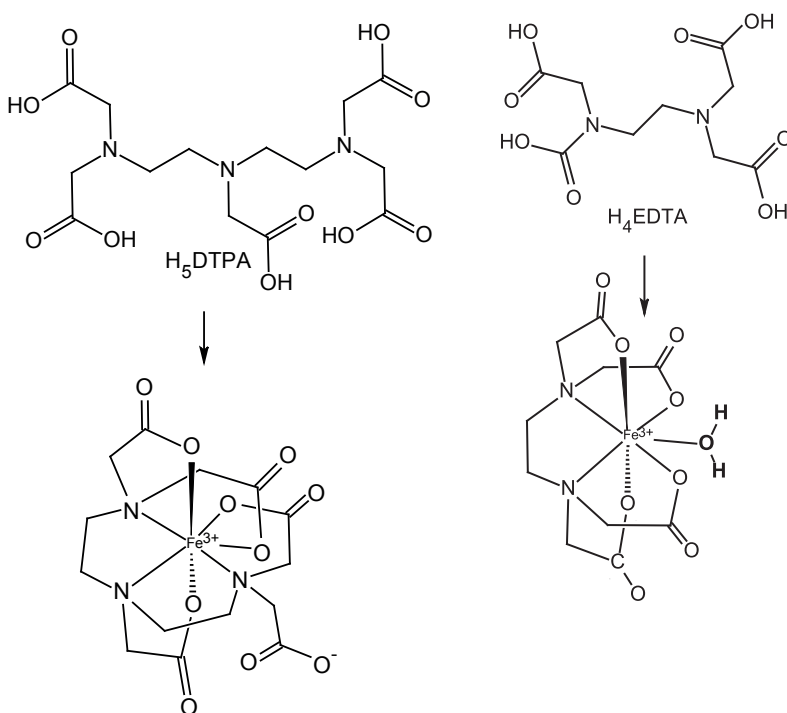
Rysunek 4. Deferoksamina i jej pochodne
Figure 4. Desferrioxamine and its derivatives

W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach dobre wyniki daje pochodna Fe-PEG-DF, dla której wzmocnienie sygnału w nerkach psa było podobne do wzmocnienia spowodowanego po podaniu $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^-$. Pochodne Fe-SDF i Fe-GDF na

obrazach T_1 -zależnych wykazywały specyficzną dla nerek, dając wzmocnienie sygnału przy nieznacznej poprawie kontrastu obrazu innych narządów. Natomiast pochodne Fe-PSDF i Fe-PGDF zdecydowanie wzmacniały sygnały w jelicie cienkim (prawie o 150%) przy minimalnej 20% poprawie obrazu wątroby. Wynik ten sugeruje, że związki te są wchłaniane w wątrobie i wydzielane z żółcią [65, 66].

Ligandy aminokarboksylowe

Do tej grupy ligandów zaklasyfikowano związki, które w swej strukturze posiadają grupy aminowe i karboksylowe, wiążące jon metalu. Ta grupa związków to jak do tej pory najlepiej zbadana klasa ligandów pod względem zastosowania w MRI ze względu na wykorzystanie ich w kontrastach gadolinowych. Kompleks dietylenotriaminopentaoctanu z jonom gadolinu(III) – $[\text{Gd}(\text{DTPA})]$ jest powszechnie stosowanym środkiem kontrastowym pod nazwą handlową *Magnevist*[®]. Czas relaksacji dla tego kontrastu, zmierzony w roztworze wodnym (przy 20 MHz i temp. 25°C) wynosi $r_1 = 3,8 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ w polu 0,47 T, co daje jedną z wyższych wartości dla stosowanych kontrastów [67].

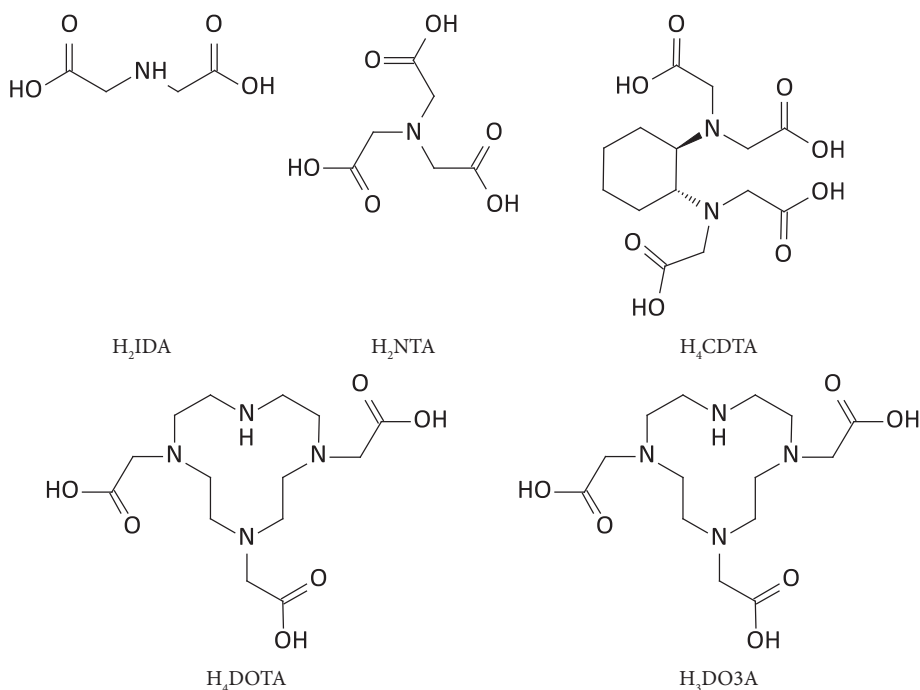


Rysunek 5. Ligandy i kompleksy amino-karboksylowe DTPA i EDTA
Figure 5. DTPA and EDTA amino-carboxylic ligands and complexes

DTPA przebadano także w formie kompleksu z jonami Fe^{3+} (Rys. 5). Tworzy on układ heptadentatny, w którym żelazo koordynuje trzy atomy azotu oraz cztery atomy tlenu grup karboksylowych. Paramagnetyczne centrum jest izolowane, nie ma możliwości bezpośredniej koordynacji cząsteczek wody. Relaksacyjność zależy tylko od zewnętrznej i drugiej sfery oddziaływań z ligandem, co przekłada się na słabe wyniki: $r_1 = 0,72 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (przy 20 MHz i temperaturze 37°C)[42].

