

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: CHEMIE  
Studijní obor: JADERNÁ CHEMIE



**Bc. Adam Čepa**

*Příprava radioaktivně značeného bilirubinu*  
*Preparation of radiolabelled bilirubin*

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Libor Vítek, Ph.D., MBA.

Praha 2013

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a za podpory grantového projektu uděleného Grantovou agenturou Univerzity Karlovy č. 556912.

**Prohlášení:**

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

V Praze

Podpis

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

BV	Biliverdin
DTPA	Diethylenamintetraoctová kyselina
ECD	Elektronické cirkulární dichroismy
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PCB	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PET	Pozitronová emisní tomografie (Positron Emission Tomography)
SPECT	Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (Single photon emission computerized tomography)
TLC	tenkovrstevná chromatografie
UCB	Nekonjugovaný bilirubin (Unconjugated bilirubin)
UGT1A	UDP-glukuronyltransferáza

## **ABSTRAKT (ČESKÁ VERZE)**

Diplomová práce navazuje na výzkum v oblasti radioaktivního značení žlučového pigmentu bilirubinu. Minoritně se bilirubin vyskytuje v organismu ve formě nekonjugované. V této práci bylo stěžejní nasynthetizovat radioaktivně značený bilirubin, který by bylo možné sledovat pomocí detektorů při *in vitro* experimentech. Případnou další aplikací, takového bilirubinu by byly *in vivo* experimenty detekovatelné pomocí  $\mu$ -PET/SPECT (mikro - pozitronová emisní tomografie/jednofotonová emisní výpočetní tomografie). Cílem této diplomové práce bylo navrhnout různé varianty značení bilirubinu pro případné radioizotopy a syntéza derivátu bilirubinu, vhodných pro radioaktivní značení. Dalším cílem této práce je syntéza a studium již známého derivátu bilirubinu tzv. ranarubinu, který by mohl mít potenciálně velmi podobné vlastnosti, jako bilirubin a proto by byl vhodným kandidátem pro radioizotopové značení a následné studium biologických soustav.

## **KLÍČOVÁ SLOVA (ČESKÁ VERZE)**

Bilirubin

Izotopy

Radioaktivita

Reakce

Struktura

## **ABSTRACT (ENGLISH VERSION)**

This thesis is dedicated to research in radiolabeling bile pigment bilirubin. Minority bilirubin present in the body the form unconjugated. In this work, it was crucial synthesize radiolabeled bilirubin which could be monitored by detector in vitro experiments. A possible further applications, such bilirubin would be detectable in vivo experiments using  $\mu$ -PET/SPECT (micro- positron emission tomography/single photon emission computed tomography) . The aim of this thesis propose variation for possible signs of bilirubin radioisotopes and synthesis of bilirubin derivatives suitable for radioactive labeling. Another objective of this work is the synthesis and study of the well-known derivative ranarubin called bilirubin, which could potentially have very similar characteristics, such as bilirubin and therefore would be a good candidate for radioisotope labeling and study of biological systems.

## **KEY WORDS (CZECH VERSION)**

Bilirubin

Isotopes

Radioactivity

Reaction

Structure

## OBSAH

	ÚVOD	10
1	LITERÁRNÍ ÚVOD	12
1.1	Nukleární medicína	12
1.1.1	Pozitronová emisní tomografie	12
1.1.1.1	Radionuklidy pro PET	13
1.1.1.2	Radiochemie s PET-izotopy	14
1.1.2	Jednofotonová emisní výpočetní tomografie	15
1.1.2.1	Radionuklidy pro SPECT	16
1.2	Značené sloučeniny	18
1.2.1	Izotopy používané v organických a biochemických experimentech	19
1.2.2	Příprava sloučenin značených radioizotopy	20
1.2.2.1	Standardní metody	20
1.2.2.2	Biosyntetické metody	21
1.2.2.3	Izotopová výměna	21
1.2.2.4	Externě značené sloučeniny radionuklidem	22
1.3	Žlučové pigmenty	23
1.3.1	Nomenklatura žlučových pigmentů	25
1.3.2	Biliverdin	27
1.3.3	Bilirubin	28
1.3.3.1	Struktura bilirubinu	28
1.3.3.2	Konjugace bilirubinu s kyselinou glukuronovou	35
1.3.3.3	Hmotnostní spektrometrie bilirubinu	36
1.3.3.4	Bilirubin-biliverdinový cyklus	37
1.3.4	Ranarubin	39
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
2.1	Použité chemikálie	40
2.2	Použité přístroje	41
2.3	Postupy	42
2.3.1	Purifikace bilirubinu	42
2.3.2	Purifikace biliverdinu	43

2.3.3	Příprava bilirubin dimethylesteru	44
2.3.3.1	Metoda s 1-alkyl-3- <i>p</i> -tolyltriazenem	44
2.3.3.2	Metoda s diazomethanem	45
2.3.4	Příprava biliverdin dimethylesteru	46
2.3.5	Oxidace bilirubinu na biliverdin pomocí chloranilu	46
2.3.6	Reakce BV XIII- $\alpha$ s kyselinou thiobarbiturovou	47
2.3.6.1	Syntéza kyseliny thiobarbiturové	47
2.3.6.2	Reakce BV XIII- $\alpha$ s kyselinou thiobarbiturovou	47
2.3.7	Kysele katalyzovaná izomerace bilirubinu IX- $\alpha$	47
2.3.7.1	Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové	47
2.3.7.2	Pomocí <i>p</i> -toluensulfonové kyseliny	47
2.3.7.3	Modifikace kyseliny katalyzované izomerace bilirubinu přídavkem [ $^{14}\text{C}$ ]formaldehydu	48
2.3.7.4	Analýza izomerů TLC	48
2.3.7.5	Analýza izomerů pomocí hmotnostní spektrometrie	48
2.3.8	Adice alkylkuprátů na biliverdin dimethylester	49
2.3.9	Syntéza thiofenol derivátů bilirubinu	49
2.3.10	Syntéza [ $^3\text{H}$ ]bilirubinu	49
2.3.11	Optimalizace syntéz ranarubinu	50
2.3.12	Stabilitní studie ranarubinu	52
2.3.13	Analýza ranarubinu a bilirubinu pomocí NMR	52
2.3.14	Analýza UCB, BV a ranarubinu pomocí ECD	52
2.3.15	Syntéza fluorovaných derivátů bilirubinu	52
3	VÝSLEDKY A DISKUSE	54
3.1	Hmotnostní spektra purifikovaného bilirubinu	54
3.2	Hmotnostní spektra purifikovaného biliverdinu	55
3.3	Příprava bilirubinu dimethylesteru	56
3.3.1	Esterifikace bilirubinu s 1-alkyl- <i>p</i> -tolyltriazenem	56
3.3.1.1	Příprava 1-alkyl- <i>p</i> -tolyltriazenu	56
3.3.1.2	Esterifikace bilirubinu triazenem	57
3.3.2	Esterifikace bilirubinu diazomethanem	58



3.3.2.1	Příprava diazaldu	58
3.3.2.2	Příprava diazometanu	59
3.3.2.3	Esterifikace bilirubinu diazometanem	59
3.4	Příprava biliverdinu dimethylesteru	60
3.5	Reakce BV XIII- $\alpha$ s kyselinou thiobarbiturovou	62
3.5.1	Syntéza kyseliny thiobarbiturové	62
3.5.2	Syntéza derivátu biliverdinu s kyselinou thiobarbiturovou	63
3.6	Kysele katalyzovaná izomerace bilirubinu IX- $\alpha$	65
3.7	Modifikace izomerace bilirubinu IX- $\alpha$ s [ $^{14}\text{C}$ ]formaldehydem	67
3.8	Adice alkylkuprátů na biliverdin dimethylester	68
3.9	Syntéza thiofenol derivátu bilirubinu	70
3.10	Syntéza [ $^3\text{H}$ ]bilirubinu	72
3.11	Syntéza ranarubinu	72
3.12	Stabilitní studie ranarubinu	76
3.13	NMR analýza bilirubinu a ranarubinu	77
3.14	ECD analýza bilirubinu, biliverdinu a ranarubinu	77
3.15	Syntéza fluorovaného derivátu bilirubinu	79
4	ZÁVĚR	81
5	POUŽITÁ LITERATURA	83
	PODĚKOVÁNÍ	88

## ÚVOD

Tato diplomová práce navazuje na výzkumy z oblasti klinické biochemie a výzkumné záměry Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy Všeobecné fakultní nemocnice v Praze v oblasti studia distribuce a přeměny žlučových pigmentů v organismu [1].

Bylo zjištěno velké množství informací o konjugacích bilirubinu v játrech a následná exkrece pigmentu do žluče. Již jsou popsány patologické stavy vznikající při nadměrné produkci volného bilirubinu (hyperbilirubinemie) a důsledky špatného vylučování a konjugace UCB (nekonjugovaný bilirubin) v organismu, což může způsobovat po narození např. neonatální žloutenku [1, 2].

Pro studium volného bilirubinu na *in vitro* a *in vivo* experimentech by bylo velice výhodné označit bilirubin radioaktivním izotopem. Takto označený UCB by bylo snadné detekovat pomocí detektorů radioaktivity. Radioizotopové značení bilirubinu pomocí  $^3\text{H}$  již známe z literatury [3, 4]. Vzhledem k nízké emisi emitujícího záření u tritia nelze tento značený bilirubin vhodně aplikovat na experimenty *in vivo* a *in vitro*.

Dalším známým radioaktivně značeným bilirubinem je  $^{14}\text{C}$ bilirubin, který byl značen pomocí syntézy ze základních prekurzorů mono- a di-pyrrolů. Tato syntéza je několikastupňová a velice časově náročná [5] a proto nemůže být tento postup použit pro syntézu  $^{11}\text{C}$ bilirubinu, jako vhodného kandidáta pro *in vivo* studie na  $\mu\text{-PET}$ . Další metoda přípravy, tentokrát  $^{14}\text{C}$ bilirubin byla provedena pomocí biosyntetického značení z  $[4\text{-}^{14}\text{C}]\text{-}\delta\text{-aminolevulové}$  kyseliny v těle potkana. Tato metoda je velice složitá a náročná na izolaci bilirubinu z potkaní žluči a následná komplikovaná purifikace a prekoncentrace značeného bilirubinu [6] k získání vysoké specifické aktivity prodlužuje časovou náročnost syntézy a proto tento postup není vhodným kandidátem pro přípravu  $^{11}\text{C}$ bilirubinu.

Hlavním cílem této diplomové práce je příprava radioaktivně značeného  $^3\text{H}$ bilirubinu, dále nalezení vhodné strategie pro radioaktivní značení bilirubinu vhodnými pozitronovými zářiči tudíž vypracovat rychlou syntézu s co nejméně syntetickými kroky a následnou minimální purifikací. Další částí práce je syntéza známého derivátu bilirubinu tzv. ranarubinu [7] a srovnání jeho fyzikálně-

chemických vlastností a nekonjugovaným bilirubinem. Ranarubin by mohl být potenciálním derivátem vhodným pro radioaktivní značení a následné biologické studie.

# **1 LITERÁRNÍ ÚVOD**

## **1.1 Nukleární medicína**

Nukleární medicína je obor, který je využíván k terapii a diagnostice chorob, zaváděním radioaktivních látek (radiofarmak) do těla pacienta [8]. První vyšetření bylo provedeno asi před 80ti lety pomocí přirozené vazby radiojódu na štítnou žlázu. Od této doby započal v nukleární medicíně obrovský vývoj v oblasti vyšetřovacích a terapeutických metod. V současné době se v radiobiologii a nukleární medicíně nejčastěji využívá moderních zobrazovacích hybridních technik. První z nich je pozitronová emisní tomografie (PET) ve spojení s výpočetní tomografií (CT), tedy PET/CT.

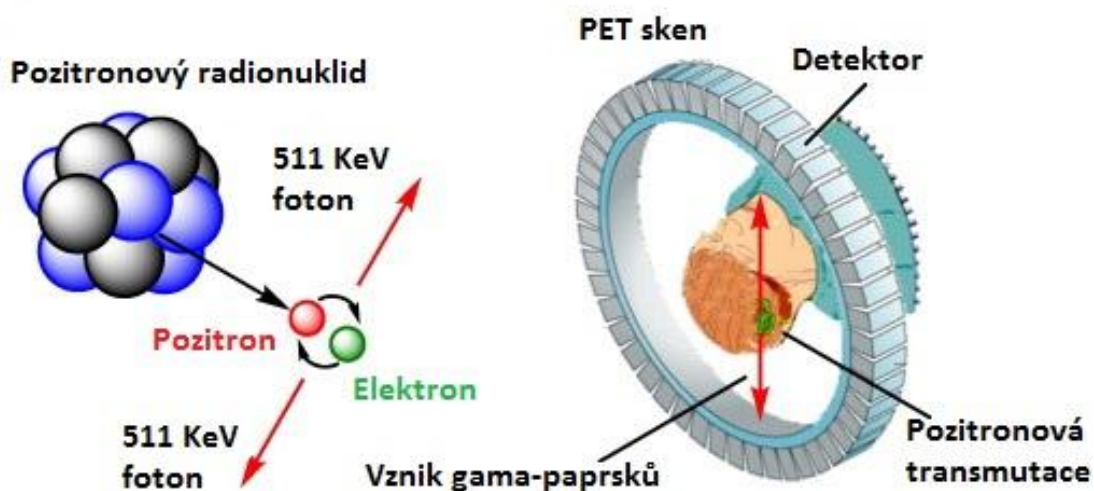
Další nejčastěji využívanou hybridní technikou je jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT) opět ve spojení s CT, tedy SPECT/CT [9].

### **1.1.1 Pozitronová emisní tomografie**

Pozitronová emisní tomografie je neinvazivní funkční metoda s dobrým rozlišením, vysokou citlivostí a přesnou kvantifikací. Důležitou výhodou PET je, že poskytuje kvantitativní informace o fyziologických, biochemických a farmakologických procesech v živém organismu. Vzhledem k tomu, že pozitronicky rozpadající se prvky, mohou být i analoga běžných biologických prvků – uhlík, kyslík či dusík či biologicky aktivní látky. Lze vytvářet analogické chemické struktury biomolekul s těmito zářiči, aniž by došlo ke ztrátě biologické aktivity.

Zájem o PET zobrazovací techniky v medicíně vzrostl především v posledních třiceti letech. PET lze využívat v mnoha oblastech lékařství, především v nukleární kardiologii, onkologii a neurologii [10-15]. Navíc PET hraje důležitou roli v procesu vývoje a hodnocení nových léčiv [16]. PET vyžaduje látku, která je označena radioaktivním pozitronovým radionuklidem. Vývoj nových zobrazovacích metod pro PET vyžaduje několikastupňový přístup zahrnující výběr cílového orgánu, přípravu radionuklidu, organickou syntézu, radioaktivní značení, *in vitro* a *in vivo* hodnocení farmakokinetiky této sloučeniny [17]. Jakmile je radioaktivní indikátor připraven, lze ho podávat pacientovi. PET radionuklid se

v těle rozpadá pozitronickou přeměnou, při které pozitron anihiluje s elektronem za současného vyzáření dvou  $\gamma$ -paprsků, které se od sebe pohybují v úhlu  $180^\circ$  (Obr. 1).



Obr. 1 Schéma anihilace pozitronu a elektronu a PET skenu [18]

Dva scintilační detektory jsou umístěny naproti sobě a snímají současně vzniklé fotony. Energie fotonů je absorbována v detektoru a vyzářena jako viditelné světlo do fotonásobiče, kde je světelný signál převeden na elektrický proud, který je úměrný dopadající energii fotonu. Registrované události jsou rekonstruovány do trojrozměrného obrazu představující rozložení radioaktivního zdroje ve studované tkáni. PET je kvantitativní metoda, která měří regionální koncentraci radioaktivní látky s vysokou přesností na pikomolární úrovni. PET obraz bývá většinou hybridizován s registrací anatomických struktur získaných z jiných zobrazovacích metod, jako jsou výpočetní tomografie (CT) a nukleární magnetická rezonance (NMR)[19]. Kinetické modelování za pomoci PET lze využít ke kvantifikaci hustoty receptorů, enzymatické činnosti, metabolismu a prokrvení [20-22].

### 1.1.1.1 Radionuklidy pro PET

Volba PET radionuklidu je založena na jeho fyzikálně chemických vlastnostech, dostupnosti a délky sledovaného biologického procesu (Tab. 1) [23]. Pro pozitronovou emisní tomografii se využívají zejména radionuklidy deficitní na neutrony. Volba radionuklidu především závisí na jeho poločasu rozpadu, který

musí být dostatečný pro chemickou reakci, která inkorporuje zářič do používané sloučeniny [24].

Tabulka 1 Radionuklidy používané pro PET [18]

Radionuklid	Poločas rozpadu	$E_{\max}(\beta^+)$	$\beta^+$ rozpad [%]	Chemie
$^{76}\text{Br}$	16,2 h	1310 keV	30	Organická
$^{11}\text{C}$	20,3 min	961 keV	100	Rychlá organická
$^{34\text{m}}\text{Cl}$	31,99 min	2,5 MeV	53	Organická
$^{55}\text{Co}$	17,6 h	1,5 MeV	77	Chelatační
$^{62}\text{Cu}$	9,8 min	2910 keV	98	Chelatační
$^{64}\text{Cu}$	12,8 min	656 keV	19	Chelatační
$^{18}\text{F}$	110 min	634 keV	97	Rychlá organická
$^{52}\text{Fe}$	8,2 h	800 keV	57	Chelatační
$^{66}\text{Ga}$	9,5 h	4153 keV	56	Chelatační
$^{68}\text{Ga}$	67,6 min	1899 keV	89	Chelatační
$^{124}\text{I}$	4,17 d	2100 keV	23	Organická
$^{52}\text{Mn}$	134,2 h	0,58 MeV	29	Chelatační
$^{13}\text{N}$	9,97 min	1190 keV	100	Rychlá organická
$^{15}\text{O}$	2,1 min	1732 keV	100	Rychlá online v plynné fázi
$^{82}\text{Rb}$	76 s	3150 KeV	95	Chelatační
$^{94\text{m}}\text{Tc}$	52,5 min	2470 KeV	72	Chelatační
$^{86}\text{Y}$	14,7 h	3150 KeV	34	Chelatační
$^{89}\text{Zr}$	78,4 h	897 KeV	23	Chelatační

### 1.1.1.2 Radiochemie s PET-izotopy

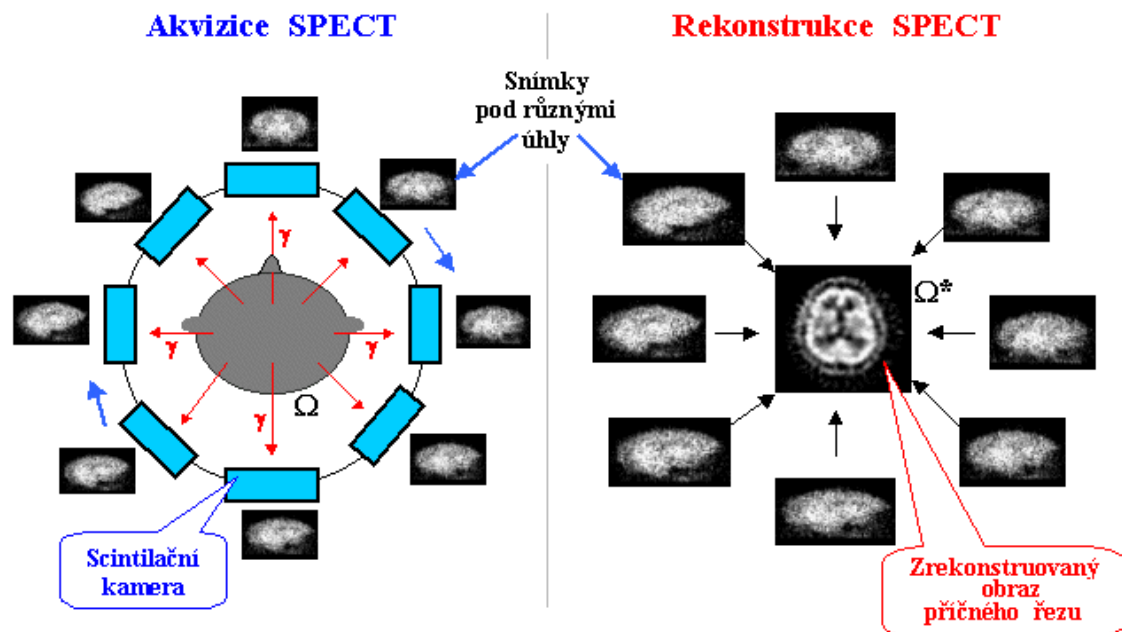
Radioznačení je chemická reakce, během které se radionuklid zavede do požadované molekuly. Pro PET chemii, která se zabývá vysokoenergetickými izotopy s krátkým poločasem rozpadu je priorita v bezpečnosti a rychlosti reakce. Aby se zabránilo vysokým dávkám ozáření radiochemika, provádí se značení

v syntézním modulu, který je umístěn za centrálním stíněním. Dalším velkým problémem je vývoj rychlých syntetických postupů pro zavádění krátkodobých pozitronických zářičů do požadované molekuly. Aby došlo k získání kvalitního PET skenu, musí být cílová značená látka syntetizována, čištěna, analyzována a případně aplikována v několika poločasech daného radionuklidu [24-26].

