

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Pikolináto komplexy lanthanoidů a jejich  
využití v medicíně a biologických vědách**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Bioanorganická chemie

Forma studia: Prezenční

Pracoviště: Katedra anorganické chemie

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Peter Antal, Ph.D.

**2019**

**Adam Sztula**

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora:	Adam Sztula
Název práce:	Pikolináto komplexy lanthanoidů a jejich využití v medicíně a biologických vědách.
Pracoviště:	Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Školitel:	Mgr. Peter Antal, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2019
Počet stran:	38
Jazyk:	čeština

## **Abstrakt**

Cílem předložené bakalářské práce je rešerše týkající se potenciálního využití komplexů lanthanoidů s ligandy obsahující pikolinátová ramena. Teoretická část práce je věnována popisu vlastností lanthanoidů a jejich komplexních sloučenin, dále je zaměřena především na praktické aplikace těchto látek jako *in vivo* luminiscenční sondy a MRI kontrastní činidla. Praktická část se zabývá přípravou 15-členného pyridinového makrocyklu se dvěma pendantními pikolinátovými rameny, který je určen pro stabilní chelataci lanthanoidů.

Klíčová slova: lanthanoidy, magnetická rezonance, kontrastní látky, luminiscence, pikolinátové rameno, makrocykly, toxicita gadolinia.

## **Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Adam Sztula

Title: Picolinate complexes of lanthanides and their use in medicine and biological science.

Department: Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Advisor: Mgr. Peter Antal, Ph.D.

The year of presentation: 2019

Number of pages: 38

Language: Czech

## **Abstract**

The aim of this bachelor thesis is to research the potential application of lanthanide complexes with ligands containing picolinate pendant arms. The Theoretical part describes basic properties of lanthanides, their complexes and practical applications of these compounds as *in vivo* luminescence probes and MRI contrast agents. The Practical part is devoted to the synthesis of 15-membered macrocyclic ligand containing two picolinate pendant arms ment for stable complexation of lanthanide ions.

Keywords: lanthanides, magnetic resonance imaging, contrast agents, luminescence, picolinate arm, macrocycles, gadolinium toxicity.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem: Pikolináto komplexy lanthanoidů a jejich využití v medicíně a biologických vědách vypracoval samostatně na základě konzultací s vedoucím práce a studia odborné literatury. Neporušil jsem autorský zákon. Seznam použité literatury se nachází na konci této práce.

V Olomouci, dne 30. 4. 2019

.....  
Podpis

**Poděkování:**

Tímto bych chtěl poděkovat svému školiteli Mgr. Peterovi Antalovi, Ph.D. za jeho nemalé úsilí, které vynaložil při realizaci této práce a za jeho vždy vstřícný, přátelský a profesionální přístup. Dále děkuji RNDr. Bohuslavovi Drahošovi, Ph.D. za měření hmotnostních spekter a také děkuji Pavle Richterové za měření elementární analýzy mých vzorků.

# Obsah

1. Úvod .....	7
2. Teoretická část .....	8
2.1 Komplexní sloučeniny lanthanoidů .....	8
2.2 Kyselina pikolinová .....	10
2.3 Optické emisní sondy .....	11
2.4 Lanthanoidy jako OES ve fluorescenční mikroskopii .....	11
2.4 Pikolináto komplexy lanthanoidů .....	14
2.5 Diagnostická metoda: magnetická rezonance .....	16
2.6 MRI konstantní látky na bázi gadolinia .....	18
2.7 Nebezpečí spojené s používáním GdKL .....	19
3. Cíle práce .....	22
4. Praktická část .....	23
4.1 Seznam použitých chemikálií .....	23
4.2 Příprava pikolinátového ramena .....	23
4.2.1 Dimethylester kyseliny pyridin-2,6-dikarboxylové (1) .....	24
4.2.2 Methylester kyseliny 6-hydroxymethylpyridin-2-karboxylové (2) .....	24
4.2.3 Methylester kyseliny 6-chloromethylpyridin-2-karboxylové (3) .....	25
4.3 Syntéza 15-pyN <sub>3</sub> O <sub>2</sub> (pic) <sub>2</sub> .....	25
4.4 Použité analytické metody .....	26
5. Výsledky a diskuze .....	28
6. Závěr .....	33
7. Seznam zkratk, značek a označen .....	35
8. Použitá literatura .....	36

# 1. Úvod

Lanthanoidy (Ln) jsou kovové prvky s význačnými optickými a magnetickými vlastnostmi. Své praktické využití našly ve formě slitin, nanočástic i různých sloučenin. Luminiscence komplexních sloučenin lanthanoidů s organickými ligandy se využívá ve zobrazovacích technikách, zejména v luminiscenční mikroskopii, kde je možné sledovat živé buňky a průběh buněčných dějů v reálném čase. Největší uplatnění nalézají komplexní sloučeniny lanthanoidů jako kontrastní činidla při magnetické rezonanci. Jako centrální atom se zde nejčastěji využívá gadolinium v oxidačním stavu III, které má 7 nepárových elektronů. Chemickou změnou na organickém ligandu lze dosáhnout požadované specifity lanthanoidové sondy pro vybrané tkáň, která je často limitujícím faktorem při jejich zavádění do praxe.<sup>1</sup> Jelikož jsou volné ionty lanthanoidů toxické ( $Gd^{III}$ ,  $Eu^{III}$ ,  $Sm^{III}$ )<sup>2,3</sup> anebo jejich účinek na živé systémy není plně popsán, je pozornost také zaměřena na stabilitu takových sond, které ve fyziologickém prostředí, plném konkurujících iontů, mohou toxické lanthanoidy uvolňovat.

Diagnóza a léčba rakoviny je jedna z největších výzev současné medicíny a zejména v této oblasti je výzkum sloučenin lanthanoidů intenzivní. Vysoká diagnostická účinnost magnetické rezonance při zobrazování nádorů a dalších abnormálních tkání je již v medicíně silně zakotvena. I když se jedná o neinvazivní techniku, existují důkazy o zdravotním riziku při použití kontrastních látek.<sup>4</sup> Komplexní sloučeniny lanthanoidů, které vykazují cytotoxické a inhibiční účinky, jsou vhodné také pro samotnou léčbu rakoviny. Mechanismus jejich účinků často spočívá v interakci s DNA<sup>5</sup> anebo inhibici transportu vápníku v mitochondriích.<sup>6</sup> Kromě komplexních sloučenin vykazují cytotoxickou aktivitu, vůči několika liniím lidských rakovinných buněk, také nanočástice oxidu ceričitého, které zvyšují oxidativní stres uvnitř buněk.<sup>7</sup> Mezi další terapeutické postupy v léčbě rakoviny, kde lze využít komplexní sloučeniny lanthanoidů, patří fotodynamická terapie. Tato technika využívá přenosu energie z komplexu (po jeho ozáření) na molekulární kyslík za tvorby kyslíku singletového, který jako silné oxidační činidlo ničí okolní maligní buňky.<sup>8</sup> Konečně lze lanthanoidy využít také v radioterapii, např. pomocí protilátek označenými  $^{177}Lu$ .<sup>9</sup>

## 2. Teoretická část

### 2.1 Komplexní sloučeniny lanthanoidů

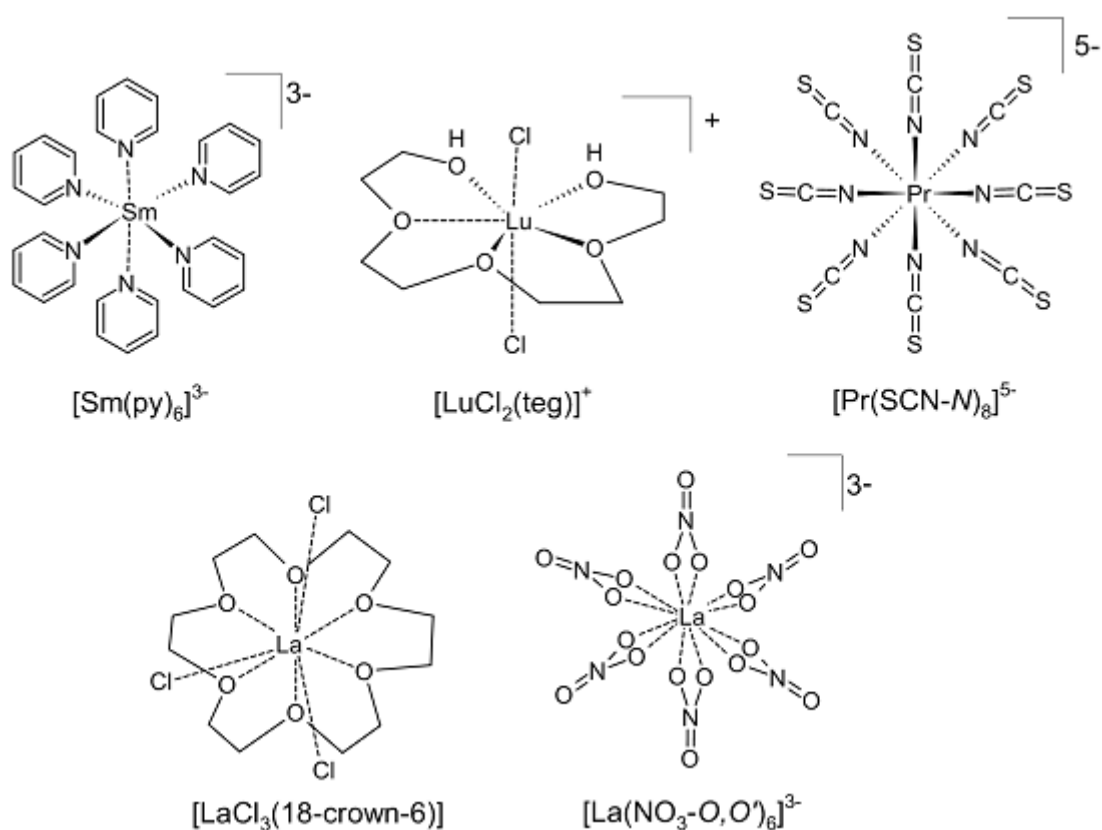
Lanthanoidy jsou kovové prvky s protonovým číslem 57-71 nacházející se v periodické soustavě prvků v 6. periodě. Typický oxidační stav pro všechny lanthanoidy je III ( $4f^0-4f^{14}$ ), avšak u některých z nich, jsou stabilní i oxidační stavy II a IV, při kterých často nabývají ionty stabilní elektronové konfigurace:  $4f^0$  ( $\text{Ce}^{\text{IV}}$ ),  $4f^7$  ( $\text{Eu}^{\text{II}}$  a  $\text{Tb}^{\text{IV}}$ ) nebo  $4f^{14}$  ( $\text{Yb}^{\text{II}}$ ). Lanthanoidy řadíme mezi neušlechtilé kovy. Vazby ve sloučeninách  $\text{Ln}^{\text{III}}$  bývají převážně iontové povahy a podobají se v tomto ohledu prvkům 2. skupiny. V porovnání s d-prvky jsou lanthanoidy reaktivnější a sousedící prvky vykazují také větší chemickou podobnost, což v minulosti činilo značné obtíže při jejich objevu a izolaci. Ve vodných roztocích se ionty  $\text{Ln}^{\text{III}}$  chovají jako tvrdé Lewisovy kyseliny a preferují vazby s aniontovými ligandy obsahující vysoce elektronegativní donorové atomy (např. O, F).<sup>10</sup>

Zejména kvůli svým velkým iontovým poloměrům mají lanthanoidy, společně s ostatními prvky vzácných zemin (Sc, Y), v komplexních sloučeninách často vysoká koordinační čísla (KČ). Jelikož je také příspěvek 4f-elektronů ke stabilizaci ligandového pole malý, může docházet v roztocích ke strukturním transformacím koordinačního polyedru (např. oktaedr  $\rightarrow$  trigonální prisma). Stabilitu  $\text{Ln}^{\text{III}}$  komplexů je možno zvýšit použitím chelatujícího ligandu. Účinná komplexace lanthanoidových iontů byla prokázána především u polyaminopolykarboxylátových chelátů, které díky své kinetické inertnosti již dlouhou dobu slouží v praxi jako kontrastní látky pro magnetickou rezonanci.

