

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Zdeňka Táborská

NOVÉ LIGANDY PRO NUKLEÁRNÍ MAGNETICKOU TOMOGRAFII;  
pH-SENZITIVNÍ KONTRASTNÍ LÁTKY

NEW LIGANDS FOR MAGNETIC RESONANCE IMAGING;  
pH-SENSITIVE PROBES

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Praha, 2011

### Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 26. 8. 2011

.....  
podpis

Na tomto místě chci poděkovat doc. RNDr. Janu Kotkovi, Ph.D., za odborné vedení bakalářské práce, za cenné rady a připomínky a jeho neutuchající optimismus.

doc. MUDr. Janu Špridrichovi, CSc., z radiodiagnostické kliniky FN Královské Vinohrady za konzultaci a zapůjčený materiál

MUDr. Jiřímu Lisému, CSc., z kliniky zobrazovacích metod UK 2. LF za poskytnuté rady.

Velký dík patří také kolegům z laboratoře za rodinnou atmosféru, která zde panuje, a jejich ochotu kdykoli a s čímkoli pomoci.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům za finanční zázemí při studiu, celé své rodině za psychickou podporu a své sestře za každodenní dávku ironie a sarkasmu.

## ABSTRAKT

TÁBORSKÁ, Z. Nové ligandy pro nukleární magnetickou tomografii; pH-senzitivní kontrastní látky. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, 2011, 32 stran. Vedoucí práce: doc. RNDr. Kotek J., Ph.D.

Magnetická rezonance je moderní zobrazovací metoda využívaná v diagnostice pro posouzení morfologie a patologie měkkých tkání. V práci je stručně nastíněn princip zobrazování magnetickou rezonancí včetně přístrojového vybavení.

V řadě případů se využívají intravenózně podávané kontrastní látky, které se používají pro diagnostické účely. V současnosti se při zobrazení MRI používají nejčastěji látky na bázi gadolinitých komplexů.

Experimentální část práce se zabývá přípravou derivátu DTPA s aminomethylfosfinátovou pendantní skupinou, jakožto potenciálního ligandu pro kontrastní látky.

## KLÍČOVÁ SLOVA:

zobrazování magnetickou rezonancí, kontrastní látky, lanthanoidy, fosfináty

## ABSTRACT

TÁBORSKÁ, Z. New ligands for magnetic resonance imaging; pH-sensitive probes. Prague: Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Inorganic Chemistry, 2011, 32 pages. Supervisor: doc. RNDr. Kotek J., Ph.D.

Magnetic resonance imaging is a modern method used in diagnostic for assessing morphology and pathology of soft tissues. This thesis briefly outlines the principles of magnetic resonance imaging, including instrumentation.

In many cases intravenously administered contrast agents are used, which are used for diagnostic purposes. At present, the most applied are CAs based on Gd(III) complexes.

The experimental part of the thesis is focused on preparation of a derivative of DTPA with aminomethylphosphinate pendant group for using as a potential ligand for CAs for the magnetic resonance imaging.

## KEYWORDS:

magnetic resonance imaging, contrast agents, lanthanides, phosphinates

## OBSAH

1.	ÚVOD.....	- 6 -
2.	TEORETICKÁ ČÁST.....	- 7 -
2.1.	Magnetická rezonance (MRI).....	- 7 -
2.1.1.	Historie.....	- 7 -
2.1.2.	Princip metody.....	- 7 -
2.1.2.1.	Spin-echo.....	- 11 -
2.1.2.2.	Ovlivnění relaxivity.....	- 12 -
2.1.3.	MR přístroj.....	- 12 -
2.1.3.1.	Hlavní magnet.....	- 13 -
2.1.3.2.	RF cívky.....	- 14 -
2.1.3.3.	Gradientní cívky.....	- 14 -
2.1.4.	Kontrastní látky pro MRI.....	- 14 -
2.1.4.1.	$T_1$ kontrastní látky.....	- 15 -
2.1.4.2.	$T_2$ kontrastní látky.....	- 18 -
2.1.4.3.	Nežádoucí účinky.....	- 19 -
2.2.	Cíle práce.....	- 19 -
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 20 -
3.1.	Seznam použitých chemikálií.....	- 20 -
3.2.	Metody charakterizace.....	- 20 -
3.2.1.	NMR.....	- 20 -
3.3.	Syntéza výchozích látek.....	- 21 -
3.3.1.	Bis(ftaloyl)diethylentriamin.....	- 21 -
3.3.2.	( <i>N,N</i> -dibenzylamino)methylfosfinová kyselina.....	- 22 -
3.3.3.	Ethyl( <i>N,N</i> -dibenzylamino)methylfosfinát.....	- 23 -
3.4.	Syntéza ligandu.....	- 24 -
3.4.1.	Diethylentriamin- <i>N'</i> -metylen(dibenzylaminomethyl)-fosfino- <i>N,N,N'',N''</i> -tetraoctová kyselina.....	- 24 -
4.	DISKUZE.....	- 25 -
4.1.	Syntéza prekurzoru 1.....	- 25 -
4.2.	Syntéza prekurzoru 2.....	- 25 -
4.3.	Syntéza prekurzoru 3.....	- 25 -
4.4.	Syntéza ligandu.....	- 25 -
5.	ZÁVĚR.....	- 27 -

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CAs	kontrastní látky (z angl. Contrast Agents)
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
DCU	dicyklohexylmočovina
DIEN	diethylentriamin
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekantetraoctová kyselina
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
DMF	dimethylformamid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EHPG	ethylenbis-(2-hydroxyfenylglycin)
FDA	vládní agentura USA, resortu zdravotnictví a služeb (z angl. Food and Drug Administration)
LD <sub>50</sub>	letální dávka (z angl. Lethal Dose); množství podané látky, kdy zahyne 50 % testovaných zvířat
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí (z angl. Magnetic Resonance Imaging)
NMR	nukleární magnetická rezonance (z angl. Nuclear Magnetic Resonance)
PD	protonová hustota (z angl. Proton Density)
RF	radiofrekvenční
RVO	rotační vakuová odparka
SE	spin-echo
soustava SI	soustava jednotek fyzikálních veličin (z franc. Le Système International d'Unités)

## 1. ÚVOD

Magnetická rezonance je moderní vyšetřovací metoda, jejíž výhodou je bezesporu její vysoká rozlišovací schopnost a skutečnost, že zobrazení probíhá bez ionizujícího záření. Na „kráse“ však této metodě ubírají vysoké pořizovací a provozní náklady a řada kontraindikací (kardiostimulátor, kovová tělesa, ušní implantáty apod.).

Tímto vyšetřením lze zobrazit jakékoli části lidského těla; své uplatnění našla především při zobrazení mozku a míchy, ale i pohybového aparátu, např. poranění měkkých struktur kloubů, či v onkologii při diagnostice nádorů.

V klinické praxi se k lepšímu rozlišení obrazu s velkou výhodou využívají kontrastní látky založené nejčastěji na bázi gadolinia, které je vázané v chelátové sloučenině, z níž není uvolněno před svou exkrecí z těla. Další skupiny MRI kontrastních látek jsou užívány podstatně méně často, v klinické praxi jen výjimečně. Jedná se především o sloučeniny manganu nebo železa.

pH senzitivní látky se často využívají k diagnóze rakoviny, protože postižená tkáň vykazuje pH o 0,4 jednotky nižší než tkáň zdravá. Aby mohl být systém považován za pH senzitivní, musí splňovat předpoklad, že strukturní a dynamické vlastnosti ovlivňující jeho relaxivitu jsou závislé na pH. Závislost relaxivity na pH odráží změny v hydratačním čísle kovových chelátů a přítomnost protonizovatelných skupin na ligandu, i gadolinitém komplexu, může ovlivnit tyto změny.



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Magnetická rezonance (MRI)



Jedná se o neinvazivní vyšetřovací metodu, která nevyužívá ionizujícího záření. Magnetická rezonance (MRI) je založena na principech NMR spektroskopie<sup>1</sup>, tj. měření vlastností NMR aktivních jader.

Ve světě je z celkového množství MRI vyšetření provedeno 35 %<sup>2</sup> za použití kontrastních látek (CAs). Ze statistických údajů Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR ze dne 22. 6. 2010 vyplývá, že jen v ČR bylo provedeno roku 2009 více než 174 000 vyšetření MRI, což představuje 1,2 % ze všech provedených radiodiagnostických úkonů.

