

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní obor: Bioanorganická chemie



Manganaté komplexy se superoxid dismutázovou (SOD)
aktivitou využitelné v tomografii magnetické rezonance (MRI)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce:

RNDr. Bohuslav Drahoš, Ph.D.

Autor práce:

Bc. Marie Pražáková

Jméno autora: Marie Pražáková
Název práce: Manganaté komplexy se superoxid dismutázovou (SOD) aktivitou využitelné v tomografii magnetické rezonance (MRI)
Název práce v angličtině: Manganese complexes with superoxide dismutase-like (SOD) activity and application potential in Magnetic Resonance Imaging (MRI)
Druh práce: Diplomová
Katedra: Katedra anorganické chemie
Vedoucí práce: RNDr. Bohuslav Drahoš, Ph.D.
Rok obhajoby: 2019

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na stručný popis diagnostické metody tomografie magnetické rezonance (MRI) a na způsob funkce kontrastních látek užívaných v klinické praxi. Rovněž je zaměřena na popis funkce superoxid dismutasy a jejich mimik. Dále se práce zabývá syntézou derivátů 15členného pyridinového makrocyclického ligandu L1 (4,12,18-triaza-6,9-dioxabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien) obsahující dlouhý alifatický řetězec, L1Oct (4-(oktadecyl)-4,12,18-triaza-6,9-dioxabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien), L1Oct2 (4,12-bis(oktadecyl)-4,12,18-triaza-6,9-dioxabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien) a syntézou strukturně podobného makrocyclického ligandu L2 (16-chloro-6,9-dioxa-3,12,18-triazabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien) a jeho derivátu L2Oct (16-oktadekanoxy-6,9-dioxa-3,12,18-triazabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien).

Připravené ligandy byly dále charakterizovány pomocí vybraných experimentálních metod. Dále byly studovány roztoky manganatých komplexů s ligandy L1Oct a L2. U prvního z nich byla potvrzena tvorba micelárních struktur, u obou komplexů byla prokázána SOD aktivita a bylo provedeno měření relaxačních časů T_1 , které potvrdilo jejich chování jako kontrastních látek pro MRI.

Klíčová slova: pyridin, makrocycklus, ligand, mangan, kontrastní látka, superoxid dismutasy, SOD mimika, micela
Počet stran: 53
Jazyk: čeština

Author's name: Marie Pražáková
Title: Manganese complexes with superoxide dismutase-like (SOD) activity and application potential in Magnetic Resonance Imaging (MRI)
Type of thesis: Diploma
Department: Department of Inorganic chemistry
Supervisor: RNDr. Bohuslav Drahoš, Ph.D.
The year of presentation: 2019

ABSTRACT

The diploma thesis is focused on brief description of Magnetic Resonance Imaging (MRI) and function of contrast agents used in this diagnostic method. It is also focused on superoxid dismutases and SODs mimics. The thesis deals with synthesis of 15membred macrocycle L1 (4,12,18-triaza-6,9-dioxabicyklo[12.3.1]octadeca-1(18),14,16-triene) and its derivates with long alifatic side chain L1Oct (4-(oktadecyl)-4,12,18-triaza-6,9-dioxabicyklo[12.3.1]octadeca-1(18),14,16-triene), L1Oct2 (4,12-bis(oktadecyl)-4,12,18-triaza-6,9-dioxabicyklo[12.3.1]octadeca-1(18),14,16-triene) as well as synthesis of analogous macrocycle L2 (16-chloro-6,9-dioxa-3,12,18-triazabicyclo[12.3.1]oktadeca-1(18),14,16-triene) and its derivate L2Oct (16-oktadecoxy-6,9-dioxa-3,12,18-triazabicyklo[12.3.1]oktadeca-1(18),14,16-triene). Synthesized ligands were characterized with common experimental methods. Manganese(II) complexes with L1Oct and L2 were studied in solution. Formation of micellar structure was confirmed for the first one. Both complexes possessed SOD activity and determination of the T_1 relaxation times confirmed their behaviour as MRI contrast agents.

Keywords: pyridine, macrocycle, ligand, manganese, contrast agent, superoxid dismutase, SOD mimics, micelle
Number of pages: 53
Language: Czech

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „*Manganaté komplexy se superoxid dizmutázovou (SOD) aktivitou využitelné v tomografii magnetické rezonance (MRI)*“ vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Bohuslava Drahoše, Ph.D. V práci jsem uvedla veškeré použité zdroje, jejichž celkový soupis je uveden v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne:

vlastnoruční podpis autora

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především RNDr. Bohuslavu Drahošovi, Ph. D. za vedení práce, trpělivý přístup, užitečné rady, ochotu vždy pomoci, za čas věnovaný konzultacím, poskytnutou literaturu a za pomoc při měření a charakterizaci NMR a MS spekter. Chtěla bych rovněž poděkovat členům Katedry anorganické chemie a Pavle Richterové za měření elementární analýzy. Dále kolegům a kolegyním za vytvoření příjemného prostředí během studia, rodičům a přátelům za jejich nezměrnou podporu během studia.

OBSAH

ÚVOD	8
CÍLE PRÁCE	9
TEORETICKÁ ČÁST	11
1. Tomografie magnetické rezonance – MRI (Magnetic Resonance Imaging)	11
1.1 Relaxační časy	12
1.2 Kontrast obrazu v MRI	13
1.3 Kontrastní látky	14
1.3.1 T_1 kontrastní látky	14
1.3.2 T_2 Kontrastní látky	19
2. Superoxid dismutasy	19
2.1 MnSOD	20
2.5 SOD mimika	22
2.5.1 Komplexní sloučeniny manganu	23
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
Seznam použitých chemikálií	26
Metody charakterizace	28
3. Syntéza ligandů L1, L1Oct a L1Oct2	29
4. Syntéza ligandu L2 a L2Oct	31
4.1 Příprava prekurzorů	31
4.2 Příprava ligandu L2 a L2Oct	33
5. Příprava vodných roztoků komplexů	35
6. Stanovení kritické micelární koncentrace (CMC) komplexu MnL1Oct	36
7. Měření SOD aktivity pro komplexy MnL1Oct a MnL2	36
8. Měření T_1 relaxačního času	37
DISKUZE	38
9. Syntéza ligandu L1Oct a L1Oct2	38

10. Syntéza L2 a L2Oct	40
10.1 Příprava prekurzorů	40
10.2 Příprava ligandu L2 a L2Oct	42
11. Stanovení kritické micelární koncentrace (CMC) komplexu MnL1Oct	43
12. Stanovení SOD aktivity pro komplexy MnL1Oct a MnL2	44
13. Měření T_1 relaxačního času	48
ZÁVĚR.....	50
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51

ÚVOD

Tomografie magnetické rezonance (MRI, z angl. Magnetic Resonance Imaging) je diagnostickou metodou sloužící k zobrazování struktur a funkce těla. Metoda využívá porovnávání rozdílů relaxačních časů, výsledkem čehož je rozdílný kontrast různých tkání. Kontrast je často nedostačující a je třeba ho zvyšovat uměle za využití kontrastních látek (CA, z angl. Contrast agents). Zkoumá se užití kontrastních látek s vyšší molekulovou hmotností, které mají rozdílnou biodistribuci, déle setrvávají v krevním řečišti a mají nižší hodnoty relaxačních časů, čímž se zvýší účinnost kontrastní látky. Příkladem mohou být sloučeniny tvořící micelární struktury díky přítomnosti např. alifatického ramena, které poskytují dobrý kontrast, obzvláště v nádorových tkáních. Alternativou k doposud používaným kontrastním látkám založených na gadolinových komplexech se jeví manganaté komplexní sloučeniny, které momentálně nejsou užívány v klinické praxi.

Tyto sloučeniny mohou rovněž napodobovat funkci enzymů podílejících se na ochraně buňky před oxidačním stresem – superoxid dismutas (SOD). Zaváděním alifatického řetězce do sloučeniny může být výhodné pro zvýšení účinnosti napodobování funkce enzymů, kdy inkorporace do membrán pomocí alifatických řetězců může zvýšit účinnost mimika SOD aktivity *in vivo*.

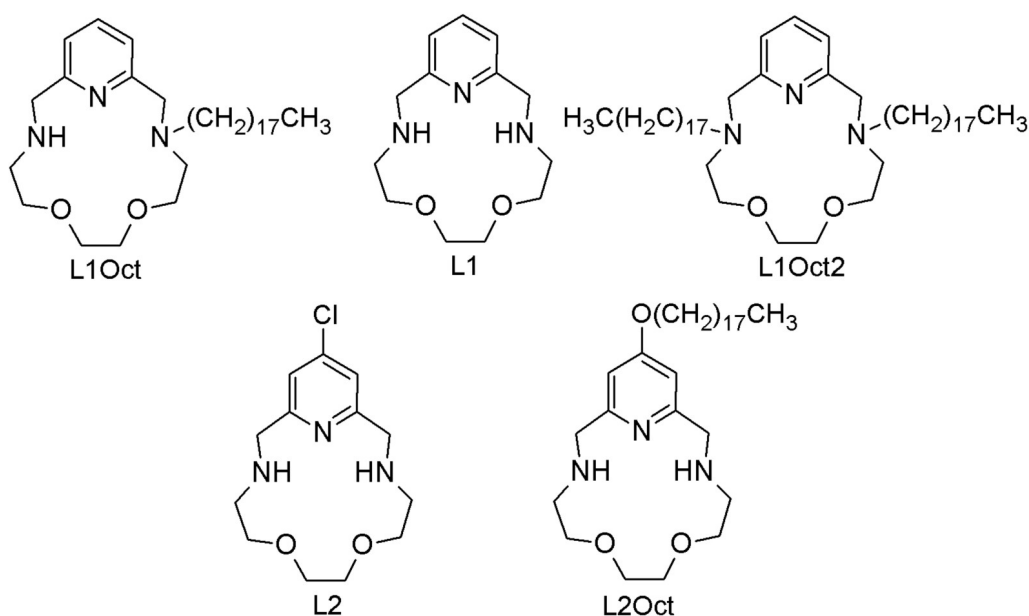
V rámci pokročilejších výzkumů zůstává otázkou, jestli by bylo možné propojit obě výše zmíněné aplikace, tj. jestli by bylo možné využít MRI k monitorování SOD aktivity.

CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo vypracování literární rešerše zabývající se diagnostickou metodou tomografie magnetické rezonance (MRI) a principem fungování kontrastních látek využívaných v MRI, dále superoxid dismutázovou (SOD) aktivitou a komplexními sloučeninami manganu, které se užívají jako mimika SOD aktivity.

Cílem bylo připravit alespoň jeden nový derivát 15členného pyridinového makrocyclického ligandu L1 (4,12,18-triaza-6,9-dioxabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien), který bude obsahovat dlouhý alifatický řetězec umožňující tvorbu micel L1Oct (4-(oktadecyl)-4,12,18-triaza-6,9-dioxabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien) a L1Oct2 (4,12-bis(oktadecyl)-4,12,18-triaza-6,9-dioxabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien) a charakterizovat tyto ligandy pomocí vybraných experimentálních metod.

Snahou bylo rovněž i připravit ligand L2 (16-chloro-6,9-dioxa-3,12,18-triazabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien) a jeho derivát s dlouhým alifatickým řetězcem navázaným na aromatické jádro L2Oct (16-oktadekanoxy-6,9-dioxa-3,12,18-triazabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien) a charakterizovat je pomocí vybraných experimentálních metod.



Obr. 1: Strukturální vzorce ligandu L1 a jeho derivátů L1Oct a L1Oct2 a ligandu L2 a jeho derivátu L2Oct

Dalším cílem bylo studium vodných roztoků manganatého komplexu s připraveným ligandem L1Oct - stanovení kritické micelární koncentrace (CMC), stanovení SOD aktivity a potvrdit potenciální možnost jeho užití jako kontrastní látky pro MRI pomocí NMR měření relaxačního času T_1 v různém prostředí, porovnat výsledky s manganatým komplexem ligandu L2, na který není připojeno alifatické rameno a následně výsledky diskutovat s literaturou.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Tomografie magnetické rezonance – MRI (Magnetic Resonance Imaging)

Tomografie magnetické rezonance je hojně využívanou technikou v klinické diagnostice a biomedicínských výzkumech. Tato technika slouží především k vizualizaci struktury a funkcí těla, a v porovnání s technikami jako je CT (z angl. Computed tomography) nemá žádnou radiační zátěž. Rovněž kontrast mezi rozdílnými druhy měkkých tkání činí tuto techniku využívanou především v oblastech medicíny jako je neurologie, onkologie a při zobrazování muskuloskeletálním a kardiovaskulárním.¹

MRI je založena na principu Nukleární Magnetické Rezonance (NMR), která je využívána v chemii k určování molekulové struktury látek.² Subjekt (měřený vzorek) je vložen do silného externího statického magnetického pole, kterého je dosaženo pomocí supravodivých magnetů. Měření je založeno na chování atomových jader v magnetickém poli, která mají lichý počet protonů, neutronů nebo obou a jejichž součet magnetických momentů všech částic jádra (spinové kvantové číslo I) je větší než nula. V případě MRI se jedná především o měření jader vodíku ^1H ($I = \frac{1}{2}$, nejvyšší citlivost z běžně studovaných jader), která jsou součástí molekul vody, a tudíž se hojně vyskytují v biologických tkáních a některých tucích. Jádro ^1H lze připodobnit k rotující nabitě sféře s magnetickým momentem.² Před vložením do magnetického pole jsou magnetické momenty orientovány náhodně, po vložení do magnetického pole B_0 , magnetický moment vykonává precesní pohyb s tzv. Larmorovou frekvencí ω_0 (1) a dojde k uspořádání magnetických momentů a jejich orientaci ve směru (paralelně) či proti směru (antiparalelně) vnějšího magnetického pole. Tyto dvě uspořádání mají různou energii, z tohoto důvodu vzniká energetický rozdíl (ΔE) mezi oběma hladinami.

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0 \quad (1)$$

(ω_0 = Larmorova frekvence – frekvence precesního pohybu kolem B_0 [$\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$]; γ = gyromagnetický (magnetogyrický) poměr; B_0 = vnější magnetické pole [T])

Podle Boltzmanova zákona (2) je populovanost jádra ^1H v nižší energetické hladině vyšší, mag. moment v nižší energetické hladině je paralelní k vnějšímu magnetickému poli B_0 , tudíž i celková magnetizace (součet jednotlivých magnetických momentů jader) M_0 bude k vnějšímu magnetickému poli paralelní.

$$\frac{n\left(+\frac{1}{2}\right)}{n\left(-\frac{1}{2}\right)} = \exp\left(\frac{\Delta E}{kT}\right) \quad (2)$$

(n = populace spinového stavu; ΔE = energetický rozdíl mezi stavy [$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$]; k = Boltzmannova konstanta [$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}$]; T = termodynamická teplota [K])

Po aplikaci radiofrekvenčního pulzu (energetický rozdíl rozštěpení hladin, ΔE , odpovídá radiovému záření v řádu MHz) tj. magnetického pole B_1 dojde, díky přebytku jader v nižší energetické hladině, k převaze absorpce záření nad emisí, a tedy k rezonanci. Po skončení pulsu dochází k návratu systému do rovnováhy – *relaxaci*, která se řídí kinetikou prvního řádu. Nejběžnějšími typy relaxace je relaxace spin-mřížková (longitudinální/podélná) a relaxace spin-spinová (transverzální/příčná). Oba typy lze charakterizovat pomocí relaxačních časů.

1.1 Relaxační časy

Longitudinální relaxační čas T_1 charakterizuje relaxaci spin-mřížkovou (rychlostní konstanta děje je $1/T_1$), která odpovídá návratu z-ové složky vektoru magnetizace do původního rovnovážného stavu. Systém během tohoto procesu ztrácí energii ve formě tepla, které je předáváno okolí především pomocí dipolárních interakcí s okolními jádry.