Typická KČ přechodných prvků a prvků hlavních podskupin jsou 2-6, kdežto nejčastější KČ pro prvky vzácných zemin jsou  $> 6$ , pro lanthanoidy poté zejména 8 a 9. Vzniklé koordinační polyedry sloučenin Ln jsou dány zejména prostorovými požadavky ligandů. Zahrnují trigonální prisma (KČ = 6) a struktury odvozené postupným přidáváním vrcholů nad jeho stěny (KČ 7-9). Pro KČ = 8 poté ještě můžeme odvodit čtvercové antiprisma a dodekaedr pro KČ = 12 (Obrázek 1), známé je také KČ = 16 nebo 10.<sup>11</sup>



Výjimečné spektrální vlastnosti  $\text{Ln}^{\text{III}}$  jsou důsledkem elektronové konfigurace  $[\text{Xe}]4f^n$  ( $n = 1-14$ ), které dávají vzniku široké řadě elektronových hladin, jejichž počet je dán vztahem  $[14!/n!(14 - n)!]$ . Pro  $\text{Eu}^{\text{III}}$  a  $\text{Tb}^{\text{III}}$  tedy vyplývá z tohoto výpočtu 3003 různých hladin. Energie těchto hladin jsou jasně definovány díky chránění 4f orbitalů podslupkami 5s<sup>2</sup> a 5p<sup>6</sup>. Štěpení energetických hladin v důsledku krystalového pole je malé a v tomto směru převládá vliv spin-orbitální interakce, z toho plyne, že jsou ionty  $\text{Ln}^{\text{III}}$  málo ovlivňovány chemickým okolím, což má za následek ostré a snadno rozpoznatelné 4f-4f přechody ve viditelné a blízké IČ oblasti (Tabulka 2). Formálně jsou tyto přechody zakázány Laportovým pravidlem, avšak tento fakt je výhodný z hlediska dlouhé doby existence excitovaných stavů, která dovoluje uplatnit časově rozlišenou detekci, hojně využívanou např. v luminiscenční mikroskopii.



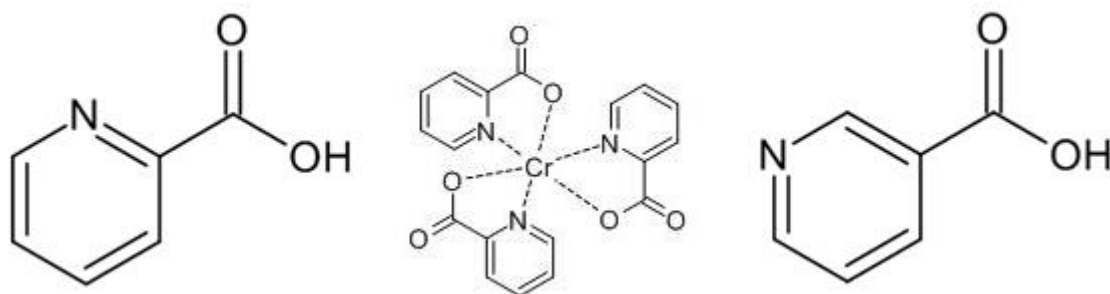
**Obrázek 1:** Strukturální vzorce vybraných komplexních částic s koordinačními čísly 6, 7, 8, 9 a 12 lanthanoidů.<sup>12</sup>

## 2.2 Kyselina pikolinová

Kyselina pikolinová je derivát pyridinu s karboxylovou skupinou na 2. pozici aromatického jádra (Obrázek 2), je isomerní s biologicky podstatně prozkoumanější kyselinou nikotinovou (vitaminem B<sub>3</sub>). Kyselina pikolinová se v lidském organismu nachází v krevním séru, mozkomíšním moku, mateřském mléku, pankreatických šťávách a dalších biologických médiích. Vzniká jako endogenní metabolit L-tryptofanu.<sup>15</sup>

I přes relativně malý objem biologických dat o kyselině pikolinové byla zaznamenána řada jejích neuroprotektivních, imunologických a antiproliferčních účinků, které se však projevují až v milimolárních koncentracích, kdežto fyziologická koncentrace bývá v průměru až milionkrát nižší.<sup>14</sup> Při vysoké koncentraci kyseliny pikolinové (1-4 mM) *in vitro* byla prokázána schopnost selektivní inhibice růstu buněk infikovaných viry HIV nebo Herpes simplex 2.<sup>13</sup> Kyselina pikolinová je také schopna posilovat antimikrobiální účinek vybraných léčiv (clarithromycin, rifampin, fluorochinilony) proti některým bakteriím rodu *Mycobacterium*.<sup>14</sup> Přesné mechanismy těchto účinků nejsou známy, nejpravděpodobněji však souvisí se schopností kyseliny pikolinové chelatovat biologicky důležité ionty jako je Fe<sup>II</sup>.

První zmínka o chelátech Cu<sup>II</sup> a Fe<sup>II</sup> s aniontem kyseliny pikolinové pochází již z roku 1879 od rakouského chemika H. Weidela.<sup>15</sup> Dnes se pikolináty zinečnaté a chromité (Obrázek 2) využívají jako doplňky stravy. U pikolinátu chromitého byl prokázán vliv na hladinu glukosy v krvi a metabolismus lipidů, zdá se tedy být vhodným doplňkem stravy hlavně pro lidi trpící diabetem typu 2. Chelatace Cr<sup>III</sup> pomáhá při jeho absorpci do organismu, která je jinak u volného iontu velmi pomalá.<sup>16</sup>



**Obrázek 2:** Strukturní vzorce kyseliny pikolinové (vlevo), pikolinátu chromitého [Cr(pic)<sub>3</sub>] a kyseliny nikotinové (vpravo).

## 2.3 Optické emisní sondy

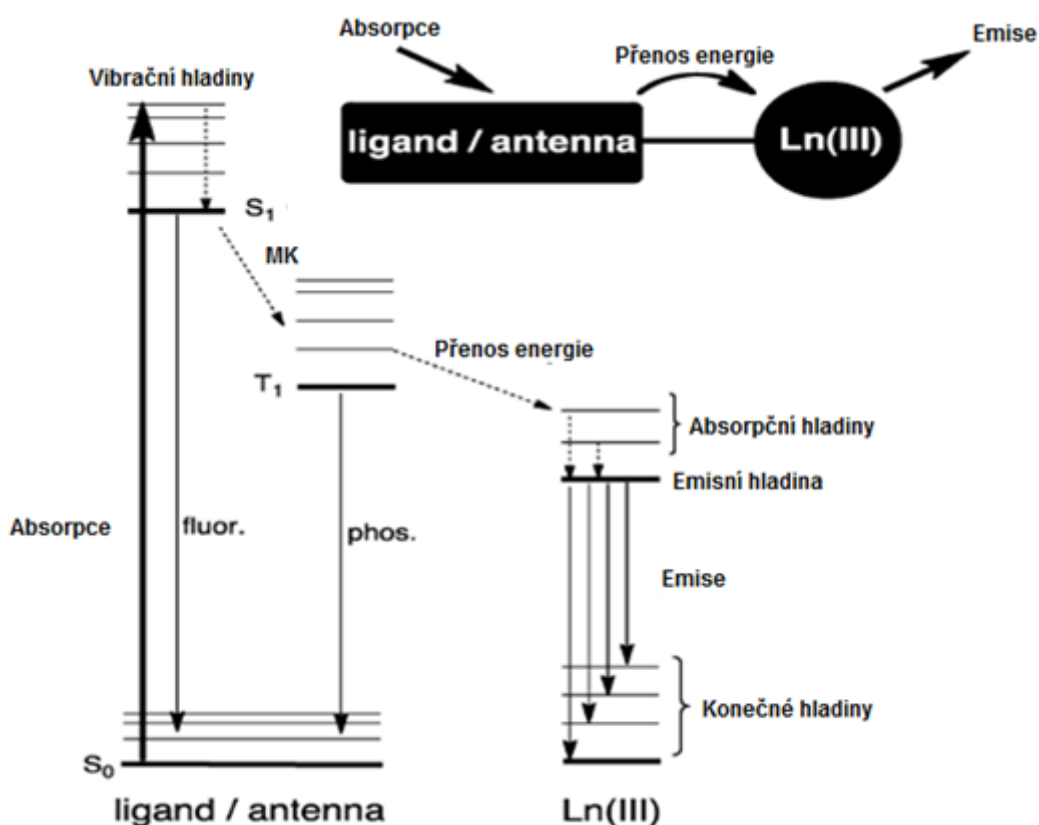
Získávání hlubších poznatků o strukturních a funkčních vlastnostech živých systémů je jedna z hlavních výzev současné medicíny a biologie. Diagnóza a léčba rakovinných onemocnění často vyžaduje individuální přístup, pro který je potřebná lepší a rychlejší patologická analýza, stejně jako vysoce rozlišené zobrazování v reálném čase. Neinvazivní techniky jsou důležité, aby nedocházelo k nadměrnému narušování funkce zkoumaných systémů. Optické emisní sondy (OES) jsou vhodným kandidátem pro toto použití. Podstata luminiscenčních zobrazovacích technik spočívá v emisi záření pomocí luminiscenční sondy zavedené do daného systému po její excitaci fotony o vhodné energii. Emitované záření při použití *in vivo* by mělo mít vlnovou délku  $> 600$  nm, kde absorpce záření tkáněmi je malá a dá se tedy lépe zachytit detekčním zařízením.<sup>17</sup>

Bioluminiscenční sondy jako luciferasa a fluorescentní proteiny, které podávají informace o genové expresi, jsou už dlouhou dobu používány v praxi ke sledování biologické aktivity. Možnost sledovat buňky emitující světlo u malých laboratorních zvířat *in vivo* přináší celou řadu výhod ve farmaceutickém a toxikologickém výzkumu, mezi které patří sledování infekčních chorob, virových onemocnění, růstu tumorů a metastáz, transgenní exprese a toxicity látek. Bioluminiscenční techniky by také měly snížit počet potřebných laboratorních zvířat a zrychlit proces objevu nových léčiv. V porovnání s tradičními způsoby strukturního zobrazování jako magnetická rezonance (MRI) a počítačová tomografie (CT) dovolují luminiscenční zobrazovací systémy sledovat více zvířat najednou, jsou rovněž méně finančně náročné a výrazně zkracují délku vyšetření ( $< 5$  min).<sup>17</sup>

## 2.4 Lanthanoidy jako OES ve fluorescenční mikroskopii

Fluorescenční mikroskopie je velmi používaná a rychle se vyvíjející technika k analýze biologických vzorků. Zatímco elektronová mikroskopie není vhodná na zobrazování živých buněk, nabízí pokrok v hardwaru a softwaru fluorescenční mikroskopie také lepší rozlišení (20-100 nm) oproti ostatním mikroskopickým technikám, které jsou často omezovány Abbeho difrakčním limitem (rozlišení 200-250 nm). Tento pokrok ve fluorescenční mikroskopii byl oceněn Nobelovou cenou za

chemii v roce 2014. Luminiscentní sondy, které jsou komerčně dostupné, zahrnují zejména organické molekuly, fluorescentní proteiny a v poslední době také biokompatibilní kvantové tečky. Mezi klíčové parametry pro popis luminiscence molekuly patří absorpční a emisní vlnové délky ( $\lambda_{abs}$  a  $\lambda_{em}$ ), jejichž rozdíl je znám jako Stokesův posun. Dále pak kvantový výtěžek  $\Phi$ , (poměr emitovaných a absorbovaných fotonů) a pozorovaná doba luminiscence ( $\tau$ ). Nejčastěji má emitovaný foton menší energii než ten absorbovaný ( $\lambda_{abs} < \lambda_{em}$ ). Komplexní sloučeniny na bázi Ln<sup>III</sup> přináší několik výhod vzhledem k ostatním typům luminiscentních látek, mezi které patří zejména dlouhá doba luminiscence  $\tau > 1$  ms a velké Stokesovy posuny.<sup>18</sup> Jelikož jsou 4f-4f přechody, které se uplatňují při luminiscenci Ln<sup>III</sup>, formálně zakázány, využívá se tzv. anténového efektu (Obrázek 3). Vhodnou volbou ligandu je tedy možno docílit přenosu absorbované energie z chromoforu ligandu na centrální atom, který je poté schopen emitovat záření.<sup>19</sup>



**Obrázek 3:** Nahoře: zjednodušené schéma mechanismu senzitivace lanthanoidové luminiscence. Dole: běžný energetický diagram tohoto procesu (fluor. = fluorescence; phos. = fosforescence; MK = mezisystémová konverze).<sup>18</sup>