#### 2.1.1. Historie

Roku 1920 předpověděl W. Pauli na základě svých logických úvah jev magnetické rezonance a roku 1945 proběhl první úspěšný pokus s NMR. Provedly jej hned 2 na sobě nezávislé týmy vedené F. Blochem a E. M. Purcellem. Oba tyto vědci získali za rozvoj nových metod pro přesná nukleární magnetická měření a objevy s tímto související<sup>3,#1</sup> r. 1952 Nobelovu cenu za fyziku.

MRI se jako zobrazovací metoda rozvíjí od roku 1973 díky dvojici P. C. Lauterbur a P. Mansfield. Oba za své příspěvky k jejímu rozvoji získali v roce 2003 Nobelovu cenu za medicínu a fyziologii.<sup>4,#2</sup> MRI se stala snad nejvyužívanější neinvazivní metodou pro studium fyziologie, patofyziologie a anatomie. Stala se široce využívanou v nemocnicích po celém světě, protože r. 1985 získala oprávnění FDA pro klinické účely<sup>5</sup>.

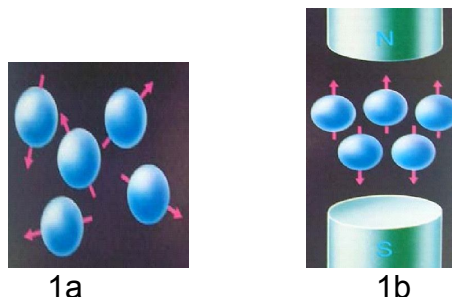
#### 2.1.2. Princip metody

Nejlépe si vysvětlíme princip MRI na jádře nejjednoduššího prvku, tj. protonu (<sup>1</sup>H). Toto jednoduché jádro je významným zdrojem informací. Má magnetický spin, proto jej můžeme měřit, a navíc je nejrozšířenějším prvkem v lidském organismu, který je v závislosti na stáří a pohlaví tvořen ze 2/3 vodou. Jádro vodíku je tvořeno jediným protonem, který rotuje, čímž vytváří magnetické pole. Rotační pohyb jader se nazývá spin. V základním stavu jsou jaderné spiny orientovány chaoticky – jsou neuspořádané (*Obrázek*

<sup>#1</sup> [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1952/index.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1952/index.html) - 5. 2. 2011 v 11:28

<sup>#2</sup> [http://cs.wikipedia.org/wiki/Magnetick%C3%A1\\_rezonance#Historie](http://cs.wikipedia.org/wiki/Magnetick%C3%A1_rezonance#Historie) - 5. 2. 2011 v 12:03

1a) a tkáň se chová nemagneticky, protože jednotlivé účinky spinů se vzájemně vyruší, tj. úhrnný vektor magnetizace tkáň  $M = 0$ . Budeme-li na tyto spiny působit externím magnetickým polem, dojde k jejich uspořádání, a to buď ve směru shodném s působením pole (stav o nižší energii) nebo v opačném směru (stav o vyšší energii) (Obrázek 1b):



Obrázek 1. Uspořádání jaderných spinů bez účinků magnetického pole (vlevo) a v přítomnosti vnějšího magnetického pole (vpravo)

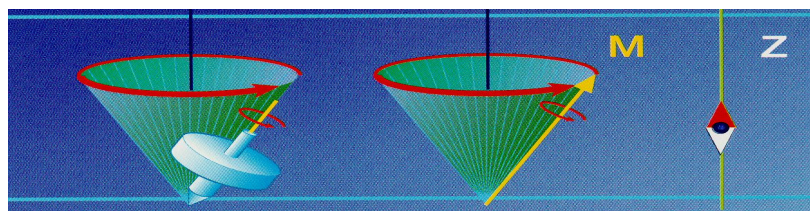
Vždy je více jader uspořádaných ve stejném směru jako externí magnetické pole, což způsobuje, že se tkáň chová magneticky vzhledem ke svému okolí, tj. úhrnná magnetizace  $M \neq 0$ . Čím vyšší intenzitu má magnetické pole, tím větší je rozdíl paralelně a antiparalelně uspořádaných jader.

Další důležitou vlastností částic s nábojem, vyjma spinu, je magnetický moment, který může být vyjádřen rovnicí (1):

$$\vec{\mu} = \frac{\gamma \cdot \vec{I} \cdot h}{2\pi} \quad (1)$$

$\gamma$  značí gyromagnetický poměr,  $I$  je spinové kvantové číslo a  $h$  je Planckova konstanta (její hodnota je v jednotkách SI  $6,626\ 068\ 96 \cdot 10^{-34}$  J s)

Jedná se o vektorovou veličinu, která je charakterizována svou velikostí a směrem. Magnetický moment popisuje, jak jádro reaguje na přítomnost vnějšího magnetického pole a jaké jsou jeho magnetické vlastnosti. Magnetický moment vykonává pohyb zvaný precese. Jedná se o rotačně kývavý pohyb po plášti kužele, jak zobrazuje Obrázek 2.



Obrázek 2. Znáznornění pohybu precese

Frekvence tohoto pohybu se nazývá Larmorova frekvence, značí se  $\omega_0$  a vypočítá se z Larmorovy rovnice (2):

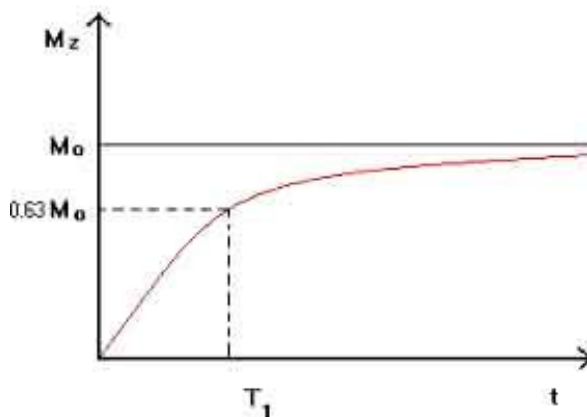
$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0 \quad (2)$$

$\omega_0$  značí Larmorovu frekvenci (v Hz příp. MHz),  $\gamma$  je gyromagnetický poměr (konstantní pro dané jádro, v MHz/T – hodnoty viz *Tabulka 1, str. 11*) a  $B_0$  je intenzita magnetického pole (v T). Vyšleme-li v tento okamžik elektromagnetické vlnění o Larmorově frekvenci vodíku, dojde k interakci dvou vlnění téže frekvence, kterou nazýváme rezonance.

Atomům vodíku je dodána energie, která má za následek vychýlení magnetických momentů všech jader z původního směru ( $M_z$ ) o určitý úhel a také k synchronizaci precese. Jakmile přestane impuls působit, atomy vodíku se začnou navracet z excitovaného stavu do původní polohy, která je energeticky méně náročná, a při tomto návratu vyzáří energii, kterou původně absorbovaly. Nastala fáze relaxace, ve které provádíme samotné měření.

Rozlišujeme dva typy relaxace:

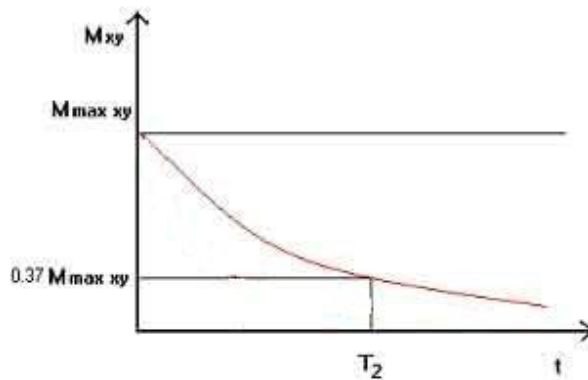
- Podélná (longitudinální, spin-mřížková) relaxace  $T_1$  – čas  $T_1$  udává dobu, která je potřeba k nárůstu podélné magnetizace na 63 % původního stavu (*Obrázek 3*). Pohybuje se mezi 300 – 2000 ms.