Hodnota relaxačního času T_1 je měřitelná pomocí experimentu „Inversion Recovery“, kdy je na systém aplikována jednoduchá pulzní sekvence, která obsahuje po sobě následující 180° a 90° pulz. Interval (τ) mezi těmito pulzy se mění. Aplikací pulzu 180° dochází k reorientaci vektoru magnetizace do směru $-z$, po skončení pulzu spiny relaxují po dobu τ a vektor magnetizace se začne vracet do původní rovnovážné polohy. Následuje 90° pulz, který převrátí vektor magnetizace do roviny xy . Změřením spekter se zvyšujícím se τ lze pozorovat změnu záporných signálů na

kladné. Intenzita signálu odpovídá kinetice prvního řádu (3). Vynesením závislosti $\ln(I_0 - I)$ na τ , lze získat přímkou se směrnici $-1/T_1$.

$$I = I_0(1 - 2 \exp(-\frac{\tau}{T_1})) \quad (3)$$

(I = intenzita signálu; I_0 = rovnovážná intenzita signálu; τ = interval mezi pulzy [s]; T_1 = relaxační čas [s])

Transverzální relaxační čas T_2 charakterizuje relaxaci spin-spinovou, během které dochází k návratu vektoru magnetizace v rovině xy do původního stavu (do nuly) díky tzv. „rozfázování“ nebo „rozsynchronizování precese“, což je způsobeno spin-spinovými interakcemi, a případnou nehomogenitou magnetického pole.³

Hodnota relaxačního času T_2 je měřitelná pomocí experimentu využívající tzv. spinové echo. Na systém je aplikován puls 90° . Následuje interval τ , kdy dochází k rozfázování magnetických momentů. Poté je aplikován puls 180° a po uplynutí intervalu τ dojde k opětovné fokusaci a příčná složka magnetizace dosáhne maxima, jehož velikost je snížena spin-spinovou relaxací. Experiment, který se běžně používá pro měření T_2 relaxačních časů se nazývá CPMG, podle objevitelů Carr – Purcell – Meiboom– Gill, kde je využíváno mnohonásobné spinové echo s konstantním τ a proměnným počtem cyklů experimentu.⁴

Měření relaxačních časů a následné porovnávání jejich rozdílů je základem MRI. Platí $T_2 < T_1$. Oba relaxační časy závisí na složení tkání. Hodnoty mohou být ovlivněny biochemickými podmínkami (koncentrace vody ve tkáni, hodnoty pH apod.), tudíž jednotlivé druhy tkání budou mít různý kontrast.

Často užívaným parametrem v MRI je relaxační čas T_2^* , který v sobě zahrnuje T_2 a příspěvek všech nehomogenit magnetického pole. Je proto spojen se specifickými vlastnostmi tkáně.²

1.2 Kontrast obrazu v MRI

Samotný obraz je získán rozdílným kontrastem mezi různými biologickými tkáněmi. Kontrast obrazu může být dále ovlivňován různými fyzikálními parametry, jako jsou relaxační časy T_1, T_2, T_2^* a protonovou hustotou. Intenzita signálu v MRI snímku je vyjádřena ve stupních šedi, kdy signál vysoké intenzity se projevuje jako bílý, a naopak signál slabé intenzity se jeví jako černý či v stupních šedi.

1.3 Kontrastní látky

V případě nedostatečného kontrastu je užíváno kontrastních látek (CA, z angl. Contrast Agent), které ho dokáží uměle zvýšit. Kontrastní látky interagují s protony molekul vody a dokáží tak přímo zkracovat relaxační časy ^1H protonů vody. Veličina popisující účinnost kontrastní látky je nazývána relaxivita r_1 nebo r_2 (4), a vyjadřuje, jak se změní hodnota relaxačních časů T_1 nebo T_2 v přítomnosti kontrastní látky.

Relaxivita rovněž závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech molekul kontrastních látek i na řadě vnějších podmínek, jako jsou intenzita magnetického pole používaného v daném tomografu a vlastnostech studovaného vzorku.

$$\frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_i^0} + r_i[\text{CA}] \quad i = 1,2 \quad (4)$$

($\frac{1}{T_i}$ = pozorovaná rychlost relaxace [s^{-1}]; $\frac{1}{T_i^0}$ = diamagnetický příspěvek k rychlosti relaxace [s^{-1}]; r_i = relaxivita [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$]; $[\text{CA}]$ = koncentrace kontrastní látky [mM])

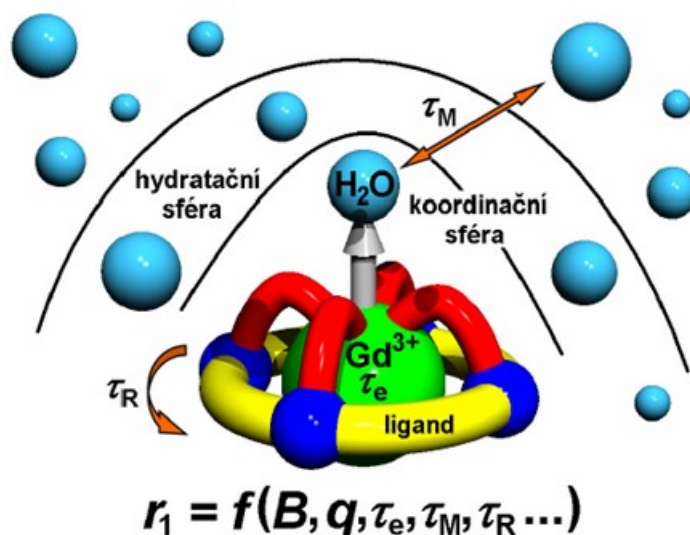
1.3.1 T_1 kontrastní látky

Do této skupiny patří především sloučeniny obsahující paramagnetický ion kovu (např. Gd^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{3+}), který má nepárové elektrony. Tyto látky zvyšují intenzitu MRI signálu ^1H vody snížením longitudinálního relaxačního času T_1 . Díky magnetickému momentu elektronu, který je 658x silnější než magnetický moment protonu, dochází k urychlení rychlosti relaxace ^1H protonů vody.

V klinické praxi jsou nejčastěji využívány komplexní sloučeniny s paramagnetickým vysokospinovým ionem Gd^{3+} , který má nejvyšší možný počet nepárových elektronů, a je tedy schopen svými magnetickými schopnostmi ovlivnit okolí maximálním možným způsobem.^{5,6} Tyto sloučeniny musí být ale značně termodynamicky stabilní (tj. mít vysokou hodnotu konstanty stability) a kineticky inertní (tj. mít velkou aktivační bariéru vedoucí k disociaci), hlavně kvůli vysoké toxicitě volných Gd^{3+} iontů. Ke komplexaci jsou využívány především oktadentátní ligandy, přičemž poslední vazebné místo musí být obsazeno molekulou vody. Koordinovaná molekula vody je podstatná pro funkci komplexu jako kontrastní látky, chemicky se vyměňuje s molekulami vody v okolí komplexu a tím zprostředkovává přenos magnetické informace z Gd^{3+} do okolí.⁶

Změnou struktury ligandů lze ovlivnit řadu fyzikálně-chemických vlastností komplexů a zlepšit účinnost kontrastní látky. Mezi tyto parametry patří především

počet molekul vody koordinovaných k centrálnímu Gd^{3+} iontu (q), rychlost jejich výměny s molekulami vody v roztoku (k_{ex} , která je obvykle vyjádřena svou převrácenou hodnotou – rezidenčním časem koordinované molekuly vody, τ_M) a rychlost rotačního pohybu celé molekuly kontrastní látky (charakterizovaná rotačním korelačním časem, τ_R) (Obr. 2).

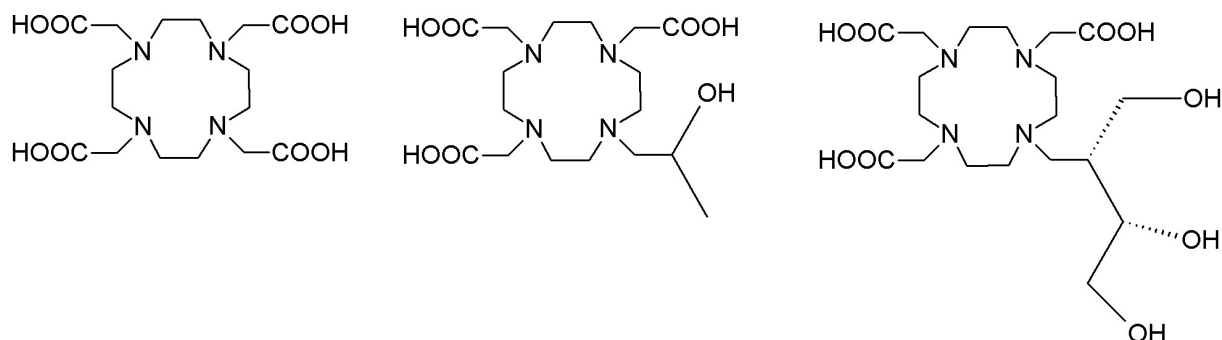


Obr. 2: Mikroskopické parametry ovlivňující relaxivitu Gd^{3+} komplexních sloučenin.⁶

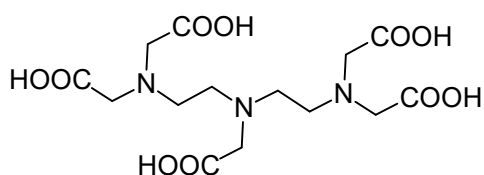
Mezi používané kontrastní látky patří komplexní sloučeniny s ligandem odvozeným od cyklenu jako je Gd -DOTA (kyselina gadoterová, Dotarem[®]; DOTA = 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina, Obr. 3). Dalšími užívanými látkami s ligandem odvozeným od cyklenu, jsou Gd -BT-DO3A (gadobutrol, Gadovist[®]; DO3A = 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina, Obr. 3) a Gd -HP-DO3A (gadoteridol, Prohance[®]; HP-DO3A = 2-(hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina, Obr. 3).

Mimo jiné jsou využívány i komplexní sloučeniny Gd^{3+} s ligandem odvozeným od ethylentriaminpentaoctové kyseliny (DTPA = 2,2',2'',2''',2''''-(ethan-1,2-dinitrilo)pentaoctová kyselina, Obr. 4). Příkladem může být Gd -DTPA (gadopentetová kyselina, Magnevist[®]), Gd -DTPA-BMA (gadodiamid, Omniscan[®]), Gd -BOPTA (kyselina gadobenová, MultiHance[®]), Gd -DTPA-BMEA (gadoversetamid, OptiMARK[®]) a rovněž také Gd -EOB-DTPA (kyselina gadoxetová, Primovist[®],

Eovist®).⁷ U látek s necyklickým ligandem se vyskytly problémy s uvolňováním Gd^{3+} , jeho hromaděním se v tkáních a spojitostí s nežádoucími účinky jako jsou kožní plaky nebo nefrogenní systémová fibróza (vznik fibrózních tkání v kůži, kloubech, svalech a vnitřních orgánech zapříčiněné poruchou ledvin).⁸ Nadále dostupná kontrastní látka s necyklickým ligandem je Gd-EOB-DTPA, užívána pro zobrazování jatek v nízkých dávkách a Gd-DTPA.



Obr. 3: Strukturální vzorce ligandů odvozených od cyklenu: DOTA (vlevo), derivát DO3A (vpravo) a HP-DO3A (uprostřed)



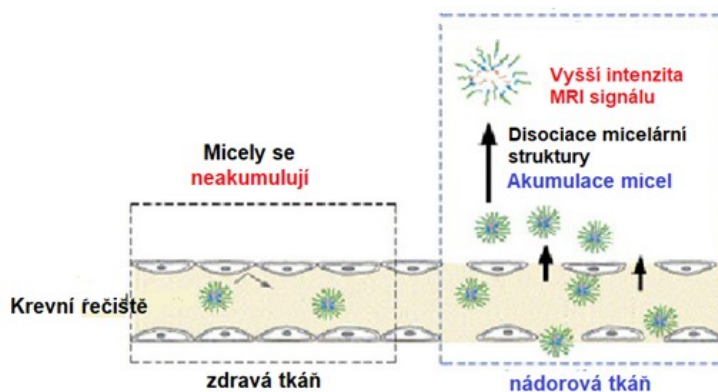
Obr. 4: Strukturální vzorec ligandu DTPA

Vhodnou alternativou ke kontrastním látkám, ve kterých je centrálním atomem Gd^{3+} , mohou být kontrastní látky, ve kterých je centrálním atomem Mn^{2+} , především díky přítomnosti pěti nepárových elektronů ve vysokospinovém uspořádání, dlouhému elektronickému relaxačnímu času a rychlé výměně koordinované vody.⁹ Tyto sloučeniny musí být rovněž termodynamicky stabilní a kineticky inertní. V klinické praxi byla užívána komplexní sloučenina $[Mn(dpdp)]^{4-}$ (Mangafodipir, Teslascan®; $dpdp^{6-} = N,N'$ -dipyridoxylethylendiamin- N,N' -diacetát-5,5'-bis(fosfát)).¹⁰ ¹¹V roce 2012 byla tato látka stažena z evropského trhu a není již dále komerčně dostupná.

1.3.1.1 Makromolekulární kontrastní látky

Navázáním (konjugací) Gd^{3+} komplexů na makromolekulární nosiče lze zformovat makromolekulární kontrastní látky (mCAs, z angl. Macromolecular Contrast Agents). Užitím makromolekulární struktury vzniká možnost připojení většího počtu molekul Gd^{3+} komplexní sloučeniny, a tím i zvýšení účinnosti.¹² V porovnání s menšími molekulami kontrastních látek vykazují řadu výhod, jako jsou vyšší hodnoty relaxivity a zvýšený retenční čas v krevním řečišti.¹³ V praxi byla zkoumána celá řada makromolekulárních a polymerních struktur přírodního i syntetického původu jako jsou proteinové struktury, nanočástice, dendrimery, liposomy, cyklodextriny a dále i micelární struktury.^{12,13,14,15}

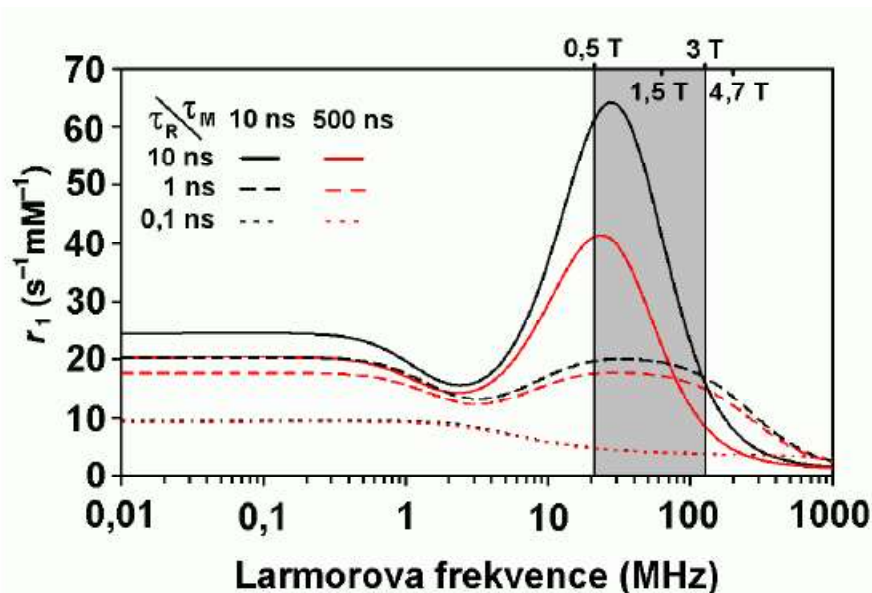
Micely jsou sférické samovolně se formující struktury, kde je hydrofilní část orientována do vodného prostředí a část hydrofóbní je orientována dovnitř. Nad tzv. kritickou micelární koncentrací (CMC, z angl. Critical Micelle Concentration) dochází ke shlukování polymerních řetězců za účelem minimalizace kontaktu hydrofóbní části s vodným prostředím a formaci „core-shell“ micelární struktury.¹⁶ Zkoumá se především využití těchto struktur v oblasti *drug-delivery*, vzhledem k možnosti modifikace povrchu, stabilitě, odlišné farmakokinetice a biodistribuci léčiva. Kontrastní látky tvořící micelární struktury jsou rovněž předmětem zájmu díky diagnostickým/zobrazovacím účelům a možnosti kontroly distribuce léčiva.¹⁷ Oproti ostatním výše zmíněným makromolekulárním kontrastním látkám vykazují rozdílnou farmakokinetiku a biodistribuci, rovněž mají vyšší retenční časy v krevním řečišti a více se akumulují v nádorech (Obr. 5).¹³



Obr. 5: Zobrazení konceptu polymerní micelární MRI kontrastní látky pro zobrazování nádorové tkáně.¹⁸

V závislosti na požadované aplikaci lze modifikovat strukturu a velikost micelární kontrastní látky. Pro využití v oblasti MRI byly zkoumány koordinační sloučeniny Gd^{3+} , Mn^{2+} , Dy^{3+} a nanočástic s oxidy železa formující micelární struktury.¹⁷ Byly připraveny vysoce účinné micelární kontrastní látky s pH-responsivními vlastnostmi jako např. sloučeniny s PEG-p(I-His) (methoxypoly(ethylen-glykol)-*b*-poly(I-histidin)) a PEG-p(I-LA)-DTPA-Gd (komplex gadolinium dianhydrid methoxypoly(ethylen-glykol)-*b*-poly(I-laktamová kyselina)-diethylentriaminopentaoctová kyselina), které zvyšují MRI kontrast zkrácením T_1 relaxačního času v kyselém prostředí nádoru.^{16,19} Ve fyziologickém prostředí (pH = 7,4) tvoří tyto látky stabilní micelární struktury, avšak v kyselém prostředí nádoru (pH = 6,5) dochází k jejich rozpadu na ve vodě rozpustné polymery se zvýšenou relaxivitou r_1 zapříčiněnou interakcemi vody v prostředí nádorové tkáně s Gd^{3+} kopolymery.²⁰