### **1.1.2 Jednofotonová emisní výpočetní tomografie**

Forma využití kombinace gamakamery a počítače je tzv. emisní výpočetní tomografie označovaná také jako jednofotonová (SPECT). Je to vyšetření, které umožňuje zobrazit jednotlivé libovolně zvolené řezy nebo vrstvy vyšetřovaného orgánu [27].

Princip vyšetření je nahromadění vhodného radiofarmaka v orgánu, které v něm zůstane beze změny po dostatečně dlouhou dobu. Vyšetřovaný pacient se uloží na speciální posuvný stůl, kolem kterého se pohybuje detektor kamery tak, že střed kružnice leží v podélné ose nemocného. Detektor je umístěn nad pacienta v úrovni vyšetřovaného orgánu. Gamakamera vytvoří emisní snímek a poté krouží kolem exponovaného orgánu po částech a vytváří jednotlivé snímky. Každý snímek je uložen do paměti počítače a dojde k vytvoření zkomprimovaného obrazu ze všech získaných skenů (Obr. 2) [28].



Obr. 2 Princip snímání scintigrafických snímků vyšetřovaného objektu  $\Omega$  pod různými úhly rotující kamerou SPECT a jejich počítačové rekonstrukce do výsledného obrazu  $\Omega^*$  příčného řezu tímto objektem [29].

### 1.1.2.1 Radionuklidy pro SPECT

Radionuklidy pro jednofotonovou emisní výpočetní tomografii musí splňovat určitá kritéria. Vzhledem k tomu, že při této diagnostické zobrazovací technice je využíván princip emise  $\gamma$ -kvanta, vznikající při interní konverzi nebo elektronovém záchytu je požadovaná energie vznikajících fotonů v intervalu od 100 do 300 keV, protože v tomto energetickém oboru nejlépe pracuje systém využívající NaI detekční scintilaci (Tab. 2) [30-32].

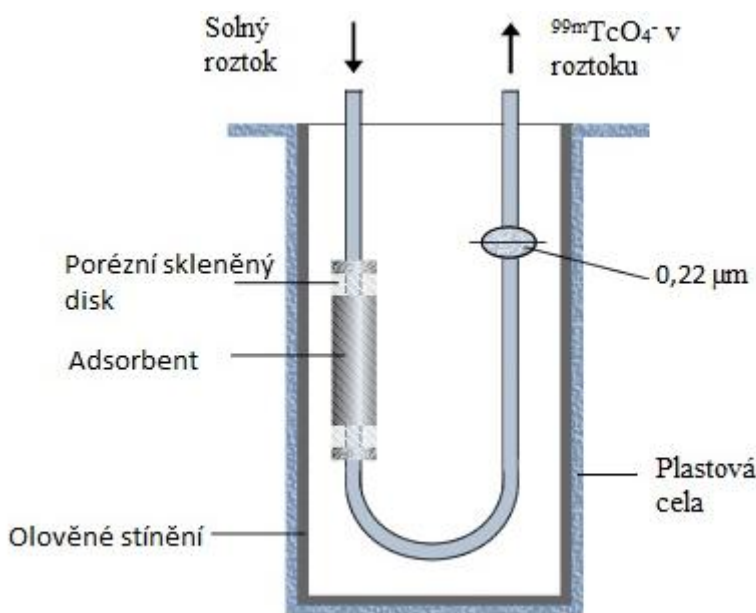
Radionuklidy pro SPECT se vyrábějí v cyklotronech, jaderných reaktorech, nebo se získávají jako tzv. dceřiné radionuklidy z radionuklidových generátorů. K přípravě radiofarmak pro lékařské účely se používají pouze umělé radionuklidy. Získávají se různými jadernými reakcemi, při kterých se mění stavba výchozího atomového jádra za vzniku jiného jádra, radioaktivního.

Generátor radionuklidu je zařízení obsahující dva geneticky příbuzné radionuklidy. Z něho je možné jednoduše získat v čisté beznosičové formě požadovaný radionuklid s krátkým poločasem přeměny (tzv. dceřiný), který



v generátoru vzniká radioaktivní přeměnou radionuklidu s delším poločasem přeměny (tzv. mateřský). Výroba generátorů (chromatografického typu) tvoří dnes základní nabídku hromadně vyráběných radiofarmak. Generátory umožňují přípravu radiofarmak značených krátkodobými radionuklidy přímo na diagnostických pracovištích nukleární medicíny.

Podle konstrukce se generátory rozlišují na chromatografické, extrakční, sublimační. Nejrozšířenější, s nejmenšími rozměry a nejméně náročný na obsluhu je chromatografický typ. Příkladem generátoru tohoto typu je generátor  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  (Obr. 3). Základem takového generátoru je kolona obsahující vysoce čistý oxid hlinitý s adsorbovaným mateřským radionuklidem  $^{99}\text{Mo}$  umístěná v olověném stínění. Molybden ve formě molybdenanu amonného se zakotví při výrobě generátoru na koloně, kde se přeměňuje s poločasem 66 hodin na metastabilní technecium  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Technecium se z kolony vymývá elucí sterilním izotonickým roztokem chloridu sodného do stíněné sterilní evakuované lahvičky. Slabě vázané technecium se z kolony vymyje (ve formě technecistanu sodného), molybdenan pevně vázaný na  $\text{Al}_2\text{O}_3$  zůstává v koloně a poskytuje přeměnou další technecium  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Generátor je použitelný dva týdny [33].



Obr. 3 Radionuklidový generátor  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  [34]

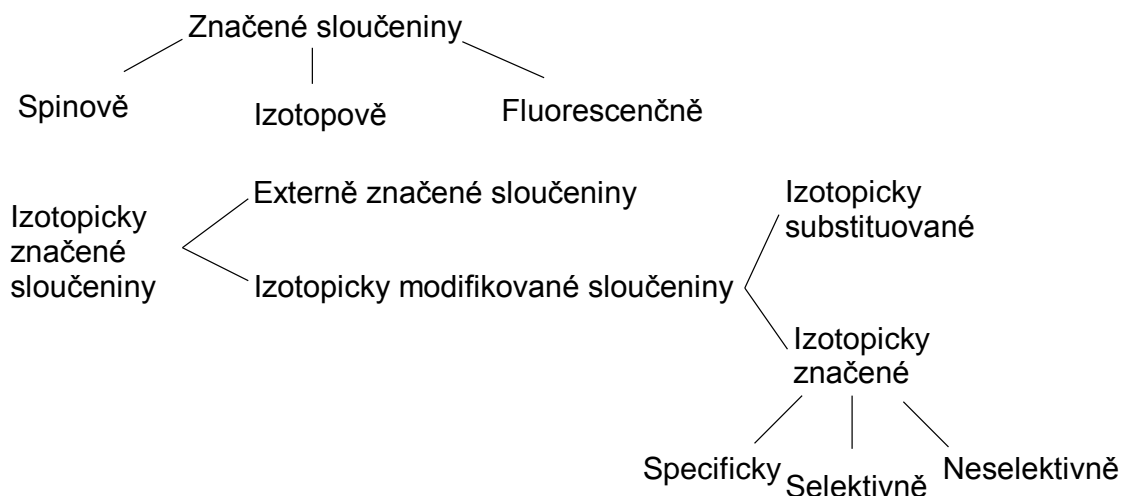
Tabulka 2 Radionuklidy používané pro SPECT [35, 36]

Radionuklid	Poločas rozpadu	Hlavní E ( $\gamma$ )	Výroba	Chemická forma
$^{51}\text{Cr}$	28 d	320 keV	Reaktor	Cr-HSA, $\text{Na}_2\text{CrO}_4$
$^{59}\text{Fe}$	45 d	1095, 1292 keV	Reaktor	Citrát železitý
$^{64}\text{Cu}$	12,9 h	511 keV	Reaktor	$\text{CuCl}_2$ , $\text{Cu}(\text{OAc})_2$
$^{67}\text{Ga}$	3,2 d	93 keV	Cyklotron	Citrát galitý
$^{87\text{m}}\text{Sr}$	2,8 h	388 keV	Generátor ( $^{87}\text{Y}$ )	$\text{SrCl}_2$
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 h	141 keV	Generátor ( $^{99}\text{Mo}$ )	$\text{NaTcO}_4$ , komplexy
$^{111}\text{In}$	2,8 d	247, 173 keV	Cyklotron	$\text{InCl}_3$ , citrát inditý
$^{113\text{m}}\text{In}$	1,6 h	395 keV	Generátor ( $^{113}\text{Sn}$ )	In-EDTA
$^{123}\text{I}$	12 h	159 keV	Cyklotron	I-organické látky
$^{131}\text{I}$	8 d	364 keV	Reaktor	I-organické látky
$^{169}\text{Yb}$	32 d	63, 107, 198 keV	Reaktor	Yb-EDTA
$^{198}\text{Au}$	2,7 d	412 keV	Reaktor	Au-koloid
$^{201}\text{Tl}$	3,1 d	167 keV	Cyklotron	$\text{TlCl}$
$^{97}\text{Ru}$	69,2 h	216, 325 keV	Cyklotron	Ru-DTPA
$^{81\text{m}}\text{Kr}$	13,3 s	191 keV	Generátor ( $^{81}\text{Rb}$ )	Plyn

## 1.2 Značené sloučeniny

Značené sloučeniny jsou takové látky, které lze od ostatních molekul odlišit nějakou fyzikálně-chemickou vlastností, která je jednoduše analyticky detekovatelná. Důležitým aspektem značených sloučenin je skutečnost, aby se fyzikálně-chemické vlastnosti takové látky výrazně nelišily od sloučeniny neznačené. Míru rozdílných vlastností určuje typ chystaného experimentu. Základním a osvědčeným postupem značení sloučenin je obvykle vnášení dobře detekovatelné skupiny nebo atomu do zkoumané molekuly, případně nahrazení atomu v původní molekule dobře detekovatelným analogem. Podle typu značení,

lze takovéto sloučeniny rozdělit na několik skupin (Obr. 4) [37].



Obr. 4 Schéma rozdělení značených sloučenin [37]

### 1.2.1 Izotopy používané v organických a biochemických experimentech

Pro jednotlivé značení sloučenin pro biochemické případně biologické experimenty je stěžejní výběr radionuklidu. Nejvíce používanými radioaktivními izotopy pro značení organických sloučenin jsou v současné době slabé beta zářiče, jako je například  $^{14}\text{C}$  s dlouhým poločasem rozpadu 5730 let. Dalším typickým velmi slabým beta zářičem je  $^3\text{H}$  s poločasem rozpadu 12,3 let. Tyto dva radionuklidy lze bez problému použít pro dlouhodobější experimentální studie. Dalším velice častým radionuklidem používaným především v biochemických a molekulárně biologických experimentech je  $^{32}\text{P}$  s poločasem rozpadu 14,3 dne. Tento izotop je silným beta zářičem s maximální energií 1,71 MeV. Seznam hlavních radioaktivních izotopů používaných pro značení organických a biomolekul viz Tab. 3 [38].

Tabulka 3 Seznam používaných radionuklidů pro značené sloučeniny a jejich základní charakteristika [38, 39]

Izotop	Přeměna	Poločas rozpadu	Maximální měrná aktivita (TBq/mmol)
<sup>3</sup> H	β <sup>-</sup>	12,3 let	0,74
<sup>14</sup> C	β <sup>-</sup>	5730 let	2,29 × 10 <sup>-3</sup>
<sup>35</sup> S	β <sup>-</sup>	87,4 dne	537
<sup>32</sup> P	β <sup>-</sup>	14,3 dne	337
<sup>33</sup> P	β <sup>-</sup>	25,2 dne	192
<sup>36</sup> Cl	β <sup>-</sup>	301000 let	0,0439
<sup>75</sup> Se	EZ	119,6 dne	40,8
<sup>125</sup> I	EZ	59,4 dne	80,5
<sup>131</sup> I	β <sup>-</sup> , γ	8,04 dne	601
<sup>18</sup> F	β <sup>+</sup>	109,7 min	63400

## 1.2.2 Přípravy sloučenin značených radioizotopy

### 1.2.2.1 Standardní metody

Standardní metody pro přípravu izotopicky značených sloučenin vychází z klasických metod organické syntézy. Základním rozdílem jsou přechody od klasických miligramových navážek u organické syntézy na nevážitelná množství radionuklidů a také je velice důležité dodržování veškerých bezpečnostních pouček při práci a nakládání s radioaktivními izotopy. Základním problémem při syntéze s radionuklidy je nedodržení stechiometrických reakčních poměrů díky nevážitelným množství radionuklidu. Je velice důležité předpřipravit reakčním systémem syntézou tzv. „za studena“ bez přídavku radionuklidu [40].

### 1.2.2.2 Biosyntetické metody

Biosyntetické metody se využívají především u takových značení, kde je potřeba označit biomolekuly případně makromolekuly. Tyto metody lze provádět ve dvou systémech. Prvním systémem jsou metody *in vitro*, u kterých se využívají tkáňové kultury nebo mikroorganismy, také lze využít rostliny pro přípravu sekundárních metabolitů, jako jsou např. značené alkaloidy. Dále lze využít také enzymatických metod k transformaci, výstavbě či vnesení určitého radionuklidu do molekuly. Dalším systémem jsou metody *in vivo*, které využívají k biosyntetickému značení živý organismus. Živý organismus se dostane do kontaktu s radioaktivní sloučeninou, kterou postupně přemění svým metabolismem na radioaktivní metabolit, který je výslednou značenou sloučeninou [41].

### 1.2.2.3 Izotopová výměna

Tato metoda je založena na zavedení radioizotopu do molekuly pomocí nahrazování již přítomného neaktivního stejného atomu, jako je atom radioaktivní. Tato metoda je typická pro nahrazování vodíkových atomů tritiem a také nahrazování halogenovaných organických sloučenin radioaktivními atomy některého halogenu. Atomy vodíku lze snadno nahradit tritiem pokud je vázán na kyslíku, síře, dusíku nebo fosforu. Tato izotopová výměna probíhá velice snadno v přítomnosti tritiované vody.

Nevýhodou takto vzniklých sloučenin je jejich rychlá zpětná reakce v protickém prostředí, z čehož vyplývá, že není možné připravit dokonale izotopicky čisté sloučeniny takovouto metodou. Pokud se ovšem podaří provést izotopovou výměnu vodíku vázaného na uhlík, tedy vazba C-H, dochází ke tvorbě stabilní vazby mezi radioizotopem a příslušnou sloučeninou. Takovéto reakce se nejčastěji provádějí s tritiovaným rozpouštědlem, kterým je nejčastěji voda, za přítomnosti acidobazických katalyzátorů nebo plynným tritiem [41].

Reakce s plynným tritiem je dobře proveditelná mechanismem katalytické hydrogenace. Nejčastějšími katalyzátory jsou paladiové částice na uhlí, platinové katalyzátory nebo homogenní hydrogenační katalyzátory Wilkinsonova typu. Důležitým katalyzátorem pro izotopovou výměnu s tritiem jsou sloučeniny iridia.

Nejčastěji byly využívány komplexy iridium-bis-trifenylfosfinové, často se využívá např.  $[(cod)Ir(py)(Pcy_3)]BF_4$  [42-44].

#### **1.2.2.4 Externě značené sloučeniny radionuklidem**

Tato metoda využívá zavedení radioaktivního izotopu ve formě atomu nebo určité modifikující skupiny. Výsledná značená molekula není ovšem totožná s původní studovanou molekulou a nemusí tudíž vykazovat stejné fyzikálně-chemické nebo biologické vlastnosti.

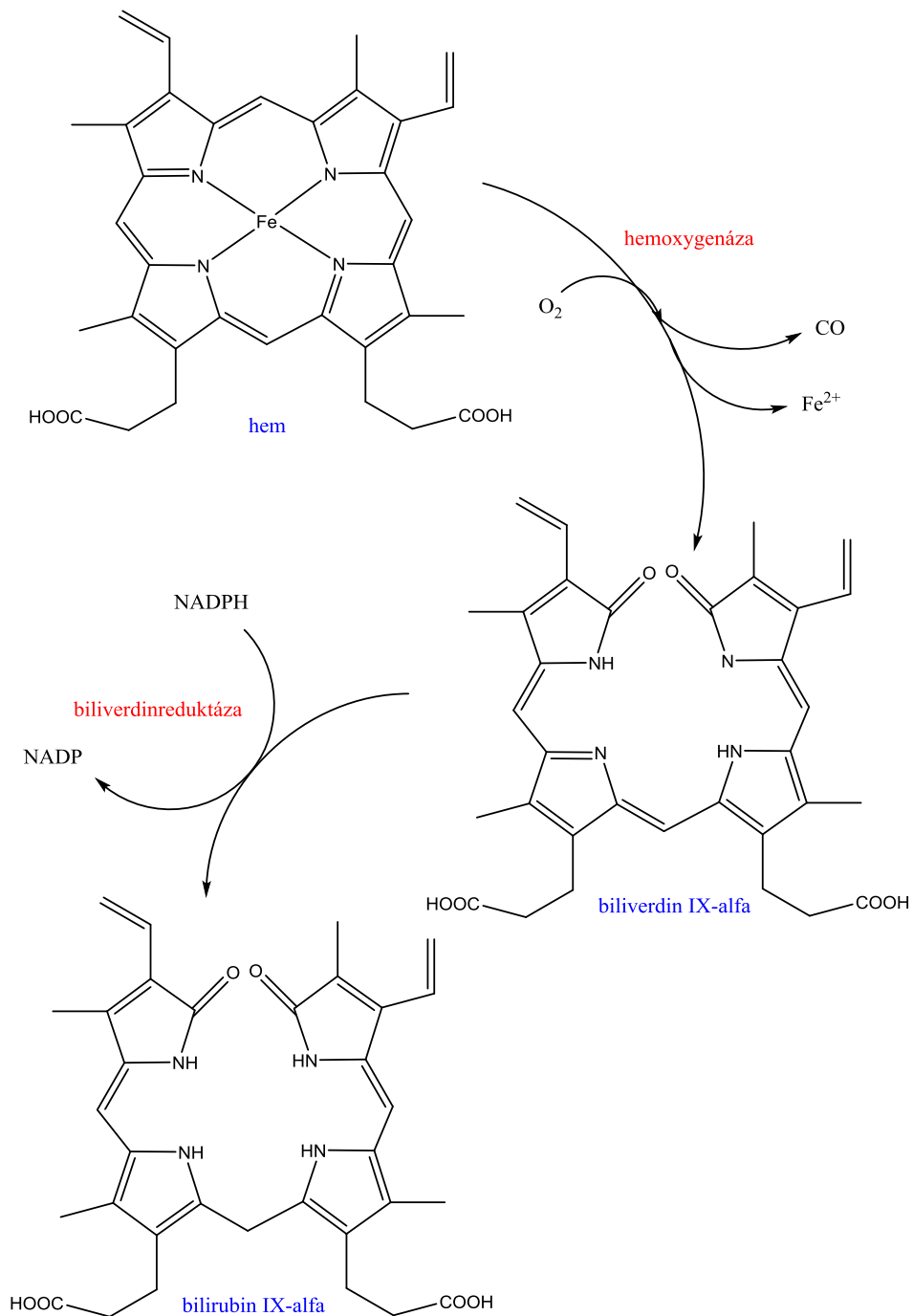
Je vhodné při použití těchto metod nejprve otestovat rozdílnost vlastností derivatizované sloučeniny od nederivatizované a následně provádět radioaktivní značení. Velice častým případem externího značení radionuklidem je použití  $^{125}I$  nebo  $^{131}I$ . Jedním z nejpoužívanějších činidel vnášejícím do molekuly radioaktivní jód je Bolton-Hunterovo činidlo [45].