Obrázek 3<sup>6, #3</sup>. Relaxace  $T_1$

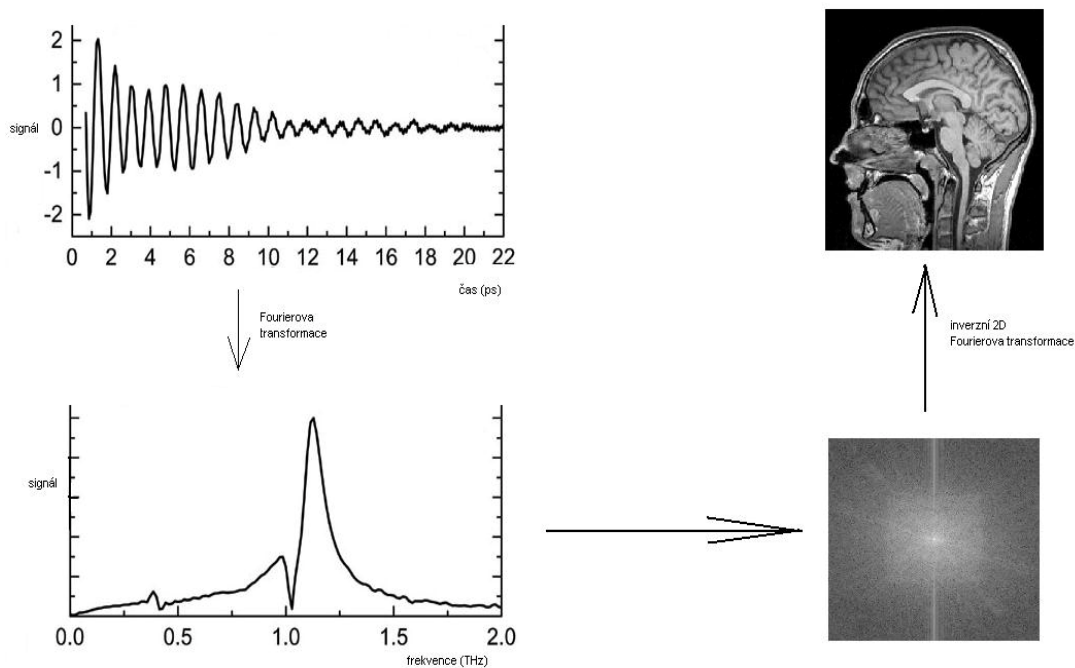
- Příčná (transverzální, spin-spinová) relaxace  $T_2$  –  $T_2$  relaxační konstanta udává čas, za který se vektor magnetizace  $M_{xy}$  sníží na 37 % své maximální hodnoty (*Obrázek 4, str. 10*). Běžné časy jsou 30 – 150 ms.

<sup>#3</sup> [http://fmri.mchmi.com/main\\_index.php?strana=13](http://fmri.mchmi.com/main_index.php?strana=13) – 3. 8. 2011 v 10:11



Obrázek 4. Relaxace  $T_2$  (upraveno podle cit.<sup>6</sup>)

Při snímání relaxačních signálů získáme závislost intenzity tohoto signálu na čase, která je podrobena Fourierově transformaci. Ta vede k zisku závislosti intenzity signálu na frekvenci. Získané signály se ukládají do tzv. k-prostoru (tj. matice naměřených signálů) a z něj lze inverzní 2D Fourierovou transformací získat výsledný obraz.



Obrázek 5. Vznik MR obrazu (upraveno podle cit.<sup>7,#4;8,#5</sup>).

<sup>#4</sup> <http://spie.org/x8448.xml?ArticleID=x8448> – 3. 8. 2011 v 1:49

<sup>#5</sup> <http://www.mr-tip.com/serv1.php?type=img&img=Brain%20MRI%20Images%20Axial%20T2> – 3. 8. v 2:13

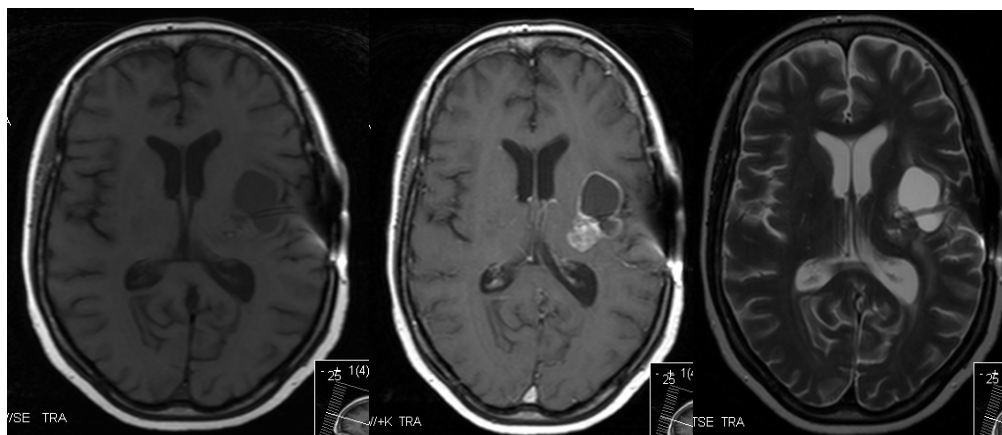
Jas výsledného obrázku je ovlivňován řadou parametrů, přičemž mezi základní patří  $T_1$  a  $T_2$  relaxace a protonová hustota (PD). Požadovaného obrazu je možné dosáhnout vhodným uspořádáním pulzní sekvence, nejvyužívanější je spin-echo (SE) sekvence. Výsledkem je poté  $T_1$ , příp  $T_2$  nebo PD vážený obraz.

izotop	složení jádra		jaderný spin, $I$	gyromagnetický		$\omega$ v 1,5 T (MHz)
	protony	neutrony		poměr $\gamma$ (MHz/T)	% přírodní složení	
$^1\text{H}$ , Protium	1	0	1/2	42.5774	99.985	63.8646
$^2\text{H}$ , Deuterium	1	1	1	6.53896	0.015	9.8036
$^3\text{He}$	2	1	1/2	32.436	0.000138	48.654
$^6\text{Li}$	3	3	1	6.26613	7.5	9.39919
$^7\text{Li}$	3	4	3/2	16.5483	92.5	24.8224
$^{12}\text{C}$	6	6	0	0	98.9	0
$^{13}\text{C}$	6	7	1/2	10.7084	1.1	16.0621
$^{14}\text{N}$	7	7	1	3.0777	99.634	4.6164
$^{15}\text{N}$	7	8	1/2	4.3173	0.366	6.4759
$^{16}\text{O}$	8	8	0	0	99.762	0
$^{17}\text{O}$	8	9	5/2	5.7743	0.038	8.6614
$^{19}\text{F}$	9	10	1/2	40.0776	100	60.1164
$^{23}\text{Na}$	11	12	3/2	11.2686	100	16.9029
$^{31}\text{P}$	15	16	1/2	17.2514	100	25.8771
$^{129}\text{Xe}$	54	75	1/2	11.8604	26.4	17.7906

Tabulka 1<sup>9</sup>. Konstanty vybraných izotopů vyskytujících se v přírodě

### 2.1.2.1. Spin-echo

Sekvence začíná  $90^\circ$  impulzem, který sklopí podélnou magnetizaci tkáně o  $90^\circ$  a sfázuje precesní pohyb spinů. Po skončení tohoto pulzu se spiny v příčné rovině rozfázují (a sledujeme úbytek signálu). Vysíláme  $180^\circ$ , po kterém se během času pohybu spinů opět sfázuje a přijímací cívka zachytí ECHO signál (obrazy získané pomocí SE viz Obrázek 6).



Obrázek 6. Anaplastický astrocytom zleva:  $T_1$ -SE nativně;  $T_1$ -SE po aplikaci Gd;  $T_2$ -TSE.

*Snímky byly pořízeny na Klinice zobrazovacích metod 2. LF UK při FN Motol.*

### **2.1.2.2. Ovlivnění relaxivity**

Relaxivita je mírou účinnosti kontrastních látek. Charakterizuje schopnost paramagnetické CA změnit relaxační rychlost.

Relaxivita komplexu je závislá na řadě parametrů, např. fyzikálně-chemických parametrech kontrastní látky: počet molekul vody koordinovaných k centrálnímu iontu gadolinia ( $q$ ), rychlost výměny těchto iontů s molekulami vody v roztoku ( $\tau_M$ ), celková hydratace molekul CA a rotační pohyb celé molekuly ( $\tau_R$ ); vnějších podmínkách: vlastnosti vzorku, intenzita použitého magnetického pole atd.

Počet molekul koordinované vody  $q$  je přímo úměrný relaxivitě. Veškeré CAs používané v klinické praxi obsahují jednu molekulu vody.

Rychlost výměny vody musí být dost rychlá na to, aby zrychlila relaxaci maximálního počtu okolních molekul vody, ale zároveň nesmí být příliš rychlá, to z toho důvodu, aby docházelo k relaxaci momentu jader protonu koordinované vody. Proto by rychlost výměny měla ležet v určitém optimu, pro tomografy pracujících při 1,5 T je toto optimum 10 – 20 ns.

CAs jsou tím účinnější, čím pomalejší je rychlost jejich pohybu v roztoku. Závislost relaxivity na rychlosti rotace není přímo úměrná, ale sigmoidální.