Jak již bylo zmíněno výše relaxivita závisí na několika parametrech, které popisují strukturu a chování sloučeniny v roztoku. Jednou z možností, jak získat informace o těchto parametrech je měřením 1H relaxivity jako funkce magnetického pole (NMRD profil), poskytující hlavně informaci o rotačním korelačním čase sloučeniny.²¹



Obr. 6: Ukázka 1H NMRD profilů (závislost relaxivity na hodnotách intenzity použitého magnetického pole) vypočítaných pro různé hodnoty τ_M/τ_R .⁶

1.3.2 T₂ Kontrastní látky

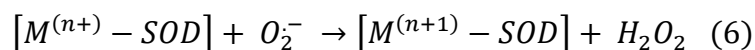
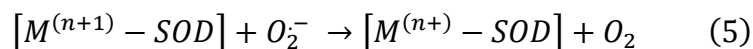
T₂ kontrastní látky jsou založeny především na super paramagnetických nanočásticích oxidů železa (Fe₃O₄/γ-Fe₂O₃),²² které jsou pokryty makromolekulárními látkami jako je dextran, karboxydextran, chitosan, heparin, albumin a polystyren. Tyto částice se chovají jako malé pohyblivé magnety. Vytvářejí silnou nehomogenitu magnetického pole a tím značně snižují T₂ relaxační čas ¹H protonů vody v okolí.² Částice se rozdělují podle velikosti do tříd: SPIO (Super Paramagnetic Iron Oxides, průměr >50 nm až k několika mikronům) nebo USPIO (Ultra-Small Super Paramagnetic Iron Oxides, průměr <50 nm).²

2. Superoxid dismutasy

Jedná se o enzymy, které jsou v živých organismech všudypřítomné,²³ a jejichž funkcí je katalyticky převádět reaktivní formy kyslíku, jako je superoxidový radikál, na kyslík či peroxid vodíku. Superoxidový radikál může být vytvořen přijetím elektronu po redoxních procesech probíhajících v buňce jako je oxidativní fosforylace. Tento radikál není silný reduktant či oxidant, tudíž s aminokyselinami reaguje jen velmi málo. Velmi reaktivní je s komplexními sloučeninami obsahujícími kov, především měď, železo a mangan, a jejich hydratovanými ionty.²⁴ V závislosti na kovu, který je přítomen v aktivním centru enzymu, lze superoxid dismutasy rozdělit do několika skupin: FeSOD, CuZnSOD, MnSOD, NiSOD. Všechny výše zmíněné lze najít v prokaryontních organismech. U organismů eukaryotních lze FeSOD nalézt v chloroplastech, MnSOD v mitochondriích a také v peroxisomech. CuZnSOD lze nalézt v chloroplastech, cytosolu, extracelulárním prostoru savčích buněk a periplastech gram-negativních bakterií. Samotný mangan může sloužit, nezávisle na jeho roli jakožto kofaktoru MnSOD, jako důležitá antioxidační záloha pro CuZnSOD.²⁵ Vysoké intracelulární hladiny manganu mohou rovněž napomoci obraně proti oxidačnímu stresu.^{26,27}

Nadprodukce superoxidu může vést k neschopnosti enzymu katalyticky odbourat superoxidový aniont. Reaktivní formy kyslíku poté mohou být mediátorem chorob jako je infarkt, mrtvice nebo zánětlivé procesy, zahrnující choroby jako jsou artritida, a rovněž hrají roli i v iniciaci neurologických poruch.²⁸

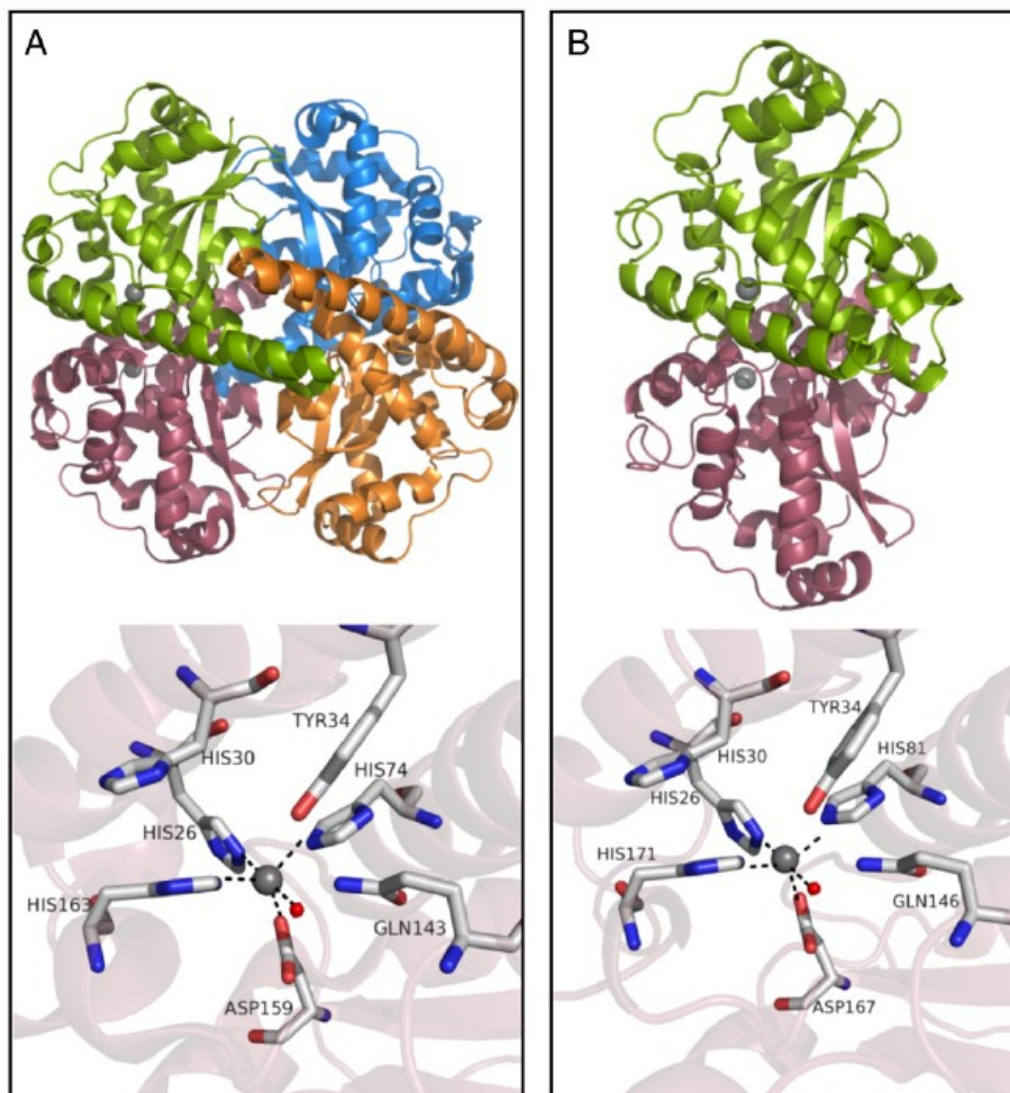
Mechanismus funkce těchto enzymů je nazýván jako „Ping-pongový“ mechanismus. Kov v aktivním centru se podílí souběžně na jedno-elektronové oxidaci a jedno-elektronové redukci dvou molekul superoxiového aniontu (5,6).²⁹



Tyto enzymy nevyžadují žádný externí přísun redoxních ekvivalentů, fungují jako nezávislé antioxidanty, což jim umožňuje fungovat jak v extracelulárním, tak intracelulárním prostředí.

2.1 MnSOD

Tato podskupina superoxid dismutas obsahuje ve svém aktivním centru mangan. Je zde vysoká sekvenční podobnost a homologie skládání proteinu s FeSOD. Enzymy mohou mít dimerní nebo tetramerní strukturu, kdy se vyskytuje jeden mangan na podjednotku. Dimerní formy se typicky vyskytují u bakterií, formy tetramerní se vyskytují především u eukaryot (Obr. 7). Aktivní místo je invariantní, mangan je vázán na tři histidiny a zbytek kyseliny aspartové, páté místo je obsazenou molekulou rozpouštědla, obvykle OH⁻ nebo vodou. Geometrie aktivního místa odpovídá deformované trigonální bipyramidě.



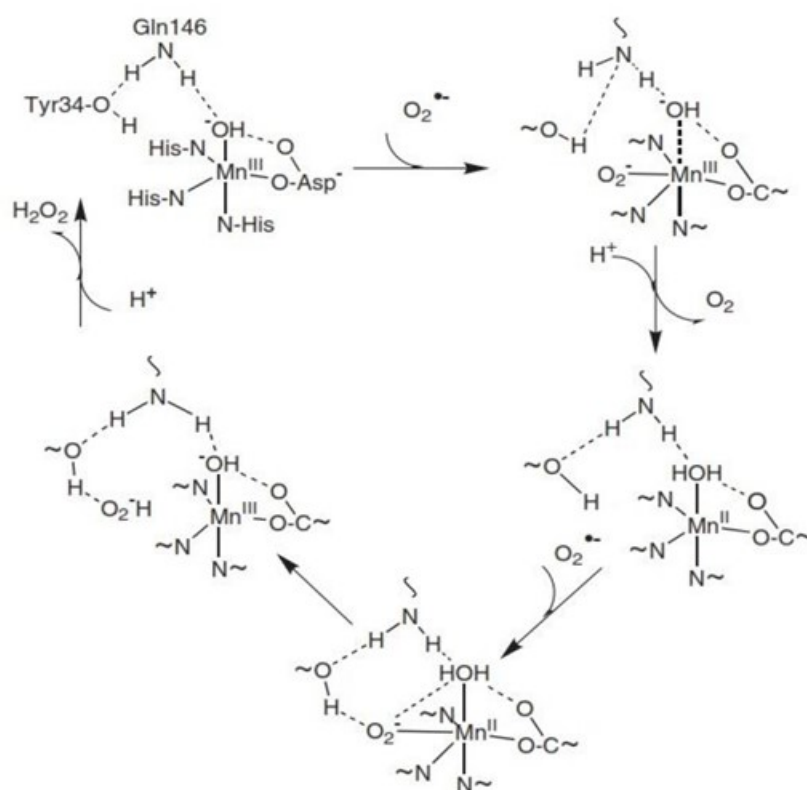
Obr. 7: Porovnání proteinové struktury a struktury aktivního místa pro lidskou MnSOD (A, vlevo) a MnSOD *E.Coli* (B, vpravo).²⁴

Díky podobnosti s FeSOD, může dojít k zabudování železa namísto manganu, např.: u *E.Coli* došlo k zabudování železa *in vivo* v anaerobních podmínkách a/nebo při vysokých extracelulárních koncentracích železa, ale enzym se stal neaktivním.²⁴

U bakterií se MnSOD vyskytuje v cytosolu. U eukaryotních organismů se MnSOD vyskytuje především v matrix mitochondrií. Eukaryotní formy zřejmě dokáží i zpomalit okamžité uvolnění toků peroxidu vodíku, což lze pokládat jako regulaci mechanismu kontrolujícího koncentraci peroxidu vodíku v buňce. Především pro lidské buňky lze toto pokládat za důležité, jelikož i malé změny v koncentraci se mohou podílet na proliferaci či apoptóze.^{30,31} U prokaryot i eukaryot dokáže H_2O_2

indukovat syntézu nových proteinů, které dokáží ochránit buňku před následky oxidativního stresu.

Mechanismus dismutace zahrnuje přechody mezi oxidovanou formou Mn^{3+} a formou redukovanou Mn^{2+} . Dochází ke koordinaci O_2^- na centrální atom a změně tvaru koordinačního polyedru z trigonální bipyramidy na tetragonální bipyramidu. Následně dochází k oxidaci superoxidu na kyslík. Kyslík je uvolněn za současné protonizace koordinovaného OH^- , rovněž dochází k redukci centrálního atomu a přechodu koordinačního polyedru zpět na tvar trigonální bipyramidy. Následnou koordinací druhé molekuly O_2^- , dochází opětovně ke změně geometrie a přenosu protonu na superoxid z protonovaného O_2H^- . Poté dojde k přenosu elektronu z centrálního atomu a změně stavu z Mn^{2+} na Mn^{3+} . Následnou protonizací odstupujícího substrátu dojde ke vzniku H_2O_2 (Obr. 8).



Obr. 8: Mechanismus dismutace superoxidového aniont radikálu na aktivním místě MnSOD.³²

2.5 SOD mimika

SOD mimika jsou nízkomolekulární látky napodobující přirozenou katalytickou funkci enzymu. Tyto látky mohou mít potenciální využití při léčbě nebo prevenci

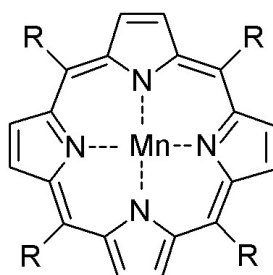
chorob, které jsou způsobeny nadprodukcí superoxidového aniont radikálu či jiných reaktivních kyslíkových forem. Oproti přirozeným enzymům mohou mít rovněž řadu výhod, jako jsou schopnost vstupu do intracelulárního prostoru, malá imunitní odpověď a delší poločas rozpadu.

2.5.1 Komplexní sloučeniny manganu

Tyto sloučeniny jsou předmětem zájmu hlavně díky nízké toxicitě manganu v porovnání s železem nebo mědí.²⁸ Lze je rozdělit na tři hlavní třídy: Mn(III) komplexní sloučeniny s ligandy na bázi porfyriu, Mn(III) komplexní sloučeniny s ligandy na bázi salenu a Schiffovými bázemi a Mn(II) komplexní sloučeniny s pentaazamakrocyclickými ligandy.³³

2.5.1.1 Komplexní sloučeniny s ligandy na bázi porfyriu

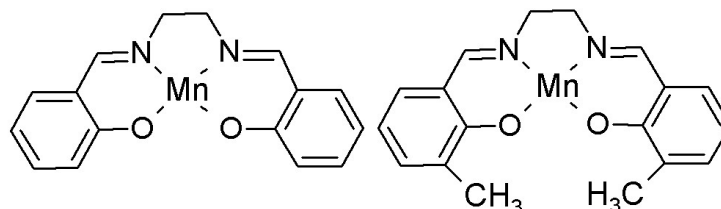
Jednou z prvních komplexních sloučenin s pozorovanou SOD aktivitou byl komplex Mn(III) s tetrakis(4-N-methylpyridin)porfyriem.³⁴ Díky své struktuře v sobě mohou Mn(III) komplexní sloučeniny s porfyriem kombinovat vlastnosti vhodné pro napodobení schopnosti a místa nativního enzymu MnSOD. Mezi tyto vlastnosti patří přítomnost redoxně aktivního manganu, několikanásobný kladný náboj a možnosti modifikace porfyrinového kruhu, např. navázáním alkylových řetězců, čímž se zvýší lipofilicita molekuly.³⁵ Čím delší je alkylový řetězec, tím snadnější je akumulace v mitochondriích. Díky svému redukčnímu potenciálu a schopnosti dosáhnout až čtyř různých oxidačních stavů *in vivo* (+2, +3, +4, +5) se mohou účastnit v nesčetném množství redoxních cest,³⁶ což naznačuje možnost vedlejších účinků.



Obr. 9: Obecný strukturní vzorec komplexních sloučenin manganu s porfyriem

2.5.1.2 Komplexní sloučeniny s ligandy na bázi salenu a Schiffových bází

Bylo prokázáno, že tyto komplexní sloučeniny vykazují SOD, katalasovou aktivitu a možné protektivní účinky proti oxidativnímu stresu.³⁷ U myší byly testovány sloučeniny EUK-8 a EUK-134 (Obr. 10) v souvislosti s chorobami způsobenými oxidativním stresem (např. neurologická onemocnění), kdy se jeví jako účinné.