Do klasy tych związków należy także kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA). Dla związku $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^-$ określono dwie struktury krystaliczne, otrzymane przy odmiennych wartościach pH. Kompleks tworzący się przy niskim pH jest heksadentatny. Jon centralny koordynuje dwa atomy azotu i trzy atomy tlenu grup karboksylowych – jedna z grup karboksylowych nie ulega deprotonowaniu, w wyniku czego pozostaje nieskoordynowana. Natomiast szóste miejsce koordynacyjne zajmuje cząsteczka wody. W wyższym pH, wszystkie grupy karboksylowe są zdeprotonowane, co sprzyja tworzeniu heptadentatnego kompleksu, w którym jon centralny wiąże cztery atomy tlenu, dwa atomy azotu oraz pojedynczą cząsteczkę wody. Zmierzane wartości r_1 dla kompleksu $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^-$ są nawet dwukrotnie większe niż dla kompleksu $[\text{Fe}(\text{DTPA})]^{2-}$. Jak można zauważyć, duży wpływ na relaksacyjności ma bezpośrednia koordynacja cząsteczek wody w pierwszej sferze koordynacji.

Przebadano także inne ligandy posiadające zarówno grupy aminowe jak i karboksylowe, których struktury przedstawiono poniżej (Rys. 6).



Rysunek 6. Ligandy amino-karboksylowe
Figure 6. Amino-carboxylic ligands

Na zwierzętach przeprowadzono badania toksyczności i biodystrybucji dla kompleksów przy użyciu radioizotopu żelaza ^{59}Fe , wykonując pomiar akumulacji metalu w narządach. Dla kompleksów $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^-$, $[\text{Fe}(\text{DTPA})]^{2-}$, $[\text{Fe}(\text{CDTA})]^-$, największe stężenie radioizotopu zidentyfikowano w moczu oraz szkielecie (kości). Natomiast dla $[\text{Fe}(\text{IDA})]^+$ i $[\text{Fe}(\text{NTA})]$ izotop odnaleziono w narządach tj.: kości, krew, szkielet czy wątroba.

Wpływ na te wyniki ma stała trwałości kompleksów. Załączona poniżej tabela pokazuje, że kompleks $\text{Fe}[\text{DTPA}]^{2-}$, mimo słabej relaksacyjności, osiąga wysoki $\log K$. Świadczy to o wysokiej trwałości tego kompleksu (Tab. 1). Można zauważyć także zależność osiągniętej wartości stałej trwałości od ładunku utworzonego kompleksu a tym samym od stopnia nasycenia miejsc koordynacyjnych żelaza. Kompleks $[\text{Fe}(\text{IDA})]^+$ obdarzony ładunkiem dodatnim wykazuje najmniejszą trwałość [68].

Tabela 1. Stałe trwałości przykładowych kompleksów amino-karboxylowych
Table 1. Stability constants of some amino-carboxylic complexes

Kompleks	$\log K$
$[\text{Fe}(\text{IDA})]^+$	10,7
$[\text{Fe}(\text{NTA})]$	16,3
$[\text{Fe}(\text{EDTA})]^-$	25,5
$[\text{Fe}(\text{CDTA})]^-$	27,5
$\text{Fe}[\text{DTPA}]^{2-}$	27,3

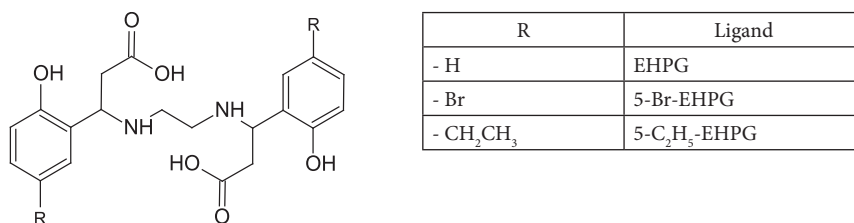
Ligandy aminofenolokarboxylowe

Ligandy zaliczane do tej klasy zawierają w swej strukturze trzy główne grupy funkcyjne, zdolne do koordynowania jonu metalu. Oprócz grupy aminowej i karboxylowej jak w opisanej wcześniej klasie, występuje tu dodatkowo przynajmniej jedna grupa fenolowa. Poniżej przedstawiono związki klasyfikujące się do tej klasy, które badano jako potencjalne kontrasty MRI.

EHPG (*N,N'*-etyleno-bis-[2-(*o*-hydroksyfenylo)]glicyna), podobnie jak deferoksamina, jest naturalnym transporterem żelaza(III). Jest to heksadentatny ligand kleszczowy o geometrii oktaedrycznej, który wiąże Fe^{3+} przez dwa atomy azotu grup aminowych, dwa atomy tlenu z grup fenolowych i dwa atomy tlenu z grup karboxylowych. Nie wykazano w kompleksie bezpośredniej koordynacji cząsteczek wody z jodem metalu [69].

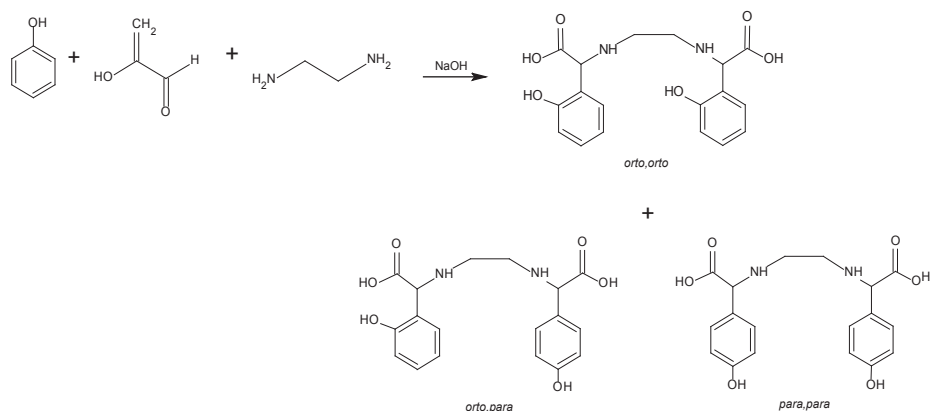
Ligand ten naturalnie występuje w postaci mieszaniny dwóch stereoisomerów *rac*-EHPG i *mezo*-EHPG. Kompleksy żelaza(III) tych diastereoizomerów mają różne stałe trwałości ($\log K = 33,28$ dla *mezo*-EHPG i $\log K = 35,54$ dla *rac*-EHPG) [68]. Badania na zwierzętach wykazały skuteczność kompleksu Fe-EHPG jako środka kontrastowego. Fe-EHPG badany był głównie jako kontrast wykazujący

wysoką specyficznosc dla wątroby i dróg żółciowych. Podany myszom w dawce 0,05 mmol/kg powodował wzmocnienie obrazu wątroby o $64 \pm 14\%$ a pęcherzyka żółciowego nawet o ponad 500%. Wykazano również, że nadaje się on do wykrywania zmian nowotworowych. Wartości relaksacyjności mierzone przy częstotliwości podstawowej aparatu 10,7 MHz i temp. 37°C wynoszą odpowiednio $r_1 = 0,9 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $r_2 = 1,2 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Zsyntezowano również nowe pochodne Fe-EHPG (Rys. 7), a przeprowadzone na zwierzętach testy wykazały, że Fe-5-Br-EHPG, na obrazach T_1 -zależnych, wykazuje porównywalną poprawę jakości obrazu wątroby do tej uzyskanej przy podaniu Fe-EHPG. Natomiast po wstrzyknięciu pochodnej 5- C_2H_5 -EHPG intensywność sygnału zwiększa się o 40% [58].