Velmi častým externím značením je pomocí radioizotopu jódu jodací na aromatická jádra tyrosinu, což je použitelné především pro značení peptidů nebo celých proteinů. Tuto metodu lze využít také pro značení jakýchkoliv molekul obsahujících aromatické jádro. Zavedení jódu do molekuly lze popsat mechanismem elektrofilní substituce aromatických sloučenin. Radioizotopy jódu jsou dodávány ve formě bazických jodidů, který musí být v prvním kroku převeden na jodový elektrofil například oxidací jodidu chloraminem [46-49], jodogenem [50], elektrolyticky [51], či enzymově [52]. Všechny tyto reakce jsou poměrně rychlé a následně po nich dochází k separaci produktů často pomocí gelové filtrace v LC nebo HPLC provedení. Velice často se také používá pro radiojodace proteinů činidla typu N-chloro-jodtyramin [53], diazotovaný anilín nebo fluorescein isothiokyanát [54].

### 1.3 Žlučové pigmenty

Žlučové pigmenty jsou jednou z majoritních složek obsažených ve žluči. Jsou degradačními produkty katabolické dráhy hemu (Obr. 5). Buňky retikuloendoteliálního systému kostní dřeně, sleziny a jater jsou obzvláště uzpůsobeny pro degradaci hemu, avšak také jiné buňky disponují enzymy, jejichž působením vzniká bilirubin. Za normálních podmínek je přibližně 80 % celkového bilirubinu produkováno odbouráváním hemu, prostetické skupiny hemoglobinu, který je uvolňován do cirkulace degradací stárnoucích červených krvinek [55].

Pro degradaci červenohnědého cyklického tetrapyrrolového porfyrinu s centrálně navázaným atomem železa hemu je zapotřebí mikrosomálního enzymu hemoxygenázy, který přetváří hem na biliverdin IX- $\alpha$ . Tento enzym katalyzuje oxidativní štěpení  $\alpha$ -methinového můstku za produkce oxidu uhelnatého [56], který difunduje z buněk a je transportován krví do plic, kterými je vyloučen. Poté dochází k redukci centrálního methinové skupiny biliverdinu IX- $\alpha$  biliverdin reduktasou za vzniku bilirubinu IX- $\alpha$  (Obr. 5) [56].



Obr. 5 Schéma katabolické přeměny hemu na bilirubin IX- $\alpha$  [56]

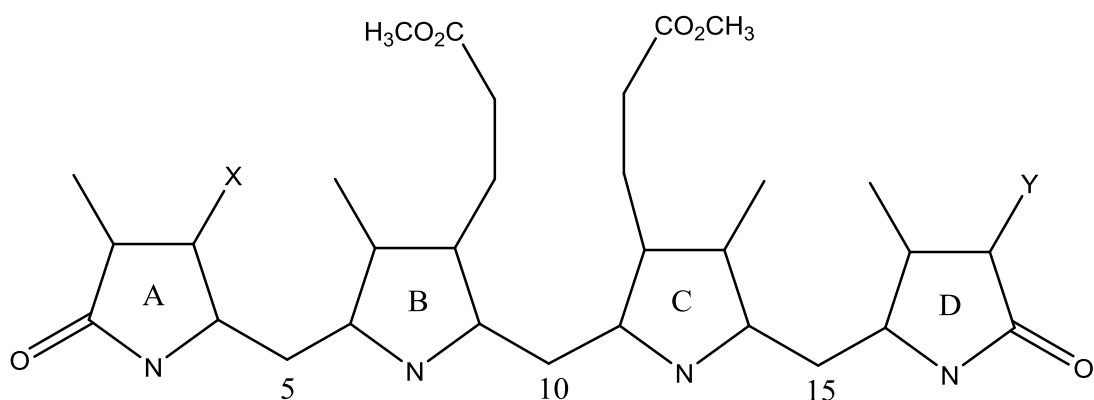
U nižších živočichů, jako jsou obojživelníci, plazi a ptáci, nedochází ke tvorbě bilirubinu, ale vylučován je biliverdin, ve vodě rozpustný netoxický prekurzor bilirubinu [57]. Důvodem je zřejmě vývoj placenty, neboť polární biliverdin



neprostupuje placentární bariéru, zatímco nekonjugovaný bilirubin ano, čímž se zabraňuje akumulaci degračních produktů hemu v těle plodu [58].

### 1.3.1 Nomenklatura žlučových pigmentů

Základní struktura žlučových pigmentů vychází z lineární terapyrrolové struktury (Obr. 6).



Obr. 6 Základní vzorec pro nomenklaturu žlučových pigmentů [59]

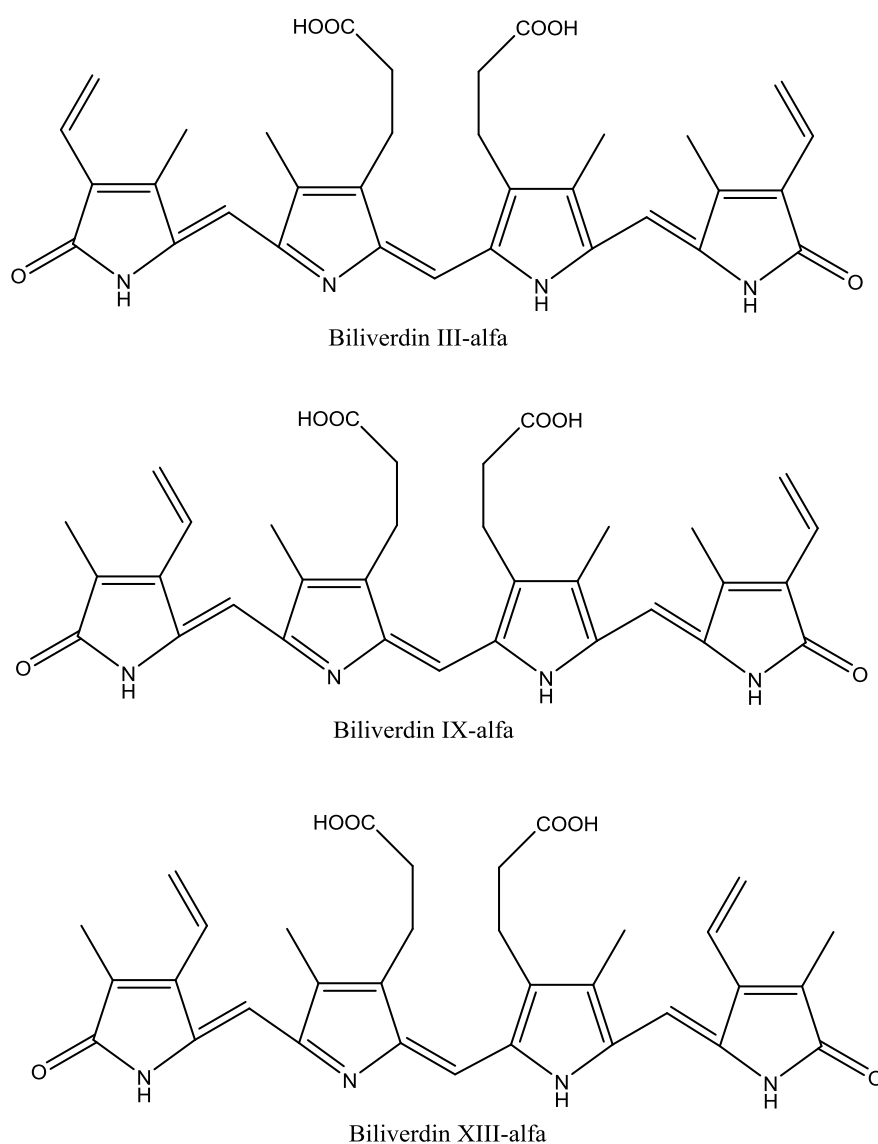
Na pyrrolech A je navázán (X) vinil, ethyl nebo ethyliden. Na pyrrol D je navázán (Y) ethyl nebo vinyl. Celá nomenklatura s triviálními názvy pigmentů je uvedena v tabulce 4.

Tabulka 4 Seznam a nomenklatura pigmentů [59]

Triviální název	IUPAC-ICB semi-systematický název
Bilirubin III- $\alpha$	[3-methyl]-[2-vinyl]-bilirubin
Bilirubin IX- $\alpha$	Bilirubin
Bilirubin XIII- $\alpha$	[18-methyl]-[17-vinyl]-bilirubin
Biliverdin III- $\alpha$	[3-methyl]-[2-vinyl]-biliverdin
Biliverdin IX- $\alpha$	Biliverdin
Biliverdin XIII- $\alpha$	[18-methyl]-[17-vinyl]-biliverdin
Dihydrobiliverdin III- $\alpha$	[2-ethyl]-[3-methyl]-biliverdin
A-dihydrobiliverdin IX- $\alpha$	[3-ethyl]-biliverdin
D-dihydrobiliverdin IX- $\alpha$	[18-ethyl]-biliverdin
Dihydrobiliverdin XIII- $\alpha$	[17-ethyl]-[18-methyl]-biliverdin
Mesobiliverdin III- $\alpha$	[2-ethyl]-[3-methyl]-mesobiliverdin
Mesobiliverdin IX- $\alpha$	Mesobiliverdin
Mesobiliverdin XIII- $\alpha$	[17-ethyl]-[18-methyl]-mesobiliverdin
Biliviolin III- $\alpha$	[3-methyl]-[2-vinyl]-15,16-dihydrobiliverdin
Biliviolin IX- $\alpha$	15,16-dihydrobiliverdin
Exo-dihydrobiliviolin III- $\alpha$	[2-ethyl]-[3-methyl]-4,5-dihydrobiliverdin
Endo-dihydrobiliviolin III- $\alpha$	[2-ethyl]-[3-methyl]-15,16-dihydrobiliverdin
A-dihydroisobiliviolin IX- $\alpha$	[3-ethyl]-4,5-dihydrobiliverdin
A-dihydrobiliviolin IX- $\alpha$	[3-ethyl]-15,16-dihydrobiliverdin
D-dihydrobiliviolin IX- $\alpha$	[18-ethyl]-15,16-dihydrobiliverdin
Exo-dihydrobiliviolin XIII- $\alpha$	[17-ethyl]-[18-methyl]-15,16-dihydrobiliverdin
Mesobiliviolin III- $\alpha$	[2-ethyl]-[3-methyl]-4,5-dihydromesobiliverdin
Isomesobiliviolin IX- $\alpha$	4,5-dihydromesobiliverdin
Mesobiliviolin IX- $\alpha$	15,16-dihydromesobiliverdin
Mesobiliviolin XIII- $\alpha$	[17-ethyl]-[18-methyl]-4,5-dihydromesobiliverdin
R*,R*-ethyliden-dihydroisobiliviolin IX- $\alpha$	(2R*,4R*)-[3-ethyliden]-2,3,4,5-tetrahydrobiliverdin
R*,R*-ethyliden-dihydroisobiliviolin XIII- $\alpha$	(16R*,18R*)-[17-ethyliden]-[18-methyl]-15,16,17,18-tetrahydrobiliverdin
R*,S*-ethyliden-dihydroisobiliviolin IX- $\alpha$	(2R*,4S*)-[3-ethyliden]-2,3,4,5-tetrahydrobiliverdin
R*,S*-ethyliden-dihydroisobiliviolin XIII- $\alpha$	(16R*,18S*)-[17-ethyliden]-[18-methyl]-15,16,17,18-tetrahydrobiliverdin
R*,R*-ethyliden-isomesobiliviolin IX- $\alpha$	(2R*,4R*)-[3-ethyliden]-2,3,4,5-tetrahydromesobiliverdin
R*,R*-ethyliden-dihydroisobiliviolin XIII- $\alpha$	(16R*,18R*)-[17-ethyliden]-[18-methyl]-15,16,17,18-tetrahydromesobiliverdin
R*,S*-ethyliden-dihydroisobiliviolin IX- $\alpha$	(2R*,4S*)-[3-ethyliden]-2,3,4,5-tetrahydromesobiliverdin
R*,S*-ethyliden-dihydroisobiliviolin XIII- $\alpha$	(16R*,18S*)-[17-ethyliden]-[18-methyl]-15,16,17,18-tetrahydromesobiliverdin

### 1.3.2 Biliverdin

Biliverdin je zelený tetrapyrrolový žlučový pigment, který je katabolickým produktem degradace hemu. Tento pigment je zodpovědný za nazelenalou barvu viditelnou u modřin [60]. Biliverdin se vyskytuje ve třech izomerních formách biliverdin III- $\alpha$ , IX- $\alpha$ , XIII- $\alpha$  (Obr. 7) [61].



Obr. 7 Strukturální vzorce biliverdinu III, IX, XIII- $\alpha$  [61]

Biliverdin byl nalezen ve zvýšené koncentraci v krvi lidí, kteří trpí jaterními chorobami. Jedním z takových chorob je žloutenka, která je způsobena hromaděním biliverdinu a bilirubinu v oběhovém systému a tkání, žloutenka kůže

a bělma očí jsou charakteristické selháním jater [62].

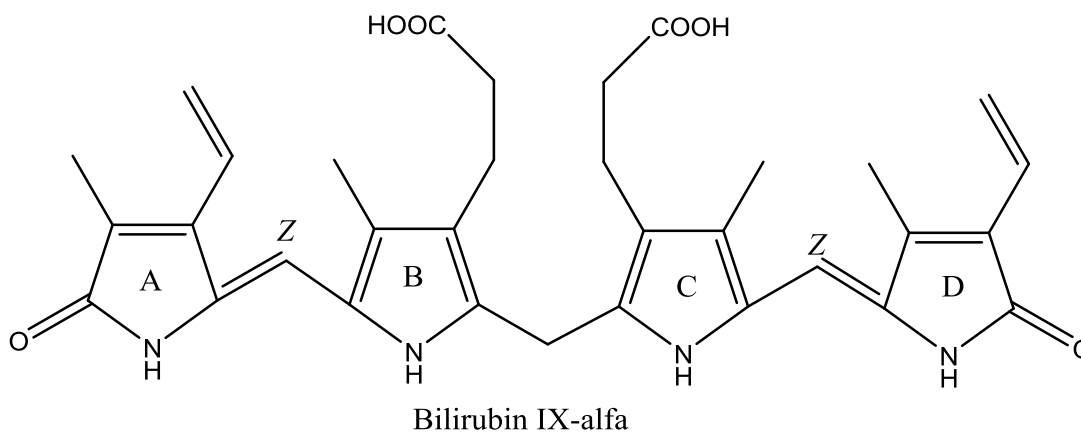
Biliverdin má přirozeně význam antimutagenní a antioxidační a proto plní užitečnou fyziologickou funkci. Bylo prokázáno, že má biliverdin vlastnost působit inhibičně na účinky polycyklických aromatických uhlovodíků (PCB), heterocyklických aminů a stopových prvků. Všechny tyto látky působí mutagenně. Některé studie dokazují, že lidé s vyššími koncentracemi biliverdinu a bilirubinu v těle mají nižší výskyt rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění [63, 64].

### 1.3.3 Bilirubin

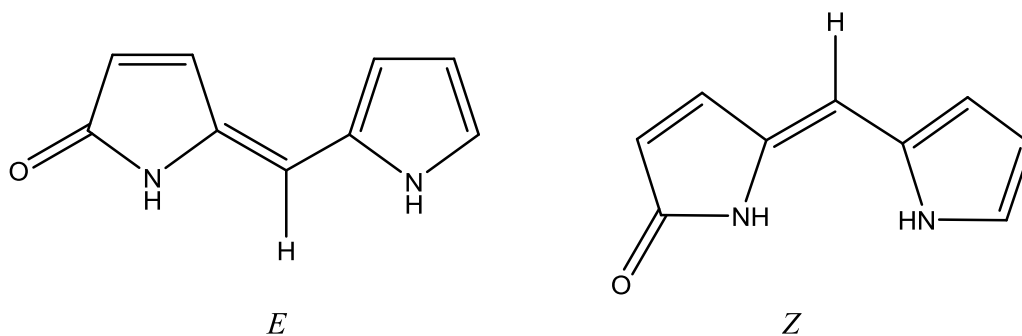
#### 1.3.3.1 Struktura bilirubinu

Bilirubin je v pevném stavu oranžovo červená látka, která může být vyseparovaná ze žlučových kamenů, je to nejznámější přírodní lineární tetrapyrrol. U savců je velice důležitým produktem degradace hemoglobinu (katabolismu hemu), a hladiny této látky a její diglukuronidy jsou důležitým nástrojem medicínské diagnostiky v klinické praxi (např. diagnostika žloutenky).

Celková chemická struktura bilirubinu (obr. 8) byla předmětem sporu mnoho let [65]. Nicméně stereochemie (*E* nebo *Z*, obrázek 9) kolem atomů C5 a C15 nebyla determinována a překvapivě nevzbudila zájem. V publikacích před rokem 1978 struktury *E* a *Z* nemají komentáře. Nicméně tautomerní formu (laktamu proti laktimu) byly intenzivně studovány již v historii.