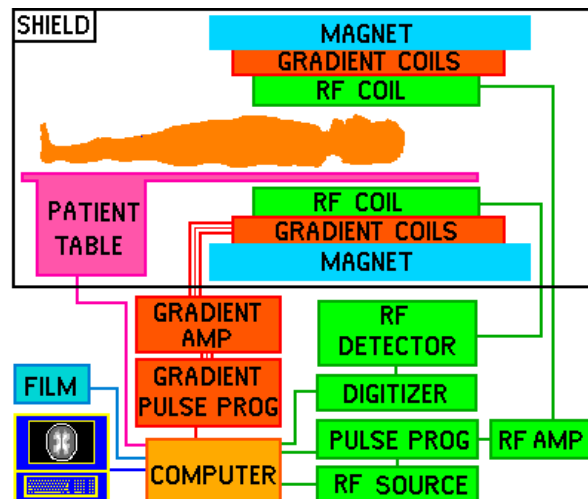
O ovlivnění relaxivity kontrastních látek pojednává hlouběji řada publikací<sup>10, 11, 14, 31, 32</sup>.

### **2.1.3. MR přístroj**

MR přístroj je složité zařízení (*Obrázek 7, str. 13*), které produkuje silné magnetické pole<sup>12, #6</sup>. Při vyšetření se využívá elektromagnetické vlnění a aby se zamezilo jeho zkreslení vnějšími vlivy, např. vysíláním v běžném FM pásmu, musí být přístroj umístěn v tzv. Faradayově kleci. Stěny této měděné klece bývají zazděny přímo ve zdech místnosti, v níž je přístroj umístěn.

Samotný přístroj je složen z velkého množství elektronických částí, jako je hlavní magnet, radiofrekvenční (RF) cívky a řada doplňujících komponent.

<sup>#6</sup> [http://www.mr-portal.com/princip\\_mr/architektura\\_mr\\_systemu.php](http://www.mr-portal.com/princip_mr/architektura_mr_systemu.php) – 25. 10. 2010, 5:52



Obrázek 7. Schéma MR přístroje

### 2.1.3.1. Hlavní magnet

Tento magnet produkuje statické magnetické pole. Základními vlastnostmi hlavních magnetů jsou jejich typ, homogenita a v neposlední řadě intenzita jejich magnetického pole. Tato intenzita se vyjadřuje v jednotkách Tesla (T) a v praxi se využívají pole pohybující se v rozmezí 0,2 – 3 T.

Rozlišujeme 3 základní typy hlavních magnetů:

- permanentní – vyrobeny ze slitin vzácných kovů, např.  $\text{SmCo}_5$ , nižší pořizovací a provozní náklady, pro generování pole  $B_0$  není třeba elektrický proud, velká hmotnost, stabilitu pole narušují i malé změny teploty;  $B_0 \leq 0,4 \text{ T}$
- odporový, rezistivní (též nazývaný elektromagnet) – pole je vytvářeno průchodem elektrického proudu vodičem ( $B_0 \sim$  proudu a počtu závitů), relativně nízká hmotnost a pořizovací náklady, velká provozní spotřeba elektrické energie, extrémně citlivé na udržení konstantní provozní teploty;  $B_0 \leq 0,4 \text{ T}$
- supravodivý – magnetické pole udržováno průchodem elektrického proudu supravodičem, jež má nulový elektrický odpor (vyžadují chlazení tekutým heliem na teplotu blízkou absolutní nule), vysoké pořizovací i provozní náklady, vysoká kvalita zobrazení (poměr signál/šum roste s  $B_0$ );  $B_0 = 0,5 - 8 \text{ T}$



Obrázek 8. Hlavní magnety – permanentní magnet, elektromagnet a supravodivý magnet

### 2.1.3.2. RF cívky

Tyto cívky fungují jako vysílač/přijímač RF signálu, tj. elektromagnetického vlnění o Larmorově frekvenci.

Rozlišuje se několik druhů RF cívek a to:

- celotělové (body coil) – vysílací i přijímací
- povrchové (surface coil) – spíše přijímací; tím, že jsou blíže k objektu, poskytují lepší signál, jsou anatomicky přizpůsobené, např. hlavová, pažní apod.
- vícesegmentové (array coil)

### 2.1.3.3. Gradientní cívky

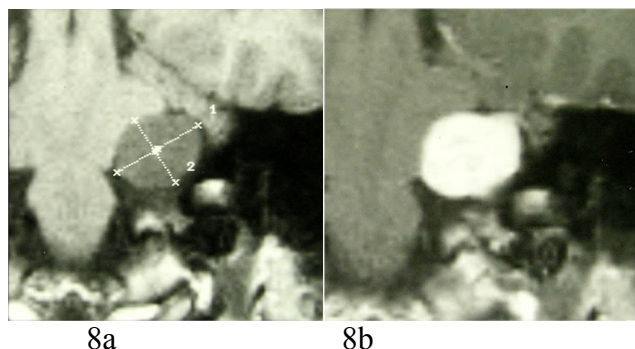
Tyto cívky slouží k lokalizaci signálu a vytvářejí přídatná magnetická pole. Umožňují změnu tohoto pole pomocí krátkodobých impulzů v předem určených na sebe kolmých směrech podél os  $x$ ,  $y$ ,  $z$ , s přesným načasováním a s časovým omezením na dobu trvání elektromagnetického impulzu.<sup>14,#7</sup>

### 2.1.4. Kontrastní látky pro MRI

Kontrastní látky (CAs) zkracují dobu relaxace a dělíme je podle toho na  $T_1$  nebo  $T_2$  CAs.  $T_1$  kontrastní látky jsou pozitivní, tzn. zesilují signál vodíku ve tkáni a způsobují zesvětlení tkáně na výsledném obrazu,  $T_2$  kontrastní látky jsou naopak negativní, tzn. zeslabují vodíkový signál a výsledný obraz tkání je ztmaven. Účinek použité kontrastní látky na výsledný obraz zachycuje *Obrázek 9, str. 15*.

<sup>#7</sup> [http://home.zcu.cz/~pleskot/vznik\\_obrazu.html](http://home.zcu.cz/~pleskot/vznik_obrazu.html) - 26. 7. 2011 v 17:51





Obrázek 9. Snímek MRI zachycující nádor ve sluchovém systému bez použití kontrastní látky (vlevo) a s využitím  $T_1$  kontrastní látky (vpravo). Snímky byly získány na radiodiagnostické klinice FNKV

Dvě základní třídy klasifikace CAs tvoří superparamagnetické částice oxidů železa ( $T_2$  CAs) a rozpustné paramagnetické cheláty kovů ( $T_1$  CAs). CAs lze dále rozdělit na extracelulární a intracelulární, či tkáňově nebo orgánově specifické, v závislosti na jejich biodistribuci.

#### 2.1.4.1. $T_1$ kontrastní látky

V současnosti jsou v klinické praxi nejpoužívanější paramagnetické kontrastní látky na bázi gadolinia, které má 7 nepárových elektronů a relativně dlouhý elektron-spin relaxační čas. Tyto vlastnosti zapříčiňují jeho velkou schopnost ovlivnit relaxační časy protonů (relaxivita  $r_1$ )<sup>14</sup>. Relaxivita je dána vztahem (3):

$$\frac{1}{T_{1,obs}} = \frac{1}{T_{1,d}} + r_1 \cdot [\text{Gd}^{3+}] \quad (3)$$

$T_{1,obs}$  značí celkovou měřitelnou rychlost relaxace protonů,  $T_{1,d}$  je diamagnetický příspěvek k relaxaci, a  $[\text{Gd}^{3+}]$  je koncentrace gadolinitých iontů v roztoku.