Rysunek 7. Ligand EHPG i jego pochodne
Figure 7. EHPG ligand and its derivatives

Związki EHPG po raz pierwszy opisał i opatentował Dexter w 1958 roku [70]. Główną metodą syntezy jest trójskładnikowa reakcja Mannicha fenolu, kwasu glioksalowego i etylenodiaminy w obecności zasady (Rys. 8). Związek EHPG (izomer *orto,orto*) jest produktem głównym reakcji. Dodatkowo, jako produkty uboczne, powstaje mieszanina izomerów (*orto,para* i *para,para*) [71].



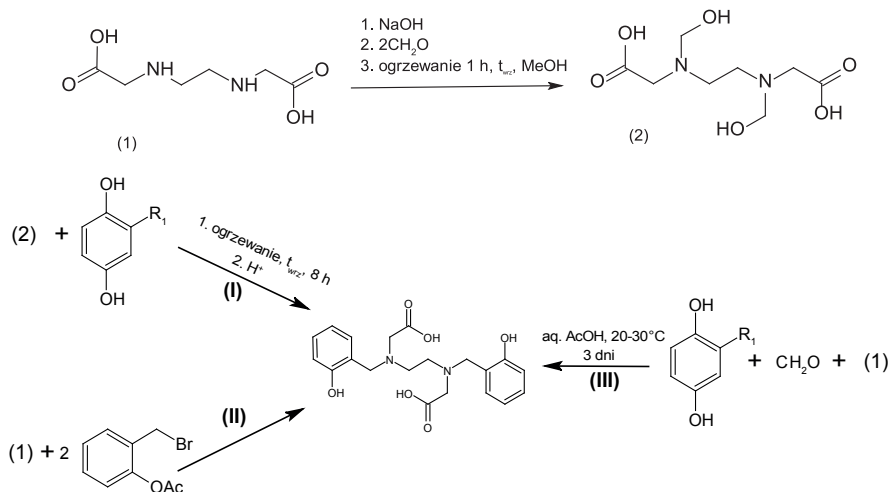
Rysunek 8. Synteza liganda EHPG na drodze reakcji Mannicha
Figure 8. Synthesis of EHPG ligand *via* Mannich reaction

EHBG (HBED) kwas *N,N'*-bis(2-hydroksybenzyl)etylodiamina-*N,N'*-diacetylowy jest to całkowicie syntetyczny aminofenolokarboksylowy, heksadentatny chelat, wiążący żelazo(III) w stosunku 1:1. Strukturalnie jest bardzo podobny do opisanego wcześniej EHPG, jednak różni się od tego ostatniego brakiem centrum chiralności (Rys. 9). Kompleks Fe-EHBG, ze stałą trwałości $\log K = 39,68$, wykazuje większą stabilność niż Fe-EHPG oraz silniejsze powinowactwo do HSA. Wartości $r_1 = 1,1 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dla Fe-EHBG (mierzone w tych samych warunkach) są niższe niż dla obu diastereoizomerów Fe-EHPG [58, 72]. Związek ten podawany pozajelitowo, stosowany jest w medycynie, jako lek w alkoholowej chorobie wątroby. Wykazuje także właściwości antyoksydacyjne [64].



Rysunek 9. Struktura EHBG i pochodnych
Figure 9. Structure of EHBG and its derivatives

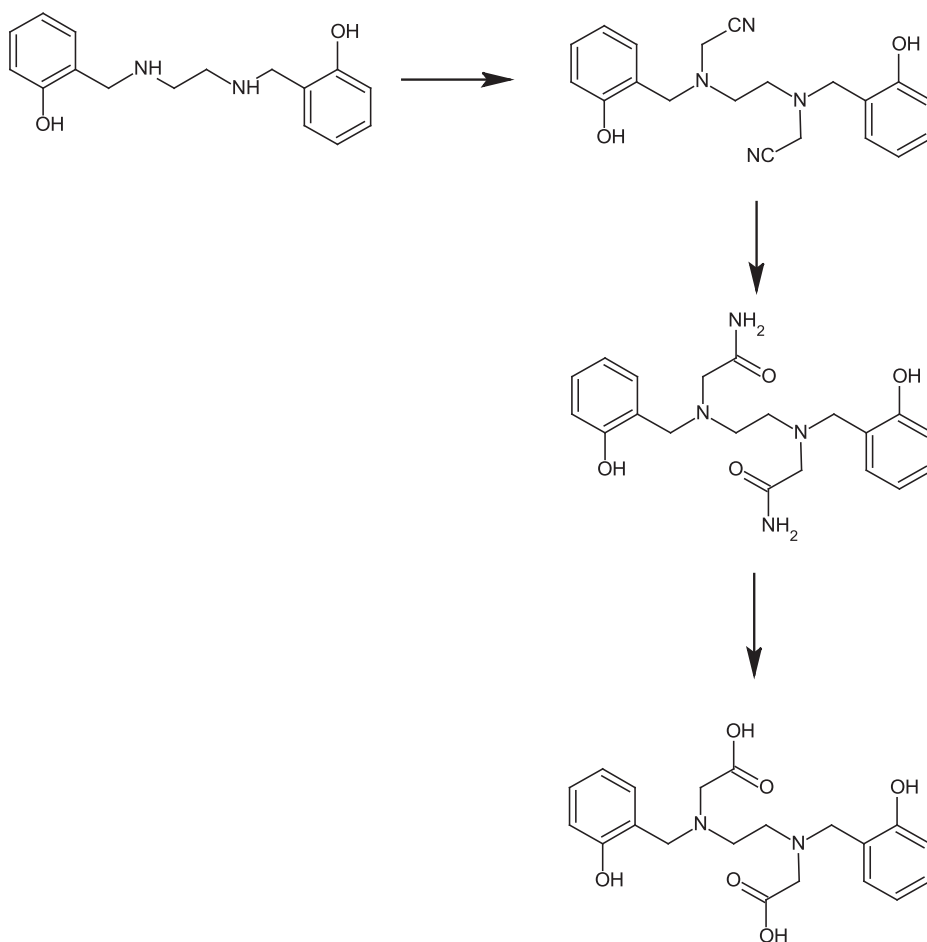
Związki EHBG po raz pierwszy zostały opisane i opatentowane przez Geigy AG w 1961 roku. Patent zawiera opis syntezy z wykorzystaniem trójskładnikowej reakcji Mannicha, w której *N,N'*-etylenobisglicynę (1) poddaje się reakcji z formaldehydem (Rys. 10). W wyniku reakcji tworzy się pochodna bis(hydroksymetylowa) (2), która ulega kondensacji z *para*-podstawionym fenolem tworząc pochodną EHBG (I) [73].



