



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ  
FAKULTA**  
Univerzita Karlova

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Anna Rosenkrancová

**Charakterizace nových kontrastních  
látek na bázi Gd-DOTA pro zobrazování  
pomocí nukleární magnetické rezonance  
(MRI)**

Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Mária Šoltésová, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2021

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval(a) samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

V ..... dne .....

Podpis autora

Mé poděkování patří především RNDr. Márii Šoltésové, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a trpělivost. Dále nesmím zapomenout na cenné rady doc. RNDr. Jana Langa, Ph.D. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Adamu Svitokovi za asistenci a vstřícnost při syntéze ligandu.

Název práce: Charakterizace nových kontrastních látek na bázi Gd-DOTA pro zobrazování pomocí nukleární magnetické rezonance (MRI)

Autor: Anna Rosenkrancová

Katedra: Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Mária Šoltésová, Ph.D., Katedra fyziky nízkých teplot

Abstrakt: Tato práce se zaměřuje na charakterizaci nové potenciální kontrastní látky skládající se z  $\beta$ -cyklodextrinu a 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1-methyl[(4-aminofenyl)methyl]fosfinové kyseliny, zkráceně DO3AP<sup>ABn</sup>. Pomocí 2D NMR experimentů byly přiřazeny signály vodíkového i uhlíkového spektra obou molekul. U molekuly DO3AP<sup>ABn</sup> byla studována teplotní závislost. Vyhodnocením <sup>13</sup>C relaxací byly zjištěny relaxační doby  $T_1$ ,  $T_2$  a Nukleární Overhauserův jev. Za použití modelu pro izotropní reorientaci byl z naměřených hodnot  $T_1$  numericky dopočten rotační korelační čas. Z rotačního korelačního času bylo zjištěno, že nejvíc rigidní částí molekuly je cyklus ( $\tau_c = 264\text{--}308$  ps). Nejpohyblivější je methylfosfinové rameno s aromatickou, jejichž korelační čas je oproti cyklu přibližně poloviční (139–156 ps).

Klíčová slova: zobrazování pomocí magnetické rezonance, Gd-DOTA, kontrastní látka

Title: Characterization of Novel Gd-DOTA Related Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging (MRI)

Author: Anna Rosenkrancová

Department: Department of Low-Temperature Physics

Supervisor: RNDr. Mária Šoltésová, Ph.D., Department of Low-Temperature Physics

Abstract: This work focuses on the characterization of a new potential contrast agent consisting of  $\beta$ -cyclodextrin and 1,4,7,10-tetraazacyclododecan-4,7,10-triocta-1-methyl[(4-aminophenyl)methyl]phosphinoic acid, short for DO3AP<sup>ABn</sup>. Using 2D NMR experiments, the hydrogen and carbon spectrum signals of both molecules were assigned. There was a temperature dependency studied in DO3AP<sup>ABn</sup>. By evaluating <sup>13</sup>C relaxation, relaxation times  $T_1$ ,  $T_2$  and Nuclear Overhauser effect were determined. Using the isotropic reorientation model, the rotational correlation time was numerically calculated from the measured values of  $T_1$ . From the rotational correlation time, the most rigid part of the molecule was found to be the cycle ( $\tau_c = 264\text{--}308$  ps). The most mobile is the aromatic methyl phosphine arm, whose correlation time is about half that of the cycle (139-156 ps).

Keywords: magnetic resonance imaging, Gd-DOTA, contrast agent

# Obsah

Úvod	2
<b>1 Jaderná magnetická rezonance</b>	<b>4</b>
1.1 Základní princip NMR	4
1.2 Dipól-dipólová interakce	5
1.3 Spinová relaxace	5
1.4 Zobrazování magnetickou rezonancí	7
<b>2 Kontrastní látky</b>	<b>8</b>
2.1 Kontrastní látky obsahující $\text{Gd}^{\text{III}}$	8
2.2 Ligandy kontrastních látek pro Gd	9
<b>3 Experimentální metody NMR</b>	<b>11</b>
3.1 Měření spekter	11
3.2 Měření podélné relaxační doby $T_1$	11
3.3 Měření příčné relaxační doby $T_2$	12
3.4 2D NMR experimenty	13
<b>4 Nastavení experimentů</b>	<b>15</b>
4.1 Měření 1D spekter	15
4.2 Měření 2D spekter	15
4.3 Měření $T_1$ , $T_2$ a $\eta$	16
4.4 Měření MRI	16
<b>5 Příprava vzorků</b>	<b>18</b>
5.1 Vzorek cyklodextrinu	18
5.2 Vzorek $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$	18
5.3 Vzorek $\text{Gd}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$	18
<b>6 Výsledky měření a diskuze</b>	<b>19</b>
6.1 Cyklodextrin	19
6.2 $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$	22
6.2.1 Teplotní závislost spekter $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$	23
6.2.2 Přiřazení signálů $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$	25
6.2.3 Dynamika $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$ vyhodnocená pomocí $^{13}\text{C}$ relaxací	29
6.3 Efekt komplexu $\text{Gd}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$ na relaxaci vody	31
<b>Závěr</b>	<b>33</b>
<b>Seznam použité literatury</b>	<b>34</b>
<b>Seznam obrázků</b>	<b>36</b>
<b>Seznam tabulek</b>	<b>38</b>

# Úvod

Zobrazování magnetickou rezonancí („Magnetic Resonance Imaging“, zkráceně MRI) je jednou z neúčinnějších diagnostických metod, která má v moderní medicíně široké využití. Její hlavní výhoda spočívá v možnosti neinvazivního zobrazení různých měkkých tkání lidského těla, což ji činí vhodnou například k zobrazování mozku, šlach a svalů, kardiovaskulárního systému, popřípadě nádorových tkání. Při mnoha vyšetřeních pomocí MRI se využívají tzv. kontrastní látky, které jsou podány pacientovy a slouží ke zlepšení kontrastu výsledného obrazu [1].

Významnou skupinu kontrastních látek tvoří koordinační sloučeniny obsahující paramagnetický ion gadolinia (Gd). Díky svým magnetickým vlastnostem tento prvek, patřící do skupiny lanthanoidů, významně zrychluje podélnou relaxační dobu  $^1\text{H}$  jader vody obsažené v tkáních. Sám o sobě je však ion gadolinia toxický. Pro aplikace *in vivo* je tedy nutné ho navázat na vhodný ligand a vytvořit dostatečně stabilní komplex, který je pro pacienta bezpečný. Stabilní komplexy gadolinia tvoří například makrocyclická sloučenina 1,4,7,10-tetraazacyklodekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina, zkráceně DOTA. Její komplex s gadolinem, Gd-DOTA, je používán v klinické praxi jako kontrastní látka pod názvem Dotarem. Struktura ligandu má kromě stability také významný vliv na efektivitu kontrastní látky. Ta je charakterizována její relaxivitou, definovanou jako zrychlení relaxace protonů vody vztažené na 1mM roztok kontrastní látky [1].

Efektivita kontrastních látek používaných v současné době v klinické praxi je výrazně nižší než teoreticky předpokládané maximum. Řada studií se proto zaměřuje na syntézu nových kontrastních látek s cílem optimalizace jejich vlastností za účelem dosažení co nejvyšší efektivity.

Jedním ze způsobů zvyšování efektivity je hledání vhodných chemických modifikací stávajících ligandů pro kontrastní látky. Řada z nich vychází z již zmiňované sloučeniny DOTA. Příkladem perspektivní modifikace je nahrazení jednoho octového ramena fosfonátovou skupinou [2]. Tato změna má za následek zvýšení relaxivity vlivem zrychlení výměny molekuly  $\text{H}_2\text{O}$ , koordinované v komplexu na ion gadolinia. Dalším důležitým parametrem ovlivňujícím relaxivitu kontrastní látky je rotační korelační čas, který udává rychlost náhodné reorientace molekuly v roztoku a přímo souvisí s velikostí kontrastní látky. Efektivního zvětšení velikosti lze dosáhnout například spojováním vícero molekul kontrastní látky [3] nebo jejich konjugací na vhodnou makromolekulu, například na dendrimery [4] nebo na cyklodextrin [5, 6]. Očekávaného zvýšení relaxivity je ale dosaženo pouze v případě, kdy celý konjugát nevykazuje přílišnou vnitřní mobilitu, případně není konjugací zpomalena výměna koordinované vody.

Tato práce se zaměřuje na charakterizaci nové potenciální kontrastní látky pomocí spektroskopie nukleární magnetické rezonance („Nuclear Magnetic Resonance“, zkráceně NMR) vysokého rozlišení. Jde o makrocyclickou sloučeninu 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1-methyl[(4-aminofenyl)methyl]fosfinová kyselina, zkráceně  $\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$ , která je chemickou modifikací molekuly DOTA, ve které je jedno pendantní rameno nahrazeno methylfosfinovou kyselinou, na které je navíc navázaný aminofenyl. Cílem je určit její strukturu a dynamiku v roztoku a vyhodnotit rotační korelační čas jako jeden z důležitých parametrů přímo určujících její efektivitu. Spektroskopie vysokého rozlišení vyža-

duje nahrazení paramagnetického gadolinia v kontrastní látce za jiný lathanoid bez paramagnetických vlastností. V našem případě je poprvé studován komplex  $\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$  s lanthanem,  $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$ . Pro účely charakterizace je nezbytným krokem nejdříve přiřazení signálů v  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spektrech jednotlivým pozicím jader v molekule. Dynamické procesy probíhající v roztoku mohou pak být kvalitativně pozorovány na teplotní závislosti  $^1\text{H}$  a  $^{31}\text{P}$  NMR spekter. Dalším krokem bylo změření relaxací uhlíku  $^{13}\text{C}$  z nichž byl vyhodnocen rotační korelační čas studované molekuly. V práci se věnujeme také studiu  $\beta$ -cyklodextrinu, především přiřazení jeho signálů v NMR spektrech a rešerši literatury na téma jeho dynamiky v roztoku. Do budoucna je cílem syntetizovat konjugát sedmi  $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$  s  $\beta$ -cyklodextrinem jako slibnou modifikaci vedoucí ke zvětšení velikosti a tím efektivity potenciální kontrastní látky. Studium jednotlivých komponent tohoto konjugátu je důležitým krokem předcházejícím jeho spektroskopické charakterizaci jako celku.

Provedli jsme také syntézu komplexu ligandu  $\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$  s gadoliniem. Metodou MRI byl pořízen snímek kyvety s vodným roztokem tohoto komplexu jako demonstrace jeho funkce jakožto kontrastní látky.

# 1. Jaderná magnetická rezonance

## 1.1 Základní princip NMR

Od každého prvku existuje alespoň jeden izotop mající nenulový spinový moment hybnosti  $\mathbf{I}$ , tomu je úměrný magnetický moment  $\boldsymbol{\mu}$ , pro který platí

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{I}, \quad (1.1)$$

kde  $\gamma$  značí gyromagnetický poměr. Projekce magnetického momentu do směru  $z$  je kvantována a nabývá hodnot

$$\mu_z = m\hbar\gamma, \quad (1.2)$$

kde  $m$  je kvantové číslo, pro které platí

$$m \in \{-I, I-1, \dots, I-1, I\}, \quad (1.3)$$

$\hbar$  značí redukovanou Planckovu konstantu a  $I$  je spinové kvantové číslo. Ve stacionárním magnetickém poli  $\mathbf{B}$  o velikosti  $B$  rovnoběžném s osou  $z$  je magnetická energie jádra o velikosti  $E$  rovna

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B} = -\mu_z B. \quad (1.4)$$

Protože průmět momentu do osy  $z$  je kvantován, viz. rovnice (2), je i energie kvantována a pro její stacionární hladiny platí

$$E_m = -m\hbar\gamma B. \quad (1.5)$$

Tím dojde k rozštěpení energetických hladin v závislosti na hodnotě kvantového čísla  $m$ . Tento efekt se nazývá Zeemanův jev.

Po zapnutí stacionárního magnetického pole se ustálí termodynamická rovnováha řídicí se Boltzmannovým rozdělením. Některé hladiny se obsazují s vyšší pravděpodobností než jiné, což vede k rozdílným populacím jednotlivých hladin. Tím vzniká makroskopická magnetizace  $\mathbf{M}$ , která je výslednicí samostatných magnetických momentů  $\boldsymbol{\mu}$  a je rovnoběžná se stacionárním polem  $\mathbf{B}$  [7].

Interakcí s proměnným radiofrekvenčním polem  $\mathbf{B}_1$  vzniká moment síly působící na magnetizaci a dochází k jejímu vychýlení z rovnovážné pozice. Magnetizace pak preceduje kolem osy  $z$  s frekvencí

$$\omega_0 = \gamma B, \quad (1.6)$$

která se nazývá Larmorova frekvence. Při experimentu nukleární magnetické rezonance (NMR) se tato frekvence měří. Protože gyromagnetický poměr je specifický pro každý izotop, frekvence jednotlivých izotopů se vzájemně liší. Navíc pole  $\mathbf{B}$  se v místě jader může mírně lišit, což způsobuje malé rozdíly v Larmorově frekvenci i pro stejný izotop. Tento rozdíl v lokálním magnetickém poli je dán interakcí stacionárního magnetického pole s elektrony obsaženými ve zkoumané látce, při které



dochází k tzv. chemickému stínění. Ve spektrech se pak vyhodnocuje chemický posun  $\delta$  daný vztahem

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{st}}{\omega_{st}}, \quad (1.7)$$

kde  $\omega$  značí frekvenci úměrnou lokálnímu magnetickému poli v místě jádra. Frekvence  $\omega_{st}$  vyjadřuje frekvenci standardu t.j. zvolené látky, vůči které posun určujeme. Chemický posun se obvykle udává v jednotkách ppm z anglického parts per million [8].

## 1.2 Dipól-dipólová interakce

Kromě stacionárního pole  $\mathbf{B}$  a elektronů působí na jádra i spiny ostatních jader v okolí. Tento jev se nazývá dipól-dipólová interakce. Rozlišujeme přímou a nepřímou dipól-dipólovou interakci.

Přímá dipól-dipólová interakce je působení jaderných dipólových momentů přes prostor. V kapalinách se díky rychlému neuspořádanému pohybu molekul středuje na nulu a ve spektrech není patrná, je však důležitým relaxačním mechanismem. Tuto interakci lze charakterizovat dipól-dipólovou interakční konstantou  $b$ , která je pro vodík s uhlíkem rovna

$$b_{CH} = -\frac{\mu_0 \gamma_C \gamma_H \hbar}{4\pi r_{CH}^3}, \quad (1.8)$$

kde  $r_{CH}$  je vzdálenost působících spinů,  $\gamma_C$  a  $\gamma_H$  příslušné gyrometrické poměry a  $\mu_0$  permeabilita vakua [9].