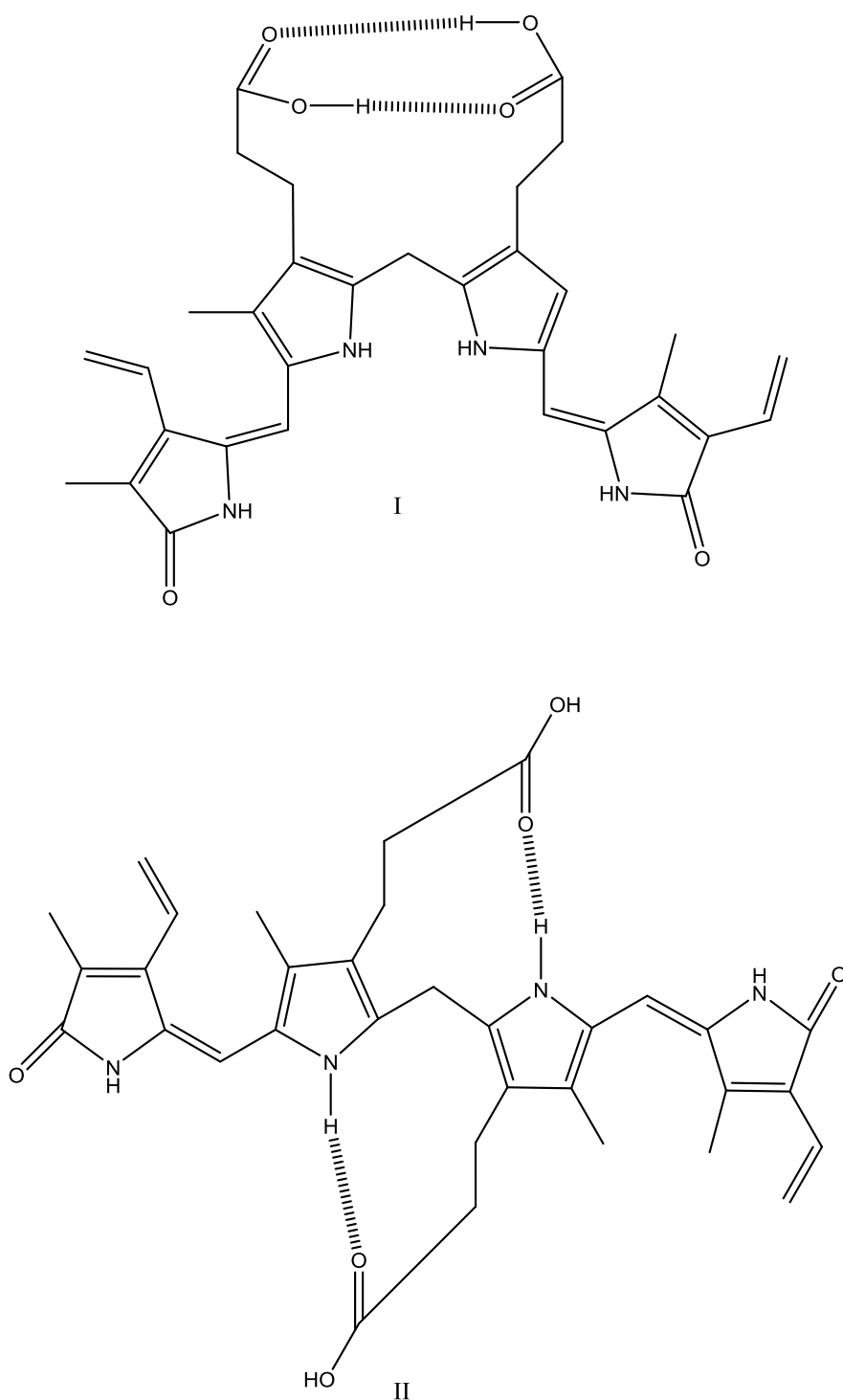


Obr. 8 Strukturální vzorec 4Z,15Z-bilirubin IX- $\alpha$  [65]



Obr. 9 *E* a *Z* konfigurace pyromethenového skeletu [65]

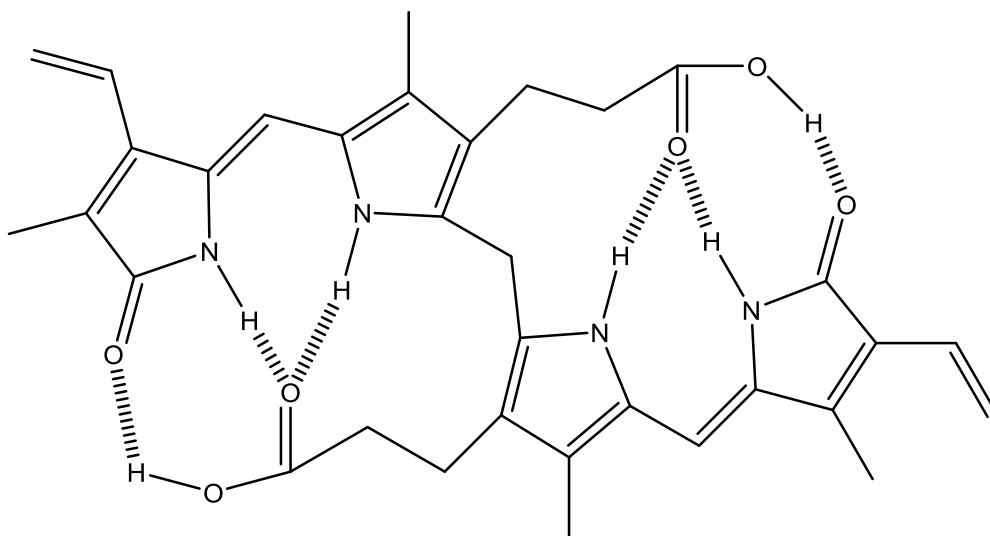
Profesor Fisher a jeho kolegové kreslili kruhy ve formě laktimu, zatímco některé důkazy [66] potvrzovali teorii převahy formy se dvěma laktamovými kruhy (obr. 9) [67]. Přestože je bilirubin nazýván jako „lineární tetrapyrrol“ a často je znázorňován jako na obrázku 8, je tato struktura nepravděpodobná. Pokud dojde ke srovnání stability bilirubinu s bilirubinem dimethylesterem, je zřejmé, že v molekule bilirubinu dochází ke stabilizaci pomocí intramolekulárních vodíkových vazeb mezi karboxyly a imino skupinami v pyrrolech [68]. Tato koncepce byla poté potvrzena na základě spektroskopických důkazů a byly navrženy alternativní struktury (obr. 10) [69].



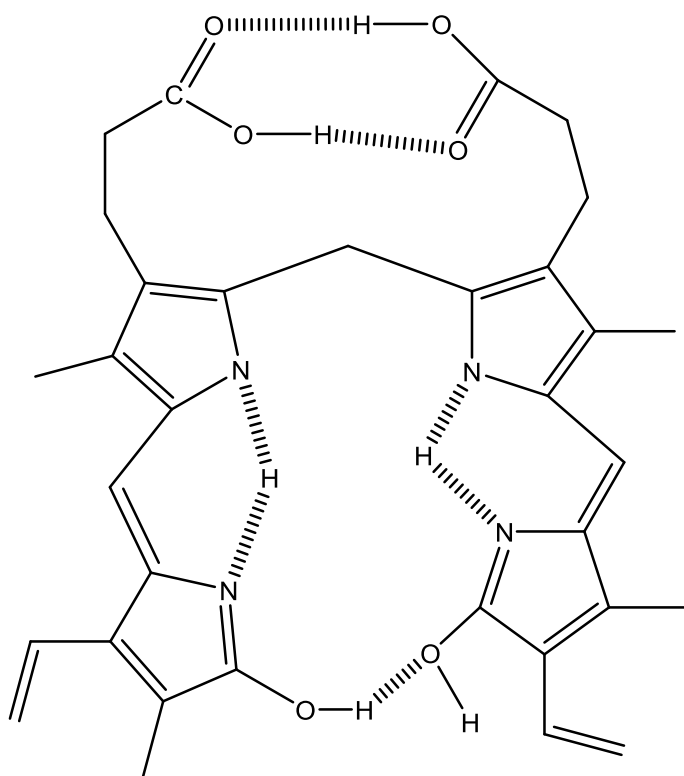
Obr. 10 Tautomerní formy bilirubinu [69]

Další vývoj myšlenek o struktuře bilirubinu založený na elementárních a hmotnostně spektrometrických analýzách vedly k návrhu konformací (obr. 11) [70]. Na druhé straně byla interpretována spektroskopická data, která preferují

makrocyclickou konformaci (obr.12) [66], ačkoliv byly důkazy pro tuto teorii sporné.

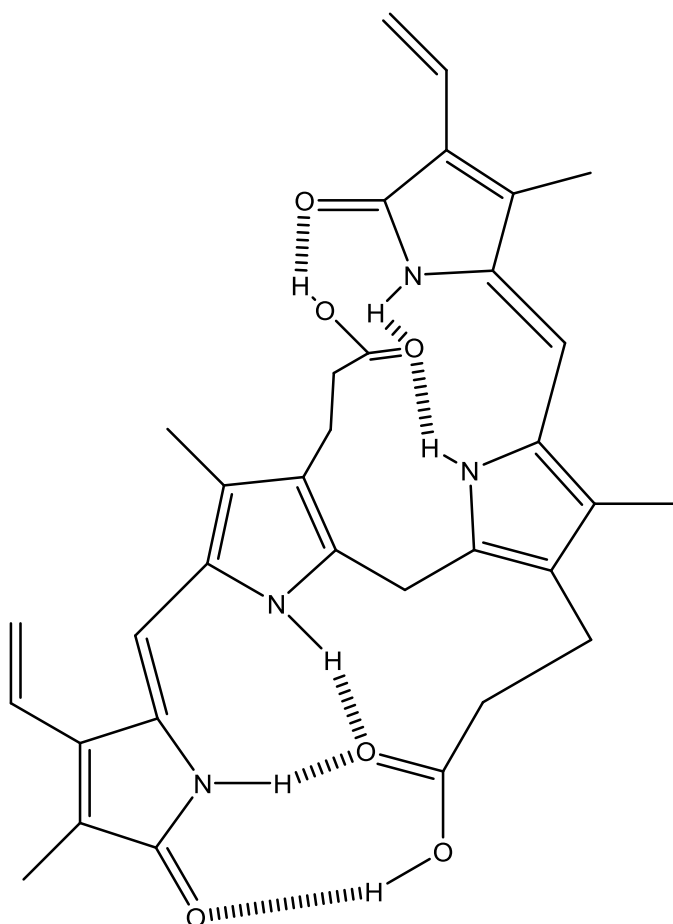


Obr. 11 Předpokládaná struktura bilirubinu [70]



Obr. 12 Navrhovaná struktura ze spektroskopických dat [66]

V současné době jsou známy všechny fyzikálně-chemické vlastnosti bilirubinu. Nekonjugovaný bilirubin (UCB) je lineární tetrapyrolový pigment s charakterem nepolární sloučeniny. Běžně v lidském organismu se vyskytující bilirubin je označován jako 4Z,15Z-bilirubin IX- $\alpha$ , což vyjadřuje, že je přirozeně tvořen z izomeru IX protoporphyrinu, který je součástí hemu a hemoproteinů. Tato struktura a konfigurace umožňují vznik vodíkových vazeb mezi postranním řetězcem tvořeným kyselinou propionovou na kruhu C a polárními skupinami na kruhu A a mezi postranním řetězcem tvořeným kyselinou propionovou na kruhu B a polárními skupinami na kruhu D (obr. 13). Tato významná konformační změna způsobená intramolekulovými vodíkovými vazbami způsobuje stínění polárních skupin a zároveň vytváří stabilní a rigidní strukturu molekuly. Z těchto vlastností vyplývá hydrofobní charakter bilirubinu a vysvětluje, proč musí být bilirubin konjugován v játrech s kyselinou glukuronovou, aby mohl být vyloučen z těla [1].

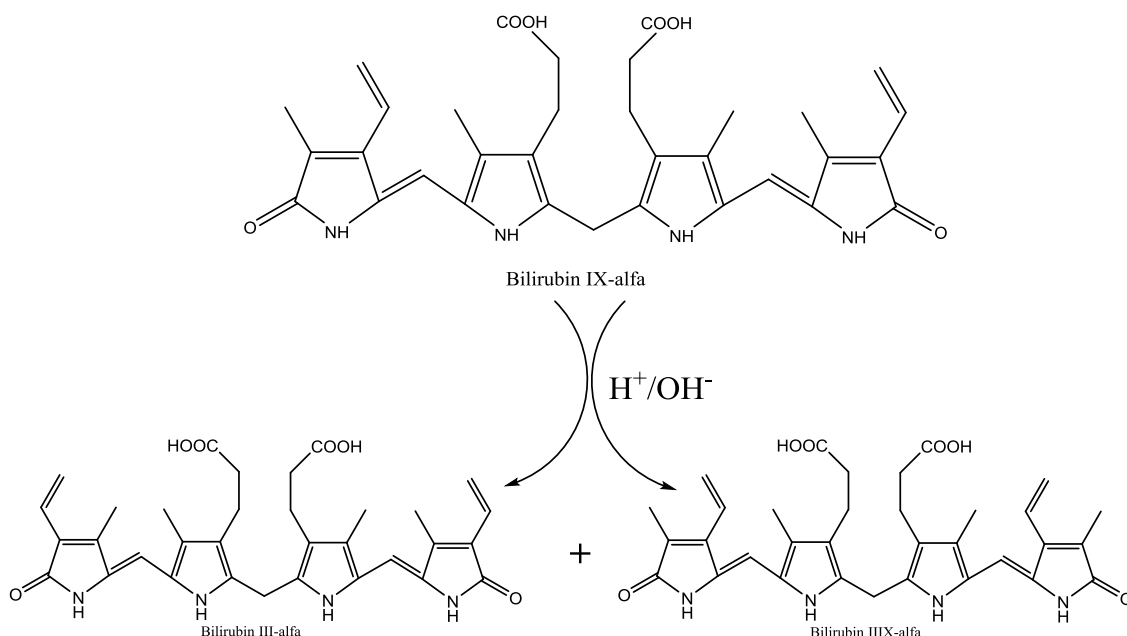


Obr. 13 Konformace 4Z,15Z-bilirubinu IX- $\alpha$ , znázornění stabilizace vodíkovými můstky [1]



Vzhledem k tetrapyrolové struktuře se UCB může vyskytovat v několika typech izomerů. Podle toho, který methinový můstek je v porfirinovém kruhu hemu štěpen, rozlišujeme konstituční izomery IX- $\alpha$ , IX- $\beta$ , IX- $\gamma$  a IX- $\delta$  [61]. V plazmě je majoritním izomer bilirubin IX- $\alpha$ . Zbylé izomery bilirubinu nevytvářejí intramolekulární vodíkové můstky, jsou tedy ve vodě rozpustnější a nevyžadují konjugaci pro vyloučení žlučí. V dospělém organismu se tyto izomery vyskytují ve stopovém množství [1].

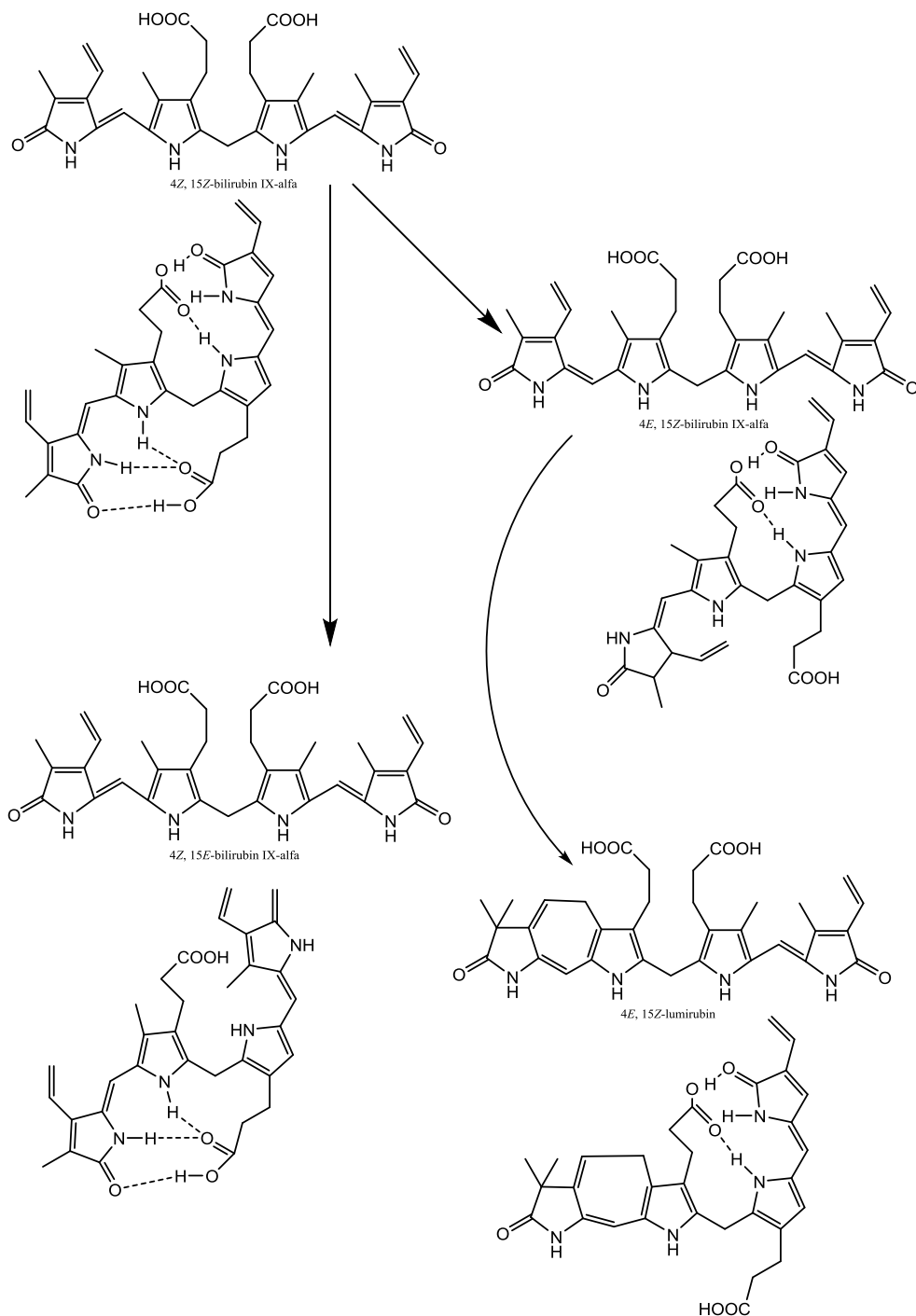
Vzhledem k tomu, že je molekula bilirubinu asymetrická a může docházet k izomeraci, spontánním štěpením bilirubinu na dvě poloviny s následnou náhodnou asociací obou polovin za opětovného vzniku tetrapyrolové sloučeniny, mohou vznikat tři typy takto vzniklých izomerů bilirubin III- $\alpha$ , IX- $\alpha$  a XIII- $\alpha$  (obr. 14) [71].



Obr. 14 Schéma izomerace bilirubinu IX- $\alpha$  [71]

Bilirubin může také podléhat konfiguračnímu typu izomerie. Mohou vznikat izomery *ZZ*, *EE* a jejich různé kombinace, které se liší v konfiguraci vazby mezi pyrolovými jádry A a B nebo C a D (obr. 15). Tento typ konfigurace má také stěžejní vliv na polaritu celé molekuly. Přirozený a majoritní izomer bilirubinu 4Z, 15Z se snadno mění fotoexcitací na *ZE/EZ* izomery, které přecházejí na stabilní a relativně polární deriváty označované názvy lumirubin, cyklobilirubin nebo

fotobilirubin II. Tyto produkty jsou vyloučeny játry bez nutnosti glukuronylace, což umožňuje eliminovat bilirubin z krevního oběhu, tento princip je využíván ve fototerapii patologické novorozenecké žloutenky nebo těžké hyperbilirubinemie doprovázející vzácný Criglerův-Najjarův syndrom I. typu [1].



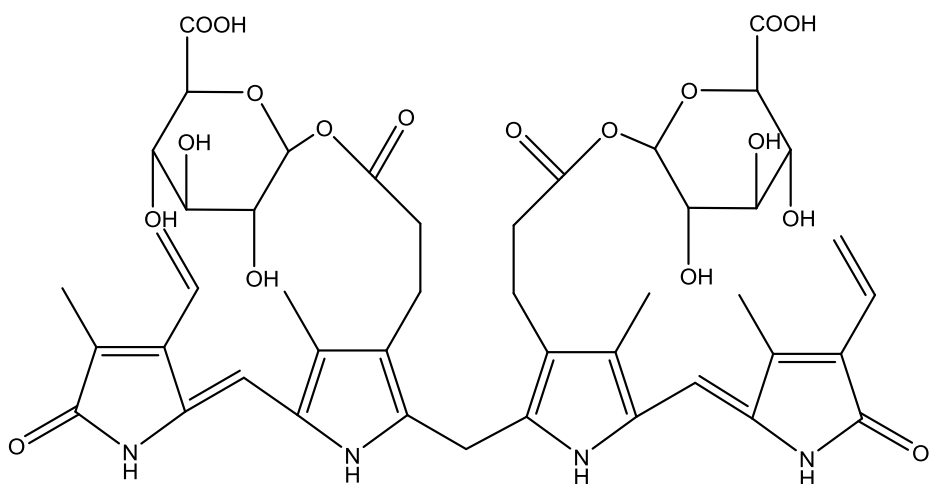
Obr. 15 Konformační izomery bilirubinu [1]

### 1.3.3.2 Konjugace bilirubinu s kyselinou glukuronovou

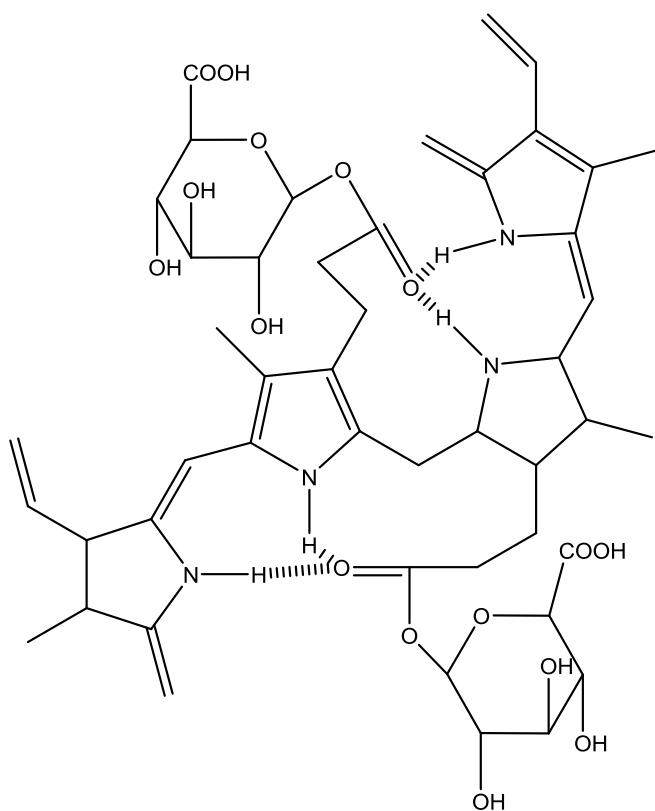
Díky nepolárnímu charakteru nekonjugovaného bilirubinu, musí být umožněna exkrece této látky pomocí biotransformačního pochodu a sice konjugace bilirubinu s kyselinou UDP-glukuronovou, aby se stal polárnějším a snadno odstranitelným z organismu. Glukuronylace dramaticky mění trojrozměrnou strukturu molekuly bilirubinu zejména uvolněním dvou vodíkových můstků a expozicí polárních skupin molekuly okolnímu prostředí (obr. 16) [1, 72].