Rysunek 10. Metody syntezy liganda EHBG
Figure 10. Synthesis methods of EHBG ligand

Kolejną metodę opisał Martell i in. w 1967 r. Metoda polega na alkirowaniu kwasu etylenodiamino-*N,N'*-dioctowego bromkiem *o*-acetyloksybenzylu w środowisku wodnego roztworu NaOH. Produkt wydzielono w postaci dichlorowodoru (II) [74]. Wilson wykorzystał metodę syntezy opracowaną przez Geigy AG i Martella, aby otrzymywać nowe pochodne liganda EHBG (III) [75].

Inną metodą syntezy jest kilkuetapowa reakcja polegająca na przekształceniu *N,N'*-bis(2-hydroksyfenylo)etylenodiaminy do diamidu z zastosowaniem formaldehydu i HCN a następnie kwasowej hydrolizie powstałego diamidu (Rys. 11). Ze względu na trudność hydrolizy diamidu, konwersję do EHBG przeprowadzano z wykorzystaniem efektów katalitycznych Cu(II) i Fe(III) otrzymując gotowe kompleksy [76].

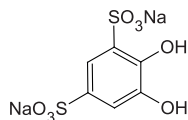


Rysunek 11. Metoda syntezy EHBG w reakcji hydrolizy kwasowej amidu

Figure 11. Synthesis method of EHBG – acidic hydrolysis of amide

Ligandy katecholowe

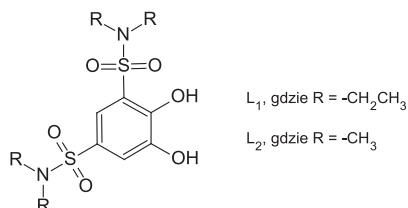
W literaturze opisano także potencjalne środki kontrastowe, w których zastosowano ligand o nazwie Tiron® (Rys. 12). Ligand ten tworzy z jonem żelaza dwa układy w stosunku 1:2 i 1:3 dając kompleksy Fe(III)-bis(Trionowe) i Fe(III)-tris(Trionowe). Środek ten działa jako kontrast drugiej sfery interakcji, oddziałując z cząsteczkami przez wiązania wodorowe między atomami tlenu grup sulfamidowych. Pomiar relaksacyjności dla Fe(III)-tris(Tironu) wykazały bardzo dobre wartości, znacznie przewyższające te, przedstawione dla wcześniej wymienianych kompleksów heksadentatnych $r_1 = 2,6 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (przy 20 MHz i temp 37°C) [77]. W badaniach przeprowadzonych *in vivo* na zwierzętach kompleks ten okazał się wysoce toksyczny. Nie było to spowodowane jednak rozpadem kompleksu i uwolnieniem jonów Fe^{3+} jak w większości przypadków, gdyż związek w całości wykrywano w moczu zwierząt. Na poziom toksyczności ma wpływ duży ładunek (aż dziewięciujemny), który powoduje niepożądane zwiększenie osmolarności.



Rysunek 12. Tiron®

Figure 12. Tiron®

Schwert i in. zsyntezowali i badali nowe dwa 3,5-dipodstawione ligandy katecholosulfonamidowe (Rys. 13) [78]. Związki te, w przeciwieństwie do Tironu, po skompleksowaniu z żelazem, w tym samym układzie 1:3, wnoszą tylko trzy ładunki ujemne.



Rysunek 13. Syntetyczne 3,5-dipodstawione katecholosulfonamidy

Figure 13. Synthetic 3,5-disubstituted catecholosulfonamides

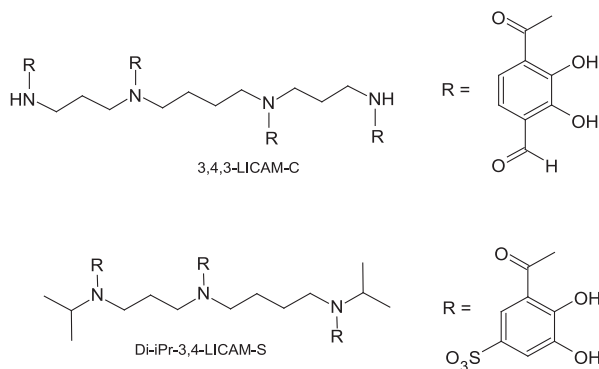
Wartości r_1 mierzone w roztworze wodnym są stosunkowo wysokie (Tab. 2). Dodatkowo wykazano wzrost wartości r_1 o co najmniej 50%, przy pomiarach wykonanych w osoczu. Wartości porównano z wynikami uzyskanymi dla Gd-EOB-DTPA, specyficznym kontrastem wątrobowym, będącym w ostatniej fazie badań klinicznych.

Tabela 2. Wartości relaksacyjności dla zsyntezowanych kompleksów katecholowych i Gd(III)-EOB-DTPA
 Table 2. Relaxivity values for the synthesized catechol and Gd(III)-EOB-DTPA complexes

Kompleks	r_1 [$\text{dm}^3 \text{mmol}^{-1} \text{s}^{-1}$] (roztwór wodny)	r_1 [$\text{dm}^3 \text{mmol}^{-1} \text{s}^{-1}$] (osocze)
Gd(III)-EOB-DTPA	5,3	8,7
Fe(III)-L ₁	1,9	4,0
Fe(III)-L ₂	2,0	3,0

Badano także związki, gdzie trzy lub cztery pierścienie katecholowe są połączone wiązaniami amidowymi z łańcuchem alkilowym (Rys. 14). Dwa takie związki przebadano pod kątem zastosowań w MRI. Pierwszy 2,3-dihydrokso-5-sulfonoil-3,7,12-triazatetradekan nazwany (Di-iPr-3,4-LICAM-S) i 1,5,10,14-tetrakis(2,3-dihydrokso-4-karboksybenzoilo)-1,5,10,14-tetraazadekan (3-,4,3-LICAM-C).