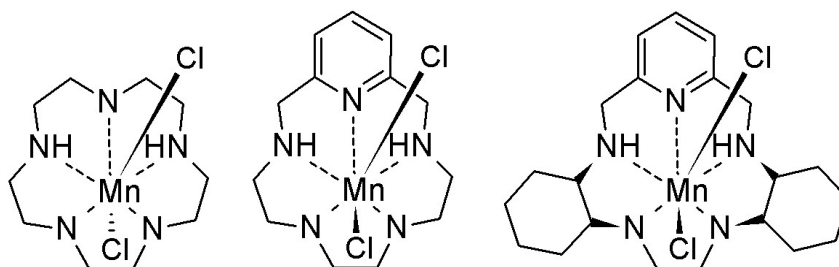


Obr. 10: Strukturální vzorce EUK-8 (vlevo) a EUK-134 (vpravo)

2.5.1.3 Komplexní sloučeniny s pentaazamakrocyclickými ligandy

Jednou z prvních látek studovaných pro SOD aktivitu z této skupiny látek byl komplex $\text{Mn}([\text{15}] \text{aneN}_5)\text{Cl}_2$ ($[\text{15}] \text{aneN}_5 = 1, 4, 7, 10, 13$ –pentaazacyklopentadekan). $\text{Mn}([\text{15}] \text{aneN}_5)\text{Cl}_2$ vykazoval výbornou katalytickou aktivitu dismutace superoxidu ($\text{pH} = 7,4$; $k_{\text{kat}} = 4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), byl termodynamicky stabilní při fyziologickém pH ($\log K = 10,7$) a kineticky inertní i v přítomnosti EDTA v rámci několika dnů.²⁸ Tento komplex byl dále modifikován za účelem zvýšení chemické stability a SOD aktivity pro další možnost využití v klinické praxi.

Byly rovněž připraveny komplexní sloučeniny jako $\text{Mn}([\text{15}] \text{PyaneN}_5)\text{Cl}_2$, který byl dále modifikován. Výsledkem modifikací byly např. komplexní sloučeniny M40404 a M40403, kdy komplex M40403 vykazoval katalytickou aktivitu ($k_{\text{kat}} = 3,55 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), zatímco M40404 byl inaktivní.³⁶

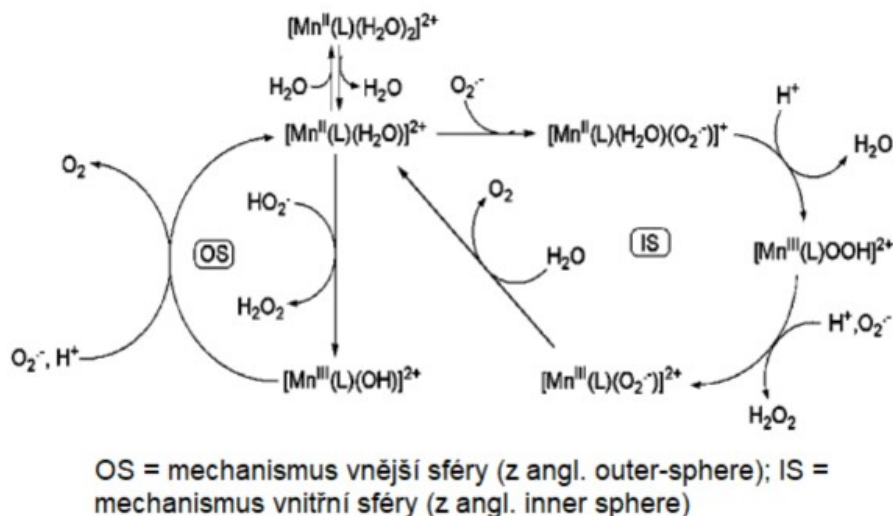


Obr. 11: Strukturální vzorce pro $\text{Mn}([\text{15}] \text{aneN}_5)\text{Cl}_2$ (vlevo), $\text{Mn}([\text{15}] \text{PyaneN}_5)\text{Cl}_2$ (uprostřed) a M40403 (vpravo)

Studovány a připraveny byly sloučeniny modifikovaného $\text{Mn}([\text{15}]\text{PyaneN}_5)\text{Cl}_2$ obsahující dlouhé alifatické řetězce navázané na aromatické jádro, tvořící micelární struktury o průměru 400nm. Tyto sloučeniny vykazovaly ve fosfátovém pufru nižší SOD aktivitu než nesubstituovaný $\text{Mn}([\text{15}]\text{PyaneN}_5)\text{Cl}_2$, zatímco při testování na buněčných kulturách bylo pozorováno účinné odbourávání hladiny superoxidu v cytosolu i mitochondriích.³⁸

Pro tyto sloučeniny, ve kterých má mangan(II) koordinační číslo 7, byl studován a popsán katalytický cyklus odbourávání superoxidu. Katalytický cyklus je složen z reakčních cest, z nichž jedna je nezávislá na pH (mechanismus vnitřní sféry) a druhá je na pH závislá (mechanismus vnější sféry) a prvním krokem cyklu je ztráta koordinované vody a vznik intermediátu s koordinačním číslem 6, který se následně účastní katalytického procesu (Obr. 12).³⁹

Reakční cesta nezávislá na pH zahrnuje vazbu superoxidu (mechanismus vnitřní sféry) na vakantní koordinační místo kovového centra. Koordinace superoxidu je rychlost určujícím krokem této reakce. Rychlost procesu závislého na pH určuje s protonem-spráženým elektronovým přenos (Obr. 12).^{40,41}



Obr. 12: Katalytický cyklus SOD mimik manganu(II) s koordinačním číslem 7.^{39,40,41}

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Seznam použitých chemikálií

Pro syntézu byly použity komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla (jejich seznam je uveden v Tabulce 1) a byly použity bez dalších úprav a čištění. 4-chloropyridin-2,6-dikarbonyl dichlorid byl připraven podle postupu uvedeného v literatuře.⁴²

Tabulka 1: Seznam použitých chemikálií

CHEMIKÁLIE	VÝROBCE
pyridin-2,6-dikarbaldehyd	Sigma-Aldrich
chlorid manganatý, tetrahydrát ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
2,2'-(ethylendioxy)bis(ethylamin)	Sigma-Aldrich
tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4)	Sigma-Aldrich
hydroxid sodný (NaOH)	Penta
síran sodný, bezvodý (Na_2SO_4)	Penta
1-bromoktadekan	Sigma-Aldrich
uhličitan draselný (K_2CO_3)	Penta
oxid seleničitý (SeO_2)	Sigma-Aldrich
síran hořečnatý, bezvodý (MgSO_4)	Penta
silikagel	Acros
oktandekan-1-ol	Sigma-Aldrich
Chelaton III.	Lachema
eriochromčern T	Lachema
hydroxylamin hydrochlorid	Lachema
chlorid amonný (NH_4Cl)	Penta
superoxid draselný (KO_2)	Sigma-Aldrich
2,3,5-trifenyltetraazolium chlorid (TTC)	Lachema
dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Lachema
hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	Lachema
jód	Penta

dusičnan olovnatý (Pb(NO ₃) ₂)	Penta
xylenová oranž	Lachema
methanol (MeOH)	Penta
chloroform (CHCl ₃)	Penta
amoniak, 25%aq. (NH ₃)	Penta
acetonitril (MeCN)	Penta
tetrahydrofuran (THF)	Penta
kyselina chlorovodíková, 36%aq. (HCl)	Penta
1,4-dioxan	Penta
ethylester kyseliny octové (ethylacetát)	Penta
dimethylsulfoxid (DMSO)	Penta
<i>n</i> -heptan	Penta
deuterovaný chloroform (CDCl ₃)	Sigma-Aldrich
deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO-d ⁶)	Sigma-Aldrich

Metody charakterizace

Spektroskopie nukleární magnetické rezonance

Získaná ^1H a ^{13}C NMR spektra byla změřena na 400 MHz spektrometru od firmy Varian. Naměřená spektra byla referencována na signály TMS (CDCl_3 : TMS δ ^1H 0,00 ppm) a reziduálního nedeuterovaného rozpouštědla (CDCl_3 : ^{13}C 77,00 ppm; DMSO- d_6 : δ ^1H 2,50 ppm; ^{13}C 39,51 ppm). Multiplicita signálů byla následně označena symboly: s – singlet, d – dublet, t – triplet, qr – kvartet, q – kvintet, bs- broad singlet, m – multiplet. Spektra byla měřena při laboratorní teplotě. Přiřazení signálů atomům vodíků či uhlíků pro ligandy L1Oct a L2 bylo provedeno na základě změřených 2D NMR spekter ^1H - ^{13}C gs-HMQC a ^1H - ^{13}C gs-HMBC (gs – gradient selected; HMQC – heteronuclear multiple quantum coherence; HMBC – heteronuclear multiple bond correlation). T_1 relaxační časy byly naměřeny pomocí experimentu „Inversion Recovery“.

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla změřena na přístroji LCQ Fleet Ion Mass Trap MS od firmy ThermoScientific s 3D iontovou pastí a ionizací elektrosprejem v kladném a záporném módu.

Elementární analýza

Elementární analýza C, N a H, byla provedena na elementárním analyzátoru ThermoScientific Flash 2000.

UV-VIS spektroskopie

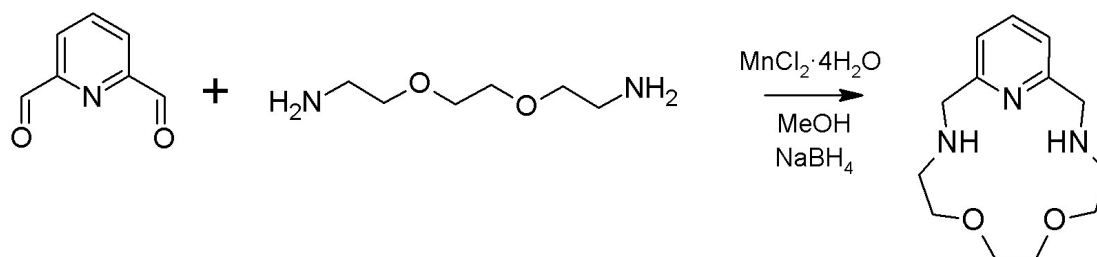
UV-Vis spektra byla měřena na dvoupraskovém UV-Vis spektrometru Cintra 3030 s rozsahem vlnových délek 190–900 nm od firmy GBC Scientific Instruments a na UV-Vis spektrometru Perkin-Elmer Lambda 35.

Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna na hliníkových destičkách potažených vrstvou silikagelu impregnovaného fluorescenčním barvivem (ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄). Pro detekci bylo použito zhášení fluorescence pod UV lampou ($\lambda = 254$ nm, 4 W) a zviditelnění párami jódu.

3. Syntéza ligandů L1, L1Oct aL1Oct2

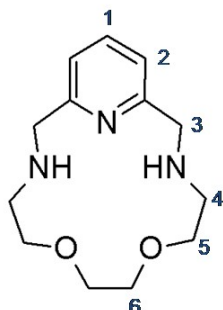
4,12,18-triaza-6,9-dioxabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien (L1)



Ligand L1 byl připraven podle postupu uvedeného v literatuře.⁴³

3,00 g pyridin-2,6-dikarbaldehydu (22,20 mmol), 4,30 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (22,20 mmol) bylo rozpuštěno v 300 ml MeOH. Za stálého míchání a zahřívání bylo přikapáno 3,32 g 2,2'-(ethylenedioxy)bis(ethylaminu) rozpuštěného v 50 ml MeOH. Směs byla refluxována po dobu 1,5 hodiny. Směs byla dále ochlazena a bylo postupně po malých částech přidáno 11,22 g pevného NaBH_4 (296,59 mmol) za stálého míchání a chlazení. Směs byla ponechána míchat přes noc při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 100 ml vody a směs byla ponechána míchat po dobu 1 hodiny. Ze směsi byl dále na rotační vakuové odparce (RVO) odpařen MeOH, následně bylo přidáno 60 ml 0,5 M vodného roztoku NaOH a směs byla extrahována 3×90 ml CHCl_3 . Spojené organické fáze byly vysušeny bezvodým Na_2SO_4 a odpařeny na RVO. Produkt byl přečištěn chromatograficky na sloupci silikagelu, kdy byla použita mobilní fáze MeOH-25%aq. NH_3 (10:1, $R_f = 0,21$). Bylo získáno 3,32 g produktu ve formě hnědožluté olejovité látky (59 %).

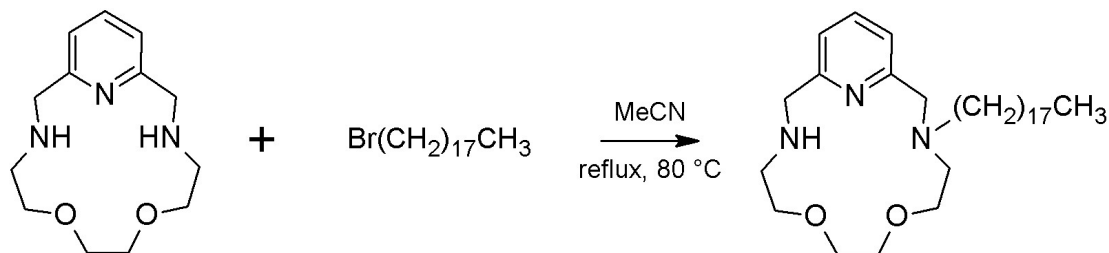
Charakterizace:



^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 2,79 (m, 4H, H4); 3,59 (s, 4H, H6); 3,64 (m, 4H, H5); 3,83 (s, 4H, H3); 6,96 (d, 2H, H2, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz); 7,47 (t, 1H, H1, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz)

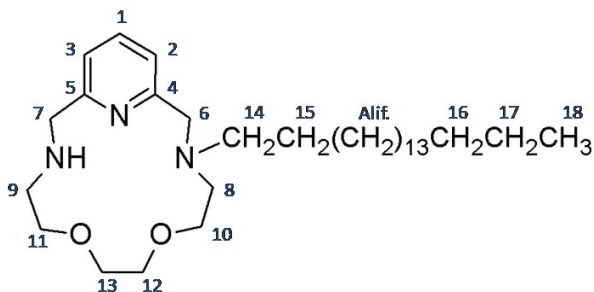
MS m/z (+): 274,15 $[\text{L1}+\text{Na}]^+$; 252,18 $[\text{L1}+\text{H}]^+$

4-(oktadecyl)- 4,12,18-triaza-6,9-dioxabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien (L1Oct)



1,70 g Ligandu L1(7,00 mmol) bylo rozpuštěno v 80 ml acetonitrilu. Následně byl po dobu 45 minut při teplotě 70°C pomalu přikapáván roztok 0,78 g 1-bromoktadekanu (2,39 mmol) v 70 ml acetonitrilu. Směs byla následně ponechána refluxovat při teplotě 80 °C po dobu 12 hodin, následovalo odpaření na RVO. Bylo získáno 2,2 g produktu, který byl dále chromatograficky přečištěn na sloupci silikagelu, kdy byla použita mobilní fáze CHCl₃-MeOH-25%aq. NH₃ (9:0,5:0,5, R_f= 0,33). Po přečištění bylo získáno 0,53 g produktu L1Oct (14 %).

Charakterizace:

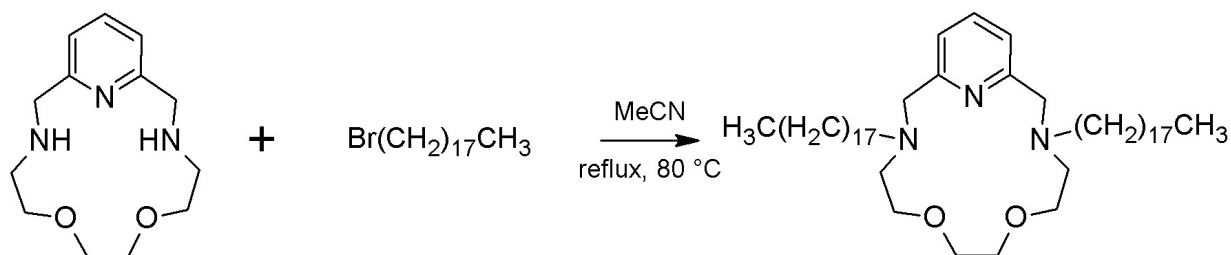


¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 0,88 (t, 3H, ³J_{HH} = 6,7 Hz, H18); 1,29 (m, 32H, H_{alif.}, H16, H17); 1,54 (m, 2H, H15); 2,56 (m, 2H, H14); 2,78 (t, 2H, ³J_{HH} = 7,0 Hz, H8); 2,82 (m, 2H, H9); 3,55 (m, 2H, ³J_{HH} = 5,1 Hz, ³J_{HH} = 2,7, H13); 3,62 (m, 2H, ³J_{HH} = 5,1 Hz, ³J_{HH} = 2,7, H12); 3,65 (m, 2H, H11); 3,73 (t, 2H, ³J_{HH} = 7,0 Hz, H10); 3,80 (s, 2H, H6); 3,88 (s, 2H, H7); 7,05 (d, 1H, ³J_{HH} = 7,6 Hz, H3); 7,09 (d, 1H, ³J_{HH} = 7,6 Hz, H2); 7,56 (t, 1H, ³J_{HH} = 7,6 Hz, H1)

¹³C NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 14,12 (C18); 22,68 (C17); 27,48 (C15); 29,69 (C_{alif.}); 31,90 (C16); 48,71 (C9); 52,79 (C8); 54,44 (C7); 56,24 (C14); 59,29 (C6); 69,11 (C10); 69,95 (C11); 70,12 (C12); 70,76 (C13); 120,58 (C3); 121,96 (C2); 136,30 (C1); 158,28 (C4, C5)

MS m/z (+): 504,53 [L1Oct + H]⁺; 526,47 [L1Oct + Na]⁺

4,12-bis(oktadecyl)- 4,12,18-triaza-6,9-dioxabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien(L1Oct2)



0,80 g ligandu L1 (3,19 mmol) bylo rozpuštěno v 60 ml acetonitrilu. K reakční směsi bylo přidáno 5g K_2CO_3 (36,18 mmol). Následně byla směs zahřívána na $50^\circ C$ a ke směsi byl během 40 minut přikapán roztok 2,34 g (7,02 mmol) 1-bromoktadekanu v 100 ml acetonitrilu. Směs byla refluxována po dobu 12 hodin při teplotě $80^\circ C$. Směs byla následně zfiltrována přes fritu (S4) a promyta acetonitrilem. Následovalo odpaření na RVO. Produkt byl přečištěn chromatograficky na sloupci silikagelu, kdy byla použita mobilní fáze $CHCl_3$ a následně $CHCl_3$ -MeOH (10:1, $R_f = 0,86$). Po přečištění bylo získáno 0,96 g produktu ve formě oranžové olejovité látky (45 %).