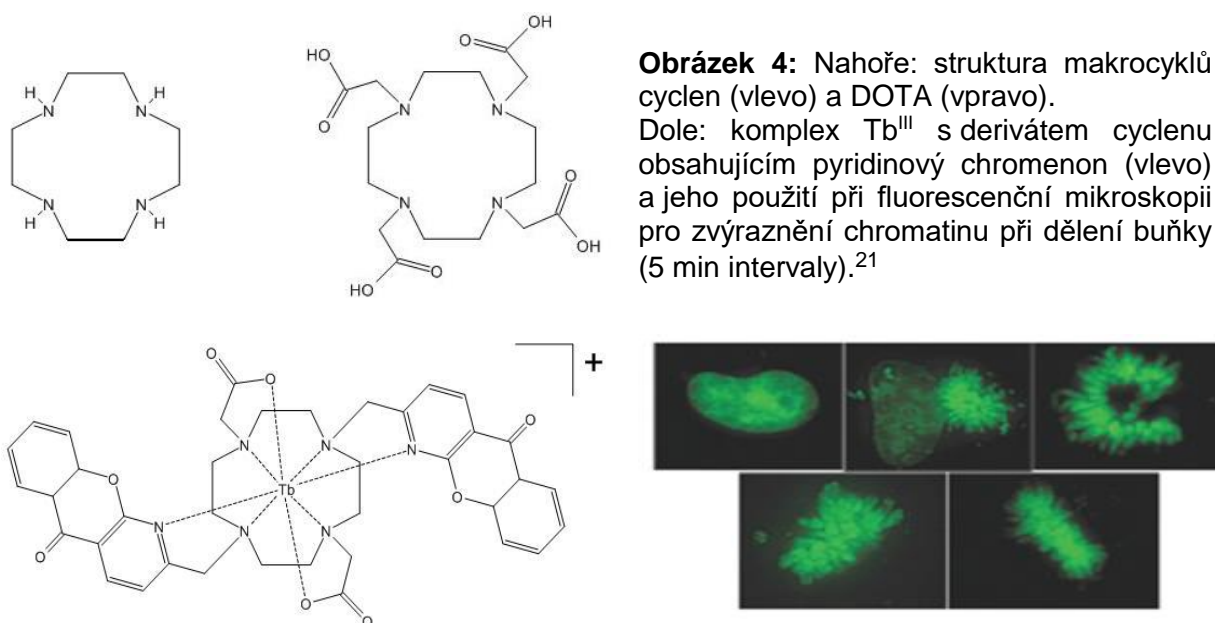
Vlastnosti Ln<sup>III</sup> a organického chromoforu se vhodně doplňují po vytvoření komplexu. Tak například výše zmíněné velké Stokesovy posuny, které jsou důležité pro lepší

rozlišení spekter, se u přímé excitace Ln<sup>III</sup> nevyskytují. Naopak Ln<sup>III</sup> jsou účinné při zhašení tripletového stavu organického ligandu, který často může vést k přeskupení vazeb a zničení fluoroforů (tzv. photobleaching). Vedle 4f-4f přechodů podléhají ionty lanthanoidů ještě přechodům 4f-5d a LMCT (ligand-to-metal charge-transfer), ty však nemají pro biologické aplikace význam, jelikož je jejich energie často příliš vysoká.<sup>20</sup>

**Tabulka 1:** Základní informace o elektronových přechodech při Ln<sup>III</sup> luminiscenci (fosf. = fosforescence, fluor. = fluorescence).<sup>18</sup>

Ln <sup>III</sup>	Základní stav	Emitující stav	Region $\lambda_{em}$	Typ emise
Pr	<sup>3</sup> H <sub>4</sub>	<sup>1</sup> D <sub>2</sub> , <sup>3</sup> P <sub>0</sub>	VIS a NIR	fosf. a fluor.
Nd	<sup>4</sup> I <sub>9/2</sub>	<sup>4</sup> F <sub>3/2</sub>	NIR	fluor.
Sm	<sup>6</sup> H <sub>5/2</sub>	<sup>4</sup> G <sub>5/2</sub>	VIS	fosf.
Eu	<sup>7</sup> F <sub>0</sub>	<sup>5</sup> D <sub>0</sub>	VIS	fosf.
Gd	<sup>8</sup> S <sub>7/2</sub>	<sup>6</sup> P <sub>7/2</sub>	UV	fosf.
Tb	<sup>7</sup> F <sub>6</sub>	<sup>5</sup> D <sub>4</sub>	VIS	fosf.
Dy	<sup>6</sup> H <sub>15/2</sub>	<sup>4</sup> F <sub>9/2</sub>	VIS	fosf.
Ho	<sup>5</sup> I <sub>8</sub>	<sup>5</sup> S <sub>2</sub> , <sup>5</sup> F <sub>5</sub>	VIS a NIR	fluor.
Er	<sup>4</sup> I <sub>15/2</sub>	<sup>4</sup> I <sub>13/2</sub>	NIR	fluor.
Tm	<sup>3</sup> H <sub>6</sub>	<sup>1</sup> D <sub>2</sub> , <sup>1</sup> G <sub>4</sub> , <sup>3</sup> H <sub>4</sub>	VIS	fosf.
Lu	<sup>2</sup> F <sub>7/2</sub>	<sup>2</sup> F <sub>5/2</sub>	NIR	fluor.

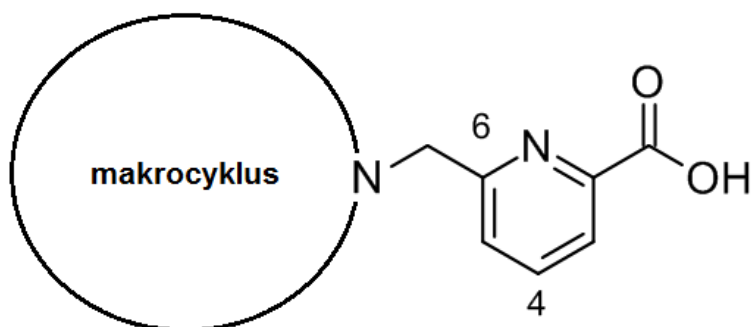
Mezi nejvíce používaná a studovaná luminiscentní činidla patří komplexy Ln<sup>III</sup> s deriváty cyclenu s pedantními rameny, mezi které patří např. DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-octová kyselina) (Obrázek 4).



**Obrázek 4:** Nahoře: struktura makrocyclů cyclen (vlevo) a DOTA (vpravo). Dole: komplex Tb<sup>III</sup> s derivátem cyclenu obsahujícím pyridinový chromenon (vlevo) a jeho použití při fluorescenční mikroskopii pro zvýraznění chromatinu při dělení buňky (5 min intervaly).<sup>21</sup>

## 2.4 Pikolináto komplexy lanthanoidů

Jak již bylo zmíněno v Úvodu, jsou komplexní sloučeniny a nanočástice lanthanoidů dnes intenzivně studovány pro své potencionální využití. Co se ovšem týče pikolináto komplexů  $\text{Ln}^{\text{III}}$ , je výzkum zaměřen na jejich aplikaci v luminiscenčních technikách a jako MRI kontrastní látky. Pokud jde o využívané sloučeniny  $\text{Ln}^{\text{III}}$  v biologických zobrazovacích technikách, jedná se zpravidla o komplexy s lineárními nebo makrocyclickými cheláty, které jsou bohaté na dusík a karboxylátové skupiny. Ligandy pikolináto komplexů poté obsahují tzv. pikolinátová ramena navázaná na dusíkové atomy výchozího ligandu. Kyselina pikolinová mimo své chelatační schopnosti nabízí zejména v poloze 4 pyridinového jádra (Obrázek 5) také možnost funkcionalizace (navázání molekul, makromolekul nebo nanočástic), která by mohly vést ke vzniku specifické sondy (pro MRI i luminiscenci) na vybrané tkáni, orgány nebo dokonce biochemické procesy na molekulární úrovni.

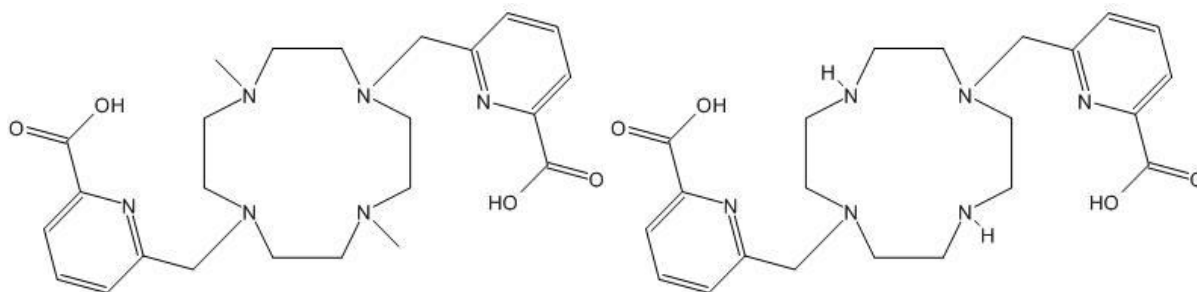


**Obrázek 5:** Schéma makrocyclického ligandu s pikolinátovým ramenem.

Navrhovaný komplex, jako luminiscenční sonda, by měl splňovat několik základních kritérií, mezi které patří 1) rozpustnost ve vodě (fyziologickém prostředí), 2) přítomnost chromoforů, schopných přenosu energie na centrální atom (anténový efekt, (Obrázek 3), 3) vysoká termodynamická a kinetická stabilita komplexu, 4) ochrana  $\text{Ln}^{\text{III}}$  od chemického okolí z důvodu minimalizace zhášecích vlivů na luminiscenci, 5) dlouhá doba existence excitovaných stavů pro časově rozlišené zobrazování a 6) přítomnost vhodných skupin k funkcionalizaci.

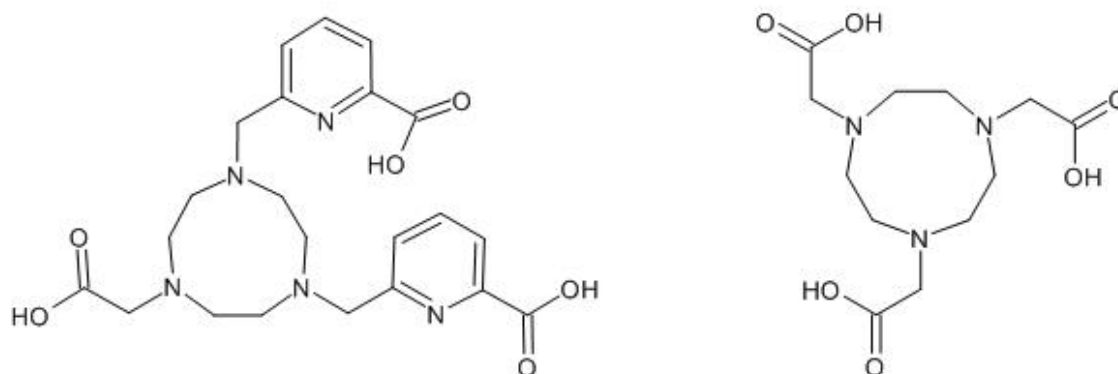
Připraveno bylo již mnoho pikolináto komplexů, z nichž většina obsahuje makrocyclické ligandy. Mezi připravené ligandy odvozené od cyclenu patří  $\text{H}_2\text{DODPA}$  a methylovaný derivát  $\text{H}_2\text{Me-DODPA}$ , oba obsahující 2 pikolinátová ramena (Obrázek 6). Pomocí rentgenové strukturní analýzy  $[\text{Yb}(\text{DODPA})](\text{PF}_6)\cdot\text{H}_2\text{O}$  bylo

určeno, že je ligand navázaný na centrální kov 8 donorovými atomy za vzniku čtvercově-antiprizmatického komplexu. Studované komplexy DODPA<sup>2-</sup> s Tb<sup>III</sup> a Eu<sup>III</sup> obsahovaly 1 molekulu vody ve vnitřní koordinační sféře, na rozdíl od komplexů s ligandem H<sub>2</sub>Me-DODPA, které vodu neobsahovaly.<sup>22</sup>



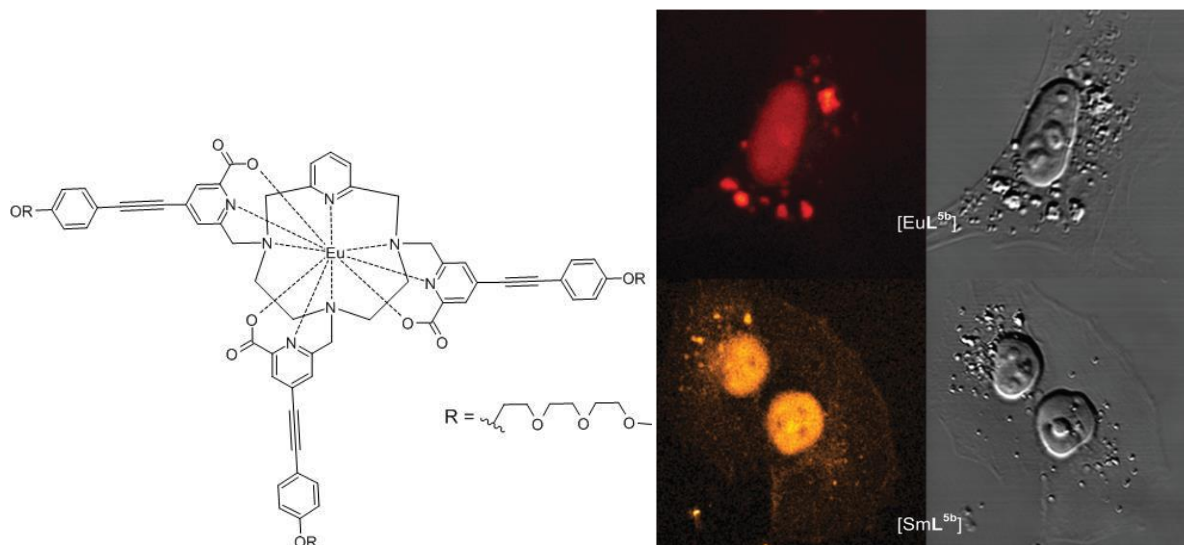
**Obrázek 6:** Strukturální vzorce ligandů H<sub>2</sub>DODPA (vlevo) a H<sub>2</sub>Me-DODPA (vpravo).<sup>22</sup>