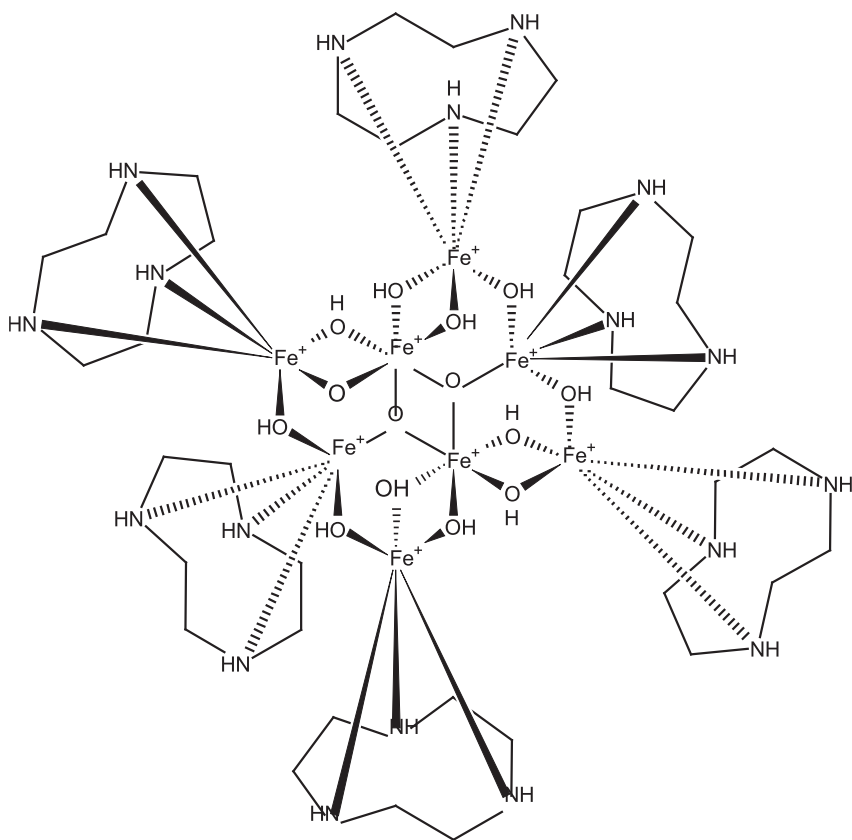
Kompleks Fe(III)-Di-iPr-3,4-LICAM-S wykazuje jedną z najwyższych relaksacyjności wśród przebadanych kompleksów żelaza $r_1 = 4,0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, natomiast wartość Fe(III)-3-,4,3-LICAM-C jest równa $1,4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Niestety badania toksyczności przeprowadzone na myszach wskazały, że jedynie pierwszy kompleks nie jest toksyczny i mógłby zostać zastosowany jako kontrast w MRI [79].



Rysunek 14. Struktury ligandów katecholowych zawieszonych na łańcuchach alkilowych
 Figure 14. Synthesis of catechol ligands hooked on alkyl chains

Ośmiordzeniowy Fe₈

Jako potencjalny środek kontrastowy przebadano także ośmiordzeniowy $\{[(\text{tacn})_6\text{Fe}_8(\mu_3\text{-O})_2(\mu_2\text{-OH})_{12}]\text{Br}_7(\text{H}_2\text{O})\}\text{Br}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Rys. 15). Dwuetapową syntezę tego związku opisał jako pierwszy Wieghardt [80].



Rysunek 15. Ośmiordzeniowy kompleks żelaza z TACN

Figure 15. Octairon TACN complex

Związek ten tworzy oktamer, w którym sześć z ośmiu kationów Fe^{3+} tworzy wiązania z grupami aminowymi. Dodatkowo jony żelaza połączone są przez dwaście mostków hydroksylowych ($\mu\text{-OH}$) i dwa mostki okso ($\mu\text{-O}$). W związku Fe_8 paramagnetyczne jony są otoczone i koordynacyjnie wysyczone, dlatego relaksacja zależy jedynie od drugiej sfery koordynacji. Oddziaływanie protonów wody z paramagnetycznymi jonami żelaza zachodzi przez dipolarną, międzycząsteczkową interakcję pomiędzy silnym momentem magnetycznym elektronów paramagnetyku a znacznie mniejszym momentem magnetycznym protonów wody.

Relaksację tej substancji mierzono w roztworze PBS w temperaturze 25°C oraz 37°C odpowiadającej temperaturze ciała (Tab. 3). Wartość r_1 w temperaturze 37°C w polu magnetycznym 1,41 T wynosi $3,91 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a r_2 $4,49 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Tabela 3. Wartości relaksacyjności dla kompleksów ośmiordzeniowych z TACN zmierzone w temperaturze 25°C

Table 3. Relaxivity values for the octairon TACN complexes at 25°C

Kontrast	Natężenie pola [T]	r_1 [dm ³ mmol ⁻¹ s ⁻¹]	r_2 [dm ³ mmol ⁻¹ s ⁻¹]
Fe ₈	9,4	5,10±0,30	8,04±0,12
Gd-DTPA	9,4	3,71±0,22	4,44±0,75
Fe ₈	1,41	4,76±0,07	5,01±0,08
GD-DTPA	1,41	4,29±0,01	4,89±0,02

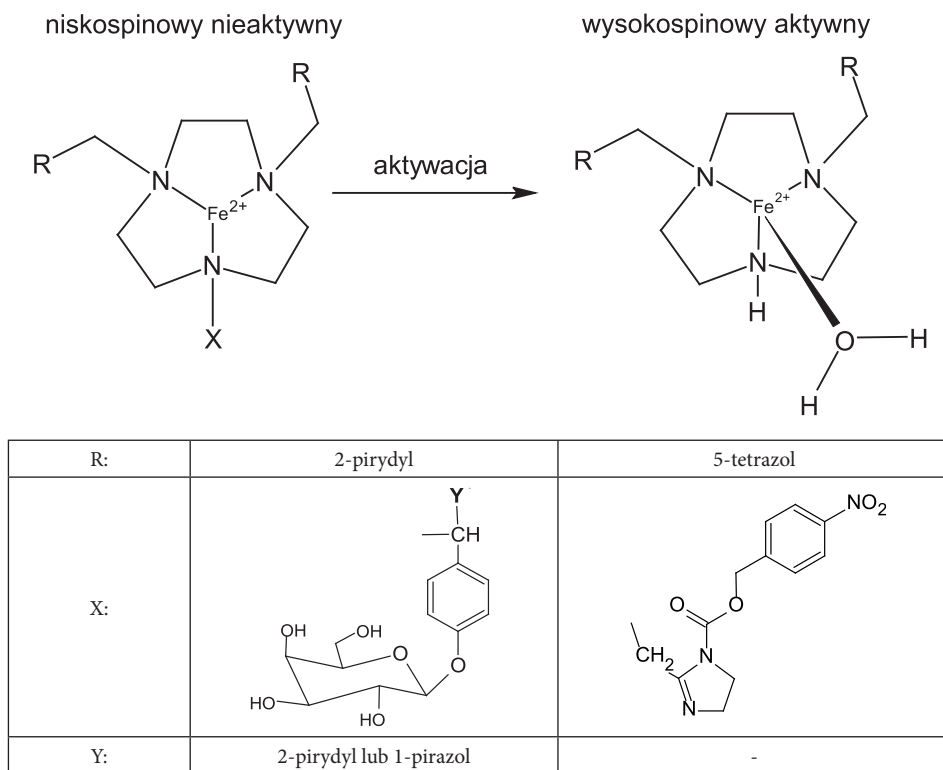
Stosunek r_2/r_1 dla Fe₈ jak i Gd-DTPA, wynosi od 1 do 2, co oznacza, że Fe₈ działa jako pozytywny środek kontrastowy skracający głównie czas relaksacji T_1 .