Nepřímá dipól-dipólová interakce působí mezi jádry spojenými chemickou vazbou, někdy se jí také říká J-vazba. Je zprostředkována vazebnými elektrony. Nepřímá dipól-dipólová interakce nezávisí explicitně na vzdálenosti jader v prostoru, s rostoucím počtem vazeb se však síla interakce snižuje. Na rozdíl od přímé dipól-dipólové interakce se projevuje ve spektrech štěpením spektrálních čar a naopak nemá vliv na relaxaci. [7].

## 1.3 Spinová relaxace

K opětovnému dosažení rovnováhy systému jaderných spinů po aplikaci radiofrekvenčního pole dochází díky dvěma procesům – spin-mřížkové a spin-spinové relaxaci. Většina relaxačních mechanismů pramení z intermolekulárních nebo intramolekulárních magnetických interakcí, které se díky náhodnému pohybu molekul stávají časově proměnné [8]. Pro diamagnetické systémy jsou hlavními zdroji fluktujícího magnetického pole přímá dipól-dipólová interakce a anizotropie chemického posunu [9].

Pro porozumění relaxačních mechanismů je třeba se blíže zaměřit na náhodný rotační pohyb molekul, ke kterému dochází v kapalině vlivem častých vzájemných kolizí.

K popisu tohoto náhodného pohybu je vhodné použít stochastickou funkci času  $Y(t)$ . Sestrojíme časovou korelační funkci  $C(\tau)$ , která koreluje náhodný proces ve dvou různých časech lišících se o  $\tau$ :

$$C(\tau) = \langle Y(t)Y^*(t + \tau) \rangle, \quad (1.9)$$

kde \* značí komplexní sdružení. Pro velmi dlouhé  $\tau$  lze předpokládat, že hodnota korelační funkce je rovna nule. Nejjednodušší funkce splňující tato kritéria je exponenciálně klesající funkce

$$C(\tau) = C(0)e^{-|\tau|/\tau_c}, \quad (1.10)$$

kde  $\tau_c$  je tzv. korelační čas, který charakterizuje náhodný pohyb molekuly [9]. Pro  $t \ll \tau_c$  je většina molekul blízko své původní polohy, naopak pro  $t \gg \tau_c$  je orientace naprosto náhodná. Pro malé molekuly v neviskózních rozpouštědlech za pokojové teploty se korelační čas pohybuje v řádech stovek ps [8].

Fourierovou transformací korelační funkce dostáváme funkci nazývanou spektrální hustota  $J(\omega)$ , která je v případě použití vztahu 1.10 rovna

$$J(\omega) = C(0) \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2}, \quad (1.11)$$

kde  $\omega$  značí charakteristickou frekvenci stochastického procesu [9]. Lze ukázat, že spektrální hustota ve tvaru 1.11 dobře popisuje náhodnou izotropní reorientaci rigidního objektu.

## Spin-mřížková relaxace

Spin-mřížková relaxace je proces, kdy se  $z$ -ová složka magnetizace vrací do své původní polohy, proto bývá také nazývána jako podélná relaxace. Při ustavování rovnováhy uvolněná energie disipuje do okolí – tzv. mřížky. K popisu tohoto procesu zavádíme charakteristickou dobu relaxace  $T_1$ . Pro  $z$ -ovou komponentu  $M_z$  pak platí diferenciální rovnice prvního řádu

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M - M_z}{T_1}, \quad (1.12)$$

kde  $M$  značí stav magnetizace před perturbací. Veličina  $R_1 = 1/T_1$  je tedy rychlostní konstanta přechodu perturbovaného systému zpět do rovnováhy [7]. Rychlostní konstanta  $R_1$  je úměrná spektrální hustotě a pro uhlíky, kde je dominantním relaxačním mechanismem dipól-dipólová interakce s přímo navázaným vodíkem, ji lze za určitých podmínek vyjádřit jako

$$\frac{1}{T_1} = \frac{\pi}{5} b_{CH}^2 [J(\omega_H - \omega_C) + 3J(\omega_C) + 6(\omega_H + \omega_C)], \quad (1.13)$$

kde  $b_{CH}$  je dipól-dipólová interakční konstanta vodíku a uhlíku,  $\omega_C$  je Larmónova frekvence uhlíku a  $\omega_H$  vodíku [9].

## Spin-spinová relaxace

Spin-spinová relaxace je návrat příčné složky magnetizace do původní polohy, respektive její vymizení. To je možné díky interakci mezi spiny, kdy dochází k postupné dekoherenci precesních pohybů příspěvků magnetizace od jednotlivých jader. Obdobně jako u spin-mřížkové relaxace zavádíme relaxační dobu  $T_2$ , pro kterou platí rovnice

$$\frac{dM_{x,y}}{dt} = -\frac{M_{x,y}(0)}{T_2}, \quad (1.14)$$

kde  $M_{x,y}$  značí příčnou složku magnetizace [7]. Za určitých podmínek lze opět vyjádřit závislost na spektrální hustotě ve tvaru

$$\frac{1}{T_2} = \frac{\pi}{10} b_{CH}^2 [4J(0) + J(\omega_H - \omega_C) + 3J(\omega_C) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_C)] \quad (1.15)$$

[9].

## Nukleární Overhauserův jev

Nukleární Overhauserův jev (NOE) je důsledkem dipól-dipólové interakce. NOE je jev, kdy dochází k přenosu energie mezi dvojicí spinů, přičemž změna  $z$ -tové složky magnetizace jednoho spinu ovlivní  $z$ -ovou složku druhého spinu a naopak. Když ozařujeme jedno jádro na jeho Larmorově frekvenci, tak dojde k vyrovnání populace jeho hladin a také ke změně stacionární intenzity druhého jádra o faktor  $1+\eta$ . Faktor  $\eta$  slouží ke kvantifikaci NOE a je definován jako podíl perturbované a normální intenzity peaku. Za určitých podmínek lze tento faktor vyjádřit následovně:

$$\eta = \frac{\gamma_H}{\gamma_C} \frac{6J(\omega_H + \omega_C) - J(\omega_H - \omega_C)}{J(\omega_H - \omega_C) + 3J(\omega_C) + 6J(\omega_H + \omega_C)} \quad (1.16)$$

[9].

## 1.4 Zobrazování magnetickou rezonancí

Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI z anglického „Magnetic Resonance Imaging“) je neinvazivní zobrazovací metoda využívající jevu nukleární magnetické rezonance. Její velkou výhodou je vysoké rozlišení a absence možného škodlivého ionizujícího záření. Některé tkáně, například nervy či mozkovou tkáň, je možné neinvazivně zobrazovat pouze za použití MRI.

Aby bylo možné vytvořit obraz, je třeba změřit signál z každého objemového elementu – voxelu. To umožňuje tzv. prostorové kódování, které využívá gradientních polí. Zavedením gradientů se intenzita pole a tím pádem i Larmorova frekvence stávají prostorově závislými. Během měření se nejprve aplikuje gradient ve směru pole  $\mathbf{B}$ , tedy ve směru osy  $z$ , čímž se vyselektuje tenký řez. Poté je tento gradient vypnut a naopak se zapnou gradientní pole ve směru osy  $y$  – kódující fáze a osy  $x$  – kódující frekvenci.

Přirozeným zdrojem kontrastu snímků získaných magnetickou rezonancí je různá protonová hustota (PD z anglického „Proton Density“) a odlišné relaxační časy  $T_1$  a  $T_2$  jader  $^1\text{H}$  vody obsažené ve tkáních. Tyto hodnoty jsou pro jednotlivé tkáně charakteristické. Nastavováním parametrů aplikované pulzní sekvence lze docílit, že velikost signálu je převážně závislá pouze na jedné z výše zmíněných vlastností tkání. Kontrast pak zajišťuje buď rozdílná protonová hustota, nebo je snímek  $T_1$  - resp.  $T_2$  - vážený [10].

## 2. Kontrastní látky

Kontrast vyvolaný rozdíly v obsahu protonů a relaxačních časech není vždy postačující. Pak přichází na řadu tzv. kontrastní látky, které se podají pacientovi, následně se akumulují ve snímané oblasti a umožňují zvýšení kontrastu. Rozlišujeme dvě kategorie kontrastních látek:

- $T_1$  kontrastní látky, které snižují dobu relaxace podélné složky magnetizace.
- $T_2$  kontrastní látky, zkracující dobu relaxace příčné složky.

Klíčovou vlastností kontrastních látek je tzv. relaxivita (rozlišujeme podélnou a příčnou relaxivitu,  $r_1$ ,  $r_2$ ), která určuje jejich efektivitu a je definována jako zvýšení relaxační rychlosti v  $s^{-1}$  (podélné nebo příčné,  $R_1$  nebo  $R_2$ ) vody způsobené přítomností 1 mM kontrastní látky [10, 6].

Poměrně častým typem (využívá se asi při 30 % vyšetření [1]) jsou kontrastní látky obsahující ionty gadolinia  $Gd^{III}$ .  $Gd^{III}$  je však sám o sobě toxický, může se usazovat v mozku, způsobit systémovou nefrogenní fibrózu a jiné závažné zdravotní komplikace [1]. Z těchto důvodů je třeba navázat gadolinium na vhodný ligand, jehož úlohou není jen eliminovat nežádoucí účinky kovového iontu, ale také dosáhnout vhodných hodnot parametrů určujících výslednou relaxivitu kontrastní látky. Mezi tyto parametry patří: počet molekul vody v tzv. vnitřní koordinační sféře  $q$ , doba, jak dlouho molekuly vody ve vnitřní sféře setrvávají  $\tau_m$  a rotační korelační čas  $\tau_R$  [1].

### 2.1 Kontrastní látky obsahující $Gd^{III}$

Kontrastní látky obsahující  $Gd^{III}$  ovlivňují kontrast MRI snímků zvýšením relaxační rychlosti spinů jader vodíků navázaných v molekulách vody. Jednou z možností, jak zrychlit podélnou i příčnou relaxaci, je fluktuující lokální magnetické pole [1]. Ionty  $Gd^{III}$  mají nespárované elektrony, jsou tedy paramagnetické. Tyto elektrony indukují magnetický dipól, který je větší než dipól indukovaný jádrem. Tím pádem má dipól-dipólová interakce větší amplitudu a dipól-dipólová relaxace se zrychlí. Výsledná pozorovaná relaxace je pak dána součtem diamagnetické  $1/T_{i,d}$  a paramagnetické  $1/T_{i,p}$ . Lokální magnetické pole klesá se vzdáleností od jádra, proto má největší efekt na molekuly, které jsou v přímém kontaktu s gadoliniem, jedná se o molekuly tvořící vnitřní koordinační sféru iontu  $Gd$ . Vliv lokálního magnetického pole je přenášen i na tzv. vnější koordinační sféru - molekuly mimo vnitřní sféru nacházející se v blízkém okolí iontu. Zvýšení rychlosti relaxace v této sféře je ale méně markantní, a proto se výsledná relaxace dělí na relaxaci vnitřní  $(1/T_{i,p})^{IS}$  a vnější sféry  $(1/T_{i,p})^{OS}$ , stejně tak relaxivita a platí rovnice

$$\frac{1}{T_{i,p}} = (1/T_{i,p})^{IS} + (1/T_{i,p})^{OS} \quad kde \quad i = 1,2 \quad (2.1)$$

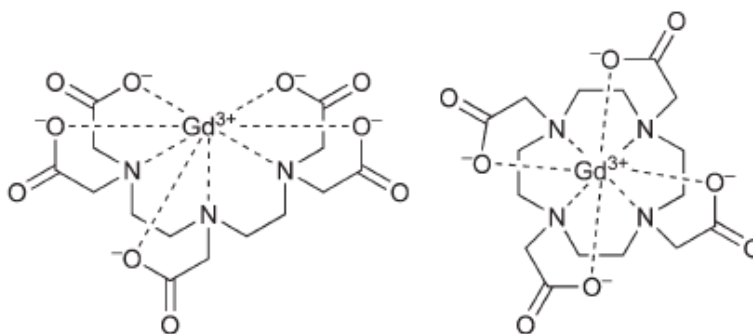
$$r_i = r^{IS} + r^{OS} \quad kde \quad i = 1,2. \quad (2.2)$$

Příspěvek vnitřní sféry roste lineárně s počtem molekul vody v ní obsažených.

V polích menších než 1,5 T platí, že s rostoucím rotačním korelačním časem klesá relaxivita, proto je vhodný co nejdelší korelační čas. Na rozdíl od nižších polí, pro pole větší než 3 T vedou k nejvyšší relaxivitě středně velké molekulární sloučeniny. Doba setrvání molekuly ve vnitřní sféře se v relaxivitě výrazně projevuje jen u pomalu se reorientujících komplexů [1]. Obecně je u klinicky schválených kontrastních látek pro MRI příliš krátký rotační korelační čas a moc dlouhá doba po kterou molekula vody setrvá ve vnitřní sféře. Krátký rotační korelační čas je obecně způsoben nízkou molekulární hmotností použitých komplexů. Jedním z možných řešení navržených v [6] je navázání kontrastní látky na  $\beta$ -cyklodextrin, jakožto na molekulu s vhodnou molekulární hmotností.

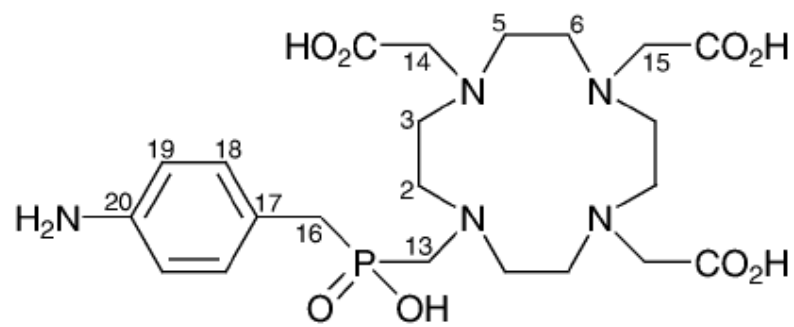
## 2.2 Ligandy kontrastních látek pro Gd

Všechny chelátory, které se dnes užívají jako kontrastní látky pro MRI, jsou oktadentátní ligandy vycházející buď z lineárního ligandu diethylenetriaminepenta-octové kyseliny (DTPA), nebo z makrocyclického ligandu 1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekan-1,4,7,10-tetraoctové kyseliny (DOTA), které jsou na obrázku 2.1 [1]. Oba ligandy mají osm donorových atomů a jednu molekulu vody ve vnitřní sféře, u které dochází k rychlé výměně, čímž se šíří paramagnetický relaxační efekt kového iontu dále do vzorku. Makrocyclické ligandy vykazují oproti lineárním vyšší kinetickou stabilitu [1].