Připraven byl také potenciálně oktadentátní ligand H<sub>3</sub>bpatcn (Obrázek 7) odvozený od 1,4,7-triazacyklononanu sestávající z jednoho acetátového a dvou pikolinátových ramen navázaných na atomy dusíku. Potenciometrické studie ukázaly na zvýšenou stabilitu Gd<sup>III</sup> komplexu s H<sub>3</sub>bpatcn ( $\log K_{GdL} = 15.8(2)$ ) oproti strukturálně analogickému Gd<sup>III</sup> komplexu s kyselinou 1,4,7-triazacyklononan-*N,N',N''*-trioctovou (H<sub>3</sub>nota) ( $\log K_{GdL} = 13.7$ ). Kromě zvýšené stability vykazoval komplex s H<sub>3</sub>bpatcn také zlepšení selektivity pro Gd<sup>III</sup> oproti Ca<sup>II</sup>. Ligand H<sub>3</sub>bpatcn je také schopen tvorby komplexu s Tb<sup>III</sup> obsahující molekulu vody ve vnitřní koordinační sféře. Tento komplex vykazuje silnou a dlouhotrvající luminiscenci ( $\Phi = 43\%$ ). Výše zmíněné ligandy se koordinují v deprotonované formě jako bpatcn<sup>3-</sup> a nota<sup>3-</sup> za vzniku neutrálních komplexů. Ligand bpatcn<sup>3-</sup> se na ion Ln<sup>III</sup> váže pomocí všech pěti atomů dusíku a jednoho atomu kyslíku z každé karboxylátové skupiny, celkem tedy osmi atomy.<sup>23</sup>



**Obrázek 7:** Strukturální vzorce ligandů H<sub>3</sub>bpatcn (vlevo) a H<sub>3</sub>nota (vpravo).<sup>23</sup>

Mezi další doposud připravené pikolináto komplexy patří i tento pyclenový derivát s pracovním názvem L<sup>5b</sup>, u kterého autoři ukázali i jeho praktické využití při luminiscenční mikroskopii (Obrázek 9). Z důvodu přítomnosti oligoethylenových fragmentů nebylo možné získat vhodné krystaly pro rentgenovou difrakci.<sup>24</sup>

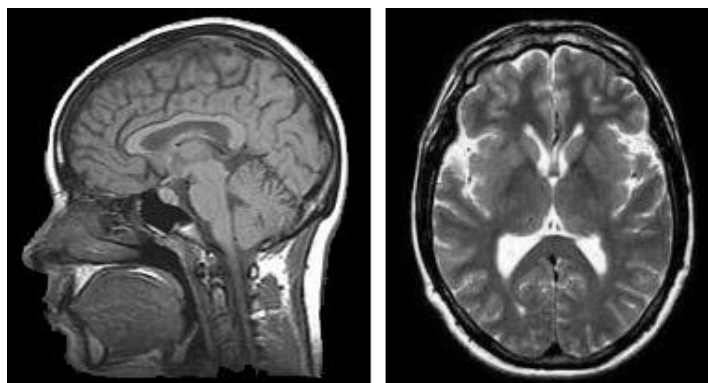


**Obrázek 9:** Struktura komplexu [EuL<sup>5b</sup>] (vlevo) a záběry luminiscenční mikroskopie T24 buněk za použití [EuL<sup>5b</sup>] a [SmL<sup>5b</sup>] (vpravo).<sup>24</sup>

## 2.5 Diagnostická metoda: magnetická rezonance

Vyšetření magnetickou rezonancí (MRI – magnetic resonance imaging) má velkou výpovědní hodnotu, je neinvazivní a dají se zobrazit všechny anatomické celky včetně cév, mozku, srdce a dalších orgánů často ve spojitosti s lokalizací nádorů nebo cévních malformací (Obrázek 10). Při vyšetření magnetickou rezonancí se pacientovi podává kontrastní látka, a to buď ústně, nebo častěji intravenózně, jejím úkolem je usnadňovat relaxaci excitovaných jader <sup>1</sup>H za vyzařování fotonů, pomocí kterých je poté počítačem sestaven diagnostický obraz. Jelikož jsou hlavním zdrojem <sup>1</sup>H jader v živých organismech voda a lipidy, dostáváme v podstatě informaci o jejich koncentraci ve studované tkáni. V oblastech, jako moderní neurochirurgie, je magnetická rezonance prakticky nenahraditelná. Obrázek 11 ukazuje operační sál v Ústřední vojenské nemocnici v Praze, který je přímo spojen MRI vyšetřovnou, kde se provádí intraoperační MRI pro zhodnocení dalšího postupu v průběhu operace. Kromě klasické magnetické rezonance existují i další druhy této techniky např. funkční magnetická rezonance, která dokáže zobrazit aktivitu neuronů pomocí přirozeného kontrastního činidla- deoxyhemoglobinu.<sup>25</sup>





**Obrázek 10:** Diagnostický obraz zdravého mozku získaný pomocí magnetické rezonance (2 různé řezy).<sup>26</sup>



**Obrázek 11:** Operační sál spojen s vyšetřovnou pro intraoperační MRI pomocí speciálních kolejí. Neurochirurgické oddělení v Ústřední vojenské nemocnici v Praze, Střešovicích.<sup>27</sup>

Magnetická rezonance (MRI) společně s počítačovou tomografií (CT) jsou dvě nejučinnější zobrazovací techniky, které se ve zdravotnických zařízeních rutinně používají. Obě tyto metody dokážou poskytnout obraz s kvalitním detailem. Porovnání několika zobrazovacích metod shrnuje Tabulka 2. Zjevnými nedostatky MRI jsou zejména její časová a finanční náročnost.

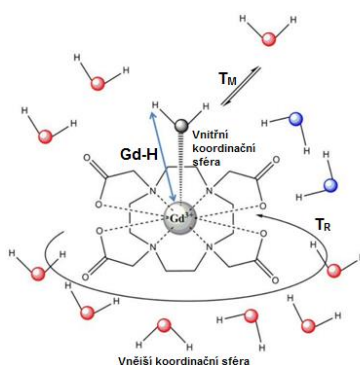
**Tabulka 2:** Porovnání různých zobrazovacích technik.<sup>18</sup>

Technika	Rozlišení	Hloubka měření	Časová náročnost	Kontrastní látka	Hlavní cíl zobrazování
MRI	50- 100 $\mu\text{m}$	Bez limitu	min- h	Gd, Dy, $\text{Fe}_n\text{O}_m$	Univerzální
CT	50 $\mu\text{m}$	Bez limitu	min	Jod	Plíce a kosti
Ultrazvuk	50 $\mu\text{m}$	cm	min	Mikrobuliny	Cévy a při zákrocích
PET	1 - 2 mm	Bez limitu	min	$^{18}\text{F}$ , $^{11}\text{C}$ , $^{15}\text{O}$	Univerzální
SPECT	1 - 2 mm	Bez limitu	min	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ , $^{111}\text{In}$	Značené protilátky
Fluorescenční mikroskopie	nm	mm	s	Fluorofory	Práce s buňkami

## 2.6 MRI konstantní látky na bázi gadolinia

Kontrastní látky na bázi gadolinia (GdKL) zkracují tzv.  $T_1$  relaxační čas, tedy návrat excitovaného jaderného spinu  $^1\text{H}$  do energeticky nižšího stavu. Účinnost konstantní látky je dána její relaxivitou, která je mírou rychlosti relaxace protonů vztažená na milimolární koncentraci kovového iontu. Relaxaci protonů usnadňuje přítomnost proměnlivého magnetického pole. Ion  $\text{Gd}^{\text{III}}$  se svými 7 nepárovými elektrony, a tedy celkovým spinem  $S = 7/2$ , je vhodným zdrojem takového pole, z tohoto důvodu jsou používány jako kontrastní látky také sloučeniny jiných kovů jako Mn nebo Fe. Relaxaci rovněž urychluje koordinace vody na  $\text{Gd}^{\text{III}}$ , proto je žádané, aby kontrastní látka měla alespoň jedno volné místo ve vnitřní koordinační sféře a vzdálenost Gd–H byla co nejmenší (Obrázek 12). Mezi další důležité parametry účinnosti kontrastního činidla patří rotační korelační čas  $T_R$  (otočení molekuly v roztoku o jeden radián za sekundu) a rezidenční čas molekuly vody ve vnitřní koordinační sféře centrálního atomu  $T_M$ .

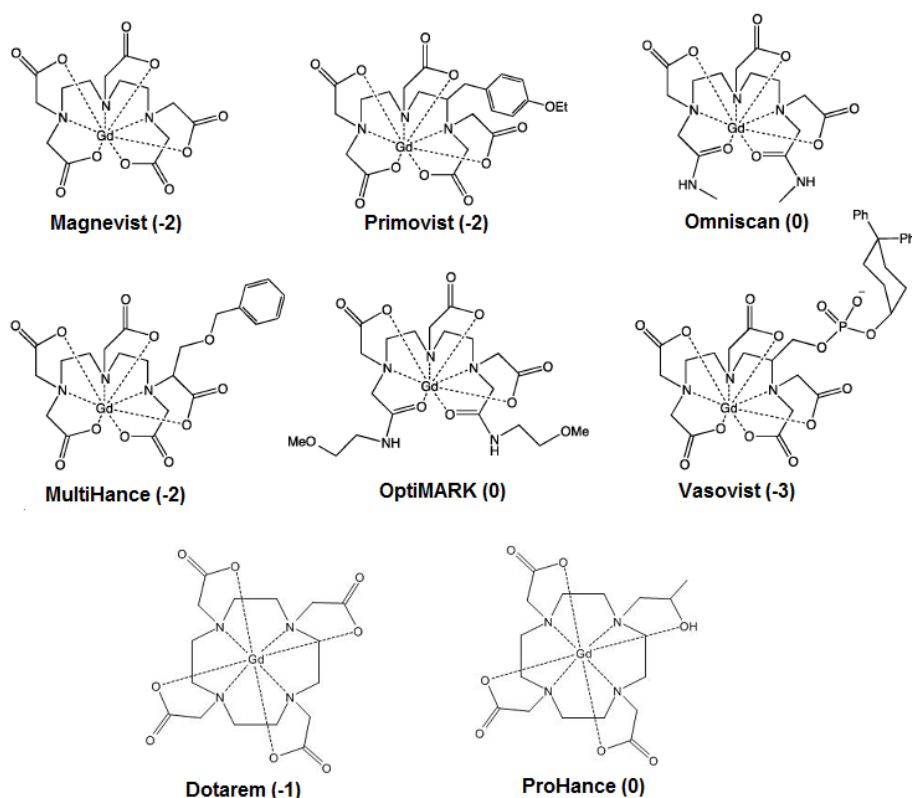
Aminokarboxylátové nebo polyaminokarboxylátové cheláty  $\text{Gd}^{\text{III}}$  jsou nejpoužívanější kontrastní látky při zobrazování pomocí magnetické rezonance (Obrázek 13). Kontrastní činidlo na bázi  $\text{Gd}^{\text{III}}$  musí pro aplikaci v humánní medicíně splňovat také bezpečnostní požadavky. Použitý komplex musí vykazovat vysokou termodynamickou a hlavně kinetickou stabilitu ve fyziologickém prostředí, aby nedocházelo k uvolňování toxického  $\text{Gd}^{\text{III}}$ . Z tohoto důvodu by měl také vybraný ligand selektivně chelatovat  $\text{Gd}^{\text{III}}$  vůči endogenním kovovým iontům jako jsou  $\text{Ca}^{\text{II}}$ ,  $\text{Zn}^{\text{II}}$  nebo  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Makrocyclické cheláty jsou zpravidla stabilnější, než ty lineární, a uvolňování toxického  $\text{Gd}^{\text{III}}$  je u nich pomalejší (viz 2.7).



**Obrázek 12:** Znárodnění důležitých parametrů GdKL.  $T_M$  = rezidenční čas molekuly vody koordinované na  $\text{Gd}^{\text{III}}$ ;  $T_R$  = rotační korelační čas GdKL; Gd–H: vzdálenost vodíku koordinované vody a  $\text{Gd}^{\text{III}}$ .