Badania cytotoxyczności Fe₈ przeprowadzone na linii komórek C6 glejaka szczurzego wykazały, że po 24 godzinach ekspozycji na stężenie 1 mmol/dm³ Fe₈ zaczyna on być toksyczny. Natomiast 100% śmiertelności komórek osiąga się po 72 godzinach ekspozycji na 1,5 mmol/dm³ Fe₈, a LD₅₀ przy 1,12 mmol/dm³ h [81].

5.2. ZWIĄZKI ŻELAZA(II)

Związkom żelaza(II) poświęcono stosunkowo mało uwagi, w kontekście środków kontrastowych do MRI, z powodu ich mniejszego momentu magnetycznego w porównaniu ze związkami żelaza(III). Pojawiły się jednak dwa nurty badań tej grupy. Jeden wykorzystuje możliwość zmiany stanu spinowego Fe(II) na skutek działania zewnętrznych bodźców (toteż można je zaliczyć do inteligentnych środków kontrastowych) indukujących zmiany strukturalne chelatu. Drugi wykorzystuje wprost słabsze właściwości magnetyczne Fe(II) w zastosowaniach jako środki z grupy ParaCEST.

Grupa Hasserodta opisała kilka modeli kompleksów Fe(II), opartych na szkieletcie TACN. Idea tych badań polega na wprowadzaniu aktywowalnego fragmentu do atomu azotu jedynej drugorzędowej aminy szkieletu TACN [82–86] (Rys. 16).



Rysunek 16. Budowa aktywowalnych kompleksów żelaza(II)

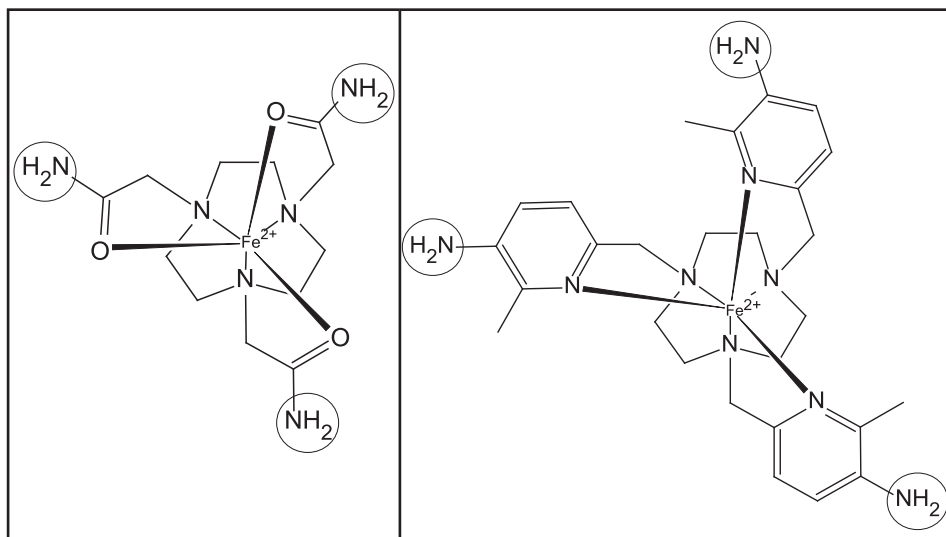
Figure 16. Structure of activable iron(II) complexes

W takiej postaci kompleksy te przyjmują stan niskospinowy, a więc są praktycznie nieaktywne jako środki kontrastowe. Następnie na skutek działania zewnętrznego bodźca – np. β -galaktozydazy lub zmiany kwasowości środowiska, następuje uwolnienie tego fragmentu, co w efekcie powoduje przyjęcie stanu wysokospinowego, czyli uaktywnienie środka kontrastowego w obrazowaniu MRI [87]. Póki co, modele te nie funkcjonują jednak dobrze w docelowym środowisku i wymagają poważnego dopracowania.

Środki ParaCEST

Efekt CEST, (ang. *C*hemical *E*xchange *S*aturation *T*ransfer), czyli przeniesienie nasycenia za pomocą wymiany chemicznej, został stosunkowo niedawno zaadaptowany do obrazowania magnetyczno-rezonansowego, jako pomysł na pogłębienie kontrastu [88]. Przedrostek „Para” jest związany z zaangażowaniem substancji paramagnetycznych do uzyskania pożądanego efektu. Mechanizm działania tej klasy środków jest zgoła odmienny od klasycznych środków. Te ostatnie przyspieszają

relaksację atomów wodoru cząsteczek wody, natomiast środki ParaCEST są pewnym mediatorem, swoistym narzędziem do wyciszenia wybranych sygnałów cząsteczek wody, co w rezultacie objawia się zaciemnieniem obrazu. Odbywa się to przez przesunięcie niektórych sygnałów protonów liganda tej substancji (to jest umiarkowany efekt paramagnetyku), następnie są one wysycane impulsem RF i dalej wymieniane z cząsteczkami ośrodka – wody. W ten sposób następuje przeniesienie nasycenia z liganda do cząsteczek wody. W roli takich mediatorów najlepiej sprawdzają się kompleksy metali o umiarkowanym momencie magnetycznym (np. Fe(II) [89], lub wybrane lantanowce [90]) i zawierające ligandy z grupami zdolnymi do oddysocjowania protonów. Spośród jonów żelaza(II) otrzymano kompleksy z podstawionym ligandem kleszczowym TACN w stanie wysokospinowym (Rys. 17) [89, 91].



Rysunek 17. Środki ParaCEST zawierające jony żelaza(II). Grupy przenoszące nasycenie zaznaczono kółkiem.
Figure 17. ParaCEST agents with iron(II). The groups able to transfer saturations are marked with circles

Moment magnetyczny tych kompleksów jest na tyle duży, aby wywołać efekt ParaCEST – następuje wyraźne przesunięcie sygnałów grup z labilnymi protonami (NH₂) do 80 ppm na widmie ¹H NMR. Z drugiej zaś strony właściwości magnetyczne nie są tak duże jak na przykład w przypadku związków Fe(III), gdzie sygnały są już bardzo szerokie i mało informatywne. Badania w tym obszarze są jednak w załazku i nie przeprowadzono dotąd badań *in vivo* dla tego typu układów. Tym nie mniej metoda ta może stanowić interesujące uzupełnienie klasycznego obrazowania a jej rozwój jest na tym etapie obiecujący.