Konjugace nekonjugovaného bilirubinu s kyselinou glukuronovou je katalyzováno enzymem bilirubin UDP-glukuronyltransferázou (UGT1A) a při této konjugaci dochází k esterifikaci karboxylových skupin bilirubinu, z čehož vyplývá, že dojde k uvolnění intracelulárních vodíkových můstků [73].

Bisglukuronyl bilirubin (obr. 16) je u dospělého člověka hlavním konjugátem bilirubinu ve žluči (asi 80 %). V mnohem menší míře se vyskytuje ve formě monoglukosiduronátu. Při cholestáze dochází v krevním séru k transesterifikační reakci významné části (až 85 %) akumulovaného UCB, při které dochází k nahrazení glukuronylové skupiny nahrazení albuminem. Bilirubin je vázán svoji karboxylovou skupinou na aminokyselinu lysin v pozici 190 v molekule albuminu a je vytvořena pevná kovalentní vazba, ze které nemůže být bilirubin dále disociovatelný. Takto vzniklý konjugát bilirubinu s albuminem je nazýván  $\delta$ -bilirubin. Takovýto konjugát nemá schopnost se vylučovat přes ledviny do moče a jeho biologický poločas je stejný jako u albuminu, tedy 14-21 dnů. U onemocnění hyperbilirubinemie takto vzniklý komplex snižuje rychlost eliminace konjugovaného bilirubinu [1, 74, 75].



Bisglukuronozyl bilirubin

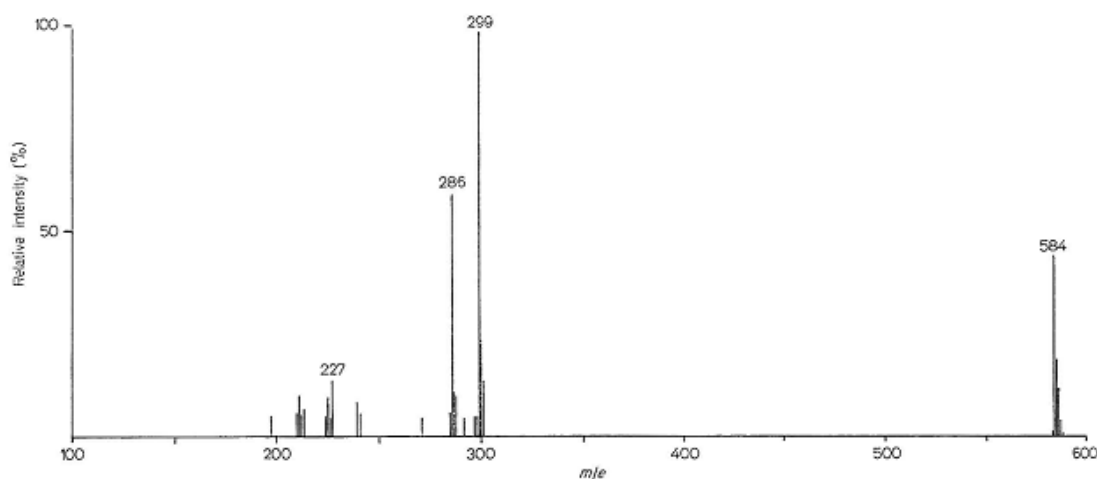


Obr. 16 Konjugovaný bilirubin (bisglukuronyl bilirubin) [1]

### 1.3.3.3 Hmotnostní spektrometrie bilirubinu

Hmotnostní spektrometrie (MS) může být použita k určení molekulových hmotností a empirických vzorců, objasnit struktury a někdy rozlišovat mezi

izomery. Dříve byly používány techniky elektronové ionizace a také ionizace pomocí desorpce polem [76]. Technika elektronové ionizace poskytuje velké množství fragmentací, což může poskytnout užitečné informace o struktuře látky, přičemž molekulární iont může být slabě a těžko identifikovatelný. Protože žlučové pigmenty jsou stálé, často je nutné při ionizaci zvýšit teplotu nad 200 °C. To může ovšem vést k tepelnému rozkladu vzorku a vzniku zavádějících spekter. S jemnější technikou ionizace desorpcí polem jsou dobře viditelné molekulární ionty, ale dochází k malému počtu fragmentací. Z toho vyplývá, že technika desorpce polem je vhodná pro identifikaci molekulárních iontů [77].



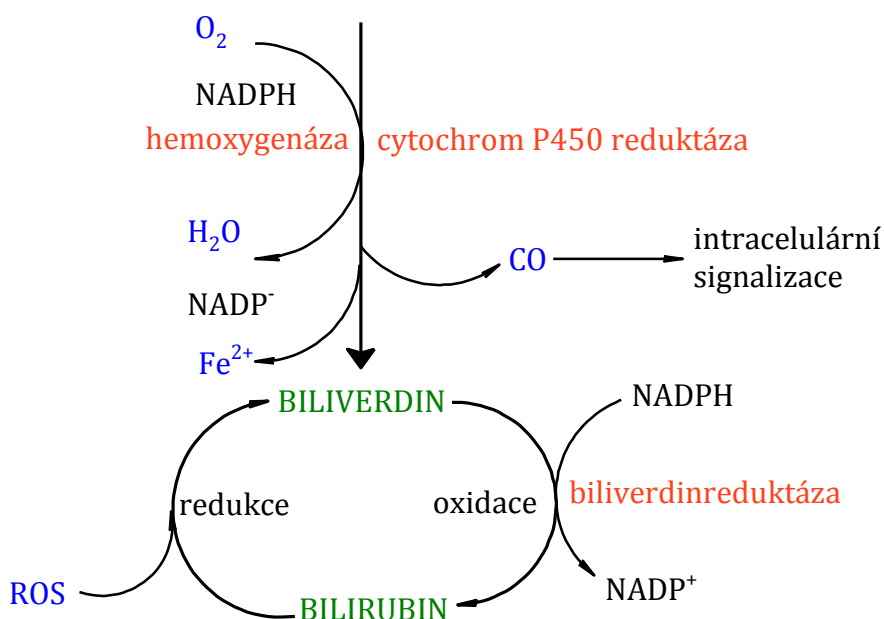
Obr. 19 Hmotnostní spektrum bilirubinu IX- $\alpha$  (elektronová ionizace) [77]

#### 1.3.3.4 Bilirubin-biliverdinový redoxní cyklus

Bylo objeveno, že bilirubin i biliverdin mají silnou antioxidační schopnost. Tato vlastnost je způsobena schopností konverze biliverdinu na bilirubin. Na první pohled se zdá, že by tato vlastnost měla mít spíše negativní dopad pro organismus díky vzniku nepolární sloučeniny z polární, čímž se snižuje rychlost exkrece žlučových pigmentů z organismu. Tato evoluční výhybka má své vysvětlení v tom, že polární molekula biliverdinu neprostupuje placentární bariérou a u placentárních živočichů by tedy docházelo ke kumulaci biliverdinu v těle plodu s možným toxickým zásahem nakumulovaného pigmentu. Naopak bilirubin, jako hydrofobní sloučenina má schopnost eliminace přes placentární bariéru z těla

plodu prostou difuzí, ale i pomocí specifických aktivních transportních mechanismů. Nejdůležitějším důsledkem konverze bilirubinu na biliverdin je ovšem zachycení volných kyslíkových radikálů v redoxním cyklu zahrnujícím oxidaci bilirubinu na biliverdin s jeho následnou redukcí zpět na bilirubin (obr. 20).

Vzhledem k tomu, že se bilirubin vyskytuje v organismu, jako endogenní sloučenina, díky tomuto redoxnímu cyklu se z bilirubinu stává nejúčinnější antioxidačně působící látka v organismu [78].



Obr. 20 Bilirubin-biliverdinový redoxní cyklus [1]

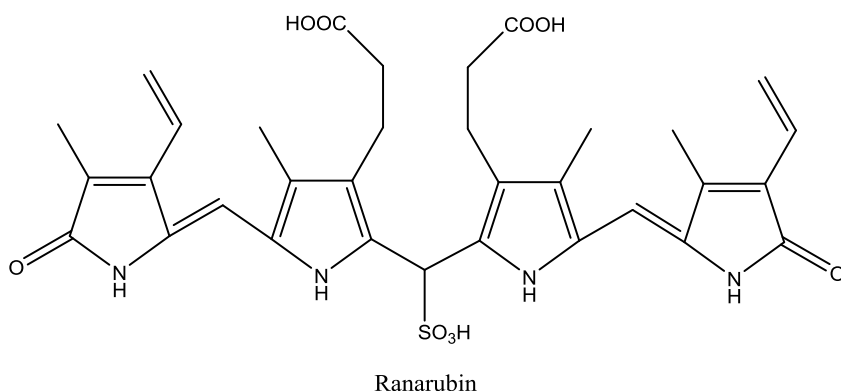
### 1.3.4 Ranarubin

Profesor McDonagh objevil pigment u mladých larev americké žáby Skokana volského (*Rana catesbiana*) (obr. 21), které neobsahovaly bilirubin glukuronidy [79]. Tento pigment identifikoval, jako bilirubin-10-sulfonovou kyselinu, která byla připravena chemicky [7].



Obr. 21 Pulci americké žáby Skokana volského (*Rana catesbiana*) [80]

Intravenózní podání biliverdinu nebo hemoglobinu těmto žábám vedlo k vylučování toxického ranarubinu, ale nevylučoval se UCB nebo bilirubin glukuronid. Toto zjištění bylo v souladu s nedostatkem aktivity biliverdinreduktázy v játrech žab. Při intravenózním podání bilirubin-10-sulfonové kyseliny těmto žábám vedlo k vylučování této látky beze změny do žluči, ovšem u potkanů tento proces pozorován nebyl. Tvorba ranarubinu (obr. 22) je v těle žab umožněna pravděpodobně díky konjugaci aniontu  $\text{HSO}_3^-$  na biliverdin v žabích játrech [81].



Obr. 22 Vzorec ranarubinu [2]

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité chemikálie

Acetonitril	p.a.	Lach:Ner (ČR)
Albumin lidský sérový	p.a.	Sigma-Aldrich (Německo)
Benzen	99,8 %	Lach:Ner (ČR)
Bilirubin IX- $\alpha$	-	Frontier Scientific (USA)
Biliverdin IX- $\alpha$	-	Frontier Scientific (USA)
Borontrifluorid v methanolu (14 %)	p.a.	Sigma-Aldrich (Německo)
Butan-1-ol	99 %	Lach:Ner (ČR)
Diethylether	p.a.	Sigma-Aldrich (Německo)
Diethyl-malonát	p.a.	Merck (Německo)
Dimethylsulfoxid	p.a.	Sigma-Aldrich (Německo)
Dusitan sodný	čistý	Penta (ČR)
Ethyl-acetát	99,7%	Lach:Ner (ČR)
Formaldehyd (36-38 %)	čistý	Lach:Ner (ČR)
Hexan	99,0 %	Sigma-Aldrich (Německo)
Hydrogensířičitan draselný	čistý	Penta (ČR)
Hydrogenuhlíčitan sodný	p.a.	Lach:Ner (ČR)
Hydroxid draselný	čistý	Penta (ČR)
Hydroxid sodný	čistý	Penta (ČR)
Chloranil	99,0 %	Sigma-Aldrich (USA)
Chlorid sodný	p.a.	Lach:Ner (ČR)
Chloroform	99,5 %	Sigma-Aldrich (USA)
Kyselina chlorovodíková (35 %)	čistý	Penta (ČR)
Kyselina octová (90 %)	p.a.	Lach:Ner (ČR)
Kyselina pikrová	p.a.	Merci (ČR)
Lithium-2-thienecyanokuprat	p.a.	Sigma-Aldrich (USA)
Methanol	99,9 %	Lach:Ner (ČR)
Methylamin (40 % aq.)	čistý	Merck (Německo)
Methylithium (1,5 M v diethyletheru)	p.a.	Sigma-Aldrich (Německo)



Methyl-t-butylether	p.a.	Sigma-Aldrich (USA)
<i>p</i> -Toluidin	99,7 %	Sigma-Aldrich (USA)
<i>p</i> -Toluensulfonylchlorid	p.a.	Merck (Německo)
Síran amonný	čistý	Penta (ČR)
Síran hořečnatý	čistý	Lach:Ner (ČR)
Síran sodný	čistý	Lach:Ner (ČR)
Sodík kovový	99,9 %	CentalChem (SK)
<i>tert</i> -Butanol	99,0 %	Sigma-Aldrich (Německo)
Tetrahydrofuran	99,9 %	Sigma-Aldrich (USA)
Thiomocovina	99,0 %	Lach:Ner (ČR)
Trimethylsilylchlorid	99,0 %	Sigma-Aldrich (Německo)
Uhličitan draselný	99,5 %	Fichema (ČR)
Uhličitan sodný	p.a.	Penta (ČR)

## 2.2 Použité přístroje

Analytické váhy	ABT 220-4M	Kern (Německo)
Dávkovací ventil	Rheodyne 7725i	Discoverysciences (USA)
Hmotnostní spektrometr	BrukerEsquire3000	Brucker Daltonics (USA)
Kapalinový chromatograf	sds 150	Watrex (ČR)
Míchačka	ColorSquid	Ika (Německo)
Mikrostříkačka	1702 RN SYR	Hamilton (USA)
NMR spektrometr	Bruker Avance 400MHz	(Bruker Daltonics, USA)
Scintilační spektrometr	LS6000SE	Beckman (Německo)
Autoradiograf	InstantImager	Packard (USA)
UV detektor	Smartline 2500	Knauer (Německo)
Vakuová odparka	Laborota 4000 WB	Heidolph (Německo)
Vakuová sušárna	SPT 200	Protech (Rusko)
Vodní lázeň	U4	Mlw (Rusko)
Vortex	ZX3	Velp Scientifica (Rakousko)

## 2.3 Postupy

### 2.3.1 Purifikace bilirubinu [71]

Sto miligramů UCB bylo rozpuštěno ve 180 ml chloroformu ve 250 ml Erlenmeyerově baňce, která byla předem obalena alobalem z důvodů fotosenzitivity UCB.

Erlenmeyerova baňka byla poté zahřívána na vodní lázni až do varu chloroformu (cca 61 °C) a roztok byl dále zahříván při této teplotě 5 min. Roztok byl ponechán schladit a následně byl přefiltrován přes filtrační papír. Filtrát byl rovnoměrně rozdělen do šesti skleněných vialek. Následně byl filtrát opakovaně vytřepán (1 × vodou, 2 × 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 1 × NaCl (10%) a 4 × vodou), při každém promytí byl filtrát důkladně 50 × protřepán a vodná fáze byla oddělena.

Dolní chloroformová nažloutlá fáze obsahovala UCB. Následně byla chloroformová fáze rozdělena do 2 nádobek a sušena síranem sodným. Následně byl roztok centrifugován 5 min při 1800 rpm. Supernatant byl zfiltrován do 250 ml Erlenmeyerovy baňky a chloroform byl odpařován na vodní lázni až do doby, kdy byla viditelná krystalizace UCB na stěnách baňky. Takto byl připraven UCB nasycený roztok. Do takto připraveného roztoku bylo za stálého míchání přidáno 1 ml methanolu a následně po vytvoření oranžového zákalu bylo přidáno dalších 15 ml methanolu. Vzniklá směs byla centrifugována 5 min při 1800 rpm, následně byla odstraněna kapalná fáze a vzniklá oranžová sraženina byla 2 × promyta 15 ml methanolu. Získaný oranžový precipitát UCB byl lyofilizován přes noc. Výtěžek purifikace byl přibližně 74 % (74 mg) [71].

### 2.3.2 Purifikace biliverdinu [82]

Do 60 ml skleněné kolony (4 × 50 cm) byla vnesena suspenze silikagelu (TLC grade), 15 g v methanol-acetonu (1:1). Kolona byla promyta mobilní fází a poté byl nanesen nepurifikovaný biliverdin (100 mg) v 30 ml směsi methanol-aceton (1:1). Následně byl silikagel promýván fází chloroform-methanol-kyselina octová (7:3:0,03). Nejprve byl eluován žlutozelený roztok a následně zelený. Jako poslední byla eluována modrozelená frakce, která byla odpařena do sucha za vakua. Vzniklé modrozelené krystalky byly rozpuštěny v 0,1 M NaOH (4 ml) a roztok byl filtrován přes tenkou membránovou vrstvu (0,2 µm). Tato vrstva byla 3 × promyta 1 ml 0,1 M NaOH. K roztoku byly přidány asi 3 kapky ledové kyseliny octové a sraženina byla izolována pomocí centrifugace. Vzniklá sraženina byla 3 × promyta vodou a rozpuštěna ve 40 ml roztoku aceton-voda (8:2). K roztoku bylo poté za stálého míchání přidáno 5 µl kyseliny octové. Směs byla míchána 10 min a poté byl izolován vzniklý precipitát pomocí centrifugace.

Precipitát byl 2 × promyt destilovanou vodou a lyofilizován do sucha přes noc. Výtěžek lyofilizovaného biliverdinu IX-α byl okolo 55 % (55 mg) [82].

## 2.3.3 Příprava bilirubinu dimethylesteru

### 2.3.3.1 Metoda s 1-alkyl-3-*p*-tolyltriazenem

#### **Příprava 1-methyl-3-*p*-tolyltriazenu [83]:**

Padesát gramů (0,47 mol) *p*-toluidinu bylo naváženo do 2 l varné baňky s míchadlem. Baňka byla následně vychlazena v solné lázni s ledem na teplotu -10 °C. K *p*-toluidinu bylo přidáno 250 g drceného ledu a 140 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl poté míchán 10 min.

Do ochlazeného roztoku bylo přikapávací nálevkou přidáno 150 ml (0,55 M) roztoku dusitanu draselného během 1,5 hodiny. Poté bylo upraveno pH směsi pomocí nasyceného vychlazeného roztoku uhličitanu sodného na hodnotu 7 při 0 °C. Takto vzniklý roztok byl během 45 minut přikapáván při -10 °C ke směsi 150 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 300 ml (30-35 %) methyaminu a 100 g drceného ledu.

Výsledná směs byla 3 × extrahována 1 l etheru. Vzniklý extrakt byl vakuově odpařen do sucha. Surový 1-methyl-3-*p*-tolyltriazen byl přečištěn pomocí sublimace při 50 °C. Izolovaný žlutý sublimát (bod tání 77 - 80 °C) byl rekrystalizován z hexanu. Vzniklé bíle podlouhlé krystalky (bod tání 80,5 – 81,5 °C) byly uloženy při -20 °C. Bylo získáno 86 % produktu (43 g).

#### **Příprava bilirubinu IX- $\alpha$ dimethyl esteru [84]:**

1-methyl-3-*p*-tolyltriazen (150 mg; 1,0 mmol) byl přidán k rozpuštěné suspenzi bilirubinu IX- $\alpha$  (120 mg; 0,2 mmol) ve 120 ml chloroformu. Tento roztok byl míchán 12 hodin ve tmě pod vrstvou argonu. Přebytečný triazen byl po reakci rozložen mícháním se 100 ml 1 M HCl po dobu 15 minut.

Chloroformový roztok byl přečištěn vytřepáním 100 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a poté 2 × promyt 100 ml vody. Po přečištění byl roztok v chloroformu sušen síranem sodným. Sušidlo bylo odstraněno filtrací a chloroform byl za vakua odpařen. Výtěžek byl okolo 46 % (69 mg).