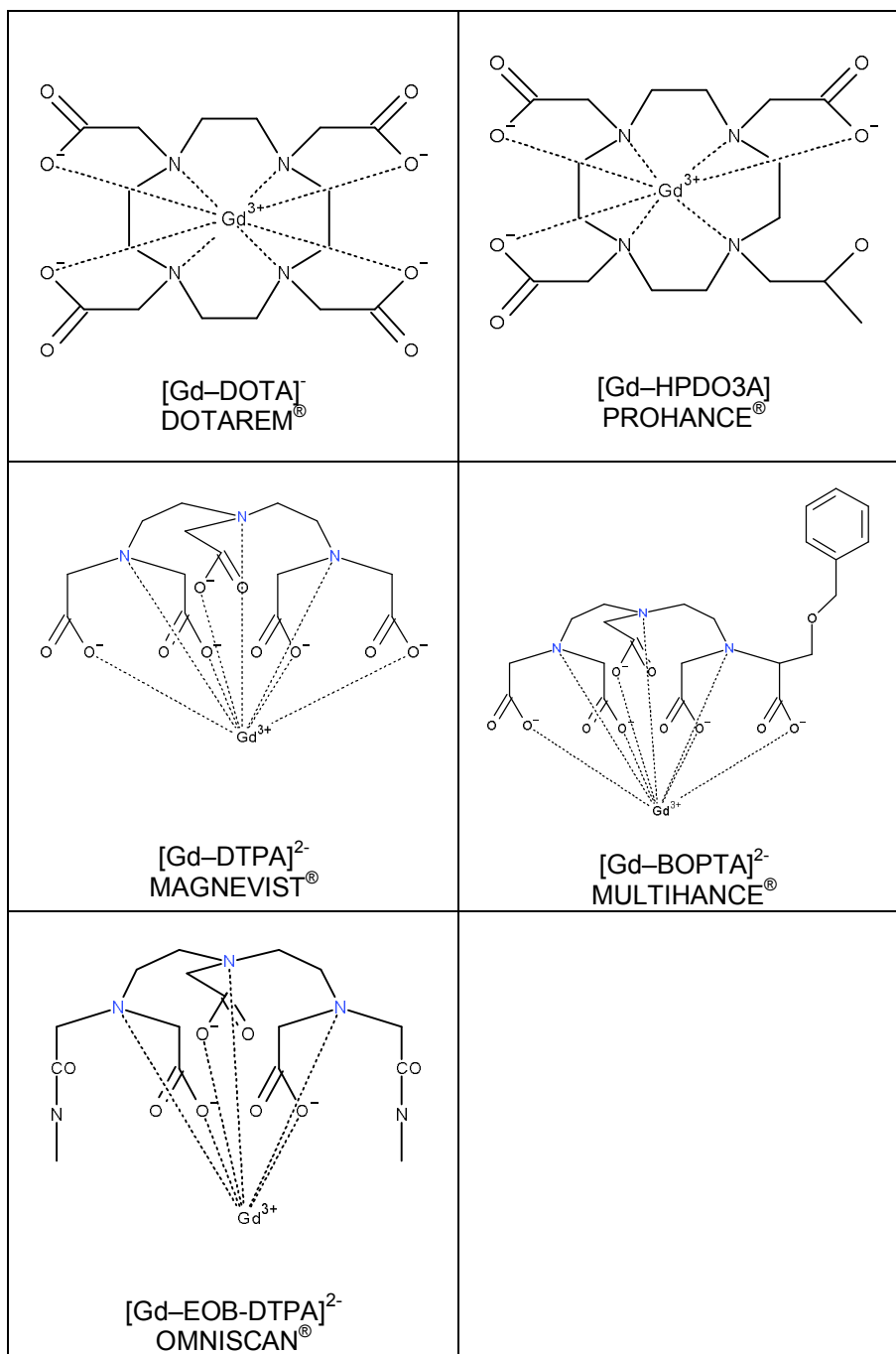
Gadolinium nezastává u savců žádnou fyziologickou funkci, působí na ně ve formě volného iontu silně toxicky, a to již při nízkých dávkách ( $10 - 20 \mu\text{mol kg}^{-1}$ )<sup>2</sup>. Proto je gadolinium vázáno do stabilních komplexů, tzv. chelátů, čímž je zabráněno, aby se volné  $\text{Gd(III)}$  dostaly do těla, ať už transchelatací (vytržení centrálního iontu jinými ligandy) nebo transmetalací (nahrazení centrálního iontu biogenním iontem), a zároveň dojde ke snížení toxicity. Příkladem může být sůl megluminu  $\text{Gd-DTPA}$  ( $\text{LD}_{50} = 10 \text{ mmol kg}^{-1}$ , i.v. u krysy)<sup>18</sup>. Údaje toxicity některých dalších komplexů  $\text{Gd(III)}$  jsou uvedeny v *Tabulce 2, str. 16*.

CA	LD <sub>50</sub> (mmol kg <sup>-1</sup> )
Omniscan <sup>®</sup>	25
ProHance <sup>®</sup>	< 15

Tabulka 2<sup>19</sup>. Akutní toxicita některých účinných látek CAs při intravenózním podání krysám

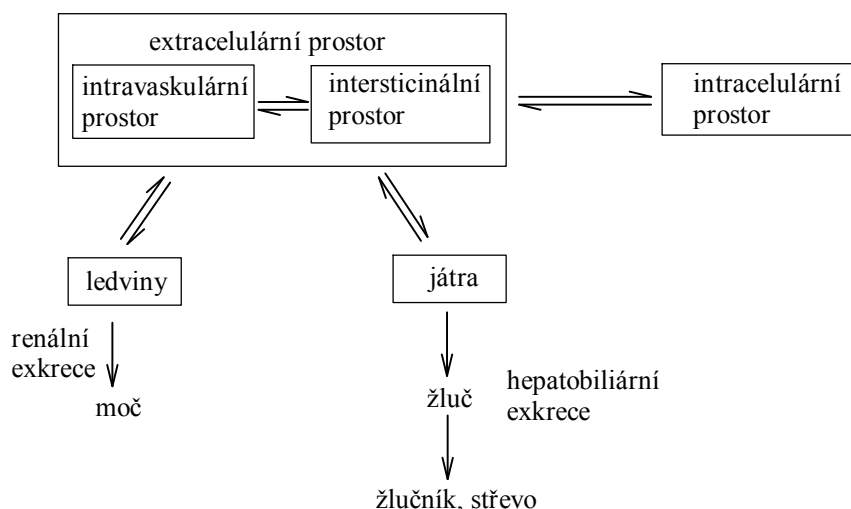
Cheláty mohou být buď molekuly lineární, jako je DTPA-BMA, DTPA-BMEA nebo makrocyclické, např. DOTA, DO3A-butrol, HP-DO3A. Gd(III) se do nich váže do formy nízkomolekulárních, ve vodě rozpustných komplexů, které jsou vylučovány ledvinami. Z nich Gd-DOTA a Gd-DTPA jsou iontové, chelát do nich přináší více než 3 záporné náboje, celkový náboj je tedy záporný (Magnevist<sup>®</sup>, Dotarem<sup>®</sup>, Vasovist<sup>®</sup>). Ostatní jsou neiontové, chelát přináší 3 záporné náboje (Omniscan<sup>®</sup>, ProHance<sup>®</sup>, Gadovist<sup>®</sup>, Optimark<sup>®</sup>). Další sloučeniny obsahují Gd(III) ve vazbě na BOPTA a EOB-DTPA nebo jim podobné ligandy, které jsou lipofilnější a jsou vylučovány nejen ledvinami, ale rovněž játry. Relaxivity těchto sloučenin jsou vyšší, poněvadž se mohou vázat na bílkoviny<sup>17</sup>, což zpomalí jejich pohyb v roztoku (viz Kapitola 2.1.2.2.)

Makrocyclické molekuly jsou stále nejen jako nabitě (Dotarem<sup>®</sup>), ale i jako neutrální (ProHance<sup>®</sup>, Gadovist<sup>®</sup>). Nižší kinetickou inertnost, tj. schopnost udržet Gd(III) ion, mají cheláty s lineární molekulou (Omniscan<sup>®</sup>, Magnevist<sup>®</sup>, Optimark<sup>®</sup>).



Obrázek 10. Struktury některých komerčně dostupných kontrastních látek pro využití v MRI

Tyto cheláty jsou distribuovány (Obrázek 11, str. 18) do extracelulární tekutiny a následně eliminovány glomerulární filtrací (farmakokinetické parametry vybraných CAS viz Tabulka 3, str. 18).



Obrázek 11. Hlavní místa distribuce a exkreční cesty pro i.v. podané rozpustné komplexy kovových iontů<sup>1</sup>

CA	Účinná látka	Průměrná distribuční doba (h)	Průměrná eliminační doba (h)
Multihance <sup>®20,#8</sup>	kyselina gadobenová	0,10	1,43
Omniscan <sup>®20,#9</sup>	gadodiamid	0,07	1,17
ProHance <sup>®21,#10</sup>	gadoteridol	0,20	1,57

Tabulka 3. Farmakokinetické parametry vybraných kontrastních látek

Komerčně dostupné CAs jsou v současné době účinné pouze ve vysokých koncentracích, tj. > 0,1 mM při  $M_r \sim 600$  Da. Jejich relaxivita je  $\sim 4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a pro dostačující kontrast snímku je ve zkoumané tkáni potřeba koncentrace CA  $\sim 125 \mu\text{M}$ .<sup>14, 15</sup>

Nejnámější kontrastní látkou využívanou v klinické praxi je Gd-DTPA. Byla popsána v roce 1984 a roku 1988 byla schválena ke klinickému použití. Po aplikaci se míchá s plasmou, vstupuje do prostoru extracelulární kapaliny, následně se vylučuje močí. Její poločas vyloučení je 60 – 90 minut<sup>17,#11</sup>.