Obrázek 2.1: Příklady klinicky schválených kontrastních látek: Gd-DTPA (vlevo) a Gd-DOTA (vpravo) [6].

DO3AP<sup>ABn</sup> je označení pro molekulu 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1-methyl[(4-aminofenyl)methyl]fosfinová kyselina, která představuje jednu z mnoha modifikací molekuly DOTA. Má místo jedné COOH skupiny navázanou část kyseliny methylfosfinové, která slouží k destabilizaci koordinované molekuly vody a tím zkracuje dobu setrvání molekuly ve vnitřní koordinační sféře  $\tau_m$  na hodnoty optimální pro MRI. Navíc rameno obsahuje také aminofenyl, který umožňuje případné navázání na makromolekulární systém [2]. Molekula je na obrázku 2.2.



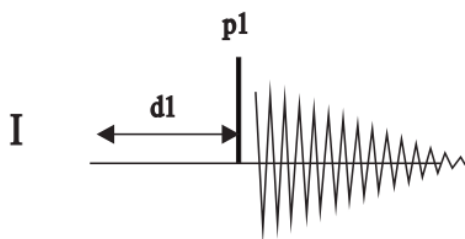
Obrázek 2.2: Molekula DO3AP<sup>ABn</sup> studovaná v této práci jako slibný nový ligand Gd pro kontrastní látky [2].

### 3. Experimentální metody NMR

Při experimentu NMR se na vzorek se aplikuje radiofrekvenční pole ve formě krátkého pulzu, popřípadě sledu pulzů, který vede k vychýlení magnetizace z rovnovážné polohy. Na detekční cívice se pak měří časový průběh napětí indukovaný Larmorovou precesí. Tento signál se nazývá signál volné precese („Free Induction Decay“, zkráceně FID). Spektrum se získá jeho Fourierovou transformací. Pro lepší poměr signálu ku šumu je často nutné naměřit vyšší počet skenů. Mezi jednotlivými skeny je časová prodleva  $d1$  sloužící k opětovnému návratu systému do rovnováhy, označovaná jako čekací doba. Pro zajištění rovnovážného stavu na začátku experimentu se někdy ještě aplikuje několik skenů, během kterých nedochází k detekci signálu a označují se jako nezaznamenané („dummy“) skeny.

#### 3.1 Měření spekter

Nejjednodušší pulzní sekvence obsahuje  $90^\circ$  pulz o délce  $p1$  a následnou detekci signálu. Slouží pro získání spektra vybraného izotopu. V případě měření izotopů  $^{13}\text{C}$  a  $^{31}\text{P}$  navíc aplikujeme tzv. decoupling. To znamená, že se ozařují i jádra  $^1\text{H}$ , čímž se odstraní vliv J-interakce na změřená spektra.



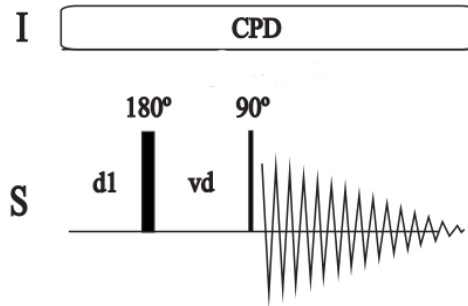
Obrázek 3.1: Základní sekvence zg použitá k měření 1D spekter obsahující čekací dobu  $d1$  a radiofrekvenční pulz  $p1$  [11].

#### 3.2 Měření podélné relaxační doby $T_1$

Nejčastěji používaným experimentem k měření podélné relaxační doby je návrat po inverzi („Inversion-recovery“). Jedná se o sekvenci, kde se nejdříve aplikuje  $180^\circ$  pulz, který převrátí vektor magnetizace  $\mathbf{M}$  do směru  $-z$ . Vlivem relaxačních mechanismů se velikost  $\mathbf{M}$  zmenšuje, projde nulou a opět se zvětšuje ve směru kladné osy  $z$ . Po uplynutí proměnného časového úseku  $vd$  se aplikuje  $90^\circ$  pulz, který převrátí magnetizaci do směru  $y$  a zaznamená se signál. S postupně se prodlužujícím  $vd$  získáme sérii spekter. Závislost intenzity signálů na čase  $t$  se poté proloží funkcí získanou řešením diferenciální rovnice 1.12

$$M_z(t) = M(1 - A\exp(-t/T_1)). \quad (3.1)$$

K měření  $T_1$  na jádrech  $^{13}\text{C}$  byla použita sekvence t1irpg, viz. obrázek 3.2, kde je kromě výše popsaných pulzů aplikován ještě decoupling na vodíky, který zajišťuje, aby se stav vodíků během  $vd$  neměnil [7, 1].



Obrázek 3.2: „Inversion-recovery“ experiment tlirpg použitý k měření  $T_1$  na jádrech uhlíku. Po uplynutí čekací doby  $d1$  po předchozím skenu se aplikuje  $180^\circ$  pulz, pak následuje proměnný časový úsek  $vd$  a je aplikován  $90^\circ$  pulz. Následně dojde k zaznamenání signálu. CPD značí vodíkový decoupling [11].

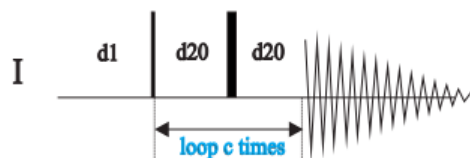
### 3.3 Měření příčné relaxační doby $T_2$

Při měření  $T_2$  je potřeba zajistit, aby se co nejméně projeví nehomogenity magnetického pole, z toho důvodu se k měření  $T_2$  používá tzv. spinové echo. Jedná se o sekvenci začínající  $90^\circ$  pulzem, který sklopí magnetizaci do směru osy  $y$ , vlivem nehomogenit a  $T_2$  relaxace dojde k rozfázování spinů a ke zmenšení příčné složky magnetizace. Po určitém čase zvaném echo čas, který je roven  $2 \cdot d20$ , je aplikován  $180^\circ$  pulz. Tento pulz obrátí příčnou rovinu kolem osy  $y$ , což vede po uplynutí doby  $d20$  k opětovné refokusaci. Výsledná příčná magnetizace je detekována a tento signál se nazývá spinovým echem, viz. obrázek 3.3.

Pro zjištění doby  $T_2$  se naměří série spekter s proměnným počtem ech  $vc$ . Závislost intenzity spinového echa na času  $t$ , daném počtem spinových ech nasobených echočasem, je dle rovnice 1.14 exponenciální a její řešení má tvar

$$M_{x,y}(t) = M_{x,y}(0)\exp(-t/T_2), \quad (3.2)$$

kde  $M_{x,y}$  je příčná složka magnetizace. Proložení získané závislosti intenzity echa na celkové době trvání použitých spinových ech touto funkcí lze získat dobu  $T_2$ .



Obrázek 3.3: Sekvence cpmg použitá na měření relaxační doby  $T_2$ . Po uplynutí čekací doby  $d1$  po předchozím skenu se aplikuje  $90^\circ$  pulz, následně se čeká po dobu  $d20$ , poté je aplikován refokusační  $180^\circ$  pulz a po opětovném uplynutí doby  $d20$  je nabírán signál. Počet spinových ech je označen jako *loop c times* [11].

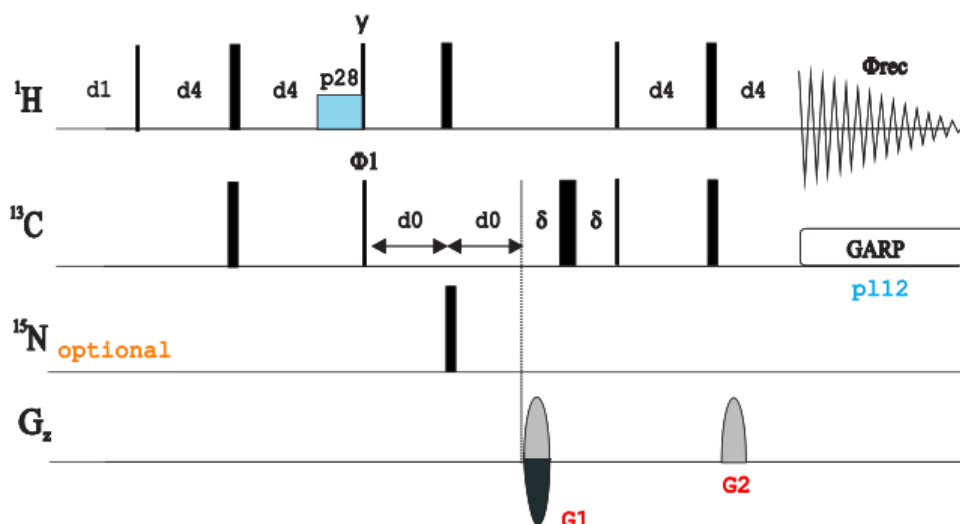


## 3.4 2D NMR experimenty

V řadě aplikací se využívá 2D NMR experimentů, které jsou schopny využít přenosu magnetizace mezi jádry a poskytnout tak užitečnou informaci o jejich vzájemné interakci. Na jádra, mezi kterými chceme pozorovat interakci (v našem případě  $^{13}\text{C}$  a  $^1\text{H}$ ), se aplikuje komplikovaná série pulzů a prodlev. Sekvence se několikrát opakuje, přičemž je alespoň jedna z prodlev proměnná. Výsledné 2D spektrum se získá Fourierovou transformací série spekter jak v časové, tak v nepřímé doméně. Každá z os ve 2D spektru přísluší jednomu ze sledovaných jader. Forma získané informace záleží na volbě pulzní sekvence. Dále budou blíže představeny experimenty zkoumající chemické vazby mezi jádry  $^{13}\text{C}$  a  $^1\text{H}$ .

### HSQC

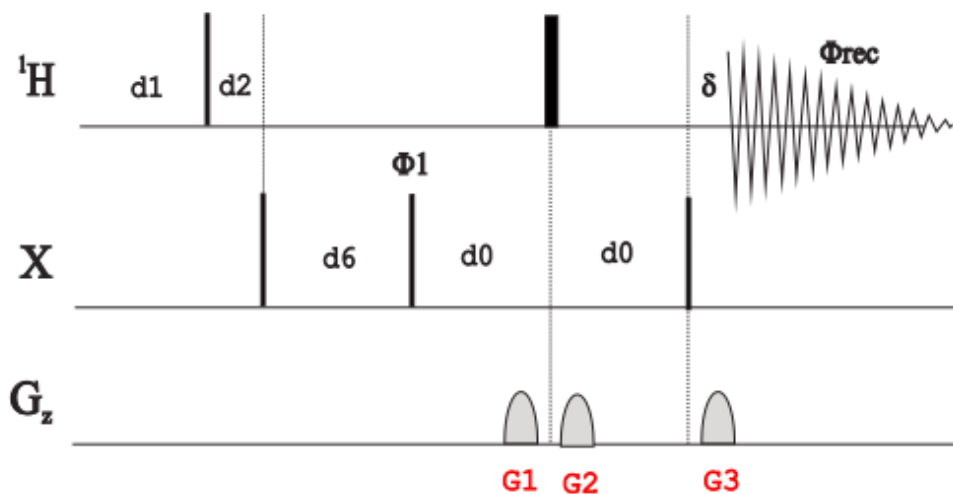
HSQC, anglicky Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy je 2D experiment, který se používá na určení jader  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ , která jsou na sebe přímo chemicky navázána. Ve spektru se tedy objeví cross-peak na souřadnicích chemického posunu uhlíku a vodíku spojeného jednou chemickou vazbou. Schéma sekvence je na obrázku 3.4 .



Obrázek 3.4: Sekvence HSQC použita k určení jader  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ , která jsou propojena přes jednu chemickou vazbu [11].

### HMBC

Zkratka vznikla z anglického „Heteronuclear Multiple Bond Correlation“. Jedná se o sekvenci, viz obrázek 3.5, kde je naopak signál přímo navázaných vodíků a uhlíků potlačen, a pozorujeme peaky na souřadnicích jader  $^{13}\text{C}$  a  $^1\text{H}$  spojených přes dvě až tři (vyjíměčně i více) chemických vazeb.



Obrázek 3.5: Sekvence HMBC použita k určení jader  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ , která jsou propojena přes dvě a více chemických vazeb [11].

## 4. Nastavení experimentů

Měření probíhalo na spektrometru Avance 500 firmy Bruker a následně zpracována v programu TopSpin. Uvnitř spektrometru se nachází magnetické pole o velikosti 11,7 T, což odpovídá frekvenci 500,130 MHz pro  $^1\text{H}$ , 202,457 MHz pro  $^{31}\text{P}$  a 125,758 MHz pro  $^{13}\text{C}$ . K měření byla použita sonda BBFO, jejíž součástí je teplotní čidlo, topná spirála a přívod chlazeného plynu umožňující regulaci teploty. Teplota byla kalibrována před každým experimentem za použití kalibračního vzorku obsahujícího methanol (teploty pod 330 K) nebo ethylen (teploty nad 330 K). Dosažená přesnost nastavení teploty je 0,5 K. Délky pulzů byly 10,0  $\mu\text{s}$  pro  $^1\text{H}$ , 9,6  $\mu\text{s}$  pro  $^{13}\text{C}$  a 20,0  $\mu\text{s}$  pro  $^{31}\text{P}$ .

Měření MRI probíhalo na spektrometru Bruker Avance III wide bore a obraz byl následně zpracován v programu Paravision. K měření byla použita sonda MIC 500 W2/54 Body s insertem 5 mm  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$  a gradientní jednotka GREAT 60.

### 4.1 Měření 1D spekter

Spektra byla získána dle postupu popsaného v sekci 3.1. Při měření jader  $^{13}\text{C}$  a  $^{31}\text{P}$  byl použit širokopásmový protonový decoupling. Nastavení jednotlivých parametrů je shrnuto v tabulkách 4.1 a 4.2.

Tabulka 4.1: Parametry pulzních sekvencí použitých pro měření vodíkových a uhlíkových spekter  $\beta$ -cyklodextrinu.

Jádro	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
Pulzní program	zg	zgdc
Počet scanů	1	1024
Počet nezaznamenávaných scanů	0	4
Čekací doba (s)	5,0	5,0

Tabulka 4.2: Parametry pulzních sekvencí použitých pro měření vodíkových, uhlíkových a fosforových spekter La(DO3AP<sup>ABn</sup>).