### 2.3.3.2 Metoda s diazomethanem

#### **Příprava diazaldu (*p*-tolylsulfonylemethylnitrosamidu) [85]:**

V 500 ml Erlenmeyerově baňce bylo smícháno 15,1 g toluensulfonylchloridu s 16,7 ml 33% methylaminu (5,5 g), směs byla míchána při 80 °C asi 10 min a poté bylo přidáno 4 ml 50% roztoku NaOH. Směs byla dále 5 minut míchána a poté bylo přidáno 7,2 g *p*-toluensulfonylchloridu a mícháno opět při 80 °C asi 10 min.

Ke směsi bylo přidáno 2 ml 50% roztoku NaOH, a opět bylo zkontrolováno pH. Směs byla míchána 5 min a poté bylo přidáno ke směsi dalších 3,2 g *p*-toluensulfonylchloridu a 2 ml 50% NaOH. Roztok byl míchán 10 min při 80 °C.

Ke směsi bylo přidáno 120 ml koncentrované kyseliny octové a mícháno dalších 10 min. Směs byla poté vložena do ledové lázně a postupně bylo přikapáno 10 g dusičnanu sodného ve 20 ml vody v průběhu 30 min. Směs byla míchána 15 min a poté bylo do směsi bylo přidáno 250 ml destilované vody.

Výsledná suspenze byla filtrována a promyta 500 ml vody až do doby, kdy nebyla cítit z pevného homogenátu kyselina octová. Výsledný nažloutlý prášek byl sušen 24 hodin v exsikátoru. Výtěžek byl okolo 87 % (13,1 g).

#### **Příprava diazomethanu [86]:**

Ke směsi 15 ml 40% roztoku hydroxidu draselného a 80 ml diethyletheru a postupně byl postupně přikapán 40 mmol roztok diazaldu (v diethyletheru) za stálého míchání. Ze směsi byl destilován žlutý roztok diazomethanu.

#### **Příprava bilirubinu IX- $\alpha$ dimethyl esteru [66]:**

Kroztoku bilirubinu (1 mg/ml) v chloroformu byl přidán nadbytek roztoku diazomethanu v etheru. Po 30 minutovém míchání byl přebytečný diazomethan odstraněn přikapáváním kyseliny octové.

Chloroformový roztok byl přečištěn vytřepáním 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, sušen síranem sodným a vakuově odpařen do sucha. Výtěžek dimethylesteru bilirubinu IX- $\alpha$  byl okolo 95 % (0,95 mg).

### 2.3.4 Příprava biliverdin dimethylesteru

Biliverdin IX- $\alpha$  (60 mg; 10,3 mmol) byl rozpuštěn ve 12 ml methanolu a do tohoto roztoku bylo přidáno 12 ml 14% BF<sub>3</sub>-MeOH pod proudem argonu, kterým byla směs probublávána 15 minut.

Směs byla zchlazena na 5 °C a míchána přes noc pod vrstvou argonu ve tmě za laboratorní teploty. Ke směsi bylo poté přidáno 72 ml vody a roztok byl extrahován chloroformem (1 × 50 ml a 2 × 10 ml). Extrakt byl extrahován 2 × 5 ml vody a 1 × 50 ml 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>. Směs byla zfiltrována přes filtrační papír a chloroformový přečištěný extrakt byl za vakua odpařen do sucha.

Vzniklé zelené krystalky s bodem tání 213 – 214 °C byly uloženy v exsikátoru ve tmě. Výtěžek byl okolo 42 % (25,2 mg) [87].

### 2.3.5 Oxidace bilirubinu na biliverdin pomocí chloranilu [88]

V 500 ml chloroformu bylo rozpuštěno 300 mg purifikovaného bilirubinu IX- $\alpha$ . K roztoku bilirubinu bylo přidáno 400 mg tetrachloro-1,4-benzochinonu a 570 mg kyseliny pikrové. Po důkladném promíchání směsi bylo přidáno 20 ml *tert*-butanolu.

Celá směs byla ponechána probublávat 10 minut proudem argonu. Poté byl roztok ponechán 6 dní za laboratorní teploty. Po 6 dnech bylo za vakua odpařeno rozpouštědlo a ke směsi byla přidána směs methanolu s benzenem v poměru (5:100). Směs byla důkladně promíchána a byl viditelný vznik zeleného precipitátu, který byl separován pomocí filtrace a poté byl několikrát promyt benzenem. Zelený precipitát biliverdinu byl ponechán vysušit v exsikátoru přes noc. Výtěžek byl okolo 65 % (195 mg) .

## **2.3.6 Reakce BV XIII- $\alpha$ s kyselinou thiobarbiturovou**

### **2.3.6.1 Syntéza kyseliny thiobarbiturové [89]**

55 mg dobře očištěného kovového sodíku bylo rozpuštěno v 1 ml suchého methanolu během, 10 min míchán za laboratorní teploty. Roztok poté zahřát na 60 °C a pomalu bylo přidáno 76 mg thiomocoviny. Směs byla dalších 5 min míchána při 60 °C. Poté bylo přidáno 182  $\mu$ l diethyl-malonátu a roztok byl míchán 30 min při 60 °C. Vznik kyseliny thiobarbiturové byl potvrzen pomocí hmotnostního spektra. Výtěžek byl okolo 80 % (60,8 mg).

### **2.3.6.2 Reakce BV XIII- $\alpha$ s kyselinou thiobarbiturovou [90]**

K roztoku 70 mg biliverdinu dimethylesteru ve 200 ml methylesteru kyseliny octové bylo přidáno 25 mg kyseliny thiobarbiturové. Došlo ke změně barvy ze zeleno-modré na tmavě fialovou. Roztok byl ponechán 6 hodin za laboratorní teploty. Poté byl tmavý roztok vakuově odpařen a vzniklé krystalky byly rozpuštěny v chloroformu. Produkt byl sražen přídatkem hexanu. Výsledné fialové krystalky derivátu BV XII- $\alpha$  s kyselinou thiobarbiturovou byly vysušeny pod proudem argonu a analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru.

## **2.3.7 Kysele katalyzovaná izomerace bilirubinu IX- $\alpha$**

### **2.3.7.1 Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové [91]**

K roztoku 100 mg bilirubinu IX- $\alpha$  ve 20 ml DMSO bylo přidáno pod proudem argonu 2,2 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Směs byla probublávána 1 minutu proudem argonu. Po 1 minutě byla reakce zastavena nalitím do 200 ml destilované vody.

Produkt se vyloučil ve formě oranžových krystalů. Směs byla centrifugována 10 min při 13 000 rpm a produkt promyt 10 ml 2  $\times$  vodou a 3  $\times$  methanolem, čímž byly odstraněny zbytky zelených nečistot. Žlutohnědé krystalky byly vakuově vysušeny za vakuu.

### **2.3.7.2 Pomocí *p*-toluensulfonové kyseliny [92]**

K roztoku 100 mg bilirubinu IX- $\alpha$  ve 20 ml DMSO bylo přidáno pod proudem

argonu 20 mg kyseliny p-toluensulfonové. Směs byla probublávána 1 minutu proudem argonu. Po 1 minutě byla reakce zastavena nalitím do 200 ml destilované vody.

Produkt se vyloučil ve formě oranžových krystalů. Směs byla centrifugována 10 min při 13 000 rpm a produkt byl promyt 10 ml 2 × vodou a 3 × methanolem, čímž byly odstraněny zbytky zelených nečistot. Žlutohnědé krystalky byly vakuově vysušeny.

### **2.3.7.3 Modifikace kyselí katalyzované izomerace bilirubinu s přídavkem [<sup>14</sup>C]formaldehydu**

Deset miligramů bilirubinu IX-α bylo rozpuštěno v 10 ml DMSO. Po řádném rozpuštění bilirubinu bylo k roztoku přidáno 10 μl 36% roztoku formaldehydu a 2 μl radioaktivně značeného [<sup>14</sup>C]formaldehydu o aktivitě 5 MBq. Směs byla míchána 10 minut a poté bylo k roztoku přidáno 220 μl kyseliny chlorovodíkové za současného probublávání směsi proudem argonu.

Po 5 minutách byla reakce zastavena nalitím směsi do 20 ml vody. V roztoku se vyloučily oranžové krystalky. Krystalky byly separovány pomocí centrifugace 10 min při 13 000 rpm a poté byly promyty 10 ml 2 × vodou a 3 × methanolem, čímž byly odstraněny zbytky zelených nečistot. Žlutohnědé krystalky byly vysušeny za vakua.

### **2.3.7.4 Analýza izomerů pomocí TLC**

Vzniklé krystaly izomerů bilirubinu byly rozpuštěny v chloroformu na koncentraci 0,5 mg/ml. Tento roztok byl nanesen na silikagelové TLC desky. Eluce probíhala pomocí 3% roztoku kyseliny octové v chloroformu. Jako další postup analýzy pomocí TLC bylo nanesení stejného roztoku směsi izomerů bilirubinu na silikagelovou desku a jako eluční činidlo byla použita fáze chloroform/benzen/methanol v poměru (100:50:1,5).

### **2.3.7.5 Analýza izomerů pomocí hmotnostní spektrometrie**

**2.3.8** Pro ověření, zda-li nedošlo k rozpadu lineárního tetrapyrolu byly vzorky analyzovány v laboratořích RNDr. Štíchy na hmotnostním spektrometru Bruker Esquire 3000 s elektrosprejovou ionizací, při výstupním napětí na kapiláře 106,7 V.



### **2.3.8 Adice alkylkuprátů na biliverdin dimethylester [93]**

Půl mililitru methyl-lithia (1,6 M) bylo smícháno s 16,7  $\mu$ l vysušeného tetrahydrofuranu (THF) při  $-72^{\circ}\text{C}$  (chlazení pomoci suchého ledu). Směs byla 1 minutu míchána a poté bylo k roztoku přidáno 33,3  $\mu$ l lithium (2-thienyl)kyanokuprátu (LTCC) (0,25 M). Směs byla míchána 2 minuty a teplota byla upravena na hodnotu  $0^{\circ}\text{C}$ . K této směsi bylo dále přidáno 10 mg biliverdin dimethylesteru a směs byla 10 minut míchána při teplotě  $0^{\circ}\text{C}$ . Dále bylo k roztoku přidáno 5  $\mu$ l trimethylsilyl chloridu a 20  $\mu$ l THF. Směs byla zahřáta na vodní lázni na teplotu  $70^{\circ}\text{C}$ . Při této teplotě byla směs míchána 5 min a poté byla ochlazená na  $0^{\circ}\text{C}$ . Roztok byl míchán dalších 10 minut reakce byla zastavena přidáním 0,125 ml 0,3 M kyseliny chlorovodíkové.

Výsledná surová směs byla analyzována pomocí hmotnostního spektrometru Bruker Esquire 3000 s elektrosprejovou ionizací.

### **2.3.9 Syntéza thiofenol derivátu bilirubinu**

Pět miligramů purifikovaného biliverdinu hydrochloridu bylo rozpuštěno v methanolu. K roztoku bylo přidáno asi 3 mg potaše, aby došlo k zneutralizování hydrochloridu, což bylo ověřeno pH indikátorem. Roztok byl filtrován přes filtrační papír a vakuově odpařen do sucha. Vysušený neutralizovaný biliverdin byl rozpuštěn v 5 ml ethyl-acetátu a k roztoku bylo přidáno 5  $\mu$ l methylaminu a směs byla míchána 10 min. Poté bylo k roztoku pipetováno 50  $\mu$ l roztoku thiofenolu a směs byla zahřáta na vodní lázni na teplotu  $40^{\circ}\text{C}$ . Roztok byl míchán 15 min. Byla pozorována změna zbarvení z temně zelené na světle žlutou. Výsledná směs byla filtrována přes filtrační papír a filtrát byl analyzován pomocí hmotnostního spektrometru Bruker Esquire 3000 s elektrosprejovou ionizací, při výstupním napětí na kapiláře - 113,0 V.

### **2.3.10 Syntéza [ $^3\text{H}$ ]bilirubinu [3]**

Byl připraven roztok rozpuštěním 5 mg biliverdinu IX- $\alpha$  ve směsi 9 ml ethanolu a 1 ml vody. Po důkladném míchání bylo k roztoku přidáno 2 mg [ $^3\text{H}$ ]borohydridu sodného. Směs byla 10 minut míchána a poté bylo přidáno 40 mg neznačeného borohydridu sodného a reakční směs byla míchána dalších 7 minut ve tmě za laboratorní teploty. Poté bylo k roztoku přidáno 10 ml glycin-HCl pufru

(0,4 M, pH 2,75) a celá směs byla extrahována do 10 ml chloroformu.

Chloroformový extrakt byl zkoncentrován vakuovým odpařením na malý objem a byl nanesen na silikagelovou desku. Jako eluční činidlo byla použita fáze chloroform/benzen/methanol v poměru (100:50:1,5). Po separaci byla oddělena oblast bilirubinu, která byla analyzována scintilačním detektorem LS6000SE (Beckman, Německo) po přidavku 5 ml scintilačního koktejlu.

### **2.3.11 Optimalizace syntéz ranarubinu**

Jako vhodným kandidátem pro rychlé radioaktivní značení bilirubinu byl vybrán známý derivát bilirubinu ranarubin, který by bylo možné potenciálně značit izotopem  $^{35}\text{S}$ . Bylo provedeno několik modifikací syntézy ranarubinu:

#### **A) Modifikace metody dle Ma et al. [7]**

V 800  $\mu\text{l}$  butanolu bylo rozpuštěno 5,5 mg biliverdinu hydrochloridu a ihned za stálého míchání bylo přidáno 42  $\mu\text{l}$  roztoku hydrogensířičitanu draselného, který byl připraven rozpuštěním 222 mg pyrosířičitanu draselného v 1 ml destilované vody. Roztok byl míchán  $\frac{1}{2}$  hodiny a poté bylo přidáno dalších 42  $\mu\text{l}$  roztoku hydrogensířičitanu draselného. Došlo k viditelné změně barvy z temně zelené na hnědožlutou. Po 2 hod míchání byl roztoku přidán 1 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  jako sušidlo a roztok byl ponechán sušit přes noc. Poté byl roztok filtrován přes vrstvu vaty a ranarubin byl z roztoku sražen přidáním polovičního objemového množství tetrahydrofuranu. Roztok se sraženinou byl centrifugován 15 min při 15 000 rpm. Vzniklá sraženina byla vysušena pod proudem argonu a analyzována pomocí LC/MS systému. Jako kolona byla použita C-18 fenyl, mobilní fáze: methanol, průtok 0,5 ml/min a vlnová délka 435 nm. Napětí na výstupní kapiláře hmotnostního spektrometru bylo -122,3 V a detekce byla prováděna pomocí iontové pasti. Výtěžek byl okolo 60 % (3,3 mg).

#### **B) Modifikace metody s MTBE**

V 5 ml methanolu bylo rozpuštěno 6,7 mg biliverdin hydrochloridu a k tomuto roztoku bylo přidáno 1 ml methyl-*tert*-butyletheru a 1 ml 1M roztoku  $\text{KHSO}_3$ . Celá směs byla zahřívána na 50  $^\circ\text{C}$  a do doby než vznikl čirý roztok, poté bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  10 % síranu amonného.

Vzniklý roztok byl extrahován 2-krát 5 ml butanolu a k extraktu bylo přidáno poloviční objemové množství tetrahydrofuranu. Vzorek byl centrifugován 15 min při 15 000 rpm. Vzniklá sraženina ranarubin byla vysušena proudem argonu. Výtěžek byl okolo 87 % (5,8 mg). Vzorek byl analyzován na hmotnostním spektrometru BrukerEsquire3000, sušící teplota byla 330 °C, napětí na kapiláře bylo -106,7 V a detekce byla provedena pomocí iontové pasti.

### **C) Metoda bez butanolu**

V 1 ml methanolu bylo rozpuštěno 6,6 mg biliverdinu hydrochloridu a k tomuto roztoku bylo přidáno 0,5 ml 1 M roztoku hydrogensířičitanu sodného, reakce byla ponechána při míchání 30 minut a poté bylo k roztoku přidáno dalších 0,5 ml 1 M roztoku NaHSO<sub>3</sub>. Po 2 hodinách bylo přidáno 500 mg síranu sodného jako sušidla a po 15 minutách byl roztok filtrován přes vatku. Filtrát byl rozdělen na 2 frakce, které byly sráženy tetrahydrofuranem a ethyl-acetátem. Po vysrážení byly obě frakce centrifugovány 15 min při 15 000 rpm a vzorek byl vysušen do sucha pod proudem argonu. Vzorek byl analyzován na hmotnostním spektrometru BrukerEsquire 3000, sušící teplota byla 330 °C, napětí na kapiláře bylo -106,7 V a detekce byla provedena pomocí iontové pasti.

### **D) Zrychlená metoda s butanolem**

V 1 ml butanolu bylo rozpuštěno 7 mg biliverdinu hydrochloridu a k roztoku bylo přidáno 50 µl 1 M roztoku hydrogenuhličitanu sodného, po ½ hodině bylo přidáno stejné množství roztoku a směs byla ponechána ½ hodiny míchat. Poté bylo k roztoku přidáno 500 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> jako sušidla a roztok byl filtrován přes vrstvu vaty a rozdělen na dvě frakce, které byly sráženy polovičním objemovým množstvím diethyletheru a benzenu. Vzniklá sraženina byla centrifugována 15 min při 15 000 rpm a vysušena pod proudem argonu. Vzorek byl analyzován na hmotnostním spektrometru BrukerEsquire3000, sušící teplota byla 330 °C, napětí na kapiláře bylo -106,7 V a detekce byla provedena pomocí iontové pasti.

### **2.3.12 Stabilitní studie ranarubinu**

Stabilita ranarubinu v průběhu 1 měsíce byla studována pomocí HPLC. Ranarubin byl připraven zrychlenou metodou v butanolu a srážením diethyletherem. Roztok 0,5 mg/ml ranarubinu v methanolu byl aplikován (20  $\mu$ l) na kolonu C-18 fenyl, jako mobilní fáze byl použit čistý methanol, průtok byl nastaven na 0,5 ml /min a detekční vlnová délka na hodnotu 435 nm. Celá analýza byla provedena v časovém horizontu jednoho měsíce.

### **2.3.13 Analýza ranarubinu a bilirubinu pomocí NMR**

Ve spolupráci s ÚOCHB AV ČR (laboratoř hmotnostní spektrometrie, RNDr. Martin Dračinský, Ph.D.) byl analyzován ranarubin a bilirubin na spektrometru Bruker Avance 400 MHz (Bruker Daltonics, USA)

Byl připraven vzorek ranarubinu 2 mg /ml DMSO, bilirubinu o koncentraci 2 mg/ml v DMSO a  $\text{CDCl}_3$  a byla proměřována vodíková spektra jednotlivých vzorků.