#### 2.1.4.2. $T_2$ kontrastní látky

Částice oxidů železa se skládají ze specifického jádra oxidu železa, ve většině případů to jsou  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nebo  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , a jsou pokryty vrstvou např. dextranu, karboxydextranu, chitosanu, škrobu, heparinu, albuminu a dalších makromolekulárních látek<sup>5</sup>.

<sup>#8</sup> <http://www.farmaceutika.info/multihance> - 29. 3. 2011 v 22:39

<sup>#9</sup> <http://www.farmaceutika.info/omniscan-0-5-mmol-ml> - 29. 3. 2011 v 21:13

<sup>#10</sup> <http://www.zdn.cz/medicament/other?seo=prohance&what=spc&id=0054253> – 29. 3. 2011 v 23:57

<sup>#11</sup> <http://www.vscht.cz/nmr/predmet/lekce/NMR-lekce13b.pdf> - 26. 5. 2011 v 21:57

Podle velikosti je dělíme na<sup>1</sup>:

- USPIO (ultra-small superparamagnetic iron oxide) particles –  $d < 50$  nm,
- SPIO (small superparamagnetic iron oxide) particles –  $1 \mu\text{m} > d > 50$  nm,
- MPIO (micron-sized iron oxide) particles –  $d > 1 \mu\text{m}$ .

### 2.1.4.3. Nežádoucí účinky

Kontrastní látky jsou chemické substance sloužící k zobrazení abnormalit v anatomické či funkční stavbě organismu. Většina léčivých přípravků, kontrastních látek nevyjímaje, se vyznačuje svými nežádoucími účinky, ať více či méně závažnými.

Mezi nejdůležitější nežádoucí příznaky při intravaskulárním podání kontrastních látek patří anafylaktické reakce, nauzea (výskyt u 1 – 2 % pacientů), kopřivka (výskyt u méně než 1 % pacientů)<sup>22</sup>, šok, srdeční selhání, srdeční arytmie, akutní selhání ledvin, toxické účinky na centrální nervový systém<sup>23</sup> či nefrogenní systémová fibróza, hlavně u pacientů se závažným poškozením ledvin (rychlost glomerulární filtrace  $< 30$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup>). Výskyt závažných neurotoxických účinků je však velmi vzácný. Vstup kontrastních látek do centrálního nervového systému je minimální.

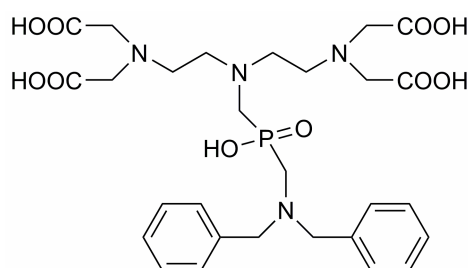
Incidence výskytu reakcí se pohybuje v rozmezí cca 1 : 900 až 1 : 3 000, mortalita asociovaná s podáním kontrastní látky je přibližně 1 : 10 000 až 1 : 50 000.<sup>24,#12</sup>.

## 2.2. Cíle práce

Předmětem práce je syntéza potenciálního ligandu kontrastních látek pro MRI.

Konkrétní cíle této bakalářské práce jsou:

- Syntéza prekurzorů pro syntézu konečného ligandu
- Syntéza ligandu (*Obrázek 12*)



*Obrázek 12. Vzorec syntetizovaného ligandu*

<sup>#12</sup>[http://www.homolka.cz/common/files/rdg\\_standardy\\_pouziti\\_intravaskularne\\_aplikovanych\\_kontrastnich\\_latek.pdf](http://www.homolka.cz/common/files/rdg_standardy_pouziti_intravaskularne_aplikovanych_kontrastnich_latek.pdf) - 13. 3. 2011 v 17:34

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Seznam použitých chemikálií

amoniak – 25 %	PENTA
chloroform – p.a., stab., 99,5 %	Lach-Ner
dibenzylamin – techn., $\geq 95$ %	Fluka
DCC – puriss, $\sim 99$ %	Fluka
ethanol – denaturovaný, 96 %	liho var Kolín
ethanol – bezvodý, 99,9 %	Sigma-Aldrich
diethylentriamin – min 98 %	Sigma-Aldrich
ftalanhydrid – čistý, $\geq 97$ %	Fluka
hydrazin hydrát – 80% vodný roztok	PENTA
hydroxid sodný	PENTA
kyselina octová – 99 %, p.a.	PENTA
kyselina fosforová – purum, $\sim 50$ % vodný roztok	Fluka
paraformaldehyd – purum	Lachema
toluen – čistý	Chemapol

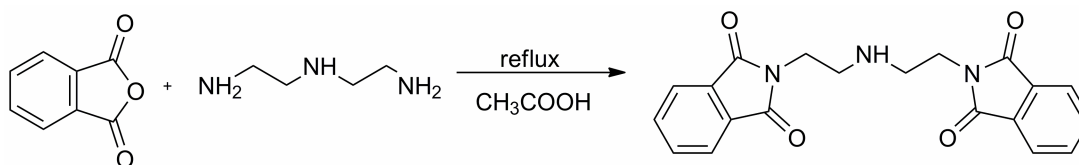
#### 3.2. Metody charakterizace

##### 3.2.1. NMR

$^1\text{H}$  a  $^{31}\text{P}$  NMR spektra byla měřena na přístrojích Varian<sup>UNITY</sup> INOVA 400 (PřF UK) a VNMR-300 (PřF UK) mými kolegy z laboratoře. Hodnoty chemických posunů  $\delta$  jsou v jednotkách ppm a interakční konstanty  $J$  v Hz.

### 3.3. Syntéza výchozích látek

#### 3.3.1. Bis(ftaloyl)diethylentriamin



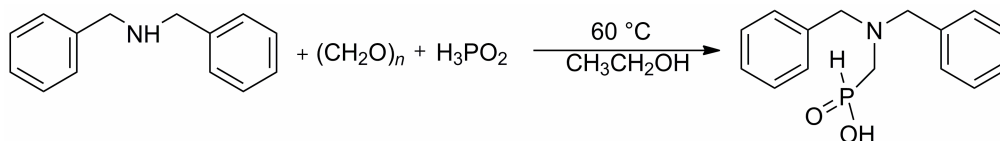
5,25 g DIENU (50,89 mmol) a 16,6 g ftalanhydridu (112,07 mmol) bylo v 250 ml baňce rozpuštěno v 85 ml kyseliny octové a zahříváno 1 hod k refluxu pod zpětným chladičem při teplotě lázně 135 °C. Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce (RVO) a odparek rozpuštěn v 80 ml ethanolu ohřátého na 45 °C. Ethanol byl odpařen na RVO, odparek rozpuštěn v 80 ml ethanolu a odsát na fritě S3. Získaný prášek byl rozpuštěn v 80 ml chloroformu a extrahován 5% NaOH (3 × 120 ml). Chloroformová fáze byla odpařena na RVO. Čistota produktu (**prekurzor 1**) ve formě bílého prášku byla zkontrolována NMR spektroskopií. Výtěžek reakce byl 1,62 g (tj. 8,76 %).

Charakterizace:

- NMR:

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 1,95 (1 H; s; NH); 2,73 (4 H; t;  $^3J_{\text{HH}} = 5,7$ ;  $\text{CH}_2\text{NCH}_2$ ); 3,57 (4 H; t;  $^3J_{\text{HH}} = 6,3$ ;  $\text{CH}_2\text{N-Pht}$ ); 7,71 – 7,79 (8 H; m; Pht)

### 3.3.2. (N,N-dibenzylamino)methylfosfinová kyselina



V 250 ml baňce bylo smícháno 50 ml ethanolu, 5,00 g dibenzylaminu (25,34 mmol) a 1,52 g paraformaldehydu (50,62 mmol, 2,00 eq.). Poté bylo přidáno 10,00 g 50% vodného roztoku kyseliny fosforené. Směs se nechala míchat při teplotě 60 °C po dobu 24 hodin. Následně byla provedena chromatografie směsi na silném kationtovém iontoměniči (Dowex 50, H<sup>+</sup>-forma, 200 ml). Kyselina fosforená a její deriváty, které neobsahovaly bazické funkce, byly eluovány vodou v ethanolu (1:1) a produkt poté amoniakem (5 %). Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO a čistota získaného produktu (**prekurzor 2**) ve formě bílého prášku byla zkontrolována NMR spektroskopií. Výtěžek reakce byl 4,01 g (tj. 57,45 %).