Charakterizace:

MS m/z (+): 756,96 [L1Oct2 + H]⁺; 778,81 [L1Oct2 + Na]⁺

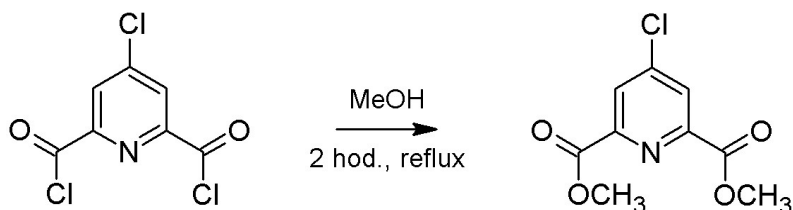
Elementární analýza pro $C_{49}H_{93}N_3O_2$; $M_r = 755,28$; nalezeno/(vypočteno): C 74,79 (77,82); N 5,35 (5,56); H 12,05 (12,39)

Elementární analýza pro $C_{49}H_{93}N_3O_2 \cdot 0,3 CHCl_3$; nalezeno/(vypočteno): C 74,79 (74,75); N 5,35 (5,30); H 12,05 (11,87)

4. Syntéza ligandu L2 a L2Oct

4.1 Příprava prekurzorů

Dimethylester 4- chlorpyridin-2,6- dikarboxylové kyseliny (A)



Dimethylester 4-chlorpyridin-2,6-dikarboxylové kyseliny byl připraven podle modifikovaného postupu uvedeného v literatuře.⁴⁴

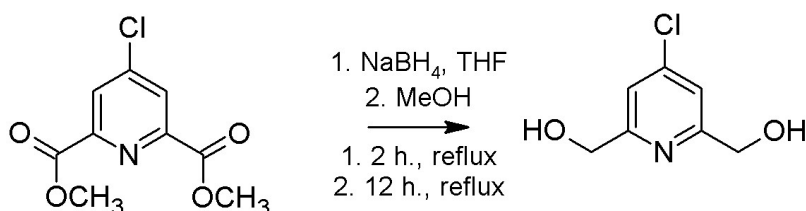
2,38 g (9,98 mmol) 4-chlorpyridinu-2,6- dikarbonyl dichloridu⁴² bylo rozpuštěno v 45 ml methanolu. Směs byla ponechána refluxovat po dobu 2 hodin. Následně byla směs odpařena a získaná pevná látka byla přečištěna pomocí rekrystalizace z methanolu. Bylo získáno 1,90 g pevné bílé látky (82 %).

Charakterizace:

¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 4,04 (s, 6H, -O-CH₃), 8,30 (d, 2H, CH_{arom})

MS m/z (+) : 248,08 [A – 2CH₃ + 2Na]⁺

2,6- bis(hydroxymethyl)-4-chlorpyridin (B)



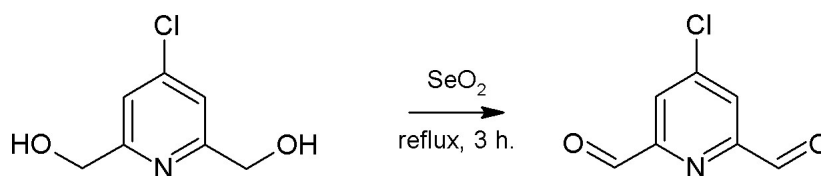
2,6-bis(hydroxymethyl)-4-chlorpyridin byl připraven podle modifikovaného postupu uvedeného v literatuře.⁴⁵

1,90 g dimethylesteru 4-chlorpyridin-2,6-dikarboxylové kyseliny (8,25 mmol) bylo rozpuštěno v 40 ml THF. Následně bylo ke směsi za stálého míchání pomalu přidáno 1,70 g pevného NaBH₄ (44,94 mmol). Směs byla ponechána refluxovat po dobu 2 hodin. Poté bylo pomalu přikapáno 35 ml MeOH a směs byla ponechána refluxovat po dobu 12 hodin. Roztok byl odpařen do sucha na RVO, následně bylo k odparku přidáno 50 ml vody a roztok byl nejprve okyselen přídatkem 36% vodného roztoku HCl (pH = 1-2) a poté bylo přidáno takové množství NaOH (ve formě pevné látky), aby bylo výsledné pH > 12. Následovala kontinuální extrakce CHCl₃ po dobu dvou dnů. Po extrakci bylo odpařením organické fáze získáno 0,90 g produktu, který byl následně rekrystalizován z toluenu. Bylo získáno 0,67 g pevné bílé látky (48 %).

Charakterizace:

¹H NMR (400 Hz, DMSO-d⁶): δ 4,49 (d, 4H, CH₂-OH, ³J_{HH} = 5,9 Hz); 5,52 (t, 2H, CH₂-OH, ³J_{HH} = 5,9 Hz); 7,33 (s, 2H, CH_{arom})

4-chlorpyridin-2,6-dikarbaldehyd (C)



4-chlorpyridin-2,6-dikarbaldehyd byl připraven podle modifikovaného postupu uvedeného v literatuře.⁴⁵

0,50 g 2,6-bis(hydroxymethyl)-4-chlorpyridinu (2,88 mmol) bylo rozpuštěno v 90 ml 1,4-dioxanu. Následně bylo přidáno 0,42 g SeO_2 (3,79 mmol) a směs byla ponechána refluxovat po dobu 3 hodin. Po ukončení refluxu byla směs ochlazena a zfiltrována přes fritu S4. Filtrát byl odpařen na RVO a odparek byl následně přečištěn chromatograficky na krátkém sloupci silikagelu za použití ethylacetátu jako mobilní fáze. Bylo získáno 0,38 g produktu (77 %).

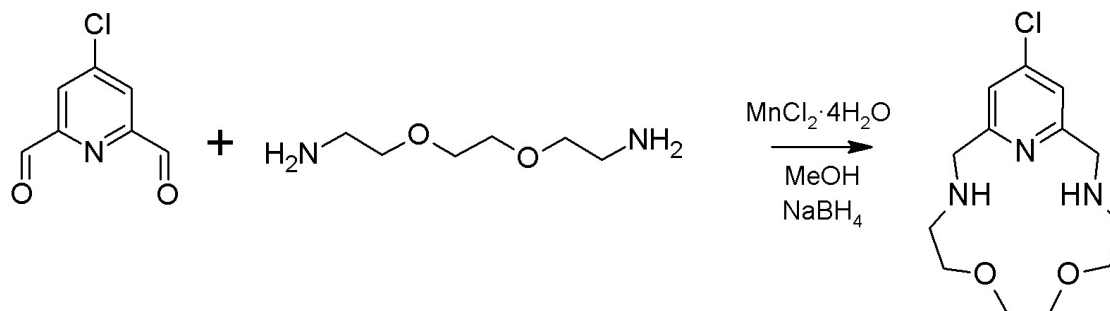
Charakterizace:

^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 8,14 (s, 2H, CH_{arom}); 10,14 (s, 2H, CHO)

MS m/z (+): 224,02 [$\text{C}+\text{CH}_3\text{OH} + \text{Na}$]⁺

4.2 Příprava ligandu L2 a L2Oct

16-chloro-6,9-dioxa-3,12,18-triazabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien (L2)

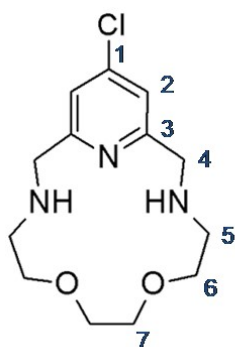


Ligand L2 byl připraven podle mírně modifikovaného postupu uvedeného v literatuře.⁴³

0,38 g 4-chlorpyridin-2,6-dikarbaldehydu (2,24 mmol), 0,44 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2,22 mmol) bylo rozpuštěno v 50 ml methanolu. Pomocí lineární pumpy bylo za stálého míchání přikapáno 0,38 g 2,2'-(ethyldioxy)bis(ethylaminu) (2,56 mmol) rozpuštěného v 10 ml MeOH (0,5 ml/1 minuta). Směs byla refluxována po dobu 3 hodin při teplotě 75 °C. Po ukončení refluxu byla směs ochlazena a bylo postupně

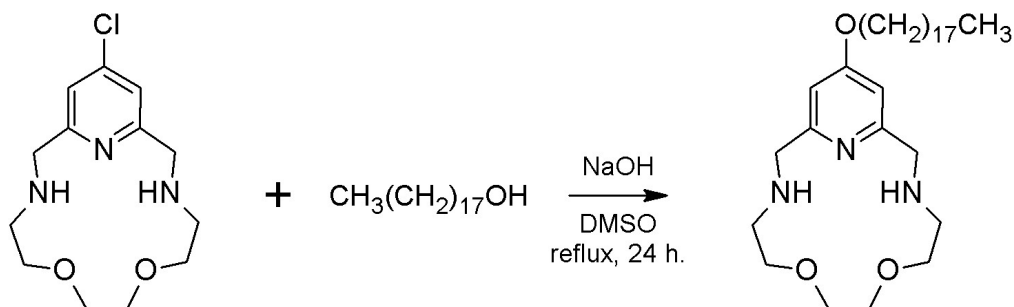
přidáno 1,5 g pevného NaBH₄ (39,7 mmol) za stálého míchání a chlazení. Směs byla ponechána míchat přes noc při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 25 ml vody a po dobu 1 hodiny byla směs ponechána míchat. Ze směsi byl dále na RVO odpařen MeOH, následně bylo přidáno 70 ml vody a poté bylo přidáno takové množství NaOH (ve formě pevné látky), aby výsledné pH >12, směs byla extrahována 4×60 ml CHCl₃. Spojené organické fáze byly vysušeny bezvodým MgSO₄, zfiltrovány a odpařeny na RVO. Odparek byl přečištěn chromatograficky na sloupci silikagelu za použití mobilní fáze MeOH-25%aq. NH₃ (10:1, R_f = 0,27). Bylo získáno 0,2 g produktu ve formě hnědožluté olejovité látky (29 %).

Charakterizace:



¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 2,82 (m, 4H, H5); 3,65 (s, 4H, H7); 3,69 (m, 4H, H6); 3,89 (s, 4H, H4); 7,04 (s, 2H, H2)
¹³C NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 49,05 (C4); 53,52 (C5); 70,10 (C7); 70,20 (C6); 120,29 (C2); 144,1 (C1); 159,74 (C3)
 MS m/z (+): 286,2 [L2 + H]⁺; 308,2 [L2 + Na]⁺

16-oktadekanoxy-6,9-dioxa-3,12,18-triazabicyklo[12.3.1]oktadeka-1(18),14,16-trien (L2Oct)



Ligand L2Oct byl připraven podle modifikovaného postupu uvedeného v literatuře.⁴⁶

0,10 g oktadekan-1-olu (0,35 mmol) a 0,10 g NaOH (1,75 mmol) bylo rozpuštěno v DMSO. Směs byla za stálého míchání zahřívána 1 hodinu při teplotě 80°C do rozpuštění NaOH. Následně bylo přikapáno za stálého míchání během 15 minut 0,10 g L2 (0,35 mmol) rozpuštěného v 5 ml DMSO. Směs byla refluxována po

dobu 24 hodin. Bylo přidáno 50 ml vody a takové množství NaOH (ve formě pevné látky), aby výsledné $\text{pH} > 12$. Směs byla dále extrahována pomocí ethylacetátu-*n*-heptanu (1:1). Organické fáze byly vysušeny bezvodým MgSO_4 , zfiltrovány a následně odpařeny na RVO. Bylo získáno 0,15 g pevné látky (83 %).

Charakterizace:

MS m/z (+): 542,46 [$\text{L2Oct} + \text{Na}$]⁺

Elementární analýza pro $\text{C}_{31}\text{H}_{57}\text{N}_5\text{O}_3$: $M_r = 518,8$; nalezeno/(vypočteno): C 73,30 (71,63); N 0,38 (8,08); H 13,10 (11,05); S 0,00 (1,99)

5. Příprava vodných roztoků komplexů

Vodné roztoky byly připraveny smícháním vodných roztoků ligandů (L1Oct a L2) a vodného roztoku $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Pro standardizaci vodného roztoku 100 ml 3 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ byla využita titrace 55 mM vodným roztokem Chelatonu III (ten byl standardizován titrací na xylenovou oranž pomocí 0,050 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) na eriochromčern T.

Do titrační baňky bylo napipetováno 20 ml $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 ml 10% vodného roztoku hydroxylaminu hydrochloridu, 5 ml amonného pufru a 0,4 ml indikátoru. Směs byla následně titrována vodným roztokem Chelatonu III. Při dosažení bodu ekvivalence došlo k barevnému přechodu z fialové na světle modrou. Titrace byla opakována čtyřikrát. Výsledné objemy spotřeby Chelatonu III. byly zprůměrovány a užity k výpočtu stanovení koncentrace $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, která činila 3,16 mM.

Vznik komplexů byl následně potvrzen proměřením MS, kdy byly komplexy MnL1Oct a MnL2 přeměřeny ve vodném roztoku i v prostředí MeOH.

Charakterizace:

MS m/z (+): 593,47 [$\text{MnL1Oct} + \text{Cl}$]⁺ (vodný roztok)

MS m/z (+): 593,48 [$\text{MnL1Oct} + \text{Cl}$]⁺; 279,41 [MnL1Oct]²⁺ (MeOH)

MS m/z (+): 375,11 [$\text{MnL2} + \text{Cl}$]⁺ (vodný roztok)

MS m/z (+): 375,11 [$\text{MnL2} + \text{Cl}$]⁺ (MeOH)

Složení vznikajících komplexů odpovídá obecnému vzorci [MnLCl_2], kdy ve vodném roztoku dochází k substituci halogenidových ligandů molekulami vody a vzniká komplexní částice obecného vzorce [$\text{MnL}(\text{H}_2\text{O})_2$]²⁺.

6. Stanovení kritické micelární koncentrace (CMC) komplexu MnL1Oct

Pro stanovení CMC vodného roztoku komplexu MnL1Oct byla zvolena metoda využívající měření UV-VIS spekter.

Byly proměřeny absorpční spektra v rozsahu 230-600 nm pro vodné roztoky komplexu MnL1Oct v rozsahu koncentrací 0,05–2,00 mM. Do kyvety bylo napipetováno 1000 μ l vzorku o dané koncentraci, který byl následně proměřen. Po proměření byly odečítány hodnoty maxima absorpčních spekter při vlnové délce 263 nm. Pomocí těchto naměřených hodnot byla vynesena závislost absorbance při 263 nm na koncentraci MnL1Oct, ze které bylo možné stanovit CMC.

7. Měření SOD aktivity pro komplexy MnL1Oct a MnL2

Pro stanovení SOD aktivity bylo zvoleno měření nepřímou metodou, která je založena na konkurenční reakci organického barviva a testované látky s nasyceným roztokem KO_2 v DMSO. Mírou aktivity je hodnota IC_{50} , která vyjadřuje koncentraci, při níž dojde k 50% úbytku barevného produktu reakce zvoleného barviva s roztokem KO_2 .