Jádro	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{31}\text{P}$
Pulzní program	zg	zgdc	zgdc
Počet scanů	1 a 32	10240	1024
Počet nezaznamenávaných scanů	0	4	4
Čekací doba (s)	5,0	5,0	1,0
Sklápěcí úhel pulzu	90°	30°	30°

### 4.2 Měření 2D spekter

Byla měřena korelovaná spektra uhlíků a vodíků postupem popsaným v sekci 3.4. Interakční konstanta J-vazby byla nastavena na hodnoty  $J_{CH} = 145$  Hz přes jednu vazbu a 7 Hz přes více vazeb. Nastavení parametrů je v tabulce 4.3.

Tabulka 4.3: Parametry pulzních sekvencí použitých pro měření 2D korelovaných spekter  $^{13}\text{C}$  a  $^1\text{H}$  La(DO3AP<sup>ABn</sup>).

Pulzní program	HSQC	HMBC
Počet scanů	32	64
Počet nezaznamenávaných scanů	16	16
Čekací doba (s)	1,5	2,0

### 4.3 Měření $T_1$ , $T_2$ a $\eta$

Měření podélné relaxační doby uhlíků  $^{13}\text{C}$  proběhlo pomocí experimentu návrat po inverzi s širokopásmovým protonovým decouplingem, viz sekce 3.2. Hodnota  $T_1$  byla získána fitováním závislosti intenzity na proměnném času dle rovnice 1.12. Hodnota  $vd$  se měnila v osmi krocích od velmi malé hodnoty po 32 s.

K měření příčné relaxační doby  $T_2$  uhlíků  $^{13}\text{C}$  bylo použito konstantní spinové echo (0,5 ms) viz 3.3. Počet ech byl měněn v 16 krocích v rozmezí 1– 512. Následně byla proložena závislost intenzity signálů na celkovém času trvání ech  $t$  dle rovnice 1.14.

Pro určení zesílení pomocí nukleárního Overhauserova efektu byla zaznamenána dvě spektra, jedno s velmi dlouhým časem ozařování (1,5 s) a druhé se zanedbatelně krátkým (0,01 ms). Faktor  $1 + \eta$  byl poté získán jako poměr příslušných intenzit těchto dvou spekter. Ostatní parametry všech tří měření jsou shrnuty v tabulce 4.4.

Tabulka 4.4: Parametry pulzních sekvencí použitých pro měření relaxačních dob  $T_1$ ,  $T_2$  a  $\eta$  La(DO3AP<sup>ABn</sup>).

	$T_1$	$T_2$	NOE
Pulzní program	t1irpg	cpmgx2.vas	noehx2.la
Počet scanů	2400	4096	1
Počet nezaznamenávaných scanů	4	16	0
Čekací doba (s)	5,0	5,0	5,0

### 4.4 Měření MRI

Byl měřen  $T_1$  vážený obraz, čehož bylo dosaženo nastavením dlouhého času opakování (daného součtem doby trvání celé pulzní sekvence a čekací doby  $d1$ ) a krátkého echo času. Konkrétní hodnoty nastavených parametrů jsou v tabulce 4.5.

Tabulka 4.5: Nastavené parametry pro získání snímku vody a roztoku Gd(DO3AP<sup>ABn</sup>).

Pulzní program	FLASH
Velikost obrázku (px)	64
Tloušťka řezu (mm)	2
Sklápěcí úhel pulzu	30°
Čas opakování (ms)	100
Echo-čas (ms)	6,4
Počet scanů	1

# 5. Příprava vzorků

## 5.1 Vzorek cyklodextrinu

V 1 ml deuterovaného dimethylsulfoxidu (DMSO-D6) od firmy Chemotrade obsahujícího 99,8 At % deuteria bylo rozpuštěno 11,1 mg  $\beta$ -cyklodextrinu od firmy Wako. Chemický posun byl referencován podle rezonancí rozpouštědla. Rezonanční frekvence jader  $^1\text{H}$  DMSO je dle [12] 2.50 ppm a jader  $^{13}\text{C}$  39,52 ppm.

## 5.2 Vzorek La(DO3AP<sup>ABn</sup>)

V 500  $\mu\text{l}$  99,9%  $\text{D}_2\text{O}$  od firmy Aldrich bylo rozpuštěno 40 mg La(DO3AP<sup>ABn</sup>). Z důvodu snížení teploty tuhnutí bylo přidáno 204  $\mu\text{l}$  methanolu. Hodnota pH vzorku je 6,7. Chemický posun byl referencován pomocí interního standardu Trimethylsilylpropionové kyseliny.

## 5.3 Vzorek Gd(DO3AP<sup>ABn</sup>)

Na zobrazování byla použita dvouplášťová kyveta. Ve vnější části byla destilovaná  $\text{H}_2\text{O}$ , ve vnitřní 20 mg Gd(DO3AP<sup>ABn</sup>) rozpuštěných ve 2 ml destilované  $\text{H}_2\text{O}$ .

## Příprava komplexu Gd(DO3AP<sup>ABn</sup>)

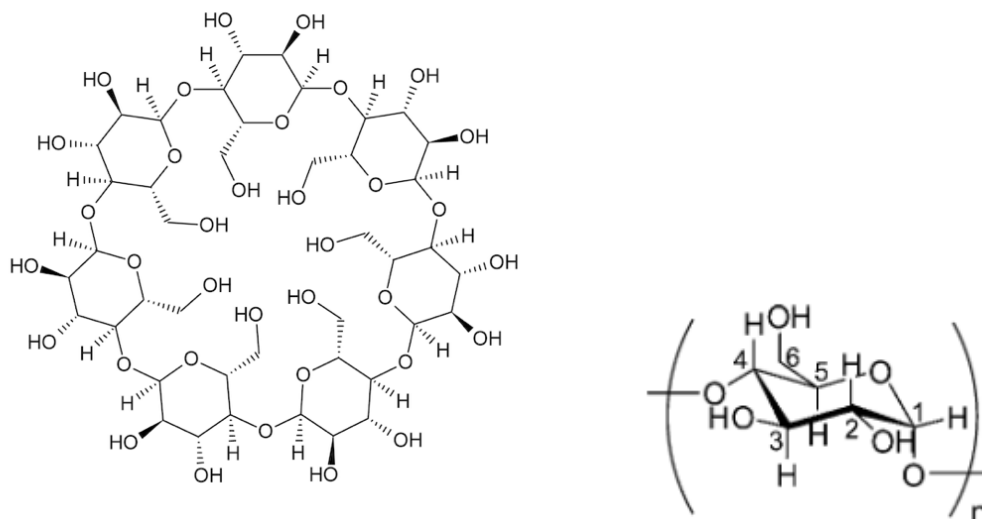
Pro přípravu komplexu bylo rozpuštěno 70,2 mg DO3AP<sup>ABn</sup> s 36 mg  $\text{GdCl}_3$  v destilované  $\text{H}_2\text{O}$ , DOTA je v nadbytku 1,2. Bylo měřeno pH roztoku a byl přikapáván 0,3% roztok  $\text{NH}_3$  do ustálení pH na hodnotě 7.5. Během této reakce dochází ve skupině COOH ke koordinaci gadolinia, přitom se uvolňují  $\text{H}^+$ . Tím pádem se snižuje pH a reakce by postupně přestala probíhat. Přikapávání  $\text{NH}_3$  zajišťuje posunutí chemické rovnováhy směrem k produktům. Následně byl roztok po dobu 3 dní zahříván při teplotě 60° C. Během této doby došlo k navázání Gd na dusíky v cyklu. Ze vzorku byla odpařena voda. Byla provedena kolonová chromatografie, jako stacionární fáze byl použit oxid hlinitý, jako mobilní fáze roztok izopropylalkoholu, 28% vodný roztok  $\text{NH}_3$  a vody v poměru 5:1:4. Směs oxidu hlinitého a promývacího roztoku byla dána do kolony a byl určen mrtvý objem, který vyšel 22 ml. Látka byla po odpaření rozpuštěna v malém množství tohoto roztoku a napipetována do kolony. Postupně bylo odebráno deset vzorků. Pomocí chromatografického papírku bylo určeno, které vzorky obsahují požadovaný produkt. Tyto vzorky byly odpařeny. Poté byly dvakrát rozpuštěny v methanolu a vypařeny pro odstranění zbytků vody. Následně byl vzorek vysrážen v diethyletheru a proplachován diethyletherem. Na závěr byl produkt umístěn na 15 min. do sušárny. Celkový výtěžek činil 68 mg. Hmotnostní spektroskopií bylo ověřeno, že se jedná o požadovaný komplex.

## 6. Výsledky měření a diskuze

V dřívějších studiích [5, 6] bylo zjištěno, že konjugát sedmi komplexů  $\text{Gd}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$  a molekuly  $\beta$ -cyklodextrinu vykazuje hodnoty parametrů ovlivňujících relaxivitu blízké optimálním hodnotám [6]. Za účelem charakterizace této nové kontrastní látky byly nejprve studovány její jednotlivé komponenty:  $\beta$ -cyklodextrin a  $\text{Gd}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$ . Měření těchto dvou částí zvláště umožňuje snazší orientaci ve spektrech a přiřazení signálů.

### 6.1 Cyklodextrin

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligomery glukózy, získávají se ze škrobu. Mezi nejčastěji používané patří  $\alpha$ -cyklodextrin, mající šest glukózových jednotek,  $\beta$ -cyklodextrin, který jich má sedm, viz obrázek 6.1, a  $\gamma$ -cyklodextrin obsahující osm glukózových jednotek [13]. Jsou biokompatibilní, netoxické a relativně levné, což je činí vhodnými k provádění *in vivo* experimentů. Cyklodextriny mají kónický tvar, jsou málo rozpustné ve vodě, vnitřní část je hydrofóbní, zvenku jsou naopak hydrofilní [14].



Obrázek 6.1: Molekula  $\beta$ -cyklodextrinu (vlevo) a glukózy (vpravo),  $n$  značí počet jednotek spojených v molekulu cyklodextrinu [14][15].

Vzhledem k širokému využití byly cyklodextriny mnohokrát studovány. NMR představuje vhodnou metodu ke zkoumání struktury i dynamických procesů. Pro syntézu kontrastní látky je žádoucí, aby její komponenty byly maximálně rigidní, z toho důvodu nás zajímají zejména studie věnující se dynamice cyklodextrinu jako molekuly.

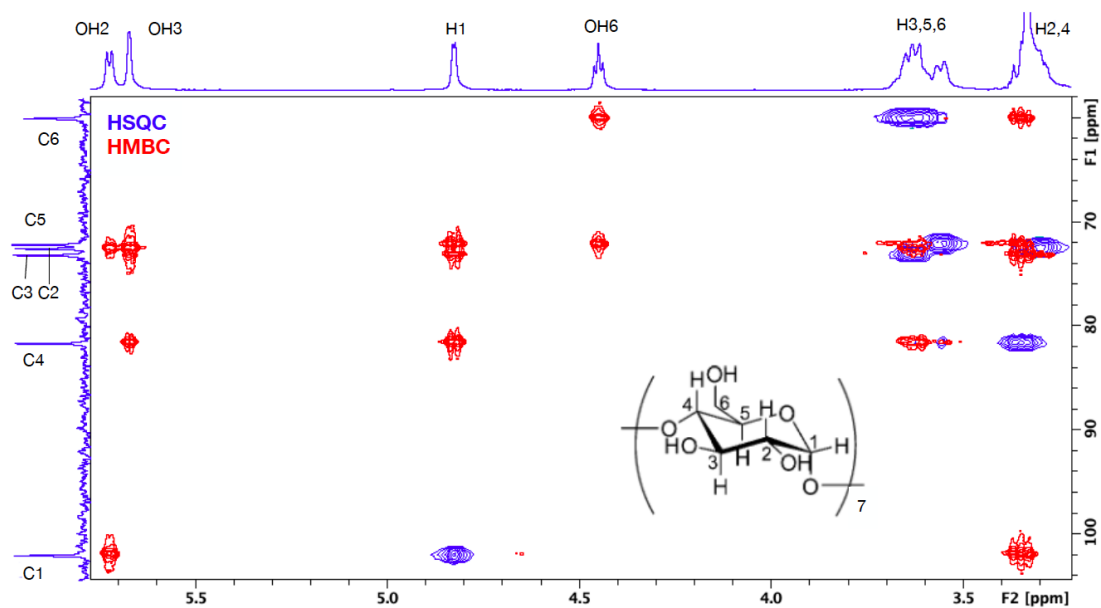
V článku [16] se nachází obecné shrnutí informací o cyklodextrinech. Studovaly se zde mimo jiné relaxace vodíků  $\beta$ -CD. Jinak je studie převážně zaměřená na měření inkluzivních komplexů cyklodextrinů a menších molekul. V [17] byly měřeny  $^{13}\text{C}$  relaxace  $\alpha$ - a  $\gamma$ -CD. K vyhodnocení  $^{13}\text{C}$  relaxací je zde použit Lipari-Szabo

model [18]. Jedná se o model, kde kromě globální změny reorientace molekuly vystupuje další stupeň volnosti. Tento model předpokládá, že globální pohyb molekuly je izotropní a je popsán globálním korelačním časem  $\tau_{uc}$ . Lokální pohyb je popsán efektivním korelačním časem  $\tau_{ue}$ . Míra korelace globálního a lokálního pohybu je dána hodnotou parametru uspořádanosti  $S^2$  z  $[0,1]$ . Čím je  $S^2$  menší, tím více jsou pohyby nezávislé. Lipari-Szabo model neposkytuje ale informaci o konkrétní podobě vnitřního pohybu. Vyhodnocením pomocí Lipari-Szabo modelu bylo zjištěno, že molekula není zcela rigidní, ale dochází i k lokálním pohybům. Ty jsou značně korelované s globální reorientací celé molekuly ( $S^2$  má hodnotu 0,80–0,85). Publikované globální korelační časy jsou 1,61 ns (303 K) a 0,90 ns (322 K) pro  $\alpha$ -CD, 2,4 ns (303 K) a 1,27 ns (322 K) pro  $\gamma$ -CD. Podle předpokladu autorů se hodnoty pro  $\beta$ -CD budou blížit spíše  $\gamma$ -CD než  $\alpha$ -CD. Tento článek ale neposkytuje informaci o konkrétní podobě vnitřního pohybu, tím se zabývá zdroj [19]. Byly studovány relaxace cyklodextrinů tvořených 6–12 glukózovými jednotkami. Bylo zjištěno, že v  $\beta$ -CD dochází k rychlému naklápění, které má malou amplitudu. Tento vnitřní pohyb je rychlejší než celková reorientace molekuly.