## 2.7 Nebezpečí spojené s používáním GdKL

Ačkoliv jsou kontrastní látky na bázi gadolinia (v doporučených dávkách) již dlouho považovány za bezpečné, objevila se v posledních letech řada studií, které popisují jejich negativní vliv, často v souvislosti s ukládáním gadolinia v různých tkáních. V nejzávažnějších případech se může u pacienta po podání GdKL vyskytnout vzácné onemocnění, nefrogenní systémová fibróza (NFS), které způsobuje zjizvení a náhradu funkčních tkání pojivem. Postižena bývá především kůže, pohybový aparát a někdy také vnitřní orgány. NFS postihuje zejména pacienty s poškozenou funkcí ledvin a může vyústit až v smrt. Za původ NSF je považováno uvolňování  $Gd^{III}$  z kontrastních látek.<sup>28</sup> Tabulka 3 shrnuje údaje o výskytu NSF po použití komerčních GdKL v EU,<sup>29</sup> na Obrázku 13 je znázorněná jejich struktura a náboj komplexní částice. Z uvedených údajů vyplývá, že GdKL, které obsahují makrocyclický ligand mají mnohem větší kinetickou stabilitu, než ostatní GdKL.



**Obrázek 13:** Strukturální vzorce diskutovaných GdKL s jejich nábojem v závorce.<sup>18</sup>

Podle Evropské lékové agentury (EMA – European Medicines Agency) se dají tyto vybrané GdKL rozdělit do 3 kategorií podle rizika výskytu NSF: <sup>29</sup>

### 1) Vysoké riziko:

a) Lineární nenabité cheláty: OptiMARK, Omniscan

b) Lineární iontové cheláty: Magnevist

### 2) Střední riziko:

Lineární iontové cheláty: Vasovist, Primovist, MultiHance

### 3) Nízké riziko:

Makrocyclické cheláty: Dotarem, ProHance

**Tabulka 3:** Diskutované GdKL a jejich souvislost s výskytem NSF.<sup>29</sup>

Kontrastní látka	Případy NSF	Počet dávek (milióny)	Počet případů NSF na milion dávek	Stabilita (log K) <sup>30</sup>	Poločas disociace
Omniscan	438	47	9,3	16,8	30 s
OptiMARK	7	0,8	8,8	16,8	
Magnevist	135	95	1,4	22,2	10 min
MultiHance	0	6	0	22,6	
Primovist	0	0,15	0		
Vasovist	0	0,05	0		
Gadovist	1	2,6	0,4		
ProHance	1	12,3	0,1	23,8	3 h
Dotarem	1	22,4	0	25,6	338 h

NSF není jediné onemocnění, které GdKL mohou způsobovat. Tabulka 4 obsahuje vybrané studie, ve kterých byly zaznamenány další negativní dopady toxicity gadolinia, které se netýkají jen ledvin, ale i nervové soustavy, slinivky břišní a jater.

**Tabulka 4:** Zaznamenané následky toxicity vyvolané GdKL kromě NSF.

Následky toxicity	Typ studie	Předmět studie
Nekróza a apoptóza <sup>31</sup>	In vitro	Renální tubuly
Nefrotoxicita (zpomalení glomerulární filtrace) <sup>32</sup>	In vivo	Prasata
Nefrotoxicita (akutní nekróza renálních tubulů) <sup>33</sup>	Případová studie	Člověk
Hematotoxicita (snížení počtu bílých krvinek) a hepatotoxicita (vakuolární destrukce, dezorganizace architektury jater) <sup>34</sup>	In vivo	Myši
Pankreatitida <sup>35</sup>	Případová studie	Člověk
Neurotoxicita (ataxie, tremor, poškození kalózního tělesa a krvácení) <sup>36</sup>	In vivo	Krasy
Neurotoxicita (encefalopatie) <sup>37</sup>	Případová studie	Člověk

Možný negativní vliv GdKL na zdraví pacienta hrozí zejména při podstoupení opakovaných MRI vyšetření a při vyšetřeních, která používají vyšší dávky GdKL jako jsou MRI srdce a většina kontrastních angiografií.<sup>38</sup> Pravidelná vyšetření bývají

prováděna zejména u pozorování mozkových nádorů, kdy se operativní zákrok jeví příliš rizikový a nádor nezpůsobuje pacientovi závažné problémy.

Akumulace gadolinia v různých tkáních je, i přes normální funkci ledvin subjektů, dokumentována jak u laboratorních zvířat, tak i u lidí. Krysy vystavované opakovaným dávkám lineárních GdKL vykazovaly hromadění gadolinia v mozečku ve větší míře, než krysy, kterým byly podávány makrocyclické GdKL.<sup>39</sup> Nekropsie mozkových tkáních lidí, kteří byli vystaveni GdKL bez diagnózy poškození ledvinové funkce, ukázala na akumulaci gadolinia v mozku, a to zejména v mozečku (nucleus dentatus) a bazálních gangliích (globus pallidus).<sup>40</sup> Gadolinium je ve zmíněných studiích detekováno pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS – inductively coupled plasma mass spectrometry). Akumulace v těchto tkáních je také patrná při nekontrastní MRI, kdy tyto části mozku vykazují zvýšenou intenzitu signálu.<sup>41</sup>

Mezi navrhované mechanismy toxicity gadolinia patří indukce apoptózy a oxidačního stresu,<sup>42</sup> dále např. transmetalace,<sup>43</sup> a hlavně kompetice  $Gd^{III}$  s  $Ca^{II}$  v buněčných procesech.<sup>44</sup> Vznik fibrotických projevů je spojován se stimulací exprese a následného uvolňování cytokinů (nebo chemokinů), které jsou za vývoj fibrózy tkání zodpovědné.<sup>45,46</sup> Negativních vlivů, které jsou spojovány s uvolňováním  $Gd^{III}$  z jeho chelátů, existuje mnoho a i v tomto odvětví by tedy mohly pomoci nové a stabilnější komplexní sloučeniny.

### 3. Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše týkající se komplexů lanthanoidů s vybranými ligandy s pikolinátovými rameny a jejich využití v medicíně (MRI zobrazovací technice) a biologických vědách.
2. Příprava navrženého makrocyclického ligandu a případná příprava komplexů s Gd (III) a Dy (III).
3. Charakterizovat připravený ligand pomocí vhodných analytických metod ve spolupráci s vedoucím práce a dalšími pracovníky Katedry anorganické chemie PřF UP v Olomouci.

## 4. Praktická část

### 4.1 Seznam použitých chemikálií

Při syntézách byly použity chemikálie z komerčních zdrojů (Tabulka 5) a takéž prekurzory (dimethylester kyseliny pyridin-2,6-dikarboxylové; methylester kyseliny 6-hydroxymethylpyridin-2-karboxylové; methylester kyseliny 6-chloromethylpyridin-2-karboxylové a 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>), připraveny pomocí modifikovaných postupů z literatury. Makrocyclický ligand (15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) nebyl v rámci práce připravován. Byl získán od RNDr. Bohuslava Drahoše, Ph.D., resp. Mgr. Petera Antala, Ph.D. Čistota prekurzorů byla ověřena pomocí elementární analýzy a <sup>1</sup>H NMR spektroskopie. Diskutované látky jsou v textu popisovány pomocí přiřazených označení v Obrázcích 14 a 15.

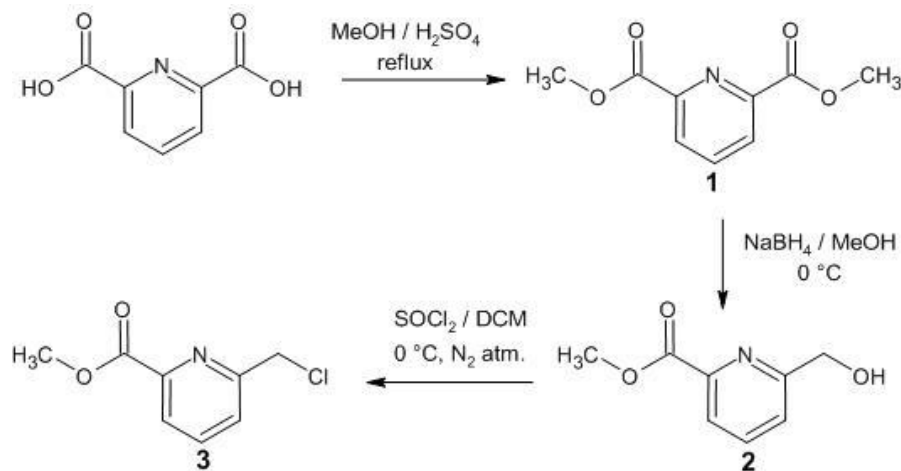
**Tabulka 5:** Seznam použitých komerčních chemikálií.

Název sloučeniny	CAS číslo	Čistota (%)	Výrobce
kyselina pyridin-2,6-dikarboxylová	499-83-2	99	Fischer Scientific
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	775-7-82-6	p.a.	Lach-Ner
NaBH <sub>4</sub>	16940-66-2	94,8	AGRECYCLING
NaHCO <sub>3</sub>	144-55-8	p.a.	Fluka
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	497-19-8	p.a.	Lach-Ner
MgSO <sub>4</sub>	7487-88-9	p.a.	Lach-Ner
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (w = 96%)	7664-93-9	p.a.	Lach-Ner
HCl (w = 37%)	7647-01-0	p.a.	VWR
SOCl <sub>2</sub>	7719-09-7	99,7	Acros Organics
Aceton	67-64-1	p.a.	VWR
Ethylacetát	141-78-6	p.a.	Lach-Ner
Acetonitril	75-05-8	p.a.	Lach-Ner
Toluen	108-88-3	p.a.	Sigma-Aldrich
Dichloromethan	75-09-2	p.a.	Sigma-Aldrich
Chloroform	67-66-3	p.a.	Lach-Ner
<i>N,N</i> -diisopropylethylamin	7087-68-5	p.a.	Sigma-Aldrich
KI	7681-11-0	p.a.	Penta

### 4.2 Příprava pikolinátového ramena

Příprava prekurzoru pikolinátového ramena (methylester kyseliny 6-chloromethylpyridin-2-karboxylové) byla tříkroková syntéza. V prvním kroku byl připraven esterifikací kyseliny dipikolinové její dimethylester, který byl následně v dalším kroku částečně redukován za vzniku asymetrického methylesteru kyseliny 6-hydroxy-

methylpyridin-2-karboxylové. V posledním kroku byl pomocí chloridu thionylu připraven methylester kyseliny 6-chloromethylpyridin-2-karboxylové (Obrázek 14).



**Obrázek 14:** Reakční schéma přípravy pikolinátového ramena.

#### 4.2.1 Dimethylester kyseliny pyridin-2,6-dikarboxylové (1).

50,57 g (0,3 mol) kyseliny pyridin-2,6-dikarboxylové bylo rozpuštěno ve směsi 250 ml methanolu a 10 ml 96% kyseliny sírové. Reakční směs byla refluxována po dobu 24 hodin. Po ochlazení na ledové lázni se produkt vyloučil v podobě bezbarvé krystalické látky, která byla odfiltrována a promyta ledovým methanolem. Bylo získáno 52,31 g (88,6 %) bílé krystalické látky 1.

C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>: vypočítané elementární zastoupení: C: 55,39 %, H: 4,65 %, N: 7,18 %.  
Nalezené: C: 55,34 %, H: 4,62 %, N: 7,00 %.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,34 (d, 2H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 7,83 Hz); 8,09 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,83 Hz); 4,04 (s, 6H).

#### 4.2.2 Methylester kyseliny 6-hydroxymethylpyridin-2-karboxylové (2).

Roztok 6,15 g (32 mmol) 1 ve 150 ml methanolu byl vychlazen na ledové lázni. Za stálého míchání a chlazení bylo do roztoku postupně přidáno 2,07 g (55 mmol) NaBH<sub>4</sub> (v průběhu 1 hodiny). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 20 hodin a poté zahuštěna na RVO na přibližný objem 30 ml. Následně bylo přidáno 100 ml nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub> a tato směs byla extrahována 5 x 50 ml CHCl<sub>3</sub>. Organická fáze byla sušena pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrována a odpařena do sucha na RVO. Surový produkt sestával ze směsi 1 a 2, která byla dále separována sloupcovou chromatografií (silikagel, DCM/acetón 10:1). Po eluci 1 byla mobilní fáze vyměněna za methanol a poté byla sbíraná frakce s 2. Bylo získáno 2,39 g (45,4 %) bílé krystalické látky 2 (*R<sub>f</sub>* = 0,5; silikagel-TLC destička/ethylacetát).



C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>: vypočítané elementární zastoupení: C: 57,48 %, H: 5,43 %, N: 8,38 %.

Nalezené: C: 57,11 %, H: 5,40 %, N: 8,23 %.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,03 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 8,29 Hz); 7,85 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,78 Hz); 7,55 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 8,15 Hz); 4,87 (s, 2H); 3,99 (s, 3H).

#### 4.2.3 Methylester kyseliny 6-chloromethylpyridin-2-karboxylové (3).

Roztok 3,98 g (21 mmol) **2** v 60 ml DCM byl vychlazen na ledové lázni a do reakční nádoby byl zaváděn plynný dusík. Za stálého chlazení a pod atmosférou N<sub>2</sub> bylo přidáno 12 ml (164 mmol) SOCl<sub>2</sub>. Reakční směs byla míchána po dobu 1 hodiny na ledové lázni. Zaváděným dusíkem bylo urychleno odpaření DCM při laboratorní teplotě. Vzniklá nažloutlá kašovitá hmota poté byla rozsuspendována v 50 ml toluenu a po přidavku 50 ml nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub> byla extrahována 3 x 50 ml toluenu. Organická fáze byla sušena pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrována a odpařena do sucha na RVO. Produkt byl šedá tuhá látka o hmotnosti 4,27 g (96,62 %).