Byly připraveny 5mM zásobní roztoky komplexů MnL1Oct a MnL2 v DMSO. Následně byly připraveny roztoky látek obou komplexů v DMSO, aby výsledná koncentrace byla $1 \cdot 10^{-4}$ M, $5 \cdot 10^{-5}$ M, $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M a $5 \cdot 10^{-6}$ M. Jako barvivo byl použit 3,75 mM roztok 2,3,5-trifenylnitroazolum chloridu v DMSO.

Reakce byla zahájena přidávkem 0,1 ml roztoku barviva k 0,1 ml vzorku v 1,2 ml 10 mM fosfátovém pufru (pH = 7,4) a následně bylo přidáno 0,1 ml nasyceného roztoku KO_2 v DMSO, který byl těsně před přidávkem zfiltrován přes stříkačkový filtr (0,45 μ l). Vzorky byly protřepány a inkubovány 25 minut při laboratorní teplotě.

Následně byla proměřena UV-VIS spektra (200-700 nm). Jako blank byl užit roztok o stejné koncentraci jako vzorek proměřovaný s barvivem, ale bez přítomnosti KO_2 . Jako kontrolní vzorek byl užit roztok 1,3 ml pufru, 0,1 ml barviva a 0,1 ml roztoku KO_2 . Hodnota absorbance byla odečítána při 528 nm.

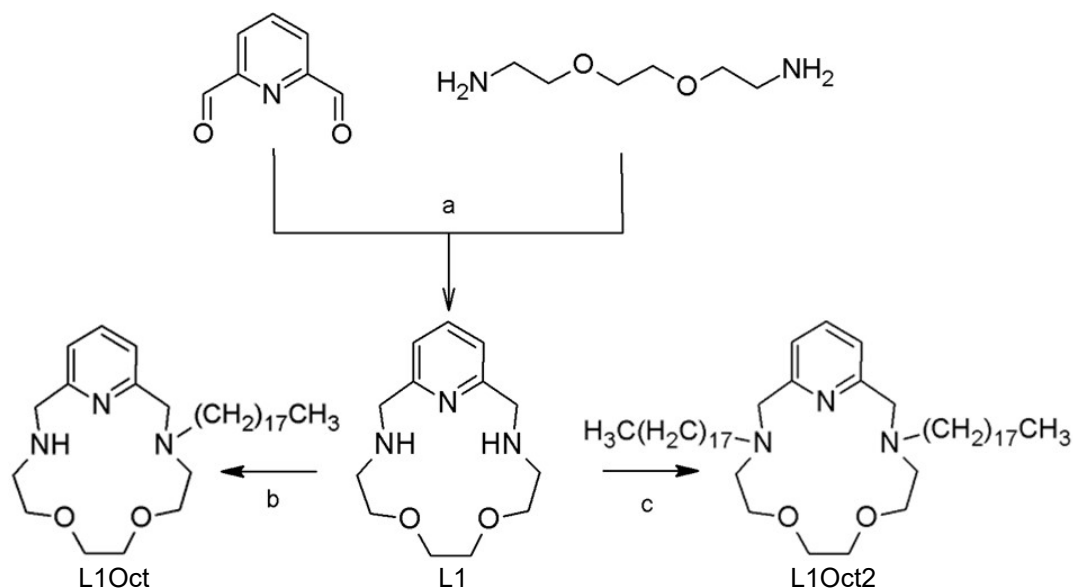
8. Měření T_1 relaxačního času

Pro měření T_1 relaxačního času byl zvolen experiment „Inversion Recovery“.

Do skelných kyvet byly připraveny vzorky: 10 mM fosfátového pufru (pH = 7,4), 2 mM roztoku MnL1Oct ve fosfátovém pufru, 2 mM roztoku MnL1Oct v DMSO a fosfátovém pufru, 2 mM roztoku MnL1Oct v DMSO a fosfátovém pufru v přítomnosti nasyceného roztoku KO_2 v DMSO a vzorky o stejném složení pro MnL2. Dále bylo provedeno měření pro vzorky: 10 mM HEPES pufru, 2 mM roztoku MnL1Oct v HEPES, 2 mM roztoku MnL1Oct v DMSO a HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-piperazinethan sulfonová kyselina), 2 mM roztoku MnL1Oct v DMSO a HEPES v přítomnosti nasyceného roztoku KO_2 v DMSO a vzorky o stejném složení pro MnL2. Měření probíhalo při hodnotě pole 400 Hz a laboratorní teplotě.

DISKUZE

9. Syntéza ligandu L1Oct a L1Oct2

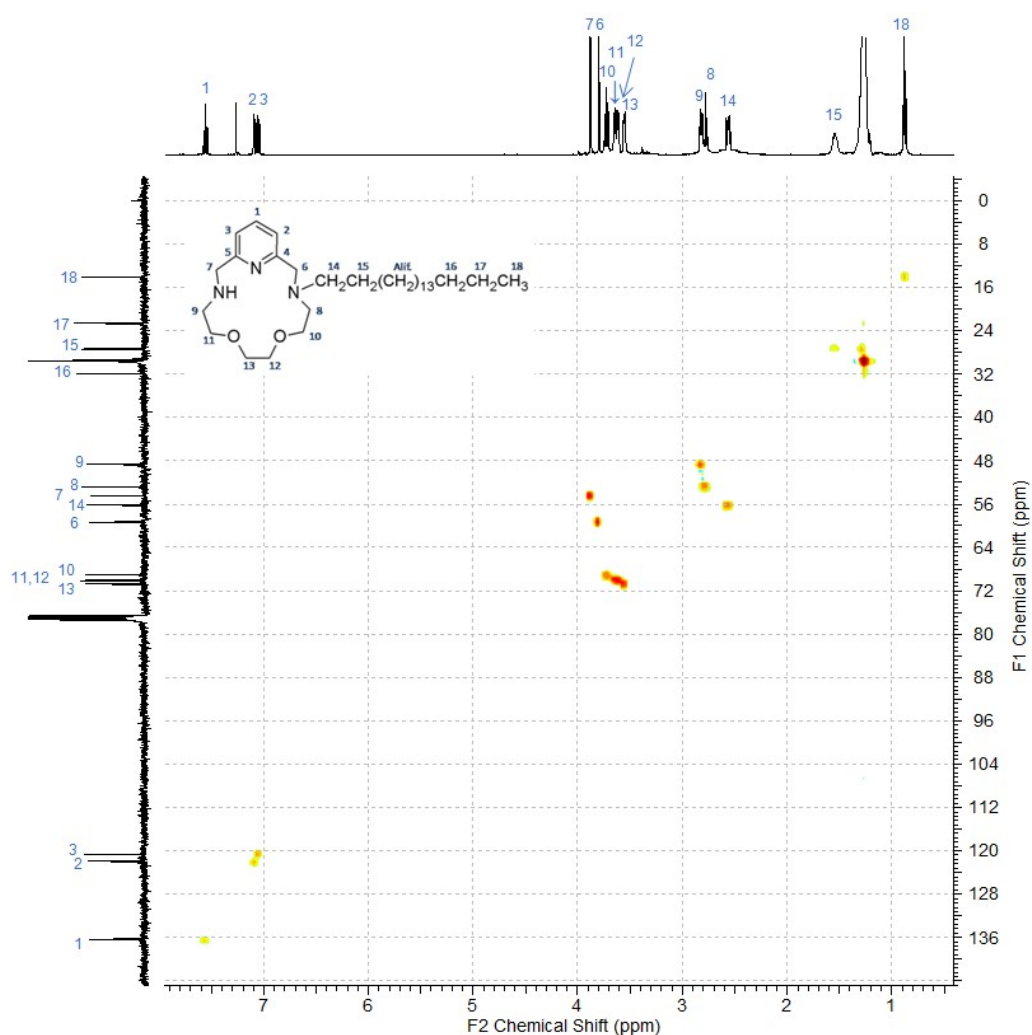


Obr. 13: Reakční schéma syntézy ligandu L1, ligandu L1Oct a ligandu L1Oct2: (a) 1. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, MeOH 2. NaBH_4 , 3. $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2$; (b) $\text{Br}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$, MeCN, reflux; (c) $\text{Br}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$, K_2CO_3 , MeCN, reflux

Jako výchozí látka pro syntézu ligandů L1Oct a L1Oct2 byl použit makrocyclický ligand L1, který byl připraven cyklizační reakcí s 2,2'-(ethylenedioxy)-bis(ethylaminem) a $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, kdy Mn(II) sloužil jako templátující ion. Použitím NaBH_4 docházelo k redukci dvojných vazeb Schiffovy báze a vzniku ligandu L1 v podobě jeho manganatého komplexu. Přidáním vody do reakční směsi a reakcí se vzdušným kyslíkem došlo k uvolnění Mn(II) ve formě MnO_2 . Po zpracování směsi bylo provedeno chromatografické čištění. Výtěžek (59 %) byl v porovnání s uvedenou literaturou nižší.¹¹ Ke ztrátám mohlo vést díky nedostatečné optimalizaci reakce např. rychlost přikapávání aminu a následný vznik vedlejších produktů jako je např. dvakrát větší 30členný cyklus, a při chromatografickém čištění.

Přečištěný ligand L1 byl dále využit pro přípravu ligandu L1Oct. Nejprve byla vyzkoušena syntéza v poměru reaktantů 1:1 v prostředí acetonitrilu, která nebyla úspěšná. Následně byl zvolen poměr 3:1, kdy byl ligand L1 použit v nadbytku jako báze. Tato reakce byla prováděna ve dvou prostředích - v MeCN a v CHCl_3 . Po

vyhodnocení TLC a MS spekter, byl jako reakční prostředí zvolen MeCN (menší množství nečistot) a reakce byla následně provedena pro větší navážky. Bylo získáno 2,2 g pevné látky obsahující produkt, kterou bylo potřeba dále přečistit na sloupci silikagelu. Jako mobilní fáze byla zvolena soustava $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-25\%aq. NH}_3$ (9:0,5:0,5). Nejprve z kolony vytékala frakce obsahující disubstituovaný cyklus L1Oct2 a nečistoty ($R_f = 0,56$), následně frakce obsahující monosubstituovaný produkt L1Oct ($R_f = 0,33$), dále směsná frakce obsahující L1Oct a výchozí ligand L1 a jako poslední vytekla frakce obsahující výchozí ligand L1 ($R_f = 0,18$). Nízký výtěžek (14 %) mohl být zapříčiněn ztrátami během chromatografického čištění a nedostatečnou optimalizací reakce (např. teplotou, rychlostí přikapávání). Produkt byl charakterizován pomocí $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ a MS. Byla provedena i řada 2D-NMR experimentů (Obr. 14), na základě kterých bylo možné přiřadit jednotlivé signály v 1D spektrech příslušným atomovým skupinám.



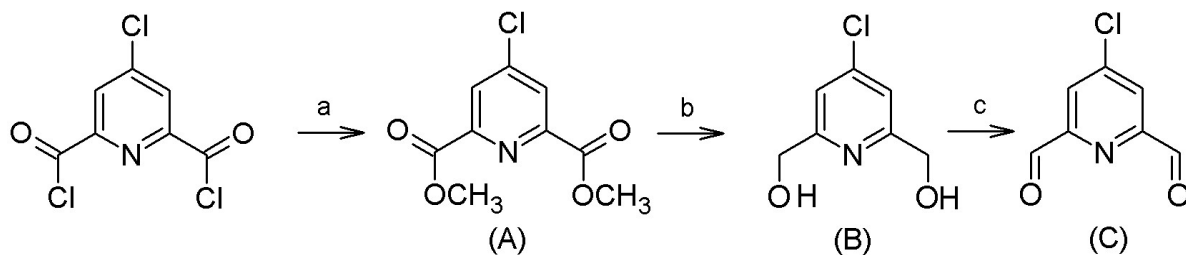
Obr. 14: Ukázka 2D NMR spektra $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ gs-HMQC s přiřazením signálů.

Ligand L1 byl dále využit pro přípravu disubstituovaného cyklu obsahujícího dvě alifatická ramena navázána na atomy dusíku v L1Oct2. Reakce probíhala v MeCN a v přítomnosti K_2CO_3 jako báze. Hrubý produkt musel být přečištěn chromatograficky na sloupci silikagelu. Jako první mobilní fáze byl zvolen $CHCl_3$, disubstituovaný cyklus L1Oct2 se nevymýval, ale došlo k vymytí alkylačního činidla (1-bromoktadekanu). Jelikož 1-bromoktadekan nezpůsobuje zhášení fluorescence pod UV lampou, bylo pro zviditelnění na TLC destičce užito par jódu. Následně byla změněna mobilní fáze na $CHCl_3$ -MeOH (10:1). Došlo k vymytí frakce obsahující disubstituovaný ligand L1Oct2 ($R_f = 0,86$) a následně frakce obsahující disubstituovaný ligand L1Oct2 a další nečistoty. Výtěžek reakce (45 %) mohl být ovlivněn ztrátami během chromatografie. Produkt byl dále charakterizován pomocí MS, 1H -NMR a elementární analýzy. Ta potvrdila přítomnost disubstituovaného produktu. Odchylna při měření byla zapříčiněna olejovitou povahou produktu L1Oct2 a přítomností zbytkového rozpouštědla $CHCl_3$.

10. Syntéza L2 a L2Oct

10.1 Příprava prekurzorů

Příprava prekurzoru vhodného pro cyklizaci a vzniku ligandu L2 probíhala v několika krocích.



Obr. 15: Reakční schéma přípravy prekurzorů: (a) MeOH, reflux; (b) 1. $NaBH_4$, THF; 2. reflux, MeOH; (c) SeO_2 , 1,4- dioxan, reflux

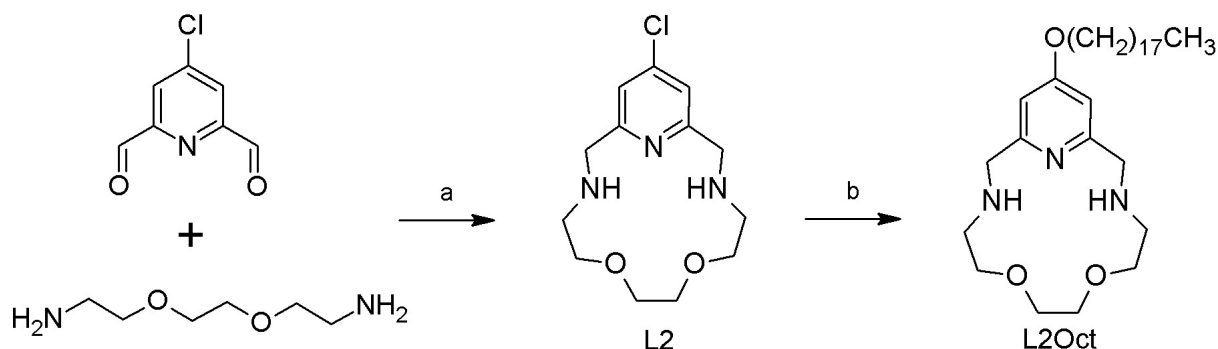
Pro přípravu 2,6-bis(hydroxymethyl)-4-chloropyridinu (B) byl jako výchozí látka nejprve použit 4-chloropyridin-2,6-dikarbonyl dichlorid a $NaBH_4$ v THF s následným přidavkem MeOH. Reakce ale probíhala s velmi malými výtěžky (11 %). Dalším alternativním postupem, využívající 4-chloropyridin-2,6-dikarbonyl dichlorid jako výchozí látku, je reakce s $NaBH_4$ v prostředí suchého bis(2-methoxyethyl)etheru pod

dusíkovou atmosférou při teplotě 0 °C uvedený v literatuře.⁴⁷ Tento postup byl synteticky náročnější, a proto nebyl zvolen. Následně byl zvolen postup, kdy byl 4-chlorpyridin-2,6-dikarbonyl dichlorid jednoduchou reakcí převeden na dimethylester 4-chlorpyridin-2,6-dikarboxylové kyseliny (A). Tato reakce proběhla v porovnání s literaturou⁴⁴ ve vyšších výtěžcích (82 %).

Následně byl redukcí dimethylesteru 4-chlorpyridin-2,6-dikarboxylové kyseliny (A) za využití NaBH₄ připraven 2,6-bis(hydroxymethy)-4-chlorpyridin (B). Reakce probíhala v prostředí THF a reakční směs bylo nutné před přidáním NaBH₄ zahřát na teplotu 50°C, aby došlo k úplnému rozpuštění látky a po rozpuštění nechat směs ochladit na pokojovou teplotu. Za stálého míchání byl přidáván NaBH₄, který byl k výchozí látce v nadbytku (5 ekvivalentů), během přidávání bylo třeba postupovat opatrně, reakční směs silně pěnila a měnila barvu ze světle žluté na sytě oranžovou. Následoval reflux po dobu 1,5 hodiny. Pomocí přikapávací nálevky s boční trubičkou na vyrovnání tlaku bylo pomalu přikapáno 25 ml MeOH (1ml/1minuta). Během přikapávání docházelo k pomalému odbarvování reakční směsi. Směs byla refluxována přes noc do úplného odbarvení, následně zpracována a kontinuálně extrahována CHCl₃ po dobu 2 dnů. Po odpaření organické fáze pomocí RVO bylo získáno 0,9 g produktu ve formě pevné látky, který bylo potřeba díky přítomnosti nečistot rekrystalizovat z toluenu.