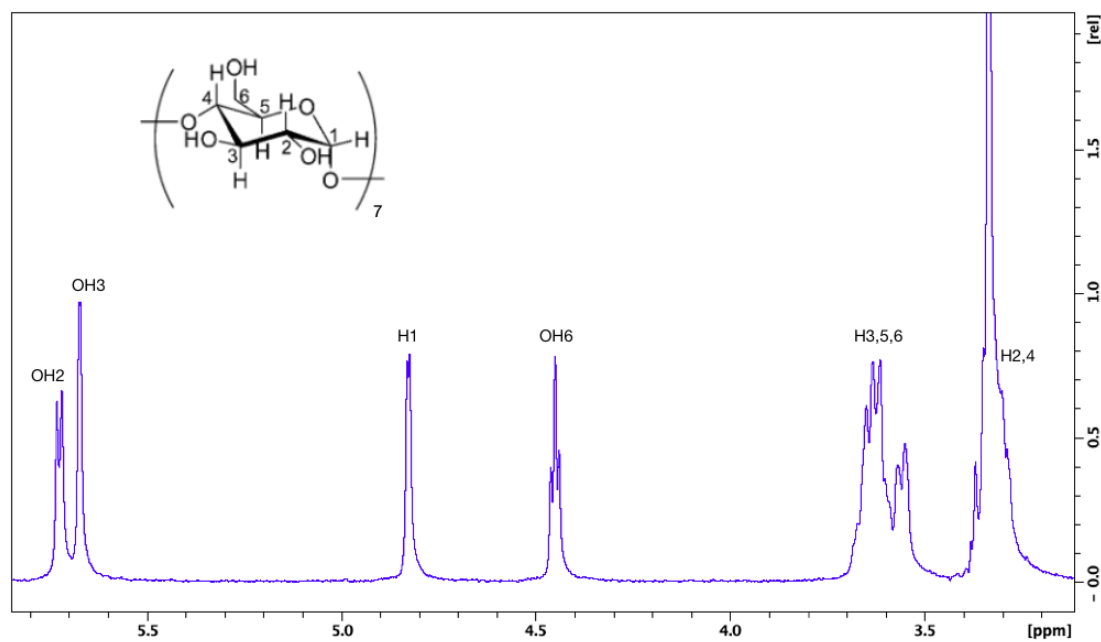
Celkově se tedy ukazuje, že  $\beta$ -cyklodextrin vykazuje i jistou vnitřní flexibilitu, která je však do značné míry omezená a dá se tedy předpokládat, že by mohl být vhodným nosičem komplexů  $Gd(DO3AP^{ABn})$ . S ohledem na publikace byly na cyklodextrinu naměřena pouze 2D spektra a přiřazení slouží hlavně k ověření použitých pulzních sekvencí, které byly nadále aplikovány na neznámou molekulu.

Ze změřených 2D spekter HSQC a HMBC (viz. obrázek 6.2) bylo přiřazeno vodíkové a uhlíkové spektrum. Molekula  $\beta$ -cyklodextrinu se skládá ze 7 glukózových jednotek a je symetrická, takže tyto jednotky jsou ekvivalentní a pozorujeme od jejich atomů pouze jeden signál místo sedmi. Nejprve byl přiřazen uhlík C6 (59,9 ppm), protože má jako jediný na sebe přímo navázané dva vodíky H6(3,5–3,6 ppm). Následně byly identifikovány OH skupiny (OH2 5,7 ppm a OH3 5,6 ppm), protože nemají v HSQS žádný signál, neboť vodík je navázaný na kyslík. Dále byla přiřazena skupina OH6 (4,4 ppm), protože je vzdálena přes dvě vazby od C6 a pozorujeme tedy signál v HMBC. Uhlík C5 by neměl mít cross-peak s žádnou OH skupinou, což splňuje pouze jeden peak na 72,0 ppm, na C5 je přímo navázaný pouze H5(3,5–3,6 ppm). Dále pozorujeme signál v HMBC mezi C5 a H4, H4 (3,3 ppm) má zase cross-peak v HSQC s C4 (81,5 ppm). Uhlík C4 má přes více vazeb cross-peak s OH skupinou. Jedná se o OH3 skupinu, která je vzdálena přes méně vazeb než OH2. Skupina OH2 má signál v HMBC s C2 (72,4 ppm) a s C1 (101,9 ppm), CH3 zas s C3 (73,0 ppm) a s C4. Nakonec byl identifikován H1 (4,8 ppm), protože je přímo navázaný na C1. Přiřazení na obrázcích 6.3 a 6.4 se shoduje s identifikací signálů v práci [20].

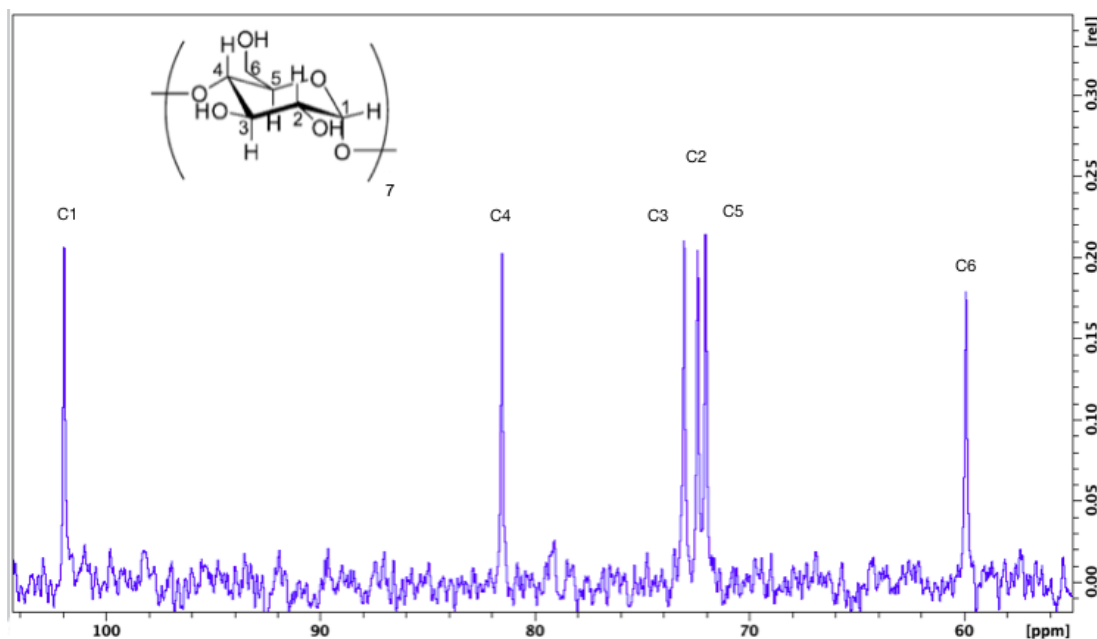




Obrázek 6.2: 2D spektra  $\beta$ -cyklodextrinu použitá k přiřazení jeho signálů. Ve spektru HSQC (modře) jsou cross-peaky na souřadnicích chemických posunů atomů  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ , které jsou vzájemně vázány chemickou vazbou. Spektrum HMBC (červeně) pak znázorňuje interakci přes více vazeb.



Obrázek 6.3: Přiřazení spektrálních čar jader  $^1\text{H}$   $\beta$ -cyklodextrinu v DMSO- $d_6$ , 298 K.



Obrázek 6.4: Přiřazení spektrálních čar jader  $^{13}\text{C}$   $\beta$ -cyklodextrinu v DMSO- $d_6$ , 298 K.

## 6.2 $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$

Jak bylo diskutováno v sekci 2.2, nahrazení jednoho octového ramena molekuly DOTA objemnou fosfinátovou skupinou vede ke zkrácení doby  $\tau_m$ , po kterou molekula vody setrvává ve vnitřní koordinační sféře. Hodnota  $\tau_m$  klesla při srovnání s původním ligandem DOTA z 243 ns na 16 ns (oboje při 298 K) [4]. Kromě optimalizace  $\tau_m$  je třeba prodloužit  $\tau_r$ . Jak už bylo také zmíněno dříve 2.1, jednou z možností je navázání analogu látky DOTA na větší molekulu. Relaxivita může být však omezena v případě, že spojovací prvky nebo molekulární nosič vykazují dodatečnou vnitřní mobilitu.

V [3] byl NMR spektroskopii zkoumán ligand skládající se ze dvou jednotek  $\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$ , navázaných na sebe thiomocovinovým můstkem. Bylo zjištěno, že reorientační pohyb komplexů tohoto ligandu s ionty lanthanoidů (Y, Eu, Gd, Dy) je převážně izotropní.

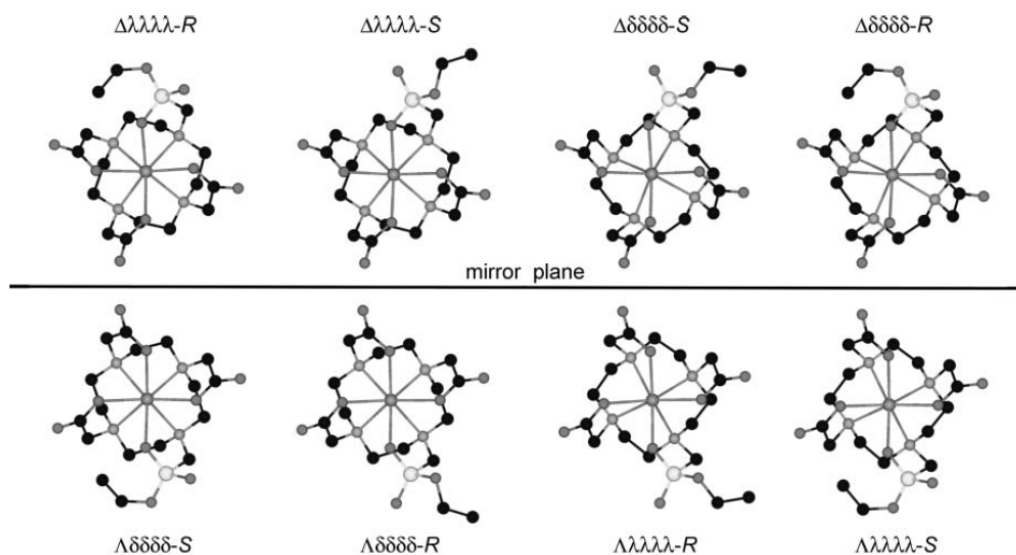
V [4] navázali  $\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$  pomocí tohoto můstku na polyamidoaminové (PAMAM) dendrimery. To jsou globulární netoxické molekuly, které se snadno rozpouští ve vodě. Na základě měření  $^{17}\text{O}$  NMR a  $^1\text{H}$  jaderné magnetické relaxační disperze („Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion“, zkráceně NMRD) a vyhodnocení těchto relaxometrických experimentů pomocí modelu Lipari-Szabo se ukázalo, že relaxivita je omezena nedostatečnou rigiditou struktury konjugátu. Molekula vykazuje nezanedbatelnou vnitřní flexibilitu ( $S^2 = 0,26$ ). Tentýž můstek byl ve studii [6] použit k navázání 6 resp. 7 komplexů  $\text{Gd}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$  na  $\alpha$ - resp.  $\beta$ -CD. Struktura těchto komplexů byla odhadnuta na základě měření komplexů s koordinovaným iontem Eu. Rozdíl ve vlastnostech mezi konjugáty na bázi  $\alpha$ - a  $\beta$ -cyklodextrinu je malý, přesto s poněkud příznivějšími výsledky pro komplex s  $\beta$ -CD. Jejich relaxivita je v polích relevantních pro klinická vyšetření (3 T) a při teplotě 37° mnohem vyšší než jednoduchých kontrastních látek používaných

v klinické praxi. Konkrétně pro komplex s  $\beta$ -CD je relaxivita rovna  $12,3 \text{ s}^{-1}$  což je třikrát více než  $3,9 \text{ s}^{-1}$  pro  $[\text{Gd}(\text{DOTA})\text{-(H}_2\text{O)}^-]$  (za stejných podmínek). Jedná se zatím o nejvyšší pozorovanou hodnotu pro kineticky inertní molekuly menší než 10 kDa.

### 6.2.1 Teplotní závislost spekter $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$

U molekuly DOTA a jejích analogů se pozoruje, že po koordinaci ligandu na ion vznikne osm chelátových kruhů, které mají svou vlastní konformaci. Celkově jsou možná dvě uspořádání makrocyklu značená  $\lambda\lambda\lambda\lambda$  nebo  $\delta\delta\delta\delta$ . Podobně i pendantní ramena mají dvě možné orientace značené jako  $\Lambda$  a  $\Delta$ . Celkem má tedy komplex dva diastereoizomery – SA a TSA, z nichž každý má dva enantiomery. Zastoupení izomerů TSA a SA je závislé na komplexovaném lanthanoidu [1]. V případě měřené molekuly je navázán lantan, u kterého se vyskytuje téměř výlučně izomer TSA.

Studovaná molekula má navíc oproti ligandu DOTA jedno methylfosfinové rameno, díky němuž se redukuje symetrie celé molekuly. Atom fosforu fosfinové skupiny se po koordinaci  $\text{Ln}^{\text{III}}$  stane chirální, komplex má tedy i stereoizomery R a S. Fosfináty obvykle výrazně preferují pouze jednu orientaci substituentů na atomu fosforu, ale ukazuje se, že v případě některých analogů DOTA s jedním fosfinovým ramenem může docházet ke vzájemné výměně koordinovaného a nekoordinovaného atomu kyslíku. Tento proces je rychlejší pro velké  $\text{Ln}^{\text{III}}$ . Izomerie fosforu se kombinuje s možným uspořádáním makrocyklu a pendantních ramen, celkově dostáváme 8 možných enantiomerů, které jsou na obrázku 6.5 znázorněny na komplexu  $\text{Ln}(\text{DO3AP}^{\text{OEt}})$ .

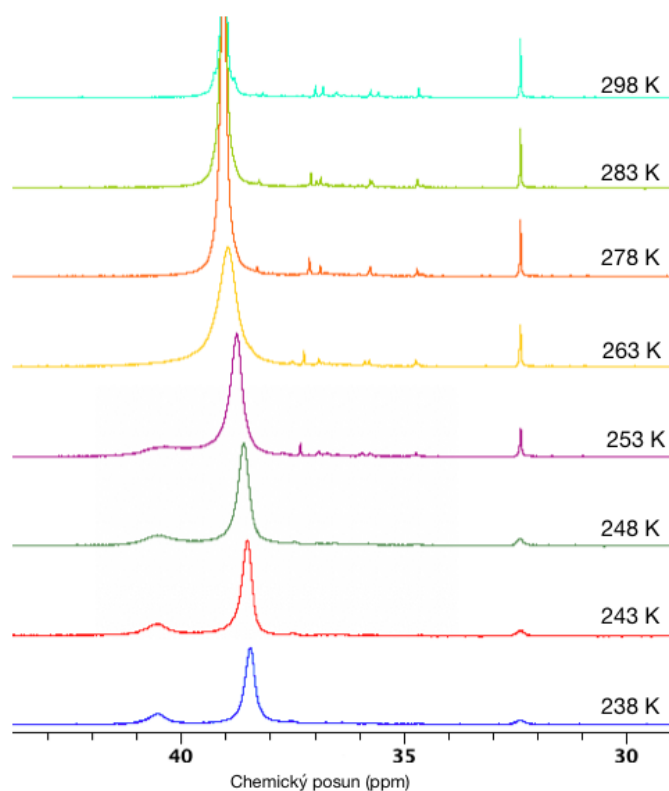


Obrázek 6.5: Osm možných izomerních forem analogu DOTA s jedním fosfinovým ramenem, znázorněných na komplexu  $\text{Ln}(\text{DO3AP}^{\text{OEt}})$  s obecným lanthanoidem [21].