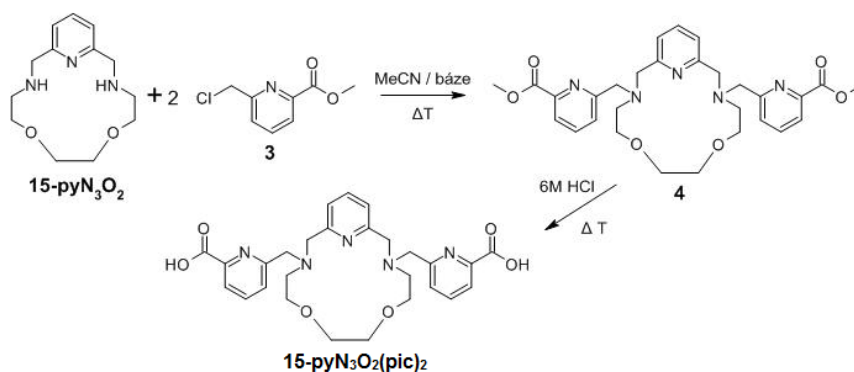
C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>Cl: vypočítané elementární zastoupení: C: 51,77 %, H: 4,34 %, N: 7,55 %.

Nalezené: C: 52,00 %, H: 4,30 %, N: 7,16 %.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,10 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 7,90 Hz); 7,91 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,75 Hz); 7,75 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 7,56 Hz); 4,79 (s, 2H); 4,02 (s, 3H).

### 4.3 Syntéza 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>(pic)<sub>2</sub>

Příprava ligandu 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>(pic)<sub>2</sub> je dvoukroková syntéza (Obrázek 15). V prvním kroku dochází k *N*-alkylaci 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> pomocí methylesteru kyseliny 6-chloromethylpyridin-2-karboxylové (**3**) a ve druhém kroku následuje hydrolýza esterových skupin produktu **4** za vzniku 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>(pic)<sub>2</sub>.



Obrázek 15: Reakční schéma syntézy 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>(pic)<sub>2</sub>.

V průběhu pokusů o přípravu ligandu byly studovány různé reakční systémy, které se navzájem odlišovaly použitou bazí ( $K_2CO_3$ ,  $Na_2CO_3$ , diisopropylethylamin), přítomností jodidu draselného jako katalyzátoru nebo reakčními podmínkami (teplota, koncentrace reaktantů). Následující postup syntézy ligandu byl nejúčinnější.

240,3 mg (0,956 mmol) 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> bylo rozpuštěno v 20 ml acetonitrilu a po přidavku 0,52 g (4,91 mmol)  $Na_2CO_3$  byla reakční směs ponechána míchat při laboratorní teplotě 30 minut. Poté byl za stálého míchání, v průběhu 20 minut, do reakční směsi po kapkách přidán roztok 356 mg (1,92 mmol) **3** v 10 ml acetonitrilu. Tato reakční směs byla míchána při teplotě 50 °C po dobu 48 hodin. Reakční směs byla poté odfiltrována a filtrát odpařen do sucha na RVO za vzniku žlutého oleje. Produkt byl rozpuštěn ve 30 ml DCM a bylo přidáno 20 ml H<sub>2</sub>O. Vodní fáze byla extrahována 3x 50 ml DCM. Spojené organické extrakty byly vysušeny nad  $MgSO_4$ , odfiltrovány a filtrát byl opět odpařen do sucha na RVO.

Surový produkt byl následně hydrolyzován pomocí 6M roztoku HCl (24 h, 50 °C). Roztok kyseliny byl poté odpařen za vzniku viskózního žlutého oleje o hmotnosti 0,5430 g 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>(pic)<sub>2</sub> odpovídající výtěžku 95,5 % (za předpokladu zisku ligandu ve formě dihydrochloridu).

#### 4.4 Použité analytické metody

Složení a čistota připravených prekurzorů a získaných produktů byla stanovena pomocí elementární analýzy, hmotnostní spektrometrie a NMR spektroskopie.

Elementární analýza byla vykonána na přístroji Flash 2000 CHNO-S Analyzer (Thermo Scientific, Waltham, USA).

Hmotnostní spektra vzorků byla získána pomocí hmotnostního spektrometru LCQ Fleet Ion Mass Trap s ionizací elektrosprejem a trojrozměrnou iontovou pastí (Thermo Fisher, Waltham, USA).

NMR spektra vzorků byla měřena na spektrometrech JNM-ECA 600 II NMR (JEOL, Tokyo, Japonsko) s rezonanční frekvencí 600 MHz pro <sup>1</sup>H (150,86 MHz pro jádra <sup>13</sup>C) a Varian 400 MHz (Varian, Palo Alto, USA) s rezonanční frekvencí 399,95 MHz pro <sup>1</sup>H (100,60 MHz pro jádra <sup>13</sup>C). Spektra byla měřena při teplotě 25 °C s použitím deuterovaného chloroformu (CDCl<sub>3</sub>-d), který obsahoval přídavek tetramethylsilanu

(TMS;  $V/V = 0,05$ ,  $\delta = 0,00$  ppm) s reziduálním signálem  $\delta = 7,26$  ppm ( $^1\text{H}$  spektra). Při měření byla použita, jako rozpouštědlo, také těžká voda ( $\text{D}_2\text{O}$ , reziduální signál,  $\delta = 4,75$  ppm). Získaná spektra byla zpracována v programu ACD 1D Processor (verze 12.01).<sup>47</sup>

Průběh chemických reakcí byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie na TLC destičkách Macherey-Nagel SIL G/UV<sub>254</sub> s UV detekcí.

Na pročištění surových produktů syntéz byla použita sloupcová chromatografie za použití silikagelu Acros Organics Silica gel (mesh 60-200  $\mu\text{m}$ , velikost pórů 60 Å). Při iontové výměnné chromatografii byl použit kationtově výměnný iontoměnič Amberlyst 15 (H-forma) a aniontově výměnný iontoměnič DOWEX 1X8 (OH-forma).

## 5. Výsledky a diskuze

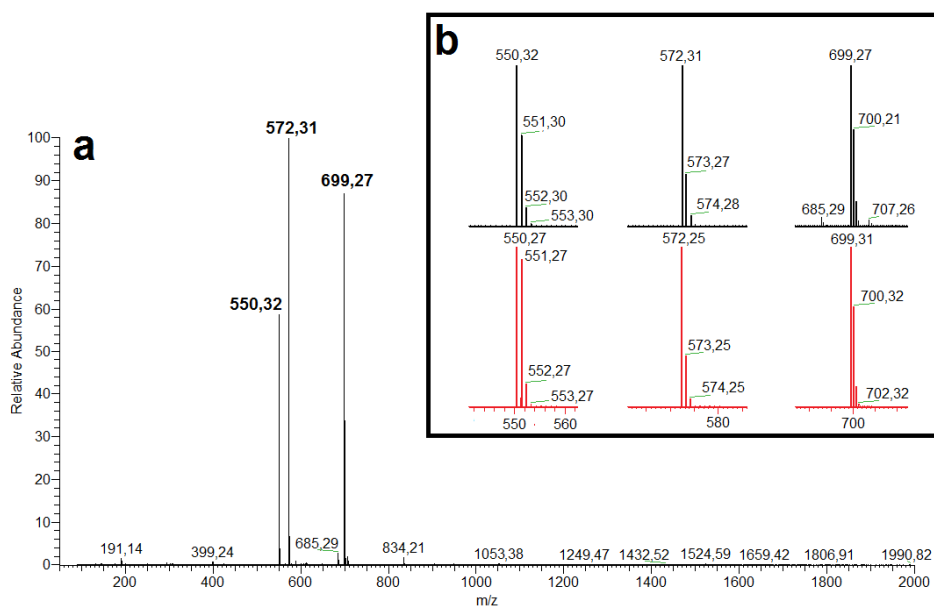
Předložená bakalářská práce byla věnována vypracování rešerše na téma pikolináto komplexů lanthanoidů a studiu přípravy 15-členného makrocyclického pyridinového ligandu se dvěma pikolinátovými rameny ( $15\text{-pyN}_3\text{O}_2(\text{pic})_2$ ). Součástí práce byla syntéza prekursoru (methylester kyseliny 6-chloromethylpyridin-2-karboxylové) na přípravu ligandu. Jednalo se o tříkrokovou syntézu, jejímž prvním krokem byla esterifikace kyseliny pyridin-2,6-dikarboxylové za vzniku jejího dimethylesteru. Částečnou redukcí tohoto esteru ve druhém kroku vznikl methylester kyseliny 6-hydroxymethylpyridin-2-karboxylové, jehož chlorace byla posledním krokem přípravy prekursoru.

Kritickým krokem se ukázala být příprava methylesteru kyseliny 6-hydroxymethylpyridin-2-karboxylové. Napříč tomu, že se jedná o látku, jejíž syntéza již byla publikována, postup uvedený v literatuře nebylo možné uspokojivě reprodukovat. Produktem byla směs obsahující žádaný methylester kyseliny 6-hydroxymethylpyridin-2-karboxylové, 2,6-dihydroxymethylpyridin a výchozí dimethylester kyseliny dipikolinové v různých poměrech. Byla proto vykonána série pokusů o jeho přípravu, při kterých byly měněny reakční podmínky a vzájemné látkové poměry reaktantů. Nejvyšší výtěžnost kýženého produktu byla dosažena při vzájemném poměru látkových množství reaktantů: dimethylester kyseliny pyridin-2,6-dikarboxylové a  $\text{NaBH}_4 = 3$  ku  $5$  a mícháním po posledním přidavku  $\text{NaBH}_4$  minimálně po dobu 20 h. Pro jednodušší separaci produktů bylo důležité, aby v získané směsi nebyl přítomný 2,6-dihydroxymethylpyridin, který vzniká redukcí obou esterových skupin. Produkt obsahující směs methylesteru kyseliny 6-hydroxymethylpyridin-2-karboxylové a dimethylesteru kyseliny dipikolinové je poté možno snadno oddělit pomocí sloupcové chromatografie.

Příprava samotného makrocyclického ligandu  $15\text{-pyN}_3\text{O}_2(\text{pic})_2$  proběhla ve dvou krocích. Prvním z nich byla *N*-alkylace základního 15-členného pyridinového makrocyclického ligandu  $15\text{-pyN}_3\text{O}_2$  pomocí methylesteru kyseliny 6-chloromethylpyridin-2-karboxylové za přítomnosti báze (diisopropylethylamin,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  nebo  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Druhým krokem syntézy bylo převedení připraveného ligandu na volnou kyselinu, čehož bylo dosaženo pomocí kyselé hydrolyzy roztokem  $\text{HCl}$ .

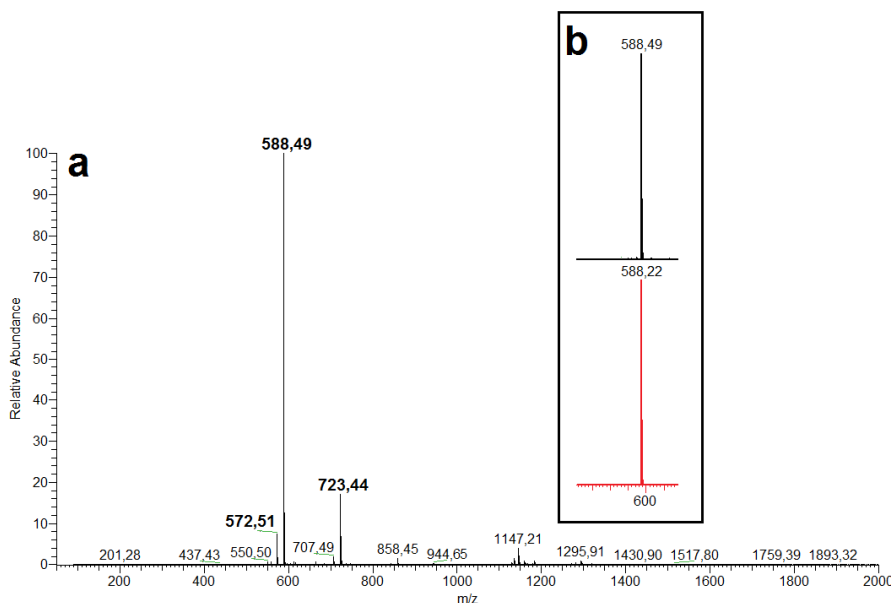
Při pokusech o přípravu ligandu byly studovány víceré reakční systémy, které se navzájem lišily vzájemným poměrem látkových množství reaktantů, reakčními podmínkami, použitou bází nebo přidavkem jodidu draselného jako katalyzátoru. Některé z produktů po *N*-alkylaci makrocyklu byly čištěny pomocí sloupcové chromatografie (silikagel), nicméně neúspěšně. Dělený produkt zůstal na začátku kolony i navzdory použití zásadité mobilní fáze methanol : konc. NH<sub>3</sub> (20 : 1), úspěch nepřinesla ani obměna mobilní fáze za méně polárnější DCM : aceton (10 : 1). Po hydrolyze dimethylesteru ligandu byla také použita iontově výměnná chromatografie, nicméně ani ta nezvýšila čistotu připraveného ligandu. Pozornost byla teda obrácena na optimalizaci reakčních podmínek, které by měly za následek vznik čistého ligandu 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>(pic)<sub>2</sub>.