UWAGI KOŃCOWE

Wprowadzenie środków kontrastowych do obrazowania magnetyczno-rezonansowego znacznie powiększyło obszar aplikacji tej techniki. Ujawniły się też negatywne efekty stosowania gadolinowych CA. Wydaje się zatem, że zastosowanie innych pierwiastków będzie co najmniej uzupełnieniem możliwości gadolinu. Pozostałe lantanowce i wybrane metale z bloku *d* czekają więc w kolejce na swój czas zastosowań. Być może wkroczą one jako inteligentne środki aktywowane *in vivo* lub umożliwią wykorzystanie techniki ParaCEST. Dodatkowym atutem endogennych pierwiastków (żelaza, manganu, miedzi) jest ich dobrze poznana fizjologia i możliwość zastosowania w śledzeniu odpowiednich szlaków metabolicznych w organizmach. Fascynująca jest myśl o kolejnym przełomie w dziedzinie diagnostyki medycznej.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy pracy dziękują mgr M. Wróblowskiej za pomoc w przygotowaniu grafiki do niniejszej pracy, a dr .W. Szczepankiewiczowi, dr A. Kuźnik i lek. med. A. Kuźnikowi za konsultacje przy tworzeniu tej pracy.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] É. Tóth, L. Helm, A. Merbach, *Top. Curr. Chem.*, 2002, 61.
- [2] V. Jacques, J. Desreux, *Top. Curr. Chem.*, 2002, 123.
- [3] M. Szczepanik, I.V. Lebedeva, Y. Xiang, P. Pande, W.F. Patton, 2012.
- [4] G.B. Giovenzana, R. Negri, G.A. Rolla, L. Tei, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2012, 2035.
- [5] E.L. Que, C.J. Chang, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **39**, 51.
- [6] D. Hogemann, J.P. Basilion, *Eur. J. Nuc. Med.*, 2002, **29**, 400.
- [7] L.M. Urbanczyk-Pearson, F.J. Femia, J. Smith, G. Parigi, J.A. Duimstra, A.L. Eckermann, C. Luchinat, T.J. Meade, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 56.
- [8] N. Kuźnik, A. Chrobaczyński, M. Mika, P. Miler, R. Komor, M. Kubicki, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **52**, 184.
- [9] B. Gonet, *Obrazowanie magnetyczno-rezonansowe*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1997.
- [10] J. Tritt-Goc, *Postępy Fizyki*, 2006, **57**, 157
- [11] W. Froncisz, *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych*, 2004, **53**, 251.
- [12] B. Ciesielski, W. Kuziemski, *Obrazowanie metodą magnetycznego rezonansu w medycynie*, Oficyna Wydawnicza TUTOR, Gdańsk-Toruń, 1994.
- [13] F. Bloch, W.W. Hansen, M. Packard, *Phys. Rev.*, 1946, **70**, 474.
- [14] I. Solomon, *Phys. Rev.*, 1955, **99**, 559.
- [15] N. Bloembergen, *J. Chem. Phys.*, 1957, **27**, 572.
- [16] J. Eisinger, R.G. Shulman, W.E. Blumberg, *Nature*, 1961, **192**, 963.
- [17] P.C. Lauterbur, *Nature*, 1973, **242**, 190.
- [18] I.R. Young, G.J. Clarke, D.R. Baffles, J.M. Pennock, F.H. Doyle, G.M. Bydder, *J. Comput. Tomogr.*, 1981, **5**, 543.

- [19] D.H. Carr, J. Brown, G.M. Bydder, H.-J. Weinmann, U. Speck, D.J. Thomas, I.R. Young, *The Lancet*, 1984, **323**, 484.
- [20] S. Aime, S.G. Crich, E. Gianolio, G.B. Giovenzana, L. Tei, E. Terreno, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, **250**, 1562.
- [21] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček, I. Lukeš, *Dalton Trans.*, 2008, 3027.
- [22] M.F. Bellin, *Eur. J. Radiol.*, 2006, **60**, 314.
- [23] P. Caravan, J.J. Ellison, T.J. McMurry, R.B. Lauffer, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2293.
- [24] I.C.S. Hyon Bin Na, *Adv. Mater.*, 2011, **21**, 2133.
- [25] Y.X. Wang, *Quant. Imaging. Med. Surg.*, 2011, **1**, 35.
- [26] C.F.G.C. Geraldes, S. Laurent, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2009, **4**, 1.
- [27] H. Ersoy, F.J. Rybicki, *J. Magn. Reson. Imaging*, 2007, **26**, 1190.
- [28] S. Laurent, C. Henoumont, L. Vander Elst, R.N. Muller, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2012, 1889.
- [29] E.J. Werner, A. Datta, C.J. Jocher, K.N. Raymond, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 8568.
- [30] G.P. Yan, L. Robinson, P. Hogg, *Radiography*, 2007, **13**, e5.
- [31] Z.R. Lu, A.M. Mohs, Y. Zong, Y. Feng, *Int. J. Nanomed.*, 2006, **1**, 31.
- [32] C. Corot, P. Robert, E. Lancelot, P. Prigent, S. Ballet, I. Guilbert, J.S. Raynaud, I. Raynal, M. Port, *Magn. Reson. Med.*, 2008, **60**, 1337.
- [33] C.T. Yang, K.H. Chuang, *Med. Chem. Comm.*, 2012, **3**, 552.
- [34] A. Jasanoff, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2007, **17**, 593.
- [35] A. Giovagnoni, A. Fabbri, F. Maccioni, *Abdom. Imaging*, 2002, **27**, 367.
- [36] T.J. Meade, A.K. Taylor, S.R. Bull, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2003, **13**, 597.
- [37] J.L. Major, T.J. Meade, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 893.
- [38] A.A. Gilad, P.T. Winnard Jr, P. van Zijl, J.W.M. Bulte, *NMR Biomed.*, 2007, **20**, 275.
- [39] K. Glunde, D. Artemov, M.F. Penet, M.A. Jacobs, Z.M. Bhujwalla, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 3043.
- [40] M.J. Allen, K.W. MacRenaris, P. Venkatasubramanian, T.J. Meade, *Chem. Biol.*, 2004, **11**, 301.
- [41] A.M. Tang, J.S. Ananta, H. Zhao, B.T. Cisneros, E.Y. Lam, S.T. Wong, L.J. Wilson, K.K. Wong, *Contrast Media Mol. I.*, 2011, **6**, 93.
- [42] R.B. Lauffer, *Chem. Rev.*, 1987, **87**, 901.
- [43] J.A. Peters, J. Huskens, D.J. Raber, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 1996, **28**, 283.
- [44] A.J.L. Villaraza, A. Bumb, M.W. Brechbiel, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2921.
- [45] M. Botta, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2000, 399.
- [46] S.A. Greenberg, *Radiology*, 2010, **257**, 670.
- [47] S. Laurent, L. Vander Elst, C. Henoumont, R. Muller, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2010, **5**, 305.
- [48] K.D. Welch, T.Z. Davis, M.E. Van Eden, S.D. Aust, *Free Radical Biol. Med.*, 2002, **32**, 577.
- [49] L. Cragg, R.P. Hebbel, W. Miller, A. Solovey, S. Selby, H. Enright, *Blood*, 1998, **92**, 632.
- [50] B.K. Takasaki, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 1121.
- [51] B.K. Takasaki, J.H. Kim, E. Rubin, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 1157.
- [52] N. Hayashi, N. Takeda, T. Shiiba, M. Yashiro, K. Watanabe, M. Komiyama, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 5899.
- [53] S. Tamagaki, K. Suzuki, W. Tagaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1989, **62**, 148.
- [54] D. Hao, T. Ai, F. Goerner, X. Hu, V.M. Runge, M. Tweedle, *J. Magn. Reson. Imaging*, 2012, **36**, 1060.
- [55] J. Witkowicz, *Nephrol. Dial. Pol.*, 2009, **13**, 10.
- [56] K. Kümmerer, E. Helmers, *Environ. Sci. Technol.*, 2000, **34**, 573.
- [57] D.L. White, *Magn. Reson. Med.*, 1991, **22**, 309.
- [58] D. Schwert, J. Davies, N. Richardson, *Top. Curr. Chem.*, 2002, 165.
- [59] N.T.V. Le, D.R. Richardson, *Int. J. Cancer.*, 2004, **110**, 468.