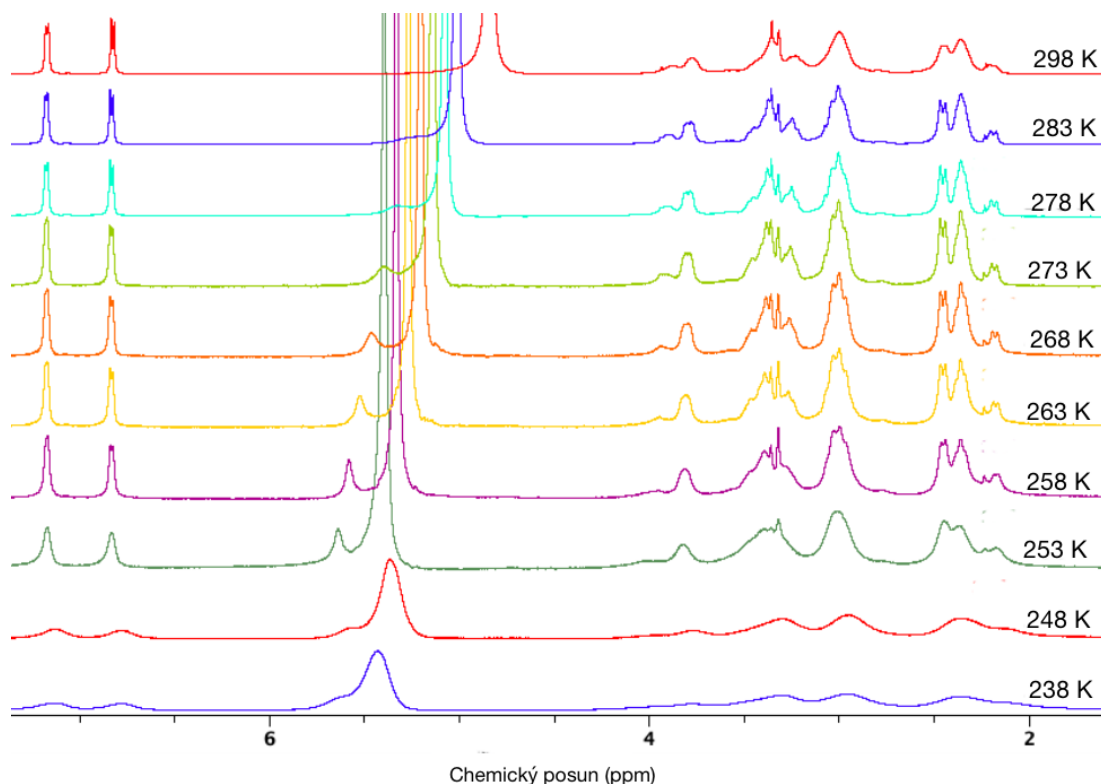
Ve fosforovém spektru (obrázek 6.6) se nachází jeden signál, který se u nižších teplot štěpí na dva. Snížením teploty se výměna koordinovaného a nekoordinovaného kyslíku zpomalí a ve spektru pozorujeme dva izomery TSA-R a TSA-S

dané chiralitou na atomu fosforu. Z intenzit signálů je vidět, že jeden ze stavů je velmi málo populovaný. Za pokojové teploty probíhá mezi těmito enantiomery rychlá výměna a pozorujeme pouze jeden signál.

Ve vodíkovém spektru dochází ke značnému rozšíření signálů. Lze předpokládat, že rozšíření se zvyšováním teploty je způsobené výměnou mezi dvěma enantiomerními formami izomeru TSA. U nízkých teplot, ve shodě s pozorováním na  $^{31}\text{P}$  spektrech, se proces enantiomerizace zpomalí, spektra však ovlivní výměna mezi R a S konfigurací na atomu P. Ne všechny atomy se účastní dynamických procesů, některé signály pocházející od aminofenyly jsou úzké napříč všemi teplotami. S ohledem na složité dynamické procesy probíhající ve vzorku bylo třeba z teplotní závislosti určit teplotu pro další měření, při které je spektrum nejvíce rozlišené a bude možné alespoň částečné přiřazení signálů. Z obrázku 6.7 je vidět, že nejvíce je spektrum rozlišené při teplotě 278 K.



Obrázek 6.6: Teplotní závislost spektra  $^{31}\text{P}$  molekuly  $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$  v rozpoštědle voda/methanol. U teploty 253 K a nižších pozorujeme rozštěpení signálu na dva, což je způsobeno chiralitou na fosforu.



Obrázek 6.7: Teplotní závislost spektra  $^1\text{H}$  molekuly  $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$  v rozpouštědle voda/methanol.

### 6.2.2 Přiřazení signálů $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$

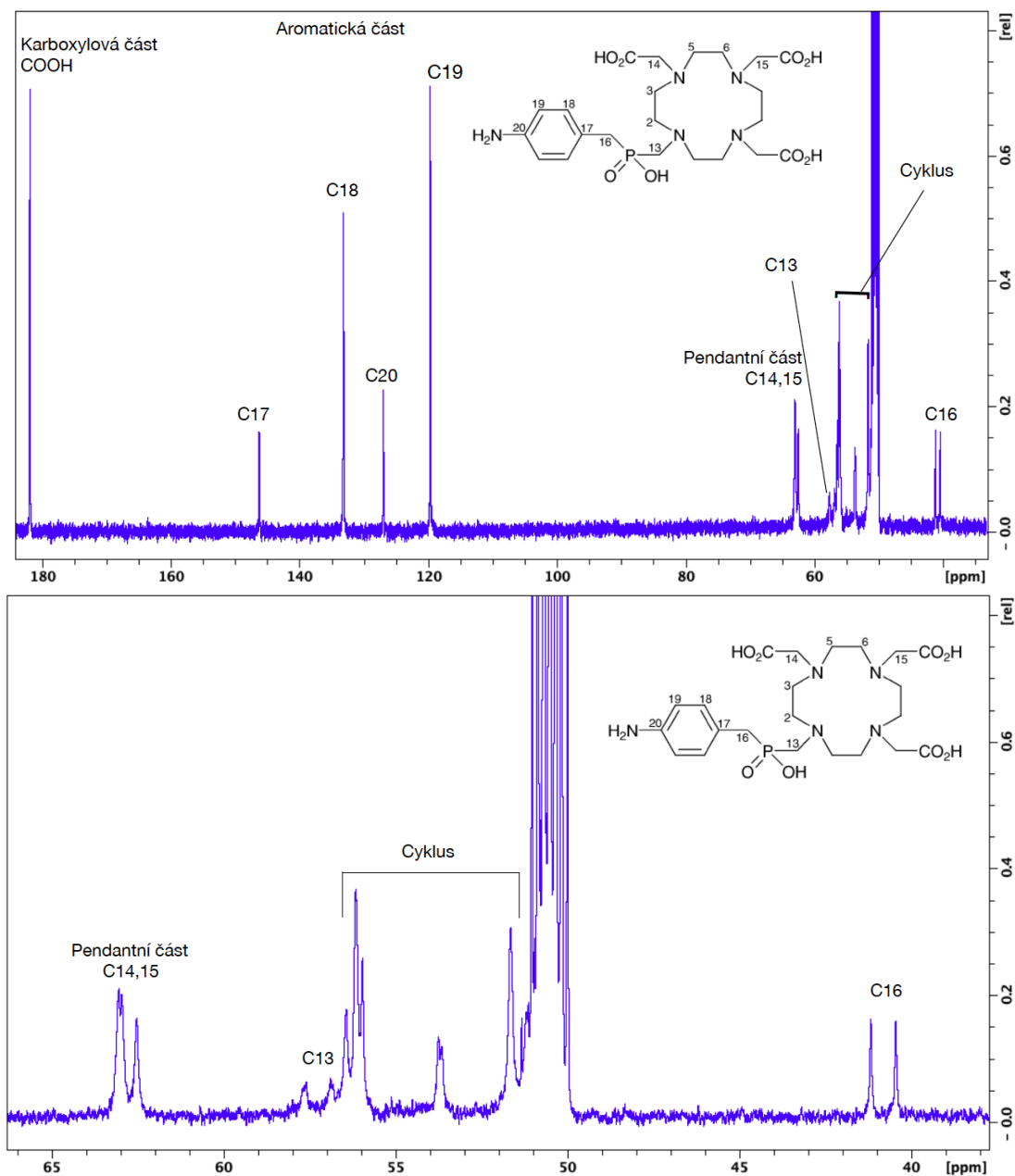
U komplexů, které jsou analogy molekuly DOTA a mají jedno fosfinové rameno, dochází k tomu, že se po koordinaci lanthanoidu všechny uhlíky a vodíky stávají vzájemně neekvivalentní a mohou každý poskytnout samostatný signál. Probíhající dynamické procesy způsobují, že spektra nejsou dostatečně rozlišená a dochází k překryvu signálů.

U vodíkového spektra (obrázek 6.9) lze s jistotou určit, že kolem 7 ppm pozorujeme dva dublety odpovídající parasubstituci benzenu. Z pozorovaného signálu mezi dubletem s vyšším ppm a uhlíkem C16 (41,0 ppm) lze soudit, že se jedná o vodík H18, dublet s nižším ppm by pak odpovídal vodíku H19. Ostatní signály už není prakticky možné jednoznačně identifikovat. Okolo 2,2 ppm pravděpodobně pozorujeme signály vodíků z cyklu, tzn. H2,3,5 a 6.

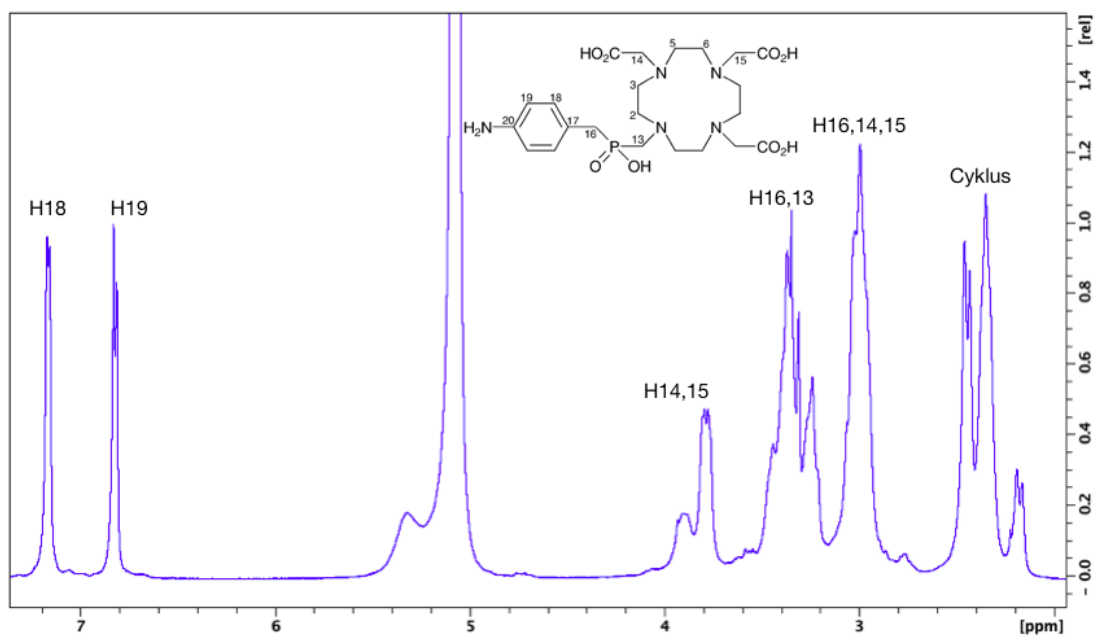
V uhlíkovém spektru (obrázek 6.8) pozorujeme celkem 3 signály, které nemají žádný signál v HSQC, musí se tedy jednat o skupinu COOH, u které byl místo vodíku nakoordinován lanthan, a kvarterní uhlíky C20 a C17. Signál skupiny COOH (182,0 ppm) je příspěvkem od třech ramen, je tedy z těchto tří nejintenzivnější. Uhlíky C20 (127,2 ppm) a C17 (146,8 ppm) lze identifikovat pomocí příslušných vodíků náležících aromaticity vzdálených přes dvě vazby. Uhlíky C18 (133,5 ppm) a C19 (119,8 ppm) byly také určeny pomocí vodíků v aromaticity, neboť jsou na ně navázané přímo. Skupiny COOH jsou přes dvě vazby spojené s H14,15 a tyto vodíky jsou přímo navázané na C14,15 (63,2 ppm). Dále pozorujeme cross-peak mezi vodíkem H18 a uhlíkem nenacházejícím se v aromatické části. Jedná se o uhlík C16, který je k aromaticity nejbližší. Uhlík C13 je pravděpodobně nenápadný

doublet okolo 58 ppm, jehož signály v HMBC nepatří k těm od zbývajících uhlíků v cyklu C2,3,5 a 6 (52,0–56,5 ppm). Z naměřeného spektra není možné odlišit, který uhlík makrocyklu je který.