Při přípravě navrhovaného ligandu za použití diisopropylethylaminu jako báze byl produktem kromě ligandu ve formě dimethylesteru také ligand obsahující tři pikolinátová ramena (15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>(pic)<sub>3</sub>). Výtěžnost reakce 122,7 % napovídá o silném znečištění produktu, který nejspíš po extrakci obsahoval navíc ještě zbytek použité báze. V hmotnostním spektru produktu syntézy (Obrázek 16) byly pozorovány píky při *m/z* = 550,32 (*I*<sub>rel</sub> = 59 %), 572,31 (*I*<sub>rel</sub> = 100 %) a 699,23 (*I*<sub>rel</sub> = 87 %), které odpovídají protonizované formě ligandu, tedy aduktu se složením [H<sub>2</sub>L+H]<sup>+</sup>, dále aduktu se sodíkem [H<sub>2</sub>L+Na]<sup>+</sup> a kvartérní amoniové soli se třemi pikolinátovými rameny [H<sub>2</sub>L+pic]<sup>+</sup>.



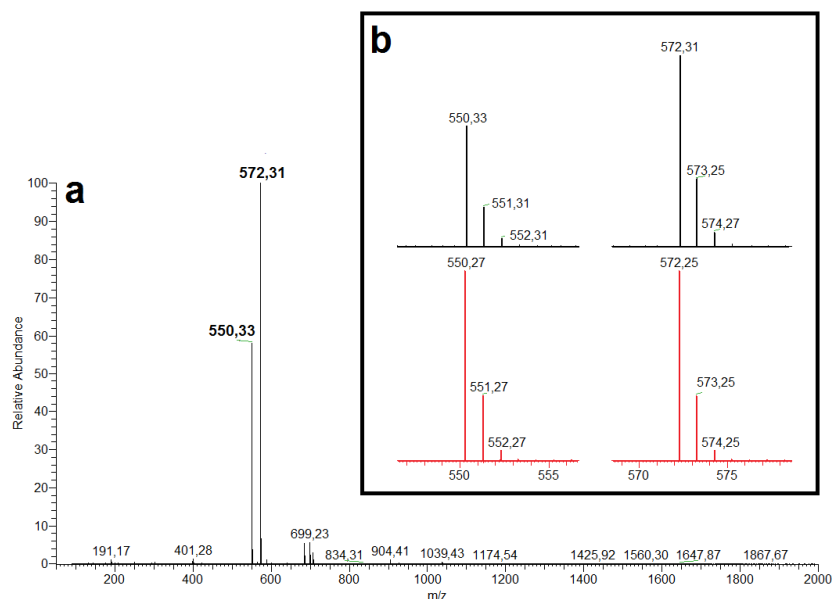
**Obrázek 16:** Hmotnostní spektrum produktu *N*-alkylace 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> s použitím diisopropylethylamin jako báze (a) s detailem majoritních píků odpovídajících aduktům H<sub>2</sub>L+H]<sup>+</sup>, [H<sub>2</sub>L+Na]<sup>+</sup> a kvartérní amoniové soli [H<sub>2</sub>L+pic]<sup>+</sup> (b).

V hmotnostním spektru produktu *N*-alkylace s použitím uhličitanu draselného ( $K_2CO_3$ ) jako báze, je přítomný majoritní pík při  $m/z = 588,49$  ( $I_{rel} = 100 \%$ ) odpovídající aduktu  $[H_2L+K]^+$ . Minoritní pík při  $m/z = 723,44$  ( $I_{rel} = 17 \%$ ) odpovídá kvarténní amoniové soli ligandu se třemi pikolinátovými rameny, přičemž na každém z nich je na karboxylové skupině navázaný sodný kationt. V hmotnostním spektru jsou ještě přítomny píky při  $m/z = 572,51$ ;  $858,45$  a  $1147,21$ . Pík při  $m/z = 572,51$  ( $I_{rel} = 7,4 \%$ ) odpovídá aduktu  $[H_2L+Na]^+$ .



**Obrázek: 17** Hmotnostní spektrum produktu *N*-alkylace 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> s použitím  $K_2CO_3$  (a) s detailem majoritního píku odpovídajícímu aduktu  $[H_2L+K]^+$  (b).

Při pokusech o přípravu ligandu, kdy byl použit uhličitan sodný ( $Na_2CO_3$ ) jako báze, byly získány produkty obsahující čistý ligand ve formě dimethylesteru. V hmotnostním spektru dimethylesteru ligandu (Obrázek 18) byly pozorovány píky při  $m/z = 550,33$  ( $I_{rel} = 58 \%$ ), a  $572,31$  ( $I_{rel} = 100 \%$ ), které odpovídají protonizované formě ligandu  $[H_2L+H]^+$  a aduktu se sodíkem  $[H_2L+Na]^+$ .

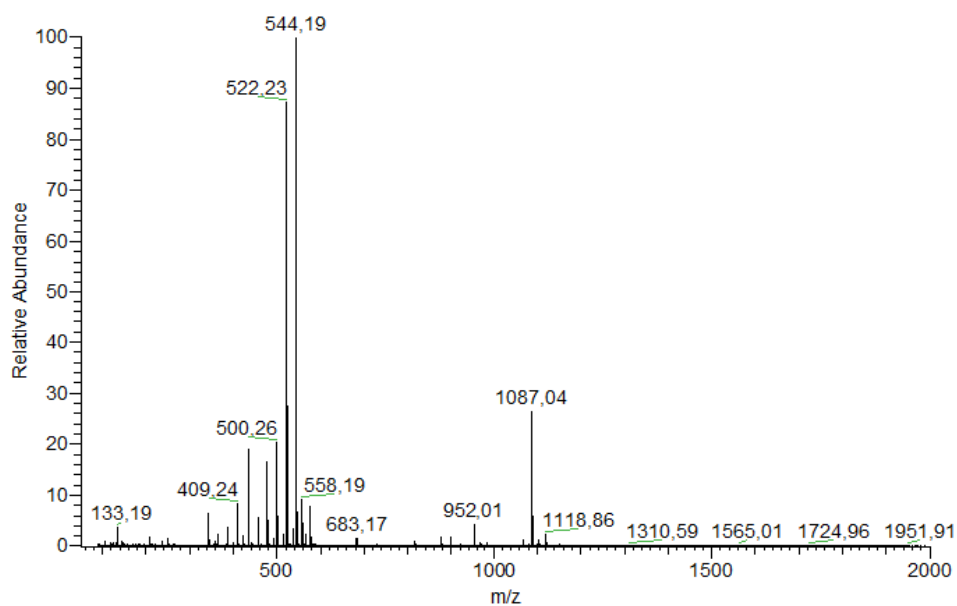


**Obrázek 18:** Hmotnostní spektrum produktu *N*-alkylace 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> s použitím Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (a) s detailem majoritních píků odpovídajících aduktům [H<sub>2</sub>L+H]<sup>+</sup> a [H<sub>2</sub>L+Na]<sup>+</sup> (b).

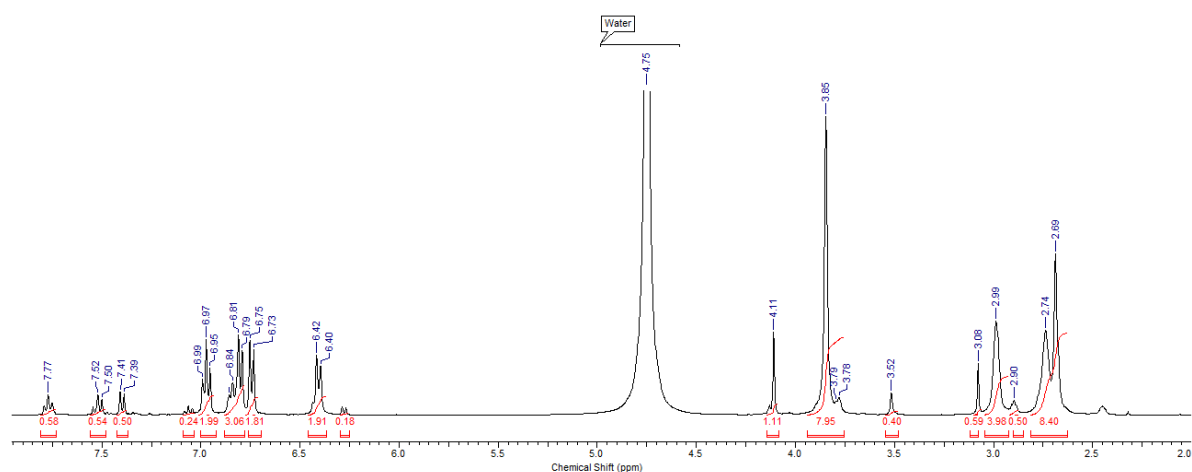
Z uvedených pokusů vyplynulo, že produkt v největším výtěžku (90-95 %) a v nejvyšší čistotě byl získán při vzájemném poměru látkových množství 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> : methylester kyseliny 6-hydroxymethylpyridin-2-karboxylové = 1 ku 2 s použitím Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jako báze.

Produkty *N*-alkylace byly hydrolyzovány pomocí roztoku kyseliny chlorovodíkové. Získané produkty byly čištěny pomocí iontové výměnné chromatografie. Nejprve byla použita kationtově výměnná chromatografie na odstranění přebytečných chloridových aniontů. Následovala aniontově výměnná chromatografie, při které byly ze směsi odstraněny draselné, případně sodné kationy. Nakonec byla znovu použita kationtově výměnná chromatografie a byl získán ligand v neutrální podobě.

Získané produkty však nebyly čisté a stále obsahovaly nečistoty. V hmotnostním spektru výsledného produktu syntézy s použitím uhličitanu sodného jako báze lze pozorovat několik píků (Obr. 19). Majoritní píky při  $m/z = 522,23$  ( $I_{rel} = 88 \%$ ) a  $544,49$  ( $I_{rel} = 100 \%$ ), odpovídají protonizované formě ligandu [H<sub>2</sub>L+H]<sup>+</sup> a aduktu se sodíkem [H<sub>2</sub>L+Na]<sup>+</sup>. Minoritní píky odpovídají aduktům ligandu s jedním ramenem (15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>(pic)) a také dvojnásobně velkému ligandu (30-py<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>(pic)<sub>4</sub>). V <sup>1</sup>H NMR spektru lze rovněž pozorovat signály, které je možno přiřadit ligandu a signály nečistot.



**Obrázek 19:** Hmotnostní spektrum produktu syntézy 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>(pic)<sub>2</sub> s použitím Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.



**Obrázek 20:** <sup>1</sup>H NMR spektrum produktu syntézy 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>(pic)<sub>2</sub> s použitím Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Syntézní postup ligandu 15-pyN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>(pic)<sub>2</sub> se z časových důvodů nepodařilo úplně zoptimalizovat, proto nebyl připraven v dostatečné čistotě.



## 6. Závěr

Předložená bakalářská práce byla věnována pikolináto komplexům lanthanoidů. V teoretické části práce je přehled pikolináto komplexů lanthanoidů, které jsou studovány z hlediska jejich potencionálního využití v medicíně resp. biovědách. Jedná se o komplexy, které mohou být využity jako kontrastní látky nebo luminiscenční sondy při diagnostice nemocí. Vypracovaná literární rešerše je zaměřena na opodstatnění výzkumu a přípravy nových stabilních pikolináto komplexů lanthanoidů, využitelných ve zobrazovacích technikách.

Praktická část práce byla věnovaná studiu přípravy 15-členného pyridinového makrocyclického ligandu se dvěma pikolinátovými rameny ( $15\text{-pyN}_3\text{O}_2(\text{pic})_2$ ). V rámci práce byla zoptimalizována syntéza prekursoru pro přípravu ligandu (methylesteru kyseliny 6-chloromethylpyridin-2-karboxylové), který byl připraven v gramových množstvích.

Syntézu ligandu  $15\text{-pyN}_3\text{O}_2(\text{pic})_2$  se z časových důvodů nepodařilo úplně zoptimalizovat. Byl sice získán produkt, v kterém uvedený ligand tvořil majoritní složku, ale nepodařilo se ho připravit v čisté formě.