### **2.3.14 Analýza UCB, BV a ranarubinu pomocí ECD**

Ve spolupráci s VŠCHT (Ústav fyziky a měřicí techniky, Prof. RNDr. Marie Urbanová, CSc.) byly měřeny elektronické cirkulární dichroismy (ECD) s chirální matricí sérového albuminu, aby došlo k ověření podobných vlastností vaznosti bilirubinu a ranarubinu. Bylo připraveno 10 mg ranarubinu viz zrychlená metoda s butanolem a srážení diethyletherem a 10 mg purifikovaného bilirubinu a biliverdinu. Byly připraveny roztoky ranarubinu (0,044 mol/l v DMSO), bilirubinu a biliverdinu (0,075 mol/l v DMSO) s lidským sérovým albuminem, které byly postupně měřeny na přístroji spektrometr Ja-810 (Jasco, Japonsko) a porovnány jednotlivá spektra pro bilirubin a ranarubin

### **2.3.15 Syntéza fluorovaného derivátu bilirubinu**

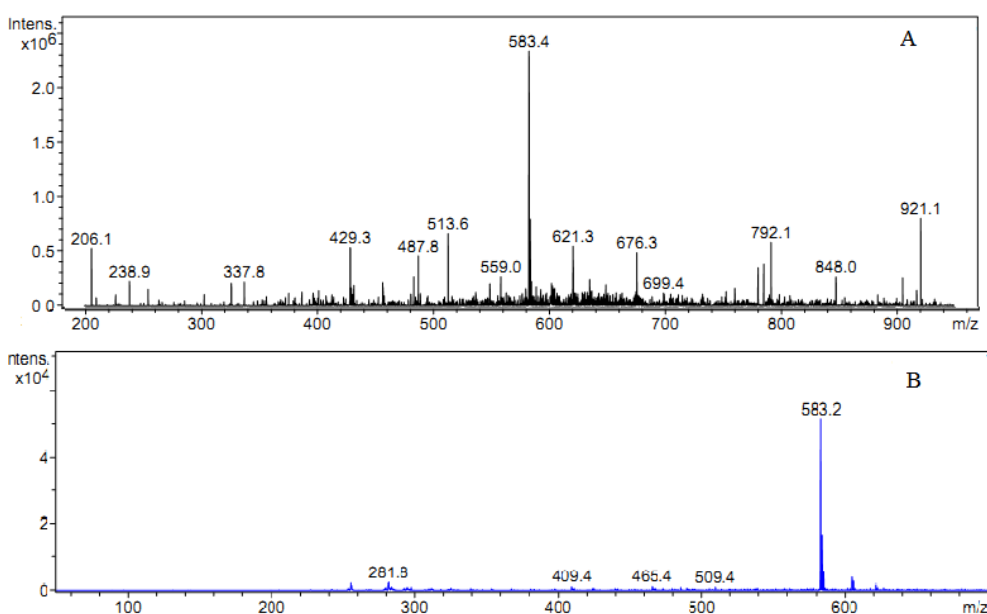
Ideálním derivátem bilirubinu pro zobrazování v nukleární medicíně bylo vhodné syntetizovat fluoroderivát bilirubinu v poloze C-10. Vzhledem ke krátkým poločasům rozpadu pozitronického izotopu  $^{18}\text{F}$  bylo vhodné vytvořit jednokrokovou rychlou syntézu s případnou adicí na dvojnou vazbu biliverdinu v poloze C-10.

Byla sestavena aparatura s reakční celou, do které byl zaváděn fluorovodík vznikající reakcí 2 g fluoridu draselného s 8 ml koncentrované kyseliny sírové. V reakční cele byl roztok 5 mg biliverdinu v 10 ml methanolu. Vznikající plyn fluorovodík byl vnášen proudem argonu přímo do reakční směsi s biliverdinem za stálého míchání. Celá reakční směs byla zahřívána na teplotu 40 °C a míchána. Výsledná surová směs byla analyzována na hmotnostním spektrometru BrukerEsquire3000, sušící teplota byla 330 °C, napětí na kapiláře bylo 124,6 V a detekce byla provedena pomocí iontové pasti.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

#### 3.1 Hmotnostní spektra purifikovaného bilirubinu

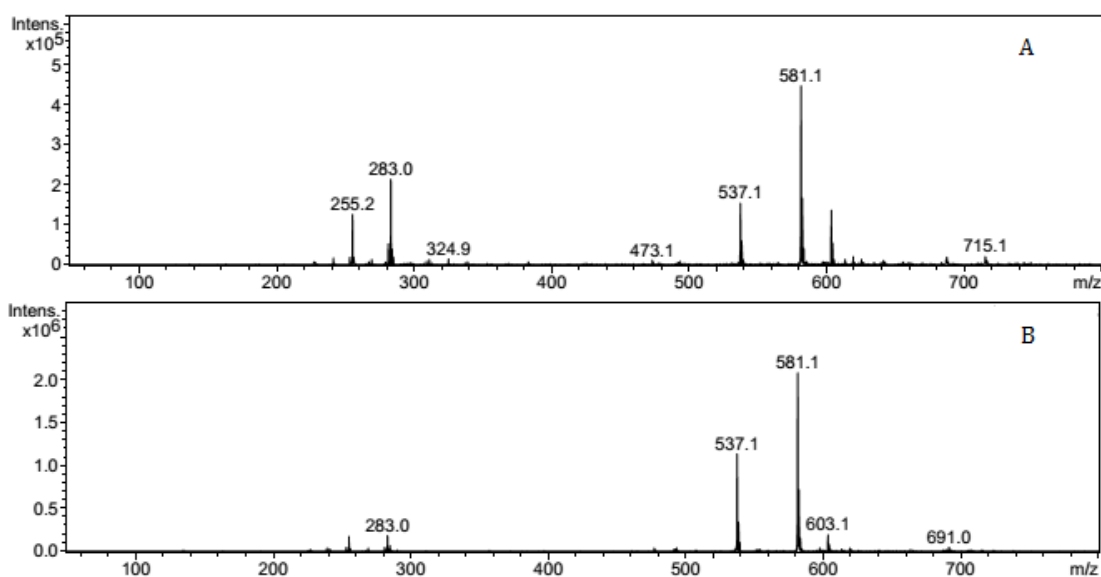
Komerčně dostupný bilirubin je získáván ze žlučových kamenů krav a není dostatečně přečištěn pro potřebné syntézy. Z obrázku 23 je patrný rozdíl mezi purifikovaným a nepurifikovaným bilirubinem IX- $\alpha$  ve hmotnostním spektru. Hmotnostní spektrum bilirubinu v negativním módu analýzy odpovídá  $m/z = 583$ , což je majoritní pík v předkládaném spektru. Znečištění bilirubinu je způsobeno především fosfolipidovými agregáty, které byly viditelně vysráženy v průběhu purifikace.



Obr. 23 Hmotnostní spektra A) nepurifikovaného B) purifikovaného bilirubinu IX- $\alpha$  ( $U_{\text{na kapiláře}} = -106,7 \text{ V}$ )

### 3.2 Hmotnostní spektra purifikovaného biliverdinu

Komerčně dostupný biliverdin je získáván redukcí bilirubinu, který je získáván ze žlučových kamenů krav a není dostatečně přečištěn pro potřebné syntézy. Z obrázku 24 je patrný rozdíl mezi purifikovaným a nepurifikovaným bilirubinem IX- $\alpha$  ve hmotnostním spektru. Hmotnostní spektrum biliverdinu v negativním módu analýzy odpovídá  $m/z = 581$ , což je majoritní pík v předkládaném spektru. Znečištění biliverdinu je způsobeno především fosfolipidovými agregáty, které byly viditelně vysráženy v průběhu purifikace.



Obr. 24 Hmotnostní spektra A) nepurifikovaného B) purifikovaného biliverdinu IX- $\alpha$  ( $U_{\text{na kapiláře}} = - 113,0 \text{ V}$ )

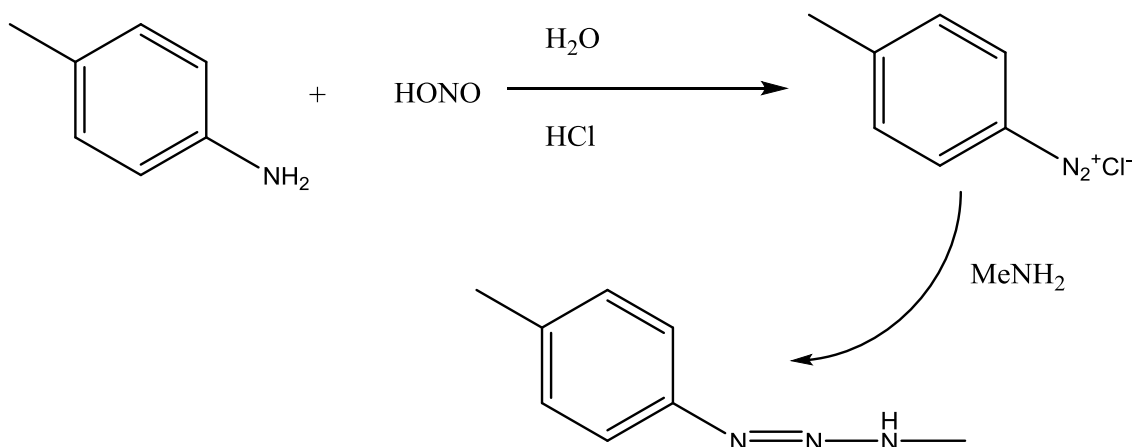
### 3.3 Příprava bilirubinu dimethylesteru

Pro další syntézy bylo potřeba připravit bilirubin dimethylester. K této přípravě bylo použito dvou strategií. Nejprve esterifikace pomocí 1-alkyl-3-*p*-tolyltriazenem a druhá metoda byla použita esterifikace diazomethanem.

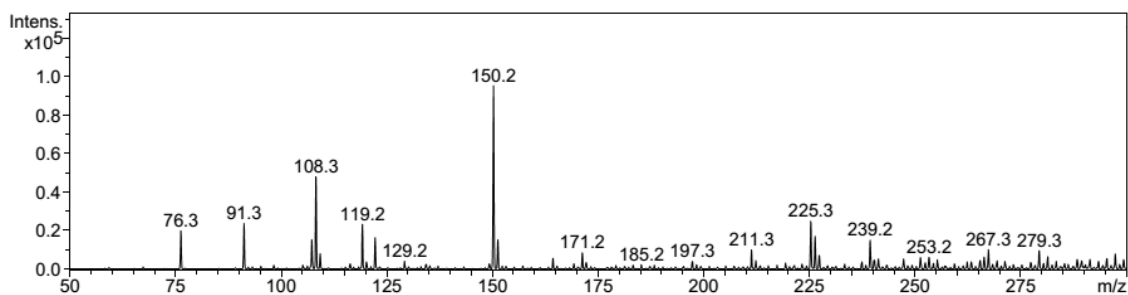
#### 3.3.1 Esterifikace bilirubinu s 1-alkyl-*p*-tolyltriazenem

##### 3.3.1.1 Příprava 1-alkyl-*p*-tolyltriazenu

1-alkyl-*p*-tolyltriazenu byl připraven postupem uvedeným na str. 43. Schéma reakcí je shrnuto v obrázku 25. Vzniklý triazen byly bílé podlouhlé krystalky s bodem tání 80,5 – 81,5 °C. Triazen byl analyzován hmotnostní spektrometrií v pozitivním módu, ve spektru (Obr. 26) je patrný pík  $m/z = 150$ , který odpovídá molekulárnímu píku triazenu.



Obr. 25 Schéma syntézy 1-alkyl-*p*-tolyltriazenu



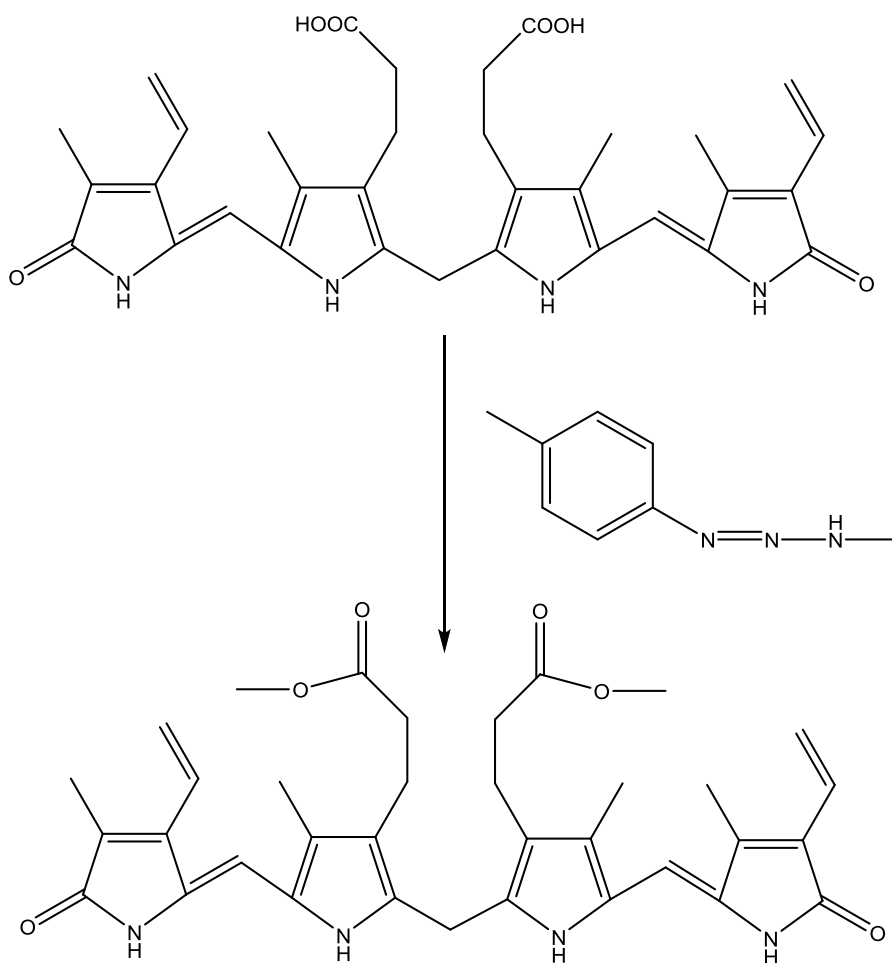
Obr. 26 Hmotnostní spektra 1-alkyl-*p*-tolyltriazenu ( $m/z = 150,2$ )

( $U_{\text{na kapiláře}} = 82,2 \text{ V}$ )

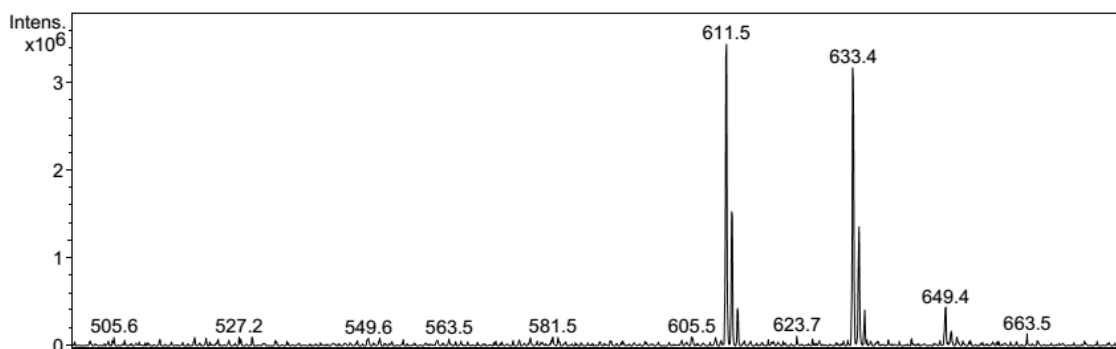


### 3.3.1.2 Esterifikace bilirubinu triazenem

S připraveným triazenem byl esterifikován bilirubin dle postupů viz. Experimentální část (Obr. 27). Vzniklý bilirubin dimethylester byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie v pozitivním módu. Hmotnostní pík bilirubin dimethylesteru odpovídá pík  $m/z = 611,5$  další majoritní pík  $m/z = 633,4$  odpovídal bilirubin dimethylesteru s kationtem sodíku (Obr. 28).



Obr. 27 Schéma esterifikace bilirubinu



Obr. 28 Hmotnostní spektra bilirubin dimethylesteru ( $m/z = 611,5$ )

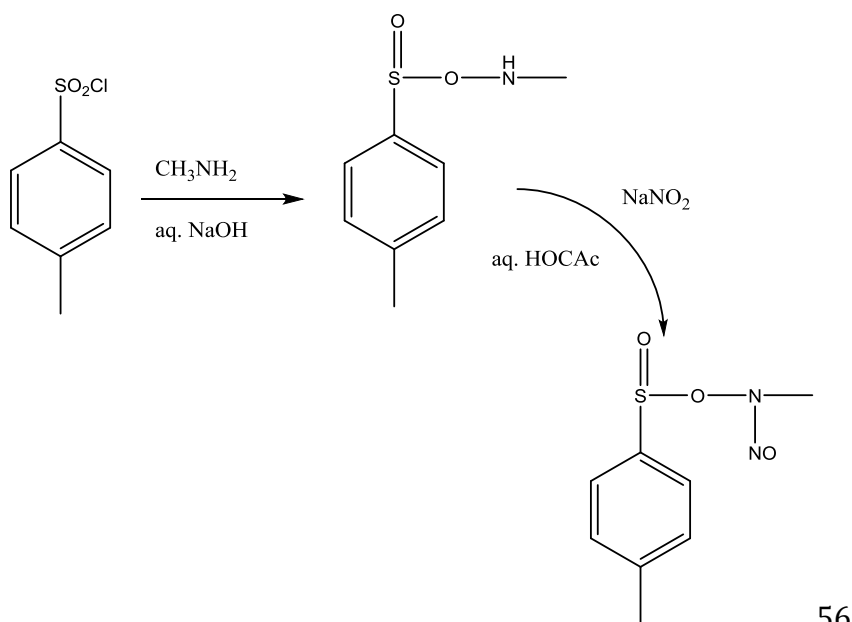
( $U_{\text{na kapiláře}} = 113,0 \text{ V}$ )

### 3.3.2 Esterifikace bilirubinu diazomethanem

Jako další metoda pro přípravu bilirubinu dimethylesteru byl použit diazomethan. Nejprve musel být nesyntetizován diazald, který byl použit jako prekurzor pro syntézu diazomethanu, se kterým byla provedena výsledná reakce za vzniku bilirubinu dimethylesteru.

#### 3.3.2.1 Příprava diazaldu

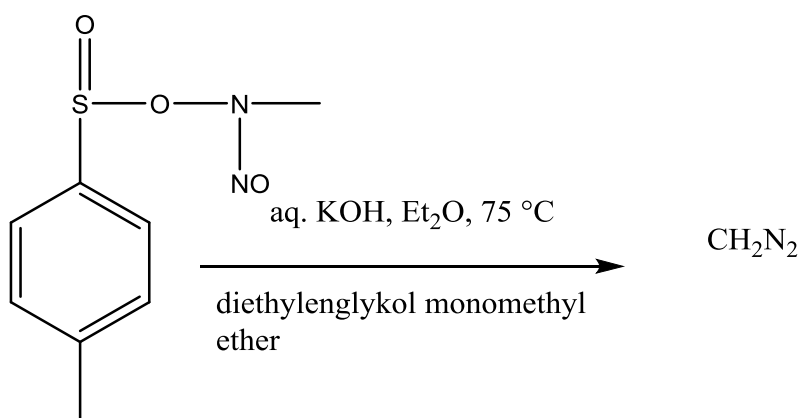
Diazald byl připraven podle známého postupu [85] viz obr. 29. Vzniklý nažloutlý prášek byl použit pro další syntézu.



Obr. 29 Schéma syntézy diazaldu

### 3.3.2.2 Příprava diazomethanu

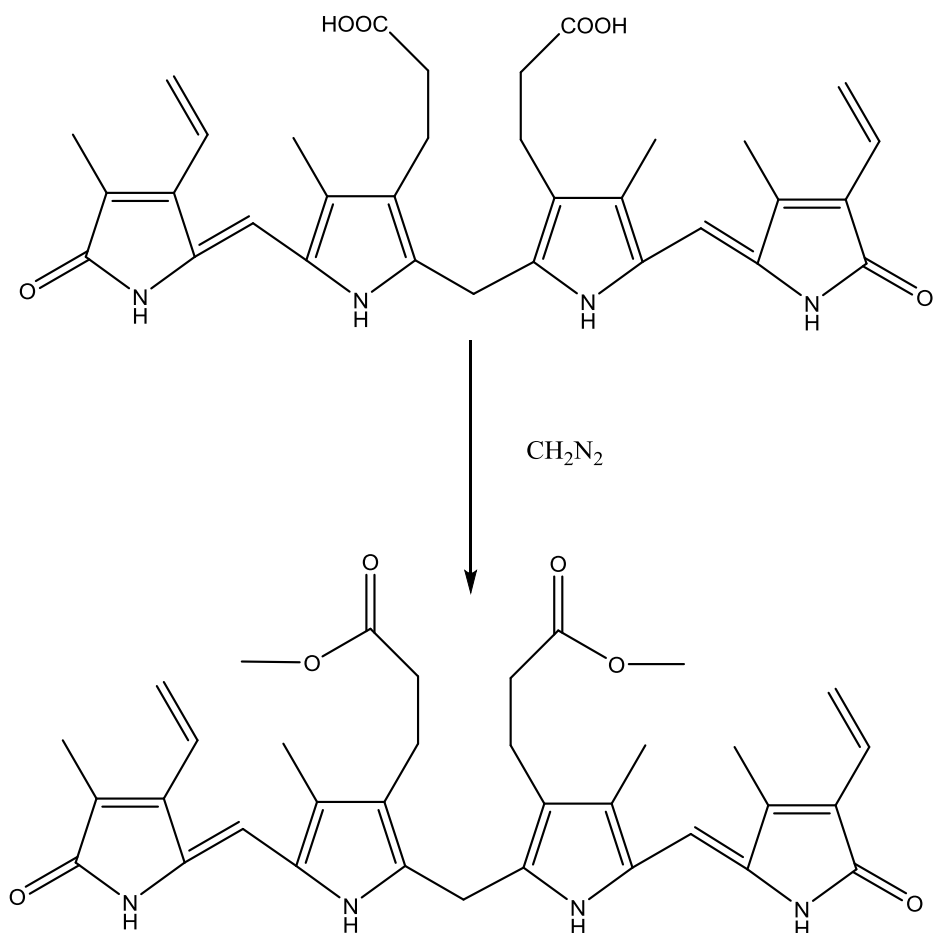
Diazomethan byl připraven alkalickým rozkladem diazaldu (Obr. 30). Vzniklý nažloutlý roztok byl použit pro syntézu bilirubinu dimethylesteru.