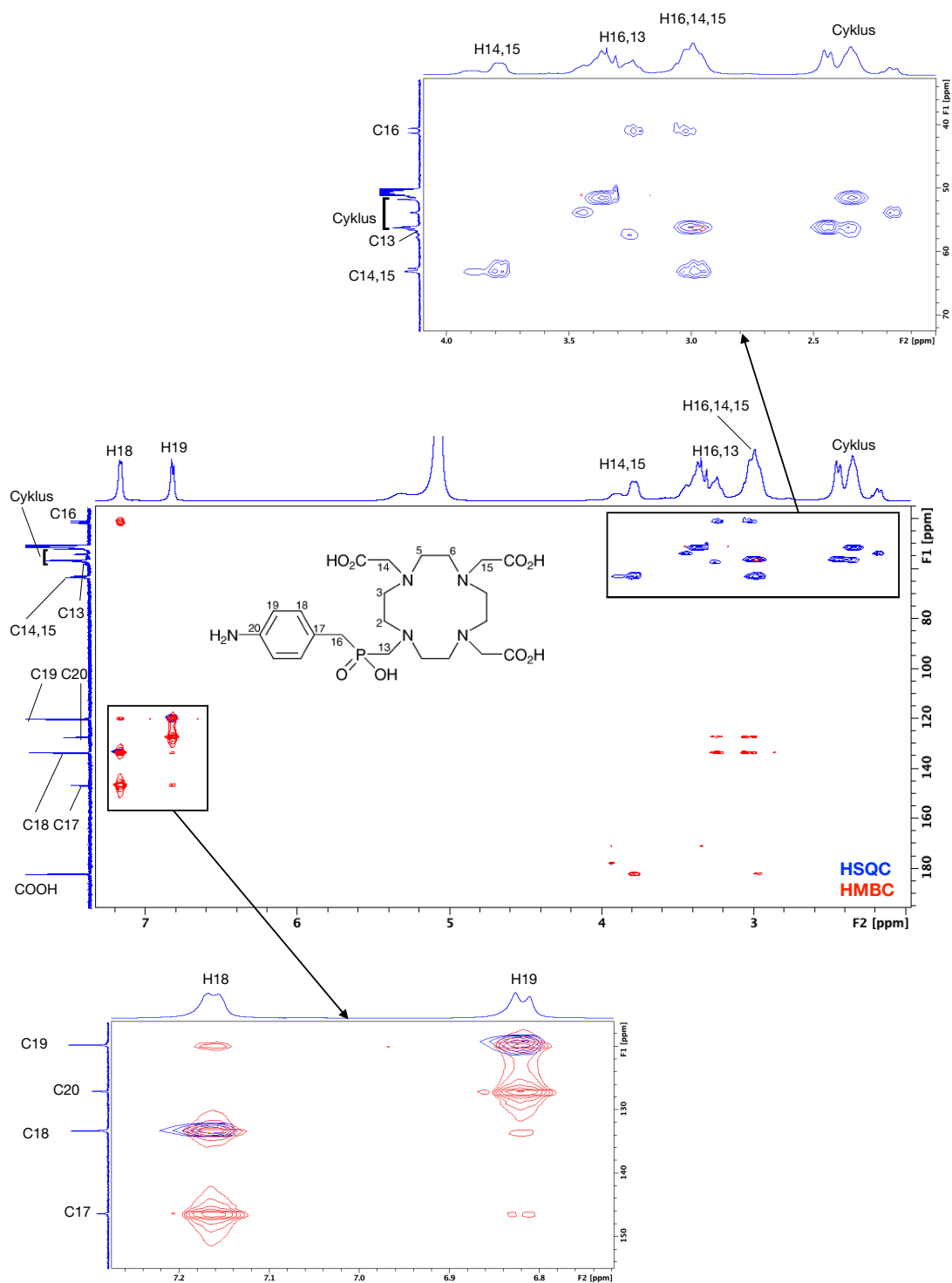
Všechny uhlíky tedy také není možné jednoznačně určit, ale pro studium uhlíkových relaxací je třeba odlišit, které signály náleží aromatické části (C17, 18, 19, 20), které makrocyklu (C2, 3, 5, 6), jaké jsou pendantní (C14, 15) a karboxylové. Toto zařazení je znázorněno na obrázcích 6.8 a 6.10.



Obrázek 6.8: Přiřazení uhlíkového spektra molekuly  $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$  naměřeného při teplotě 278 K.



Obrázek 6.9: Přiřazení vodíkového spektra molekuly La(DO3AP<sup>ABn</sup>) naměřeného při teplotě 278 K.



Obrázek 6.10: 2D spektra  $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$  (278 K) použitá k přiřazení jejich signálů. Ve spektru HSQC (modře) jsou signály na souřadnicích chemických posunů atomů  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ , které jsou vzájemně vázány chemickou vazbou. Spektrum HMBC (červeně) pak znázorňuje interakci přes více vazeb.



### 6.2.3 Dynamika La(DO3AP<sup>ABn</sup>) vyhodnocená pomocí <sup>13</sup>C relaxací

Byla studována náhodná reorientace molekuly La(DO3AP<sup>ABn</sup>), která byla zjištěna vyhodnocením spinové relaxace za použití modelu pro izotropní tuhé těleso. Ve vyhodnocení relaxačních dat byl tedy použitý tvar spektrální hustoty dle rovnice 1.11. Jak bude diskutováno později, studovaná molekula plně izotropnímu tuhému tělesu neodpovídá, ale i tak poskytuje tento model základní obraz o reorientaci molekuly. Náhodná reorientace molekul o velikosti studovaného komplexu se pohybuje na časové škále řádově okolo ps až ns, což jsou mnohem kratší časy než u izomerizace diskutované v 6.2.1, kterou pozorujeme v rozmezí  $\mu$ s až s.

Hlavním relaxačním mechanismem pro jádra <sup>13</sup>C je dipól-dipólová interakce s přímo navázanými vodíky. Pro relaxační doby  $T_1$ ,  $T_2$  a faktor NOE  $1 + \eta$  tedy předpokládáme teoretickou závislost na spektrální hustotě dle vztahů 1.131.15 a 1.16. Nejdelsí relaxační doby tedy pozorujeme u kvarterních uhlíků C17, C20 a COOH (viz tabulka 6.1), Skupiny CH by měly mít výrazně kratší relaxační doby a skupiny CH<sub>2</sub> ještě kratší, přibližně o faktor 2. Jeden navázaný proton mají uhlíky C19 a C18, jejichž  $T_1$  vychází 378 ms a 394 ms, což je opravdu přibližně dvakrát více než hodnoty 193 ms a 206 ms příslušející uhlíku C16 vzdáleného jednu vazbu od benzylu. U ostatních uhlíků pozorujeme ještě kratší relaxační doby, tyto uhlíky jsou ale už od aromatiky příliš vzdálené a jsou ovlivněny jinými faktory.

Experimentální hodnoty  $T_1$  a  $T_2$  uhlíků náležících stejné části molekuly, jako cyklus nebo rameno, viz 6.11, by měly mít podobnou velikost, což až na aromatikou, která byla okomentována výše, souhlasí. Větší rozptyl hodnot pozorujeme jen u  $T_2$  uhlíků v cyklu. Signály náležící atomům C16 a C13 jsou doublety, které byly fitovány zvlášť a měly by mít stejné relaxační doby. Pro C16 se relaxační doby shodují, ale pro uhlík C13 pozorujeme u  $T_1$  rozdíl 103 ms. Z obrázku 6.8 je vidět, že signál tohoto doubletu je velmi nízký a jeho integrální hodnota je ovlivněna šumem. Navíc se částečně překrývá s jiným signálem cyklu, realističtější je doba  $T_1$  získaná ze signálu s vyšším ppm, tedy 143 ms.

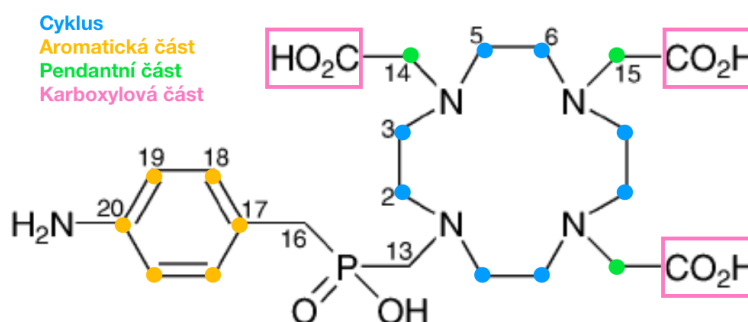
Příčná relaxační doba je u všech uhlíků přibližně o řád kratší než podélná, to je způsobeno jednak konkrétní kombinací velikosti zkoumané molekuly a magnetického pole a jednak přítomností chemické výměny díky výše vzpomínaným enatiomerizačním procesům. Hodnoty  $\eta$  jsou v rozmezí 1,1–2,4, což odpovídá tomu, že se jedná o větší molekulu. Běžná experimentální chyba měření  $T_1$  se pohybuje v rozmezí 1 – 3 %,  $T_2$  2 – 4 % a  $\eta$  kolem 5 %.

Hodnoty  $T_1$  nejméně trpí na systematické chyby. Oproti tomu  $T_2$  jsou značně ovlivněny chemickou výměnou a měření NOE je zatíženo velkou experimentální chybou. Korelační časy  $\tau_c$  byly tedy zjištěny numerickým řešením rovnice 1.13 za použití naměřených hodnot  $T_1$ . Stejný postup byl zvolen například v článku [22], kde se diskutuje, že daná rovnice má dva kořeny vzhledem k  $\tau_c$ , jeden fyzikální a druhý nefyzikální. Použitý model dobře popisuje izotropní rotaci, molekula ale nemá vnitřní rigiditu, ramena jsou mobilnější než zbytek. Z toho důvodu byly jednotlivé uhlíky vyhodnocovány jednotlivě, aby bylo zřejmé, zda a do jaké míry se korelační časy  $\tau_c$  liší pro jednotlivé části molekuly.

Solomonova teorie, z které rovnice 1.13 vychází, uvažuje vliv pouze dipól-dipólové interakce a nezohledňuje další relaxační mechanismy. V aromatické části

ale k relaxaci významně přispívá i anizotropie chemického posunu, kterou nelze zanedbat. Vliv anizotropie chemického posunu činí cca 10 %, korelační časy dopočtené z této teorie tedy dobře odráží lokální pohyb v molekule, přestože hodnoty  $\tau_c$  nemusí být úplně přesné. Teorie také předpokládá interakci mezi uhlíkem a vodíkem, není tedy aplikovatelná na kvartérní uhlíky. Nejlépe použitý model a teorie popisují jádra  $^{13}\text{C}$  náležící makrocyklu, kde je možné anizotropii chemického posunu zanedbat a zároveň je v této části molekula rigidní.

V [2] měřili rotační korelační čas stejného chelátu, nejednalo se o komplex s lantanem nýbrž s gadoliniem. Rotační korelační čas byl zde vyhodnocován fitováním disperzí vodíku ( $^1\text{H}$  NMRD profilu), ne z  $^{13}\text{C}$  relaxací. Byla také měřena spektra jader  $^{17}\text{O}$  pro různé teploty. Experimentální data byla pak vyhodnocena podle Solomon–Bloembergen–Morganovy teorie paramagnetické relaxace. Tento postup je z hlediska experimentálního času i vyhodnocení méně náročný než měření  $^{13}\text{C}$  relaxací, lze jej ale považovat také za méně přesný. Z fitu jedné závislosti  $r_1$  na magnetickém poli se totiž určuje celá řada různých parametrů, mezi nimi i  $\tau_c$ , zatímco hodnota získaná z  $^{13}\text{C}$  relaxací je zjištěna jako jediný parametr přímým výpočtem. Výsledná hodnota rotačního korelačního času udávaná v této práci ( $88 \pm 4$ ) ps při teplotě 298 K. Srovnáme-li to s hodnotami  $\tau_c$  uhlíků v cyklu, pro které je model nejpřesnější, vidíme, že hodnota je přibližně 3krát větší než ve zmíněném článku. Měření relaxací uhlíku probíhalo při teplotě 278 K, se zvýšením teploty lze tedy předpokládat zmenšení hodnoty  $\tau_c$ , ale ne o dvě třetiny.



Obrázek 6.11: Vyznačení částí molekuly  $\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$ .

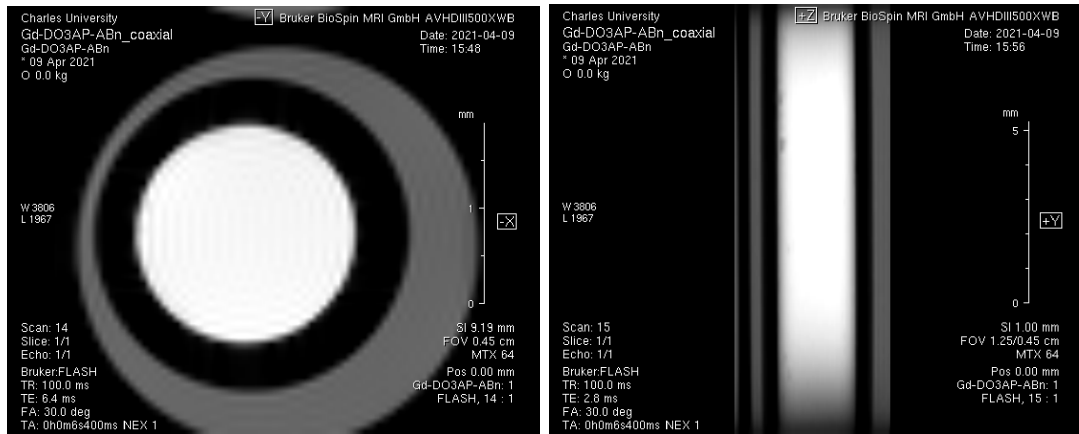
Tabulka 6.1: Experimentální relaxační doby  $T_1$ ,  $T_2$  a  $\eta$  naměřené na uhlíkách a numericky dopočtené hodnoty  $\tau_c$  dopočtené dle rovnice 1.13 .

		$\delta$ (ppm)	$T_1$ (ms)	$T_2$ (ms)	$\eta$	$\tau_c$ (ps)
Cyklus	C2,3,5,6	56,5	140	7,5	2,0	270
		54,1	133	17,5	2,1	308
		52,0	142	10,2	2,1	264
Aromatická část	C20	127,2	1020	128	1,2	–
	C19	119,8	394	71,8	2,0	148
	C18	133,5	378	69,8	2,0	156
	C17	146,8	1150	77,9	1,1	–
Pendantní část	C14,15	63,4	165	17,2	2,0	196
		62,9	164	15,6	2,2	199
Karboxylová část	COOH	182,0	1930	162	1,2	–
	C13	58,2	143	10,7	2,1	261
		57,4	246	10,4	2,1	240
	C16	41,5	193	29,3	1,1	152
		40,8	206	31,1	2,4	139

### 6.3 Efekt komplexu $\text{Gd}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$ na relaxaci vody

Jako demonstrace toho, že  $\text{Gd}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$  opravdu funguje jako kontrastní látka, byl pořízen snímek viz obrázek 6.12. Na příčném (vlevo) i podélném (vpravo) řezu kyvetou pozorujeme celkem 3 barevné oblasti — vnitřní bílá obsahující kontrastní látku, prostřední černá příslušící stěně kyvety a vnější šedý kruh náležící destilované vodě. Parametry experimentu byly nastaveny tak, aby byl obraz  $T_1$  - vážený, t.j. kontrast byl určen rozdílem podélných relaxačních dob přítomné vody. Na první pohled je zřejmé, že obsah kontrastní látky má na intenzitu MRI obrázku zásadní vliv. Komplex  $\text{Gd}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$  zkracuje relaxační dobu  $T_1$  vody a tím dochází k posunutí barvy vnitřku kyvety do bíla.