Oxidací 2,6-bis(hydroxymethy)-4-chlorpyridinu (B) pomocí SeO₂ byl připraven 4-chlorpyridin-2,6-dikarbaldehyd (C). Během reakce se na stěnách baňky usazoval postupně šedý selen, který byl po ukončení reakce zfiltrován přes fritu (S4). Na základě širokých signálů v NMR spektru byl produkt přečištěn na krátkém sloupci silikagelu za použití ethylacetátu jako mobilní fáze. Zbytky selenu a nečistot (monooxidovaný produkt) zůstaly na sloupci silikagelu. V porovnání s výtěžkem uvedeném v literatuře (93 %)⁴⁵ byl dosažený výtěžek nižší (77 %). Ke ztrátám mohlo dojít během chromatografického čištění.

10.2 Příprava ligandu L2 a L2Oct



Obr. 16: Reakční schéma přípravy ligandu L2 a L2Oct: (a) 1. MnCl₂·4H₂O, MeOH, 2. NaBH₄; (b) CH₃(CH₂)₁₇OH, NaOH, DMSO, reflux

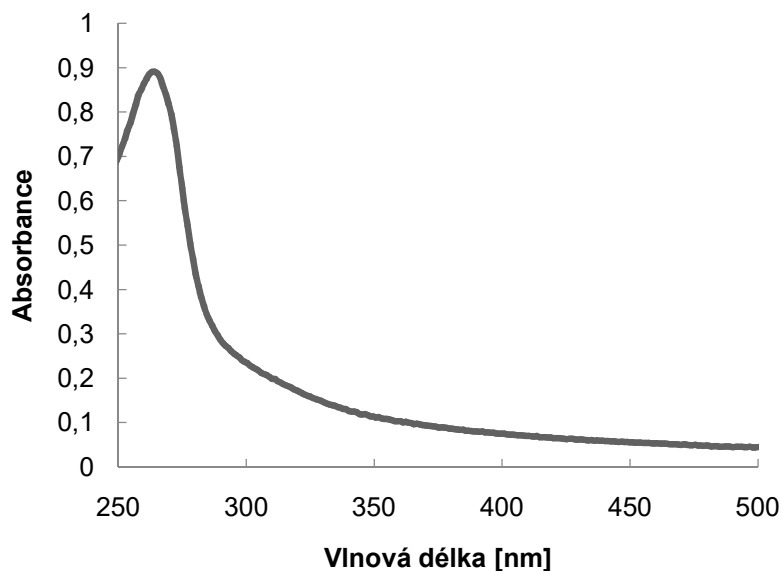
Příprava ligandu L2 proběhla stejnou cyklizační reakcí využívající templátové syntézy (viz. kap. 9). V porovnání s výtěžkem u připraveného ligandu L1 (59%) byl výtěžek reakce pro přípravu L2 o polovinu nižší (29 %). Nízký výtěžek mohl být způsoben ztrátami během chromatografického čištění, kdy ligand L2 s chlorem navázaným na aromatickém jádře má jinou pohyblivost na sloupci silikagelu a hůře se dělí od nečistot.

Přečištěný ligand byl dále použit pro přípravu ligandu L2Oct, kdy byla snaha navázat alifatický řetězec přes kyslík na aromatické jádro. Na rozdíl od postupu uvedeného v literatuře,³⁸ byla nejprve provedena cyklizační reakce a následně zaváděn řetězec. Po ukončení reakce byla přidána voda a pevný NaOH a směs byla extrahována pomocí EtAc-*n*-heptan (1:1). Fáze se od sebe velmi špatně dělily, bylo potřeba velmi dlouho čekat a dále bylo zapotřebí většího množství bezvodého MgSO₄, aby byly spojené organické fáze dobře vysušeny.

Byly proměřeny MS spektra, kdy byly viditelné pouze píky odpovídající produktu. Po proměření NMR spekter nebyly viditelné signály odpovídající aromatickému kruhu ani makrocyklu, ve spektru byly viditelné pouze signály odpovídající alifatickému řetězci. Z měření elementární analýzy bylo zjištěno, že reakce proběhla jen ve velmi malém rozsahu, byly přítomné i zbytky rozpouštědla a produktem reakce byla především výchozí látka oktandeka-1-ol. Z časových důvodů a malého množství připraveného výchozího ligandu L2 nebylo možné reakční podmínky dále optimalizovat např. změnou reakčního prostředí, poměrů reaktantů, změnou teploty atd. a proto nebyl produkt L2Oct připraven.

11. Stanovení kritické micelární koncentrace (CMC) komplexu MnL1Oct

Pro stanovení CMC bylo využito měření UV-VIS spekter (Obr. 17) a následně byla odečtena hodnota maxima při vlnové délce 263 nm (Graf. 1).

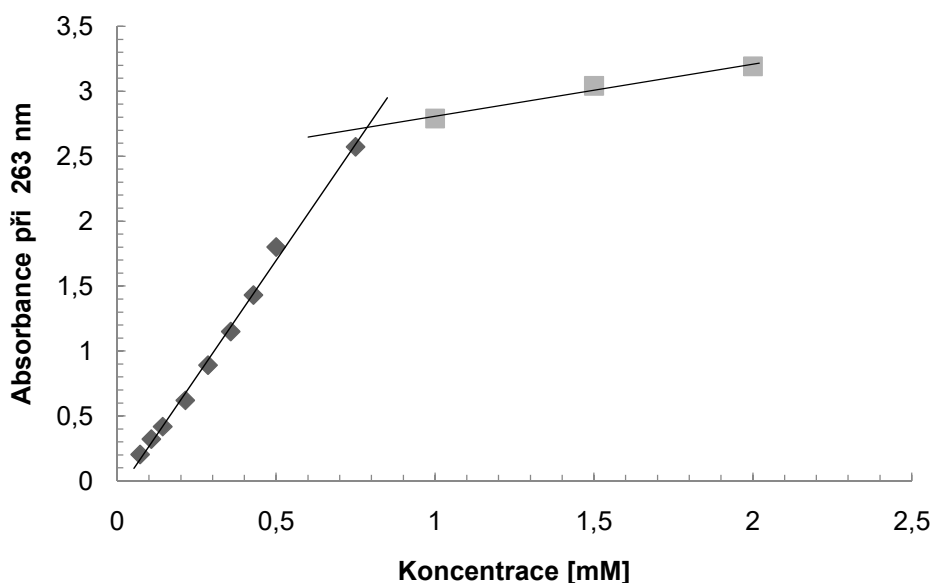


Obr. 17: Ukázka UV-VIS spektra MnL1Oct pro koncentraci 0,286 mM

Hodnoty byly vyneseny jako závislost absorbance na molární koncentraci komplexu, kdy pozorovaný zlom v získané závislosti určuje koncentraci nutnou pro tvorbu micel (CMC).

Tabulka 2: Absorbance při 263 nm pro jednotlivé koncentrace vzorků MnL1Oct

Koncentrace [mM]	Absorbance (263 nm)
0,054	0,126
0,071	0,202
0,107	0,321
0,142	0,418
0,214	0,620
0,286	0,890
0,357	1,150
0,428	1,430
0,500	1,800
0,750	2,572
1,00	2,790
1,50	3,040
2,00	3,190



Graf 1: Závislost absorpce při 263 nm pro zvyšující se koncentraci komplexu MnL1Oct

Naměřené hodnoty byly proloženy přímkami, tak aby výsledný koeficient spolehlivosti byl co nejvyšší. Průnik obou přímek určuje hodnotu CMC. Po vynesení závislosti bylo zjištěno, že hodnota CMC je 0,78 mM.

Podle dalších postupů uvedených v literatuře⁴⁸ lze stanovit CMC proměřením absorpce v přítomnosti organické sondy PAN (1-(2-pyridylazo)-2-naftol), která je omezeně rozpustná ve vodě. V přítomnosti micel však dochází k enkapsulaci organické sondy a vzrůstá její rozpustnost a hodnota absorpce, která je odečítána ve viditelné oblasti při 410 nm. Vzhledem k přítomnosti aromatického jádra, které samo absorbuje světlo v UV oblasti, nebyl tento postup zvolen.

12. Stanovení SOD aktivity pro komplexy MnL1Oct a MnL2

SOD aktivita byla měřena pomocí nepřímé metody využívající reakci barviva 2,3,5-trifeny-2H-tetraazolium chloridu (TTC) se superoxidem za vzniku barevného 1,3,5-trifenylylformazánu (TPF).

Nasyčený roztok KO_2 bylo nutné nechat neustále míchat a před každým pipetováním bylo nutné roztok nejprve zfiltrat přes stříkačkový filtr, aby se do roztoku nedostaly zvržené pevné částičky KO_2 , které by mohly ovlivnit měření, a poté roztok napipetovat ihned k roztoku vzorku, aby poskytl barevnou reakci. Zfiltrovaný

roztok KO₂ delším stáním již neposkytoval barevnou reakci, proto bylo nutné tento postup pokaždé opakovat.

Z naměřené hodnoty absorbance při 528 nm pro oba komplexy bylo vypočteno procento inhibice %INH pro každou koncentraci (7).

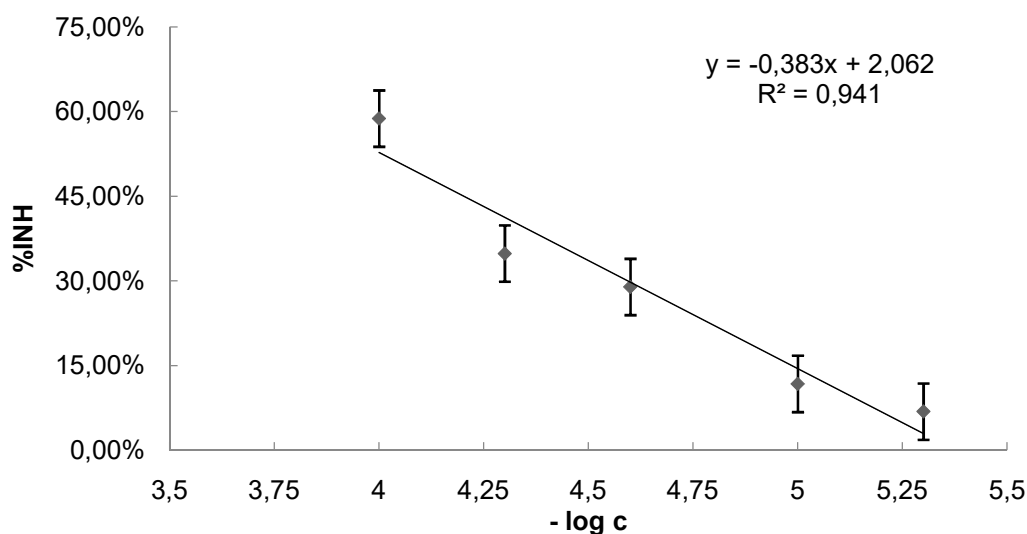
$$\%INH = 100 - 100 \times \frac{ABS_{vz}}{ABS_{kontr}} \quad (7)$$

(%INH = procento inhibice; ABS_{vz} = hodnota absorbance vzorku; ABS_{kontr} = hodnota absorbance kontroly)

Po vynesení závislost %INH na záporném dekadickém logaritmu koncentrace ($-\log c$) testovaných látek byla získána rovnice přímky lineární regrese, ze které byla následně vypočtena hodnota IC₅₀ (koncentrace testované látky, při níž se vyskytne 50% úbytek barevného produktu reakce barviva se superoxidem).

Tabulka 3: Hodnoty absorbance při 528 nm a spočítané %INH pro MnL1Oct

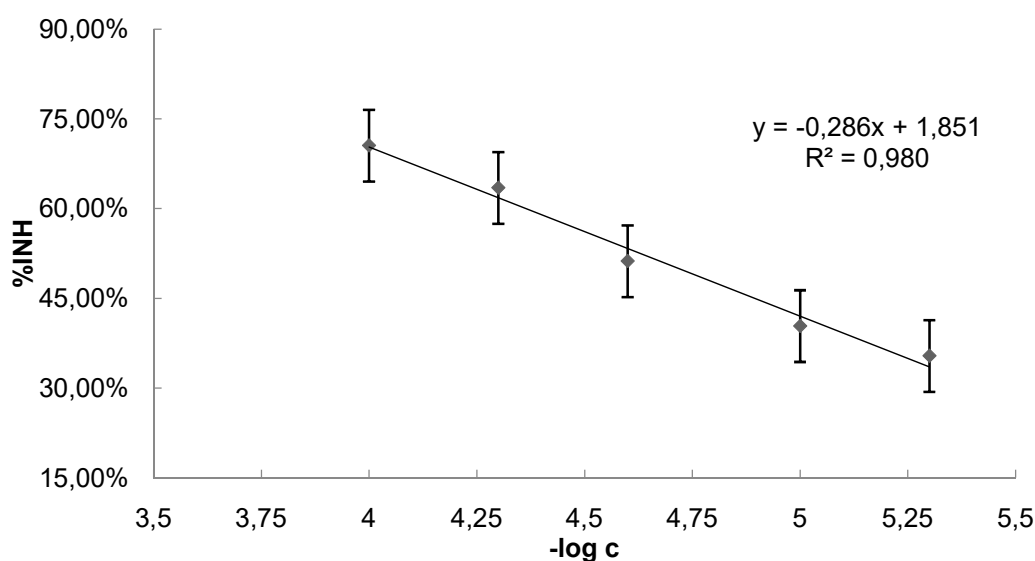
Koncentrace [mol×dm ⁻³]	Absorbance	%INH
1×10 ⁻⁴	0,403	58,79
5×10 ⁻⁵	0,637	34,87
2,5×10 ⁻⁵	0,695	28,94
1×10 ⁻⁵	0,863	11,76
5×10 ⁻⁶	0,911	6,85
Kontrola	0,978	-



Graf 2: Závislost %INH na $-\log c$ pro komplex MnL1Oct

Tabulka 4: Hodnoty absorbance při 528 nm a spočítané %INH pro MnL2

Koncentrace [mol×dm ⁻³]	Absorbance	%INH
1×10 ⁻⁴	0,288	70,55
5×10 ⁻⁵	0,357	63,50
2,5×10 ⁻⁵	0,477	51,23
1×10 ⁻⁵	0,583	40,39
5×10 ⁻⁶	0,632	35,38
Kontrola	0,978	-



Graf 3: Závislost %INH na – log c pro komplex MnL2

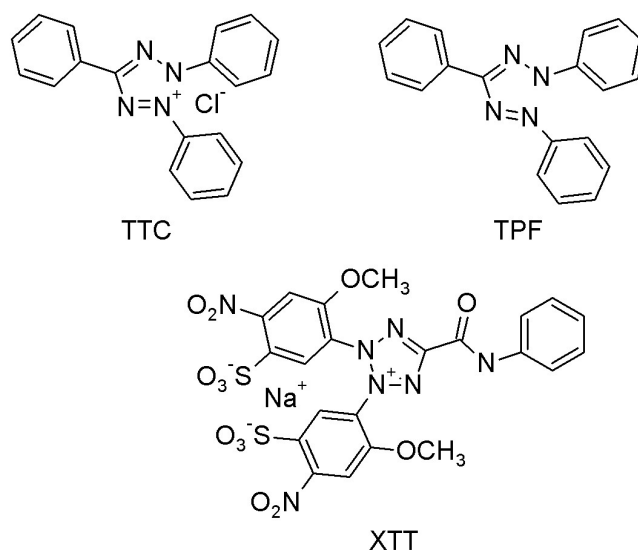
Z rovnic přímek byly vypočteny hodnoty IC₅₀ pro komplex MnL1Oct (83,5 μM) a pro komplex MnL2 (18,9 μM).

Hodnoty IC₅₀ nejsou přímo porovnatelné mezi sebou, jelikož hodnota závisí na množství zvoleného indikátoru a proto se nehodí k porovnání účinnosti jednotlivých SOD mimik, pokud je ale známa rychlostní konstanta reakce superoxidu se zvoleným barvivem (k_{ind}), lze dopočítat rychlostní konstantu dismutace s mimikem (k_{kat}), která je nezávislá na množství použitého barviva (8).⁴⁹

$$k_{kat} = \frac{k_{ind} \cdot [ind]}{IC_{50}} \quad (8)$$

(k_{kat} = rychlostní konstanta reakce superoxidu s mimikem [M⁻¹s⁻¹]; k_{ind} = rychlostní konstanta reakce superoxidu s barvivem [M⁻¹s⁻¹]; [ind] = koncentrace barviva/barevného indikátoru [M]; IC₅₀ = procento inhibice)

Vzhledem ke strukturní podobnosti 2,3,5-trifenylnitrazolium chloridu (TTC) s dalším barvivem používaným ke stanovení aktivity – sodné soli XTT, jejíž rychlostní konstanta reakce se superoxidem je známa ($k_{ind} = 8,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁵⁰ a lze předpokládat obdobnou hodnotu k_{ind} , byly dále vypočteny přibližné hodnoty k_{kat} .