Charakterizace:

- NMR:

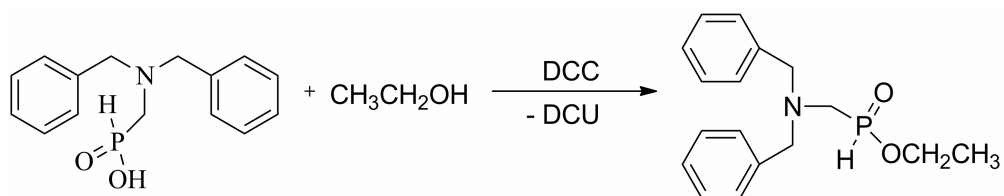
<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): 2,58 (2 H; d; <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 10,5; CH<sub>2</sub>P); 3,62 (4 H; s; NCH<sub>2</sub>-arom); 6,85 (1 H; d; <sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 523,7; PH); 7,00 – 7,10 (10 H; m; arom)

<sup>31</sup>P NMR (D<sub>2</sub>O): 20,12 (1 P; dt; <sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 480,2; PH; <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 20,1; CH<sub>2</sub>P)

<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} NMR (D<sub>2</sub>O): 20,13 (1 P; s)



### 3.3.3. Ethyl(*N,N*-dibenzylamino)methylfosfinát



3,00 g produktu z předchozí reakce (10,90 mmol) byly smíchány s 2,70 g DCC (13,09 mmol, 1,3 ekvivalentů) a rozpuštěny v 80 ml suchého ethanolu. Směs se nechala míchat po dobu 2 dní. Směs byla odsáta na fritě S3, k roztoku pod fritou byl přidán ethanol a následně byl odpařen na RVO. Odparek byl rozpuštěn v ethanolu (**prekurzor 3**) a jeho čistota byla zkontrolována NMR spektroskopií.

Charakterizace:

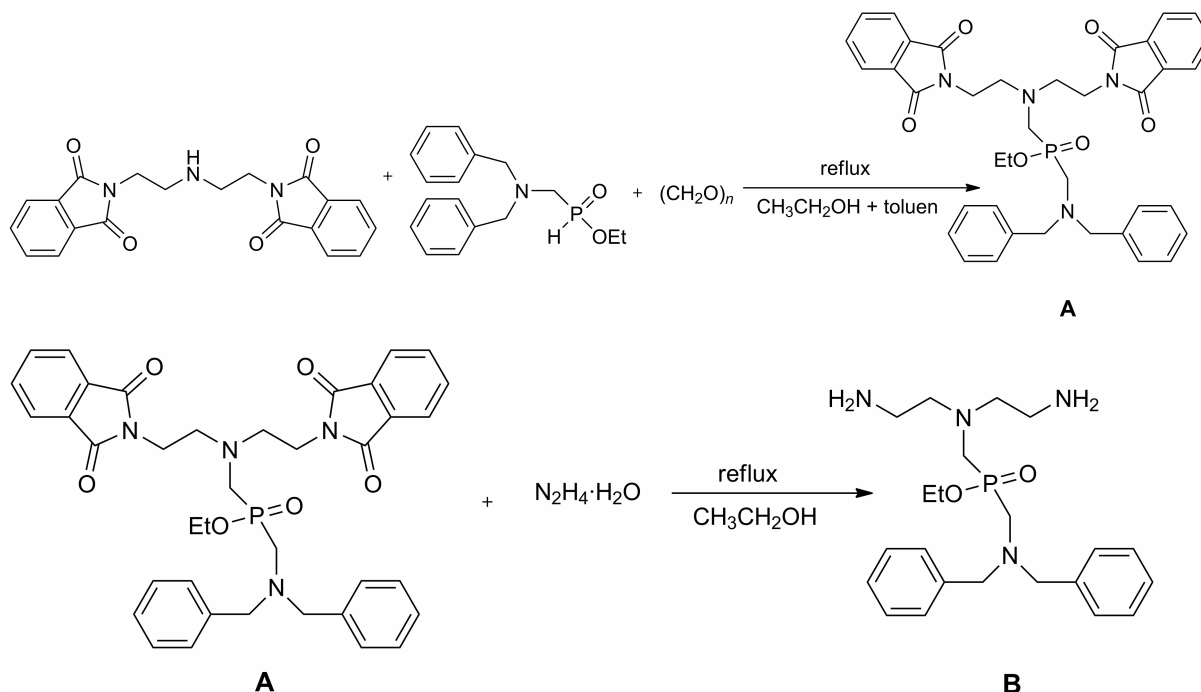
- NMR:

$^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 36,95 (1 P; dt;  $^1J_{\text{PH}} = 550,0$ ; PH;  $^3J_{\text{PH}} = 17,0$ ;  $\text{CH}_2\text{P}$ )

$^{31}\text{P}$  { $^1\text{H}$ } NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 36,95 (1 P; s)

### 3.4. Syntéza ligandu

#### 3.4.1. Diethylentriamin-*N'*-methylen(dibenzylaminomethyl)-fosfino-*N,N,N'',N''*-tetraoctová kyselina



Bis(fthaloyl)diethylentriamin (4,00 g, 11,01 mmol) byl smíchán s ethyl(*N,N*-dibenzylamino)methylfosfinátem a rozpuštěn ve směsi 50 ml toluenu a 20 ml ethanolu. Směs se zahřívá k refluxu s Dean-Starkovou pastí. V průběhu 6 hodin bylo přidáno po částech 0,50 g paraformaldehydu (16,65 mmol, 1,5 eq.) a směs se nechala refluxovat přes noc. Bylo proměřeno  $^{31}\text{P}$  NMR spektrum látky A. Na spektru byly zachyceny dva signály  $\sim 42$  ppm a  $\sim 43,8$  ppm.

Směs byla odpařena na RVO, odparek rozpuštěn ve 40 ml suchého ethanolu a přidáno 1,10 g 80% hydrazin hydrátu (21,97 mmol), směs se nechala zahřívát přes noc k refluxu pod zpětným chladičem při teplotě lázně  $125$  °C. Směs byla ochlazena, odsáta na fritě S3 a roztok pod fritou byl odpařen na RVO. Produkt ve formě žlutohnědého oleje byl přečištěn chromatografií na silikagelu, k eluci byl použit roztok amoniak:ethanol (1:20 a 1:5). Byla proměřena  $^1\text{H}$  a  $^{31}\text{P}$  NMR spektra.

## 4. DISKUZE

### 4.1. *Syntéza prekurzoru 1*

Syntéza prekurzoru 1 byla provedena dle návodu (cit. <sup>34</sup>) s polovičním množstvím použitých reagensů, ale nebyl získán požadovaný produkt. <sup>1</sup>H NMR spektrum poukázvalo na přítomnost tří ftaloylů v molekule. Domnívali jsme se, že je ve formě kyseliny ftalové, proto byl zařazen další krok.

Jednalo se o rozpuštění meziprojektu v 80 ml chloroformu, které následovala třikrát opakovaná extrakce 120 ml 5% NaOH. Vodná fáze byla odpuštěna a organická fáze byla dosucha odpařena na RVO. Tímto přídatným krokem byl již získán požadovaný prekurzor 1.

### 4.2. *Syntéza prekurzoru 2*

K syntéze tohoto prekurzoru byl využit postup zveřejněný v literatuře (cit. <sup>33</sup>), výtěžek je uváděn 85 %.

Po chromatografii na silném kationovém iontoměničím měl produkt dostačující čistotu, proto již nebyla zařazena chromatografie na silném aniontovém iontoměničím, jak je uvedeno v postupu.

### 4.3. *Syntéza prekurzoru 3*

Syntéza prekurzoru probíhala bez obtíží, jediným problémem je stálost tohoto produktu. Snadno podléhá hydrolyze a tak je třeba jej zpracovávat okamžitě, příp. po delší době stání vysušit dalším přídavkem DCC a následně zpracovat.