Na obou snímcích pozorujeme několik artefaktů. Došlo k uříznutí části pozorovaného objektu a k jejímu zobrazení na opačné straně obrázku. U příčného řezu pozorujeme uřízlou spodní část kruhu a při pohledu podél osy  $z$  pravou část kyvety. Tento jev se nazývá „aliasing“ artefakt a vzniká ve směru gradientu kódujícího fázi. Objevuje se, když rozměry objektu přesahují zorné pole a signál generovaný mimo toto pole se pak zobrazí jako překrytý objekt na opačné straně obrazu. Zobrazovaná kyveta je symetrická, oba řezy se ale jeví nesymetrické. Pozorujeme zde tedy také artefakt chemického posunu, kdy čistá  $\text{H}_2\text{O}$  má jiný chemický posun než roztok s kontrastní látkou a vnitřek se pak jeví asymetrický vůči vnějšku.



Obrázek 6.12:  $T_1$ -vážený snímek příčného (vlevo) a podélného (vpravo) řezu kyvety pořízený pomocí MRI. Obrázek slouží k porovnání kontrastu vodného roztoku kontrastní látky Gd(DO3AP<sup>ABn</sup>) (vnitřní bílá část) a samotné vody (šedá část).

# Závěr

Byla změřena spektra jader  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$   $\beta$ -cyklodextrínu, vyhodnocením měření HSQC a HMBC byly přiřazeny vodíkové a uhlíkové signály. Byly proměřeny teplotní závislosti spekter  $^{31}\text{P}$  a  $^1\text{H}$  molekuly  $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$  v rozmezí 238–298 K. Při nízkých teplotách pozorujeme ve spektru  $^{31}\text{P}$  dva signály, které jsou způsobené chiralitou fosforu. Stejným postupem jako u cyklodextrínu byla přiřazena uhlíková a vodíková spektra komplexu  $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$ . Komplikovaná dynamika systému znemožňuje přesnou identifikaci signálů, zvláště u vodíků. V uhlíkovém spektru se podařilo určit, které uhlíky náleží makrocycly, aromatické části, pendantní části a karboxylové části.

Byly také změřeny  $^{13}\text{C}$  relaxace za účelem vyhodnocení rotačního korelačního času komplexu  $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$ . Nejdélejší relaxační doby  $T_1$  byly pozorovány u kvartérních uhlíků C20 (1020 ms), C17 (1150 ms) a COOH (1930). Nejkratší podélnou relaxační dobu mají uhlíky náležící cyklu (133 – 142 ms). Relaxační doba  $T_2$  vyšla mnohem kratší (7,5–162 ms) než  $T_1$ , neboť je značně ovlivněna chemickou výměnou. Hodnota  $\eta$  se pohybuje okolo 2, což odpovídá kombinaci velikosti molekuly a magnetického pole, ve kterém byly prováděny experimenty.

Rotační korelační čas  $\tau_c$  byl vyhodnocen na základě relaxačních dob  $T_1$  s využitím modelu pro izotropní reorientaci. Z rotačního korelačního času bylo zjištěno, že nejvíc rigidní částí molekuly je cyklus ( $\tau_c = 264\text{--}308$  ps). Nejpohyblivější je methylfosfinové rameno s aromatickou, jejichž korelační čas je oproti cyklu přibližně poloviční (139–156 ps).

Z kontrastu snímku dvouplášťové kyvety je zřejmé, že přítomnost kontrastní látky zásadně ovlivňuje podélnou relaxační dobu vody.

# Seznam použité literatury

- [1] V. C. Pierre and M. J. Allen. *Contrast Agents for MRI*. The Royal Society of Chemistry, London, 2018.
- [2] J. Rudovsky, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukes, V. Mainero, and S. Aime. Synthesis of a Bifunctional Monophosphinic Acid DOTA Analogue Ligand and its Lanthanide(III) Complexes. A Gadolinium(III) Complex Endowed with an Optimal Water Exchange Rate for MRI Applications. *Org. Biomol. Chem.*, (3):112 – 117, 2005.
- [3] J. Rudovský, M. Botta, P. Hermann, A. Koridze, and S. Aime. Relaxometric and Solution NMR Structural Studies on Ditopic Lanthanide(III) Complexes of a Phosphinate Analogue of DOTA with a Fast Rate of Water Exchange. *Dalton Transactions*, (19), 2006.
- [4] J. Rudovský, M. Botta, P. Hermann, K. I. Hardcastle, I. Lukeš, and S. Aime. PAMAM Dendrimeric Conjugates with a Gd-DOTA Phosphinate Derivative and Their Adducts with Polyaminoacids: The Interplay of Global Motion, Internal Rotation, and Fast Water Exchange. *Bioconjugate Chem.*, (17):975 – 987, 2006.
- [5] Z. Kotková, J. Kotek, D. Jiráček, P. Jendelová, V. Herynek, Z. Berková, P. Hermann, and I. Lukeš. Cyclodextrin-Based Bimodal Fluorescence/MRI Contrast Agents: an Efficient Approach to Cellular Imaging. *Chem. Eur. J.*, (16):10094 – 10102, 2010.
- [6] Z. Kotková, L. Helm, J. Kotek, P. Hermann, and I. Lukeš. Gadolinium Complexes of Monophosphinic Acid DOTA Derivatives Conjugated to Cyclodextrin Scaffolds: Efficient MRI Contrast Agents for Higher Magnetic Fields. *Dalton Transactions*, (41):13509 – 13519, 2012.
- [7] H. Guenther. *NMR Spectroscopy*. II. John Wiley and Sons, England, 1995.
- [8] P. J. Hore. *Nuclear Magnetic Resonance*. II. Oxford University Press, Great Britain, 1995.
- [9] J. Kowalewski and L. Maeler. *Nuclear Spin Relaxation in Liquids: Theory, Experiments, and Applications*. Taylor and Francis, New York, 2006.
- [10] S. Laurent, C. Henoumont, D. Stanicki, S. Bountry, E. Lipani, S. Belaid, R. N. Muller, and L. V. Elst. *MRI Contrast Agents From Molecules to Particles*. Springer, Singapore, 2006.
- [11] Pulse Program Catalogue: I. 1D and 2D NMR Experiments. Bruker, 10.05. 2021. [Online]. Dostupné z: <https://pharm.ucsf.edu/sites/pharm.ucsf.edu/files/Pulse%20Program%20Catalog%20%281D%20and%202D%20Experiments%29.pdf>.
- [12] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, and A. Nudelman. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry*, (62):21, 1997.

- [13] A. J. M. Valente, R. A. Carvalho, and O. Soederman. Molecula Dynamics of Cyclodextrins in Water Solutions from NMR Deuterium Relaxation: Implications for Cyclodextrin Aggregation. *Langmuir*, (33):8233–8238, 2017.
- [14] F. B. T. Pessine, A. Calderini, and G. L. Alexandrino. Cyclodextrin Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques. *InTech*, 2012.
- [15] Beta-Cyclodextrin. Chemodex, 10.05. 2021. [Online]. Dostupné z: <https://www.chemodex.com/products/beta-cyclodextrin>.
- [16] F. B. T. Pessine, A. Calderini, and G. L. Alexandrino. Review: Cyclodextrin Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques, Magnetic Resonance Spectroscopy. *InTech*, 2012.
- [17] G. Widmalm J. Kowalewski. Multiple-Field Carbon-13 NMR Relaxation Study of Cyclodextrins. *J. Phys. Chem.*, (98):28 – 34, 1994.
- [18] A. Szabo G. Lipari. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules 1. Theory and Range of Validity. *J. Am. Chem. Soc.*, (104), 1982.
- [19] A. Ejchart H. Dodziuk E. Kaczorowska H. Ueda P. Bernatowicz, K Rusczyńska-Bartnik. Carbon-13 NMR Relaxation Study of the Internal Dynamics in Cyclodextrins in Isotropic Solution. *J. Phys. Chem. B.*, (114):59 – 65, 2010.
- [20] NMR Techniques for Characterization of Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. Romanian Academy “PETRU PONI” Institute of Macromolecular Chemistry, 10.05. 2021. [Online]. Dostupné z: <https://www.icmpp.ro/doctorate/anunturi/6/Rezumat-MBalan-eng.pdf>.
- [21] P. Lebdušková, P. Hermann, L. Helm, É. Tóth, J. Kotek, K. Binnemans, J. Rudovský, I. Lukeš, and A. E. Merbachb. Gadolinium(III) Complexes of Mono- and Diethyl Esters of Monophosphonic Acid Analogue of DOTA as Potential MRI Contrast Agents: Solution Structures and Relaxometric Studies. *Dalton Transactions*, pages 493 – 501, 2007.
- [22] V. V. Mateev, D. A. Markelov, E. A. Brui, V. I. Chizhik, P. Ingman, and E. Laehderanta. <sup>13</sup>C NMR Relaxation and Reorientation Dynamics in Imidazolium-based Ionic Liquids: Revising Interpretation. *Dalton Transaction*, (16):10480–10484, 2014.

# Seznam obrázků

2.1	Příklady klinicky schválených kontrastních látek: Gd-DTPA (vlevo) a Gd-DOTA (vpravo) [6]. . . . .	9
2.2	Molekula DO3AP <sup>ABn</sup> studovaná v této práci jako slibný nový ligand Gd pro kontrastní látky [2]. . . . .	10
3.1	Základní sekvence zg použitá k měření 1D spekter obsahující čekací dobu $d1$ a radiofrekvenční pulz $p1$ [11]. . . . .	11
3.2	„Inversion-recovery“ experiment t1irpg použitý k měření $T_1$ na jádrech uhlíku. Po uplynutí čekací doby $d1$ po předchozím skenu se aplikuje $180^\circ$ pulz, pak následuje proměnný časový úsek $vd$ a je aplikován $90^\circ$ pulz. Následně dojde k zaznamenání signálu. CPD značí vodíkový decoupling [11]. . . . .	12
3.3	Sekvence cpmg použitá na měření relaxační doby $T_2$ . Po uplynutí čekací doby $d1$ po předchozím skenu se aplikuje $90^\circ$ pulz, následně se čeká po dobu $d20$ , poté je aplikován refokusační $180^\circ$ pulz a po opětovném uplynutí doby $d20$ je nabírán signál. Počet spinových ech je označen jako <i>loop c times</i> [11]. . . . .	12
3.4	Sekvence HSQC použita k určení jader $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ , která jsou propojena přes jednu chemickou vazbu [11]. . . . .	13
3.5	Sekvence HMBC použita k určení jader $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ , která jsou propojena přes dvě a více chemických vazeb [11]. . . . .	14
6.1	Molekula $\beta$ -cyklodextrinu (vlevo) a glukózy (vpravo), $n$ značí počet jednotek spojených v molekulu cyklodextrinu [14][15]. . . . .	19
6.2	2D spektra $\beta$ -cyklodextrinu použitá k přiřazení jeho signálů. Ve spektru HSQC (modře) jsou cross-peaky na souřadnicích chemických posunů atomů $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ , které jsou vzájemně vázány chemickou vazbou. Spektrum HMBC (červeně) pak znázorňuje interakci přes více vazeb. . . . .	21
6.3	Přiřazení spektrálních čar jader $^1\text{H}$ $\beta$ -cyklodextrinu v DMSO- $d_6$ , 298 K. . . . .	21
6.4	Přiřazení spektrálních čar jader $^{13}\text{C}$ $\beta$ -cyklodextrinu v DMSO- $d_6$ , 298 K. . . . .	22
6.5	Osm možných izomerních forem analogu DOTA s jedním fosfinovým ramenem, znázorněných na komplexu $\text{Ln}(\text{DO3AP}^{\text{OEt}})$ s obecným lanthanidem [21]. . . . .	23
6.6	Teplotní závislost spektra $^{31}\text{P}$ molekuly $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$ v rozpouštědle voda/methanol. U teploty 253 K a nižších pozorujeme rozštěpení signálu na dva, což je způsobeno chiralitou na fosforu. . . . .	24
6.7	Teplotní závislost spektra $^1\text{H}$ molekuly $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$ v rozpouštědle voda/methanol. . . . .	25
6.8	Přiřazení uhlíkového spektra molekuly $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$ naměřeného při teplotě 278 K. . . . .	26
6.9	Přiřazení vodíkového spektra molekuly $\text{La}(\text{DO3AP}^{\text{ABn}})$ naměřeného při teplotě 278 K. . . . .	27



6.10	2D spektra La(DO3AP <sup>ABn</sup> ) (278 K) použítá k přiřazení jejich signálů. Ve spektru HSQC (modře) jsou signály na souřadnicích chemických posunů atomů <sup>1</sup> H a <sup>13</sup> C, které jsou vzájemně vázány chemickou vazbou. Spektrum HMBC (červeně) pak znázorňuje interakci přes více vazeb. . . . .	28
6.11	Vyznačení částí molekuly DO3AP <sup>ABn</sup> . . . . .	30
6.12	<i>T</i> <sub>1</sub> -vážený snímek příčného (vlevo) a podélného (vpravo) řezu květy pořízený pomocí MRI. Obrázek slouží k porovnání kontrastu vodného roztoku kontrastní látky Gd(DO3AP <sup>ABn</sup> ) (vnitřní bílá část) a samotné vody (šedá část). . . . .	32

# Seznam tabulek

4.1	Parametry pulzních sekvencí použitých pro měření vodíkových a uhlíkových spekter $\beta$ -cyklodextrinu. . . . .	15
4.2	Parametry pulzních sekvencí použitých pro měření vodíkových, uhlíkových a fosforových spekter La(DO3AP <sup>ABn</sup> ). . . . .	15
4.3	Parametry pulzních sekvencí použitých pro měření 2D korelovaných spekter <sup>13</sup> C a <sup>1</sup> H La(DO3AP <sup>ABn</sup> ). . . . .	16
4.4	Parametry pulzních sekvencí použitých pro měření relaxačních dob $T_1$ , $T_2$ a $\eta$ La(DO3AP <sup>ABn</sup> ). . . . .	16
4.5	Nastavené parametry pro získání snímku vody a roztoku Gd(DO3AP <sup>ABn</sup> ). 16	16
6.1	Experimentální relaxační doby $T_1$ , $T_2$ a $\eta$ naměřené na uhlíkách a numericky dopočtené hodnoty $\tau_c$ dopočtené dle rovnice 1.13 . . . .	30