Obr. 18: Strukturní vzorce TTC, jeho barevného produktu TPF a barviva XTT, sodné soli

Tabulka 5: Srovnání aktivity některých SOD mimik s komplexy MnL1Oct a MnL2

Komplex	IC ₅₀ [μM]	k_{kat} [M ⁻¹ s ⁻¹]	Metoda
Mn([15]aneN ₅)Cl ₂ ⁵¹		$4,13 \cdot 10^7$	SF
Mn([15]PyaneN ₅)Cl ₂ ⁵²		$4,10 \cdot 10^7$	SF
M40403 ³³		$4,91 \cdot 10^7$	SF
EUK-8 ⁴⁹	1,40	$6,0 \cdot 10^5$	cyt C
EUK-134 ⁴⁹	1,42	$6,0 \cdot 10^5$	cyt C
MnL1Oct	83,5	$3,8 \cdot 10^6$	TTC
MnL2	18,9	$1,71 \cdot 10^7$	TTC

(SF = stopped-flow metoda, cyt C = cytochrom C assay)

Z výsledků měření lze vyčíst, že oba komplexy MnL1Oct i MnL2 mají nižší SOD aktivitu než zkoumaná SOD mimika obsahující makrocyclické ligandy [15]aneN₅ a [15]PyaneN₅, přesto MnL2 se jim svou SOD aktivitou blíží. Kvůli nízkým koncentracím, pro které byla SOD aktivita měřena, nedocházelo u komplexu

MnL1Oct ke tvorbě micel, které by mohly aktivitu ovlivnit. Vzhledem k použitému barvivu, které se využívá pro monitorování redoxních procesů např. dehydrogenas, a nikoli ke stanovení SOD aktivity, bylo nutné hodnoty stanovit pouze přibližně. Pro přesné stanovení a potvrzení katalytické aktivity by bylo vhodnější užití metody stopped-flow.

13. Měření T_1 relaxačního času

Pro výpočet relaxivity bylo nejprve nutné změřit pomocí experimentu „Inversion Recovery“ relaxační časy T_1 pro 10 mM pufr (pH = 7,4), aby byl zjištěn diamagnetický příspěvek prostředí k relaxaci.

Dále byly pomocí stejného experimentu změřeny T_1 relaxační časy pro 2mM roztok MnL1Oct ve fosfátovém pufru a 2mM roztok MnL1Oct v DMSO a fosfátovém pufru, aby bylo možné porovnat, zda má přítomnost DMSO vliv na relaxační čas T_1 a výslednou relaxivitu r_1 .

Nakonec byl změřen 2mM roztoku MnL1Oct v DMSO a fosfátovém pufru v přítomnosti nasyceného roztoku KO_2 v DMSO, tak aby byly reakční podmínky co nejvíce podobné těm, pro které se měřila SOD aktivity.

Tento experiment byl proveden i pro manganatý komplex ligandu L2.

Analogickým způsobem byla rovněž provedena měření v HEPES pufru (pH = 7,4) (viz. Tabulka 6), aby bylo možné zjistit, zda má měření ve fosfátovém pufru vliv na výsledné hodnoty relaxivity.

Vzorky bylo nutno připravovat v čistém laboratorním skle několikrát promytém vodou v čistotě užívané pro HPLC a vysušeném, aby se zabránilo kontaminaci vzorků a následnému zkreslení výsledků měření. Při měření T_1 relaxačního času vzorků v kyvetách čištěných chromsírovou směsí byly naměřeny extrémně nízké hodnoty relaxačních časů díky přítomnosti zbytkového množství paramagnetického Cr^{3+} , proto byly použity nové kyvety, kdy po proměření byly získány hodnoty v očekávaném/běžném rozmezí.

Tabulka 6: Naměřené hodnoty relaxačních časů a vypočtené hodnoty relaxivit

	fosfátový pufr (PBS)		HEPES pufr	
	T_1 [ms]	r_1 [mM ⁻¹ s ⁻¹]	T_1 [ms]	r_1 [mM ⁻¹ s ⁻¹]
10 mM pufr	2840 ± 43	0.35	2624 ± 46	0.38
Vzorek 1 MnL1Oct				
2 mM MnL1Oct/pufr	235 ± 2	1.95	82.8±0.3	5.85
2 mM MnL1Oct/pufr/DMSO	732±8	0.51	50.69±0.05	9.67
2 mM MnL1Oct/pufr/DMSO/KO ₂	887±4	0.39	60.2±0.3	8.11
Vzorek 2 MnL2				
2 mM MnL2/pufr	105±2	4.57	107.3±0.9	4.47
2 mM MnL2/pufr/DMSO	90.94±0.5	5.32	68.0±0.2	7.17
2 mM MnL2/pufr/DMSO/KO ₂	100.9±0.5	4.78	71.8±0.4	6.77

Porovnáním naměřených hodnot bylo zjištěno, že komplex MnL2 ve fosfátovém pufru vykazuje nižší hodnoty relaxačních časů T_1 a vyšší hodnoty relaxivity než komplex L1Oct. Nízké hodnoty relaxivity MnL1Oct mohou být zapříčiněny srážením manganu (pravděpodobně ve formě komplexu MnL1Oct) v prostředí fosfátového pufru. V prostředí HEPES pufru k tomuto jevu nedochází a komplex MnL1Oct vykazoval vyšší hodnoty relaxivity než MnL2, což mohlo být způsobeno přítomností alifatického řetězce a následnou tvorbou micel (překročení CMC), což vedlo ke zkrácení T_1 .

V prostředí fosfátového pufru i pufru HEPES, došlo přidavkem DMSO do obou vzorků ke vzrůstu relaxivity. Přídavek KO₂ naopak zapříčinil snížení hodnot relaxivit, což mohlo být způsobeno řadou možných příčin - vznikající H₂O₂ mohl ovlivnit rychlost výměny koordinované vody, mohlo dojít ke tvorbě hydroxo-komplexů a také k částečné oxidaci Mn(II) na Mn(III).

Naměřené hodnoty relaxivity pro MnL2 jsou velmi podobné s hodnotou komplexu MnL1 (4.48 mM⁻¹s⁻¹)⁴³, hodnoty relaxivity pro MnL1Oct byly výrazně vyšší, což bylo pravděpodobně způsobeno tvorbou micel. Výše uvedené hodnoty navíc dobře korespondují s přítomností dvou koordinovaných molekul vody ve všech studovaných manganatých komplexech.

ZÁVĚR

V rámci práce byly připraveny a charakterizovány strukturně nové ligandy L1Oct, L1Oct2 a L2, které byly charakterizovány vybranými experimentálními metodami. Výtěžky reakcí L1Oct, L1Oct2 a L2 byly malé, ale optimalizace reakcí jejich příprav by mohla vést k výtěžkům vyšším.

Derivát ligandu L2, ligand L2Oct, se nepodařilo připravit a charakterizací bylo prokázáno, že zvolená reakční cesta není pro jeho přípravu vhodná a je třeba zvolit jiné reakční podmínky, aby byla reakce úspěšná.

Dále byly zkoumány vodné roztoky komplexních sloučenin MnL1Oct a MnL2 a byla stanovena jejich SOD aktivita při pH = 7,4. Ukázalo se, že dlouhý alifatický řetězec a tvorba micelárních struktur ligandu L1Oct, nemá na SOD aktivitu v podmínkách *in vitro* v porovnání s komplexem MnL2, zásadní vliv vzhledem k nízkým koncentracím, při kterých bylo měření prováděno - nedochází k překročení CMC a tvorba micel je minimální. Měřením byla stanovena hodnota IC₅₀ a ta byla dále přepočtena na přibližnou hodnotu k_{kat} . Porovnáním se známými hodnotami zkoumaných SOD mimik bylo zjištěno, že hodnoty pro MnL2 se blíží hodnotám pro zkoumané makrocyclické SOD mimika jako jsou Mn([15]JaneN₅)Cl₂ a Mn([15]PyaneN₅)Cl₂. Je třeba ale vzít v potaz, že získané hodnoty jsou pouze přibližné a jejich přesné stanovení by vyžadovalo volbu jiné metody např. stopped-flow metodou, ze které by bylo možno získat přesnější hodnotu k_{kat} .

Proměřením relaxačních časů T₁ byly stanoveny hodnoty relaxivity r_1 . Ukázalo se, že volba prostředí má vliv na výsledky měření pro komplex MnL1Oct, kdy byly naměřené hodnoty relaxivity nízké vlivem srážení Mn(II). Proto bylo provedeno měření v HEPES pufru. Ze získaných hodnot relaxivity pro komplexy MnL1Oct a MnL2 lze usoudit, že přítomnost alifatického řetězce a tvorba micel zvyšuje hodnoty relaxivity r_1 . Přítomnosti KO₂ sice způsobila měřitelný pokles v hodnotách relaxivity, ale jelikož samotný proces odbourávání superoxidu probíhá velmi rychle (vůči časové škále NMR měření), monitorování SOD aktivity pomocí MRI se proto jeví jako velice obtížné a vyžadovalo by důkladnější návrh experimentálního uspořádání.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ J. Folkman, *N. Engl. J. Med.*, **1971**, 1182–1186
- ² A. Merbach, É.Tóth, L. Helm, *The chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, Wiley, **2013**, p.1–23
- ³ J. Vomáčka, J. Nekula, J. Kozák, *Zobrazovací metody pro radiologické asistenty, Univerzita Palackého v Olomouci*, **2012**, p. 48–49
- ⁴ M.H. Levitt, *Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance*, Wiley, **2008**
- ⁵ F. Hampl, S. Rádl, J. Paleček, *Farmakochemie, VŠCHT Praha*, **2015**, 562–566
- ⁶ J.Kotek, I. Lukeš, *Chem. Listy*, **2010**, 1163–1174
- ⁷ P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček, I. Lukeš, *Dalton Trans.*, **2008**, 3027–3047
- ⁸ J. Rodriguez, S. Lai, B. D. Ehst, D. M. Fine, D. A. Bluemke, *Radiology*, **2009**, 371–377
- ⁹ B. Drahoš, I. Lukeš, E. Tóth, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 1975–1986
- ¹⁰ S. M. Rocklage, W. P. Cacheris, S. C. Quay, F. E. Hahn, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.*, **1989**, 477–485
- ¹¹ B. Drahoš, J. Kotek, I. Císařová, P. Hermann, L. Helm, I. Lukeš, É. Tóth, *Inorg. Chem.*, **2011**, 12785–12801
- ¹² A. Bumb, M. W. Brechbiel, P. Choyke, *Acta Radiol.*, **2010**, 751–767
- ¹³ J. Tang, Y. Sheng, H. Hu, Y. Shen, *Progr. Polymer Sci.*, **2013**, 462–502
- ¹⁴ T. Barret, H. Kobayashi, M. Brechbiel, P. L. Choyke, *Eur. J. Radiol.*, **2006**, 353–366
- ¹⁵ J. P. André, E. Tóth, H. Fischer, A. Seeling, H. R. Mäcke, A. E. Merbach, *Chem. Eur. J.*, **1999**, 2977–2983
- ¹⁶ S. Movassaghian, O. M. Merkel, V. P. Torchillin, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, Wiley, **2015**, 691–707
- ¹⁷ V. P. Torchilin, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2000**, 183–215
- ¹⁸ E. Nakamura, K. Makino, T. Okano, T. Yamamoto, M. Yokoyama, *J. Control. Release*, **2006**, 325–333
- ¹⁹ G. Goncalves, G. Tobias, *Nanooncology: Engineering nanomaterials for cancer therapy and diagnostic*, Springer, **2018**, p. 211–238
- ²⁰ K. S. Kim, W. Park, J. Hu, Y. H. Bae, K. Na, *Biomaterials*, **2014**, 337–343

-
- ²¹ A. Babič, V. Vorobiev, C. Xayaphoummine, G. Lopicorey, A. Chauvin, L. Helm, E. Allémann, *Chem. Eur. J.*, **2018**, 1348–1357
- ²² W. Krause, Contrast Agents I. Magnetic Resonance Imaging, *Springer*, **2002**, p. 1–24
- ²³ R. E. Blankenship, *Plant Physiol.*, **2010**, 434–438
- ²⁴ I. A. Abreau, D. E. Cabelli, *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, 263–274
- ²⁵ A. R. Reddi, L. T. Jensen, A. Naranuntarat, L. Rosenfeld, E. Leung, R. Shah, V. C. Culotta, *Free Rad. Biol. Med.*, **2009**, 154–162
- ²⁶ M. J. Daly et al., *Science*, **2004**, 1025–1028
- ²⁷ F. S. Archibald, I. Fridovich, *J. Bacteriol.*, **1981**, 442–451
- ²⁸ D. P. Riley, *Chem. Rev.*, **1999**, 2573–2587
- ²⁹ V. Cizewski, V. Culotta, M. Yang, T. V. O'Halloran, *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 747–758
- ³⁰ L. Policastro, B. Molinari, F. Larcher, P. Blanco, O. L. Podhajcer, C. S. Costa, P. Rojas, H. Durán, *Mol. Carcinog.*, **2004**, 103–113
- ³¹ G. R. Buettner, C. F. Ng, M. Wang, V. G. J. Rodgers, F. Q. Schafer, *Free Rad. Biol. Med.*, **2006**, 1338–1350
- ³² J. A. McCleverty, J. T. Meyer, *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Vol. 8, *Elsevier Pergamon*, **2003**, p. 495
- ³³ F.C. Friedel, D. Lieb, I. Ivanović-Burmazović, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 26–32
- ³⁴ R. J. Sanchez, C. Srinivasan, W. H. Munroe, M. A. Wallace, J. Martins, T. Y. Kao, K. Le, E. B. Gralla, J. S. Valentine, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2005**, 913–923
- ³⁵ S. Miriyala, I. Spasojevic, A. Tovmasyan, D. Salvemini, Z. Vujaskovic, D. St. Clair, I. Batinić-Haberle, *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, 794–814
- ³⁶ I. Batinić-Haberle, J. S. Reboucas, I. Spasojević, *Antioxid. Redox. Signal*, **2010**, 877–918
- ³⁷ M. Baudry, S. Etienne, A. Bruce, M. Palucki, E. Jacobsen, B. Malfroy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1993**, 964–968
- ³⁸ D. Lieb, I. Kenkell, J. Miljković, D. Moldenhauer, N. Weber, M. Filipović, F. Gröhn, I. Ivanović-Burmazović, *Inorg. Chem.*, **2014**, 1009–1020
- ³⁹ A. Dees, A. Zahl, R. Puchta, N. J. R. van Eikema Hommes, F. W. Heinemann, I. Ivanović-Burmazović, *Inorg. Chem.*, **2007**, 2459–2470

-
- ⁴⁰ D. P. Riley, P. J. Lennon, W. L. Neumann, R. H. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 6522–6528
- ⁴¹ D. P. Riley, S. L. Henke, P. J. Lennon, K. Aston, *Inorg. Chem.*, **1999**, 1908–1917
- ⁴² J. Kupai et al., *ARIKVOG*, **2016**, 130–151
- ⁴³ B. Drahoš, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, E. Tóth, *Inorg. Chem.*, **2010**, 3224–3238
- ⁴⁴ V. V. Zhdankin, *J. Org. Chem.*, **2005**, 6484–6491
- ⁴⁵ U. Luning, R. Baumstark, K. Peters, H. G. von Schnering, *Liebigs Ann. Chem.*, **1990**, 129–143
- ⁴⁶ A. R. Katritzky, R. J. Murugan, *J. Chem. Soc.*, **1987**, 1867–1869
- ⁴⁷ B. S. Chhikara, N. Kumar, V. Tandon, A. K. Mishra, *Biorg. Med. Chem.*, **2005**, 4713–4720
- ⁴⁸ K. G. Furton, A. Norelus, *J. Chem. Ed.*, **1993**, p. 254
- ⁴⁹ O. Iranzo, *Bioorg. Chem.*, **2011**, 73–87
- ⁵⁰ M. W. Sutherland, B. A. Learmonth, *Free Radical Res.*, **1997**, 283–289
- ⁵¹ D. P. Riley, R. H. Weiss, *J. Am. Soc.*, **1994**, 387–388
- ⁵² D. P. Riley, O. F. Schall, *Adv. Inorg. Chem.*, **2007**, 233–263