To dává podnět pro další experimentální práci za účelem optimalizace postupu přípravy ligandu, ale i prekursoru na jeho přípravu. Především nalezení vhodné mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii, při čištění ligandu ve formě dimethylesteru, by mohlo tento postup více zefektivnit. Výměna silikagelu za oxid hlinitý jako stacionární fázi by také mohla vést k vyšší čistotě připravovaného ligandu. Taktéž na hydrolýzu dimethylesteru ligandu by mohla být použita namísto kyselé, taktéž zásaditá hydrolýza.

Nejméně účinným krokem při přípravě prekursoru pro ligand je selektivní redukce dimethylesteru kyseliny dipikolinové za vzniku methylesteru kyseliny 6-hydroxymethylpyridin-2-karboxylové. Nalezení vhodnějších reakčních podmínek (např. zvolení jiného redukčního činidla) by i zde mohlo vést ke zlepšení výtěžnosti.

Připravený ligand by měl sloužit především k přípravě stabilních komplexů s lanthanoidy, které by mohli mít potencionální využití například jako luminiscenční

sondy nebo najít uplatnění jako MRI kontrastní látky. Uvedené komplexy by však mohly být zajímavé i z hlediska jejich magnetických vlastností.

## 7. Seznam zkratek, značek a označen

15-pyN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	6,9-dioxa-3,12,18-triazabicyklo[12.3.1]oktadeka-1,14,16-trien
CDCl <sub>3</sub>	deuterovaný chloroform
CT	Computed Tomography – výpočetní tomografie
cyclen	1,4,7,14-tetraazacyklododekan
$\delta$	chemický posun v NMR spektrech
DCM	dichloromethan
DNA	Deoxyribonucleic acid – deoxyribonukleová kyselina
DOTA	kyselina 1,4,7,14-tetraazacyklododekan-1,4,7,14-tetraoctová
$\Phi$	kvantový výtěžek
Gd–H	vzdálenost gadolinia a vodíku koordinované vody
GdKL	kontrastní látka na bázi gadolinia
KČ	koordináční číslo
$\lambda_{abs}$	vlnová délka absorbovaného záření
$\lambda_{em}$	vlnová délka absorbovaného záření
LMCT	Ligand-to-Metal Charge Transfer – přenos náboje z ligandu na kov
Ln	lanthanoid
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MK	mezisystémová konverze
MRI	Magnetic Resonance Imaging – magnetická rezonance
NSF	nefrogenní systémová fibróza
NIR	Near-infrared – blízká infračervená oblast
OES	optická emisní sonda
$R_f$	retenční faktor
RVO	rotační vakuová odparka
S	celkový spin
SPECT	Single Photon Emission CT – jednofotonová emisní výpočetní tomografie
$\tau$	pozorovaná doba luminiscence
TLC	Thin Layer Chromatography – chromatografie na tenké vrstvě
T <sub>M</sub>	rezidenční čas molekuly vody ve vnitřní koordinační sféře
T <sub>R</sub>	rotační korelační čas
UV	Ultraviolet – ultrafialová oblast
VIS	visible – viditelná oblast

Složitě systematické názvy diskutovaných organických ligandů jsou v celé práci nahrazeny zkratkami nebo označeními, která vždy korespondují se strukturami vyznačených na referovaných obrázcích, resp. v jejich popisku.

## 8. Použitá literatura

- <sup>1</sup> Teo R. D., Termini J., Gray H. B., Lanthanides: Applications in Cancer Diagnosis and Therapy, *Journal of Medical Chemistry*, **2016**, *59*, 6012- 6024.
- <sup>2</sup> Jin Y., Chen S., Duan J., Jia G., Zhang J., Europium-doped Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanotubes cause the necrosis of primary mousenbone marrow stromal cells through lysosome and mitochondrion damage, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2015**, *146*, 28- 36.
- <sup>3</sup> Zhang D. Y. et al., Effects of subchronic samarium exposure on the histopathological structure and apoptosis regulation in mouse testis, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2014**, *37*, 505- 512.
- <sup>4</sup> Rogosnitzky M., Branch S., Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms, *BioMetals*, **2016**, *29*, 365- 376.
- <sup>5</sup> Chen Z.-F. et al., High Cytotoxicity of Dihalo-Substituted 8-Quinolinolato-Lanthanides, *Dalton Transactions*, **2011**, *40*, 1684- 1692.
- <sup>6</sup> Reed K.C., Bygrave F. L., The Inhibition of Mitochondrial Calcium Transport by Lanthanides and Ruthenium Red, *Biochemical Journal*, **1974**, *140*, 143- 155.
- <sup>7</sup> Wason M. S., Zhao J., Cerium Oxide Nanoparticles: Potential Applications for Cancer and Other Diseases, *American Journal of Translational Research*, **2013**, *5*, 126- 131.
- <sup>8</sup> Sessler J. L., Biomedical Applications of Lanthanide (III) Texaphyrins Lutetium(III) Texaphyrins as Potential Photodynamic Therapy Photosensitizers, *Journal of Alloys and Compounds*, **1997**, *249*, 146- 152.
- <sup>9</sup> Tagawa S. T., Anti-Prostate-Specific Membrane Antigen-Based Radioimmunotherapy for Prostate Cancer, *Cancer*, **2010**, *116*, 1075- 1083.
- <sup>10</sup> Cotton S., Lanthanide and Actinide Chemistry, *John Wiley & Sons*, 2006, ISBN: 9780470010051.
- <sup>11</sup> Dehnicke K., Greiner A., Unusual Complex Chemistry of Rare-Earth Elements: Large Ionic Radii—Small Coordination Numbers, *Angewandte Chemie*, **2003**, *42*, 1340- 1354.
- <sup>12</sup> Housecroft C., Sharpe A. G., Anorganická chemie, *VŠCHT Praha*, **2014**, IBSN: 9788070808726.
- <sup>13</sup> Fernandez-Pol J. A. et al., Antiviral, cytotoxic and apoptotic activities of picolinic acid on human immunodeficiency virus-1 and human herpes simplex virus-2 infected cells, *Anticancer research*, **2001**, *21*, 3773- 3776.
- <sup>14</sup> Cai S. et al., Antimicrobial activity of picolinic acid against extracellular and intracellular Mycobacterium avium complex and its combined activity with clarithromycin, rifampicin and fluoroquinolones, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2006**, *57*, 85- 93.
- <sup>15</sup> Grant R. S., Coggan S. E., Smythe G. A., The Physiological Action of Picolinic Acid in the Human Brain, *International Journal of Tryptophan Research*, **2009**, *2*, 71- 79.
- <sup>16</sup> Broadhurst C. L., Clinical studies on chromium picolinate supplementation in diabetes mellitus—a review, *Diabetes Technology & Therapeutics*, **2006**, *8*, 677- 687.
- <sup>17</sup> Rice B. W., Cable M. D., Nelson M. B., *In vivo* imaging of light-emitting probes, *Journal of Biomedical Optics*, **2001**, *6(4)*, 432- 440.
- <sup>18</sup> Amoroso A. J., Pope S. J. A., Using lanthanide ions in molecular bioimaging, *Chemical Society Reviews*, **2015**, *44*, 4723- 4742.
- <sup>19</sup> Werts M. H. V., Making sense of lanthanide luminescence, *Science Progress*, **2005**, *88*, 101- 131.
- <sup>20</sup> Bünzli J.-C. G., Lanthanide Luminescence for Biomedical Analyses and Imaging, *Chemical Reviews*, **2010**, *110*, 2729- 2755.
- <sup>21</sup> Smith G. D., Evidence for the optical signalling of changes in bicarbonate concentration within the mitochondrial region of living cells, *Chemical Communications*, **2011**, *47*, 7347- 7349.
- <sup>22</sup> Mato-Iglesias M. et al., Lanthanide Complexes Based on a 1,7-Diaza-12-crown-4 Platform Containing Picolinate Pendant: A New Structural Entry for the Design of Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents, *Inorganic Chemistry*, **2008**, *47*, 7840- 7851.
- <sup>23</sup> Nonat A. et al., Lanthanide Complexes of a Picolinate Ligand Derived from 1,4,7-

Triazacyclononane with Potential Application in Magnetic Resonance Imaging and Time-Resolved Luminescence Imaging, *Chemistry – A European Journal*, **2006**, *12*, 7133- 7150.

<sup>24</sup> Hamon et al., Combining a pycnen framework with conjugated antenna for the design of europium and samarium luminescent bioprobes, *Chemical Communications*, **2018**, *54*, 6173- 6176.

<sup>25</sup> Geraldes C. F. G. C., Laurent S., Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging, *Contrast Media & Molecular Imaging*, **2009**, *4*, 1- 23.

<sup>26</sup> www.ncm-c.org, klíčová fráze: MRI. (dostupné k 22. 04. 2019)

<sup>27</sup> www.uvn.cz, klíčová fráze: magnetická rezonance. (dostupné k 22. 04. 2019)

<sup>28</sup> Grobner T., Gadolinium: a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis?, *Nephrology Dialysis Transplantation*, **2006**, *21*, 1104- 1108.

<sup>29</sup> Assessment report for Gadolinium-containing contrast agents, **2010**, EMA/740640/2010.

<sup>30</sup> Reilly R. F., Risk for nephrogenic systemic fibrosis with gadoteridol (ProHance) in patients who are on long-term hemodialysis, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, **2008**, *3*, 747- 751.

<sup>31</sup> Heinrich M. C. et al., Cytotoxicity of iodinated and gadolinium-based contrast agents in renal tubular cells at angiographic concentrations: in vitro study, *Radiology*, **2007**, *242*, 425- 434.

<sup>32</sup> Elmstahl B. et al., Gadolinium contrast media are more nephrotoxic than iodine media. The importance of osmolarity in direct renal artery injections, *European Radiology*, **2006**, *16*, 2712- 2720.

<sup>33</sup> Akgun H. et al., Are gadolinium-based contrast media nephrotoxic? A renal biopsy study, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **2006**, *130*, 1354- 1357.

<sup>34</sup> Chen R. et al., Parallel comparative studies on mouse toxicity of oxide nanoparticle- and gadolinium-based T1 MRI contrast agent, *ACS Nano*, **2015**, *9*, 12425- 12435.

<sup>35</sup> Blasco-Perrin H. et al., Gadolinium induced recurrent acute pancreatitis, *Pancreatology*, **2013**, *13*, 88- 89.

<sup>36</sup> Ray D. E. et al., Neurotoxic effects of gadopentetate dimeglumine: behavioral disturbance and morphology after intracerebroventricular injection in rats, *American Journal of Neuroradiology*, **1996**, *17*, 365- 373.

<sup>37</sup> Hui F. K., Mullins M., Persistence of gadolinium contrast enhancement in CSF: a possible harbinger of gadolinium neurotoxicity?, *American Journal of Neuroradiology*, **2009**, *30*, e1.

<sup>38</sup> <http://www.crs.cz/cs/dokumenty/doporuceni-prehled/doporuceni-pro-aplikaci-gadoliniovych-kontrastni-latek-se-zretelem-na-minimalizaci-rizika-vzniku-nefrogeni-systemove-fibrozy.html>, (dostupné k 23. 04. 2019)

<sup>39</sup> Robert P. et al., T1-weighted hypersignal in the deep cerebellar nuclei after repeated administrations of gadolinium-based contrast agents in healthy rats: difference between linear and macrocyclic agents, *Investigative Radiology*, **2015**, *50*, 473- 480.

<sup>40</sup> Kanda T. et al., Gadolinium-based contrast agent accumulates in the brain even in subjects without severe renal dysfunction: evaluation of autopsy brain specimens with inductively coupled plasma mass spectroscopy, *Radiology*, **2015**, *276*, 228- 232.

<sup>41</sup> Stojanov D. A. et al., Increasing signal intensity within the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1 W magnetic resonance images in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: correlation with cumulative dose of a macrocyclic gadolinium-based contrast agent, gadobutrol, *European Radiology*, **2016**, *26*, 807- 815.

<sup>42</sup> Xia Q. et al., Gadolinium-induced oxidative stress triggers endoplasmic reticulum stress in rat cortical neurons, *Journal of Neurochemistry*, **2011**, *117*, 38- 47.

<sup>43</sup> Corot C. et al., Structure-activity relationship of macrocyclic and linear gadolinium chelates: investigation of transmetallation effect on the zinc-dependent metalloproteinase angiotensin-converting enzyme, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, **1998**, *8*, 695- 702.

<sup>44</sup> Sherry A. D. et al., Primer on gadolinium chemistry, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, **2009**, *30*, 1240- 1248.

<sup>45</sup> Idee J. M. et al., The role of gadolinium chelates in the mechanism of nephrogenic systemic fibrosis: a critical update, *Critical Reviews in Toxicology*, **2014**, *44*, 895- 913.

<sup>46</sup> Newton B. B., Jimenez S. A., Mechanism of NSF: new evidence challenging the prevailing theory, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, **2009**, *30*, 1277- 1283.

<sup>47</sup> ACD/ID NMR Processo, verzia 12.1, Advanced Chemistry Development, Toronto, Kanada