### 4.4. *Syntéza ligandu*

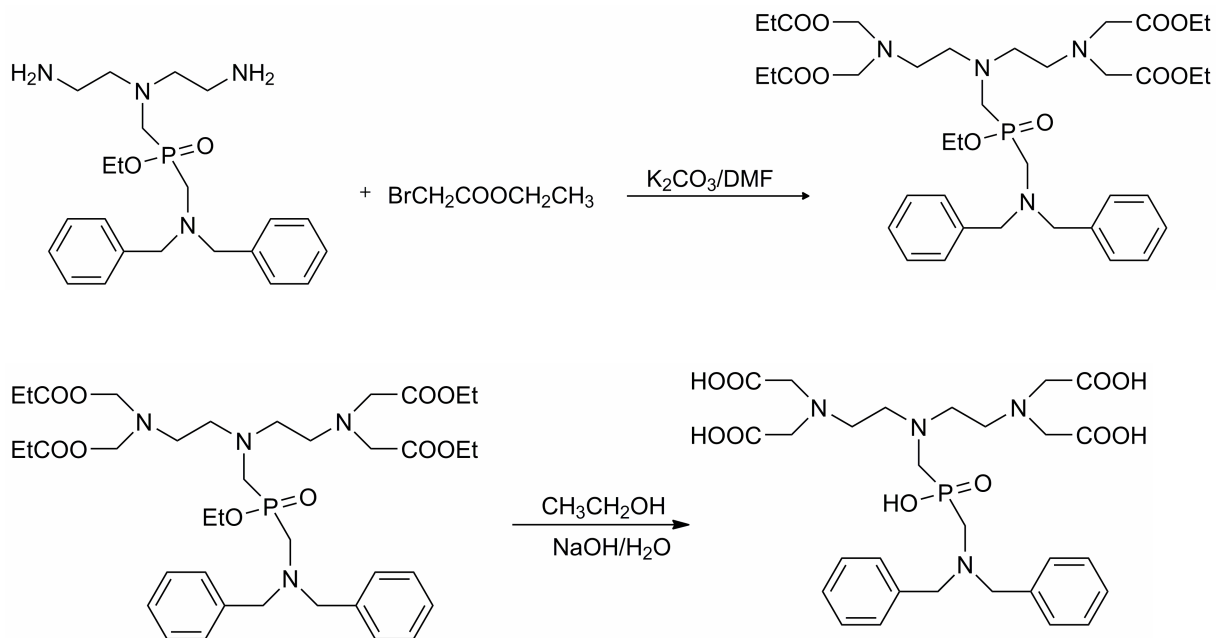
K přípravě ligandu byla zamýšlena syntéza podle postupu zveřejněném v literatuře (cit. <sup>33</sup>).

Byla využita Mannichova reakce v prostředí směsi toluenu a ethanolu za použití Dean-Starkovy pasti. Oproti návodu bylo použito dvojnásobné množství prekurzoru 1. Paraformaldehyd byl přidáván po malých částech, aby se zabránilo vypěnění směsi. Při proměření <sup>31</sup>P NMR spektra toto spektrum nevykazovalo signály, které by odpovídaly nezreagovaným P–H prekurzorům či kyselině fosfinové, bylo tedy usuzováno na přítomnost žádané látky **A**.

Při chromatografii na silikagelu byl nejprve k eluci využit roztok amoniak:ethanol (1:20), kdy byla jímána jedna frakce, poté jsme použili roztok amoniak:ethanol (1:5), kdy bylo jímáno 6 frakcí. Byla proměřena <sup>1</sup>H a <sup>31</sup>P spektra frakce 1 a 5, přičemž ve fosforových

spektrech nebyl zaznamenán signál fosforu. Fosfor byl hledán ve frakci, která byla získána elucí amoniak:ethanol (1:20), ale ani zde nebyl nalezen. Je tedy možné, že látka **A** má k silikagelu velkou afinitu a je na něm stále navázána.

Dále měla syntéza probíhat dle následujících reakcí:



## 5. ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce byly připraveny látky pro syntézu ligandu. Klíčová syntéza, tedy příprava konečného ligandu, nebyla z časových důvodů dovedena do zdárného konce.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Gerald C. F. G. C. a Laurent S. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* 4/**2009**: 1 – 23
2. Aime S., Barge A., Gianolio E., Geninatti Crich S., Dastrù W. a Uggeri F. Paramagnetic Metal Complexes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging v Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents – the use of metals in medicine, England: John Wiley & Sons, Ltd., **2005**. Kapitola 28, s. 541 – 560
3. <http://nobelprize.org>
4. <http://www.cs.wikipedia.org>
5. Yan G.-P., Robinson L. a Hogg P. Magnetic resonance imaging contrast agents: Overview and perspective. *Radiography* 13/**2007**: e5 – e19
6. <http://fmri.mchmi.com>
7. <http://spie.org>
8. <http://mri-tip.com>
9. Brown M. A. a Semelka R. C. MRI: Basic Principles and Applications, 3rd ed. Wiley, Hoboken, New Jersey. **2003**
10. Pniok M. Makrobicyklické ligandy pro aplikace v MRI. Praha, **2011**, 80 s. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze na katedře anorganické chemie. Vedoucí diplomové práce Jan Kotek
11. Tóth É., Helm L. a Merbach A. E. Relaxivity of MRI Contrast Agents. *Top. Curr. Chem.* 221/**2002**: 61 - 101
12. <http://www.mri-portal.com>
13. <http://home.zcu.cz>
14. Caravan P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* 35/**2006**: 512 – 523
15. Chan W.-Y. K. a Wong W.-T. Small molecular gadolinium (III) complexes as MRI contrast agents for diagnosis imaging. *Coord. Chem. Rev.* 251/**2007**: 2428 – 2451
16. Muller R. N. a Rinck P. A. MR contrast agents vary in chelate power. *Dg imaging Europe* 5/**2009**: 13 – 14
17. <http://www.vscht.cz>
18. Weinmann J. H., Brasch C. R., Press R. W. a Wesbey E. G. Characteristic of gadolinium-DTPA complex: a potencial NMR contrast agent. *Am. J. Roentgenol.* 3/**1984**: 619 – 624

19. Gries H. Extracellular MRI Contrast Agents Based on Gadolinium. *Top. Curr. Chem.* 221/**2002**: 1 - 24
20. <http://www.farmaceutika.info>
21. <http://www.zdn.cz>
22. Buhaescu I. a Izzedine H. Gadolinium-induced nephrotoxicity. *Int. J. Clin. Pract.* 62/**2008**: 1113 – 1118
23. Junck L. a Marshall W. H. Neurotoxicity of Radiological Contrast Agents. *Ann. Neurol.* 13/**1983**: 469 – 484
24. <http://www.homolka.cz>
25. Kotek J. a Lukeš I. Cheláty pro použití v biomedicínských oborech. *Chem. Listy* 104/**2010**: 1163 – 1174
26. Merbach A. E. a Tóth É. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. John Wiley & Sons, Chichester. **2001**
27. Hermann P., Kotek J., Kubíček V. a Lukeš I. Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes. *Dalton Trans.*, **2008**: 3027 - 3047
28. Kuperman V. Magnetic Resonance Imaging: Physical principles and applications. USA: Academic Press, **2000**
29. Weishaupt D., Köchli V. D. a Marincek B. How Does MRI Work?: An Introduction to the Physics and Function of Magnetic Resonance Imaging, 2nd ed. Germany: Springer Verlag, **2006**
30. Liney G. MRI from A to Z: A Definitive Guide for Medical Professionals. USA: Cambridge University Press, **2005**
31. Bonnet C. S., Fries P. H., Crouzy S. a Delangle P. Outer-Sphere Investigation of MRI Relaxation Contrast Agents. Example of a Cyclodecapeptide Gadolinium Complex with Second-Sphere Water. *J. Phys. Chem. B* 114/**2010**: 8770 – 8781
32. Caravan P., Astashkin A. V. a Raitsimring A. M. The Gadolinium(III) – Water Hydrogen Distance in MRI Contrast Agents. *Inorg. Chem.* 42/**2003**: 3972 - 3974
33. Kotek J., Lebdušková P., Hermann P., Elst L. V., Muller R. N., Geraldés C. F. G. C., Maschmeyer T., Lukeš I. a Peters J. A. Lanthanide(III) Complexes of Novel Mixed Carboxylic-Phosphorus Acid Derivatives of Diethylenetriamine: A Step Towards More Efficient MRI Contrast Agents. *Chem. Eur. J.* 9/**2003**: 5899 – 5915

34. Ng Ch. Y., Motekaitis J. a Martell A. E. New multidentate ligands. 18. Synthesis of 1,4-Bis(bis(2-aminoethyl)aminomethyl)benzene: Binuclear chelating tendencies and mixed-ligand binuclear chelate forming. *Inorg. Chem.* 18/**1979**: 2982 – 2986
35. Bellin M.-F. a Molen A. J. Van D. Extracellular gadolinium-based contrast media: An overview. *EJR.* 66/**2008**: 160 – 167
36. Caravan P., Ellison J. J., McMurry T. J. a Lauffer R. B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.* 99/**1999**: 2293 – 2352