- [60] D.L. Rubin, H.H. Muller, S.W. Young, *Magn. Reson. Med.*, 1992, **23**, 154.
- [61] Y. Ogawa, Y. Noda, K. Morio, A. Nishioka, T. Inomata, S. Yoshida, T. Toki, S. Ogoshi, *J. Comput. Assist. Tomogr.*, 1996, **20**, 455.
- [62] D. Kivelitz, H.B. Gehl, A. Heuck, T. Krahe, M. Taupitz, K.P. Lodemann, B. Hamm, *Acta Radiologica*, 1999, **40**, 429.
- [63] R.S. Smith, *Br. Med. J.*, 1962, **2**, 1577.
- [64] G.M. Brittenham, *Alcohol*, 2003, **30**, 151.
- [65] D.L. Whire, R.G. Eason, A.L. Alkire, D.C. Price, B.A. Hoerner, L.A. Milco, R.E. Keen, J.L. Barnhart, *Invest. Radiol.*, 1991, **26**, S146.
- [66] B.A. Hoener, A.A. Tzika, B.L. Englestad, D.L. White, *Magn. Reson. Med.*, 1991, **17**, 509.
- [67] S. Laurent, L.V. Elst, R.N. Muller, *Contrast Med. Mol. Imaging*, 2006, **1**, 128.
- [68] N. Richardson, J.A. Davies, B. Raduchel, *Polyhedron*, 1999, **18**, 2457.
- [69] N. Bailey, D. Cummins, E. McKenzie, J. Worthington, *Inorg. Chim. Acta*, 1981, **50**, 111.
- [70] M. Dexter, US 2,824,128, 1958.
- [71] M. Gómez-Gallego, M.A. Sierra, R. Alcázar, P. Ramírez, C. Piñar, M.J. Mancheño, S. García-Marco, F. Yunta, J.J. Lucena, *J. Agric. Food. Chem.*, 2002, **50**, 6395.
- [72] B.A. Hoener, B.L. Engelstad, E.C. Ramos, H.A. Macapinlac, D.C. Price, T.R. Johnson, D.L. White, *J. Magn. Reson. Imaging*, 1991, **1**, 357.
- [73] H. Kroll, S. John, M. Knell, 1961
- [74] F.L. Eplattenier, I. Murase, A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 837.
- [75] G. Wilson, *Aust. J. Chem.*, 1988, **41**, 173.
- [76] A.E. Martell, R.J. Motekaitis, E.T. Clarke, J. Harrison, *Can. J. Chem.*, 1986, **64**, 449.
- [77] J.A. Davies, S.G. Dutremez, C.M. Hockensmith, R. Keck, N. Richardson, S. Selman, D.A. Smith, C.W. Ulmer II, L.S. Wheatley, J. Zeiss, *Acad. Radiol.*, 1996, **3**, 936.
- [78] D.D. Schwert, N. Richardson, G. Ji, B. Radüchel, W. Ebert, P.E. Heffner, R. Keck, J.A. Davies, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 7482.
- [79] F.L. Weitzel, K.N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 2289.
- [80] K. Wieghardt, K. Pohl, W. Gebert, *Angew. Chem.*, 1983, **95**, 739.
- [81] E. Rodríguez, A. Roig, E. Molins, C. Arús, M.R. Quintero, M.E. Cabañas, S. Cerdan, P. Lopez-Larribia, C. Sanfeliu, *NMR Biomed*, 2005, **18**, 300.
- [82] V. Stavila, Y. Stortz, C. Franc, D. Pitrat, P. Maurin, J. Hasserodt, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2008, 3943.
- [83] V. Stavila, M. Allali, L. Canaple, Y. Stortz, C. Franc, P. Maurin, O. Beuf, J. Samarut, M. Janier, J. Hasserodt, *New J. Chem.*, 2008, **32**, 428.
- [84] F. Touti, P. Maurin, L. Canaple, O. Beuf, J. Hasserodt, *Inorg. Chem.*, 2011, **51**, 31.
- [85] F. Touti, A.K. Singh, P. Maurin, L. Canaple, O. Beuf, J. Samarut, J. Hasserodt, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 4274.
- [86] J. Hasserodt, *New J. Chem.*, 2012, **36**, 1707.
- [87] N. Kuźnik, V. Stavila, M. Allali, Y. Stortz, P. Maurin, J. Hasserodt, *Abstr. Pap. Am. Chem. S.*, 2008, 343.
- [88] S. Zhang, M. Merritt, D.E. Woessner, R.E. Lenkinski, A.D. Sherry, *Acc. Chem. Res.*, 2003, **36**, 783.
- [89] S.J. Dorazio, J.R. Morrow, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2012, 2006.
- [90] S. Viswanathan, Z. Kovacs, K.N. Green, S.J. Ratnakar, A.D. Sherry, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2960.
- [91] S.J. Dorazio, P.B. Tsitovich, K.E. Sifers, J.A. Sperryak, J.R. Morrow, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 14154.