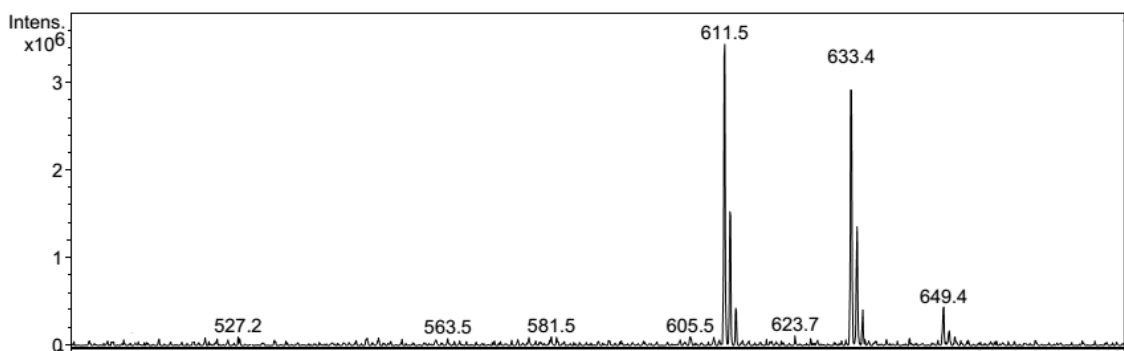
Obr. 30 Schéma syntézy diazomethanu

### 3.3.2.3 Esterifikace bilirubinu diazomethanem

Pomocí připraveného diazomethanu byl esterifikován bilirubin dle schématu (Obr. 31). Vzniklý bilirubin dimethylester byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie v pozitivním módu. Hmotnostní pík bilirubin dimethylesteru odpovídá signálu  $m/z = 611,5$  další majoritní pík  $m/z = 633,4$  odpovídal bilirubin dimethylesteru s kationtem sodíku (Obr. 32).



Obr. 31 Schéma esterifikace bilirubinu diazomethanem

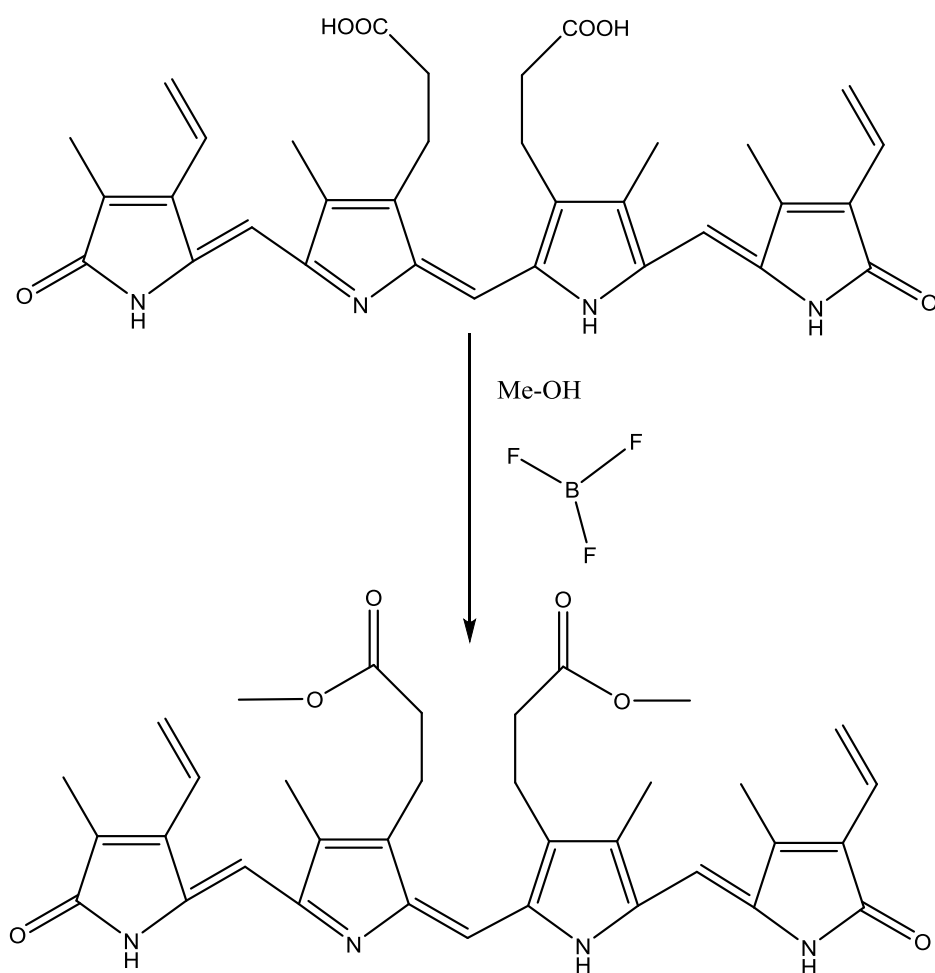


Obr. 32 Hmotnostní spektra bilirubin dimethylesteru ( $m/z = 611,5$ )

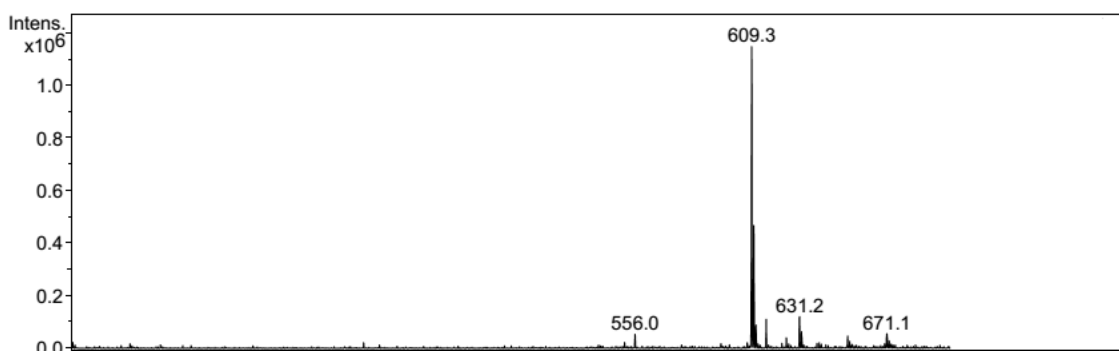
( $U_{\text{na kapiláře}} = 116,2 \text{ V}$ )

### 3.4 Příprava biliverdinu dimethylesteru

Biliverdin dimethylester byl připraven reakcí s  $\text{BF}_3\text{-MeOH}$  viz. Experimentální část (Obr. 33). Výsledné zelené krystalky byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie v negativním módu. Hmotnostní pík biliverdinu dimethylesteru odpovídá pík  $m/z = 609,3$  (Obr. 34).



Obr. 33 Schéma esterifikace biliverdinu



Obr. 34 Hmotnostní spektra biliverdinu dimethylesteru ( $m/z = 609,3$ )

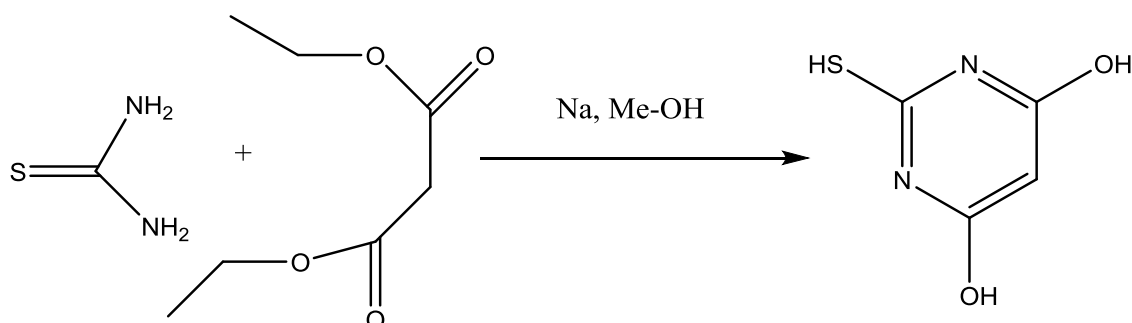
( $U_{\text{na kapiláře}} = -127,3 \text{ V}$ )

### 3.5 Reakce BV XIII- $\alpha$ s kyselinou thiobarbiturovou

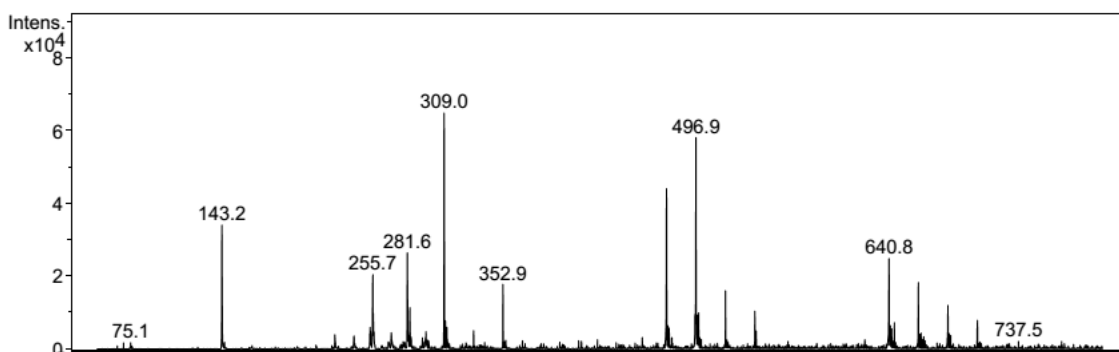
Reakce BV XIII- $\alpha$  s kyselinou thiobarbiturovou vede k adici na C-10, čímž by došlo k syntéze derivátu bilirubinu v poloze C-10. Kyselina thiobarbiturová by byla potenciální derivátem pro značení radioaktivní  $^{35}\text{S}$  nebo  $^{14}\text{C}$ , jak je popisováno v literatuře [94].

#### 3.5.1 Syntéza kyseliny thiobarbiturové

Kyselina thiobarbiturová byla připravena dle postupů viz. Experimentální část (Obr. 35). Vzniklý nažloutlý prášek byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie v pozitivním módu. Hmotnostní pík kyseliny thiobarbiturové odpovídá signálu  $m/z = 143,2$  (Obr. 36). Další vyšší signály ve spektru pravděpodobně odpovídají dimerní, v tetramerním až pentamerním strukturám této kyseliny. Ve spektru jsou také patrné méně zastoupené izotopy síry, což dokazuje navázání atomu síry v majoritní molekule.



Obr. 35 Schéma syntézy kyseliny thiobarbiturové

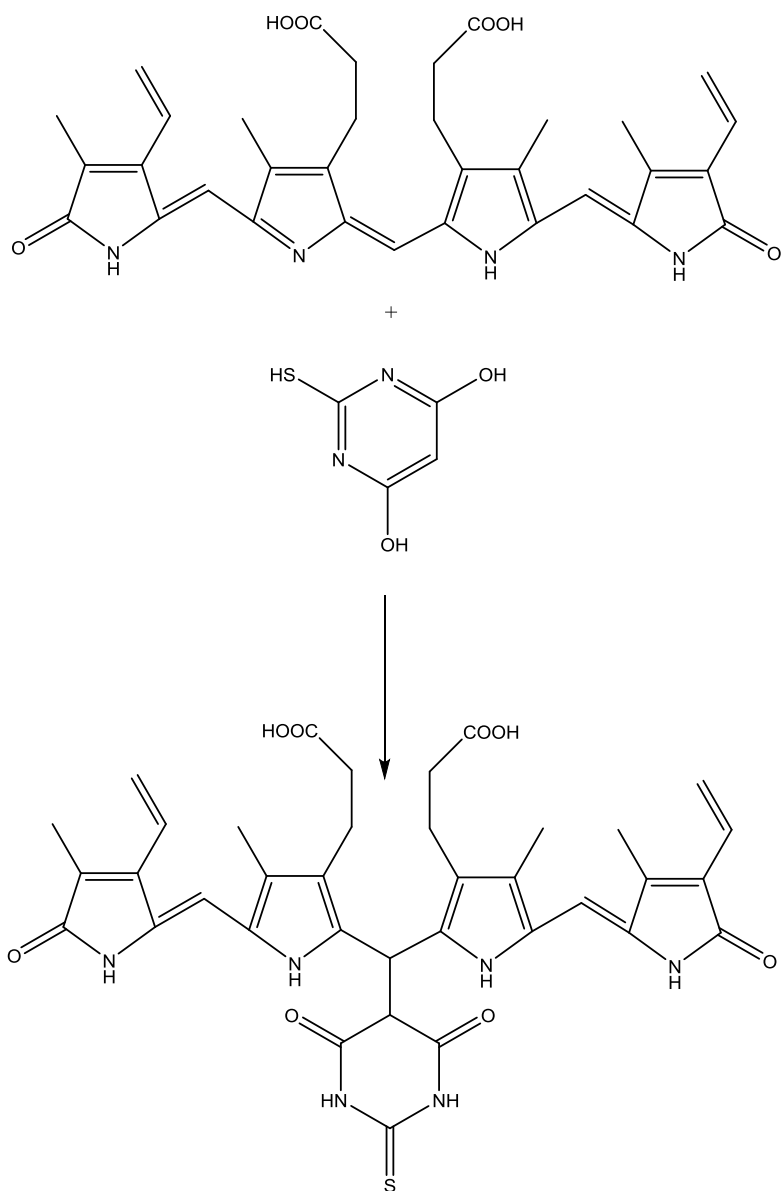


Obr. 36 Hmotnostní spektrum kyseliny thiobarbiturové ( $m/z = 143,2$ )

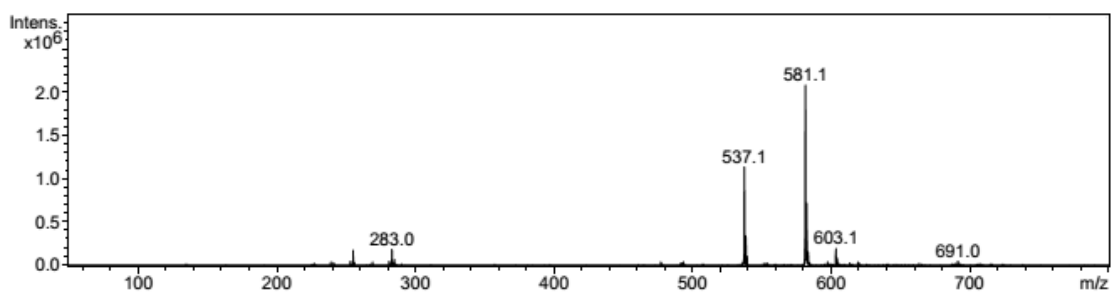
( $U_{\text{na kapiláře}} = 106,7 \text{ V}$ )

### 3.5.2 Syntéza derivátu biliverdinu s kyselinou thiobarbiturovou

Syntetizovaná kyselina barbiturová byla ponechána reagovat s biliverdinem viz. Experimentální část (Obr. 37). Výsledný vzorek byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie v negativním módu. Ze získaného spektra lze usoudit, že nedošlo k navázání kyseliny thiobarbiturové na biliverdin, což dokazuje majoritní pík  $m/z = 581,1$ , který odpovídá samotnému biliverdinu (Obr. 38), pík  $m/z = 726$ , který teoreticky odpovídal derivátu biliverdinu s kyselinou thiobarbiturovou ve spektru chybí. Samotná kyselina thiobarbiturová byla pravděpodobně odstraněna ze směsi v průběhu izolace.



Obr. 37 Schéma reakce biliverdinu s kyselinou thiobarbiturovou

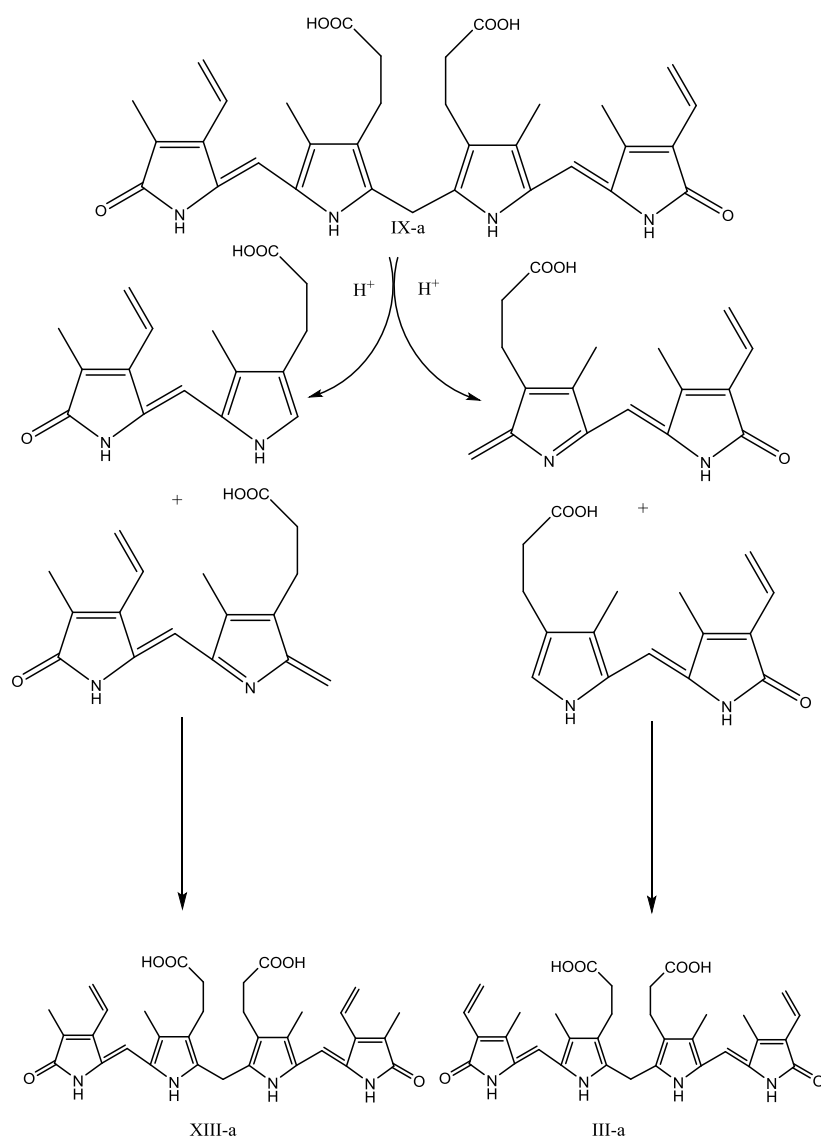


Obr. 38 Hmotnostní spektrum derivátu BV s kyselinou thiobarbiturovou ( $m/z = 726$ ) ve spektru chybí ( $U_{\text{na kapiláře}} = -113,0 \text{ V}$ )

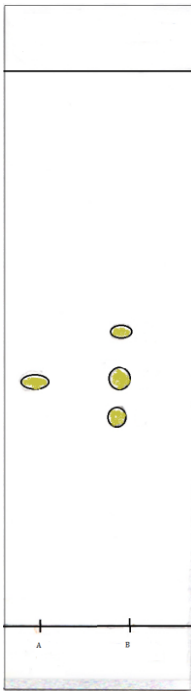


### 3.6 Kyselá katalyzovaná izomerace bilirubinu IX- $\alpha$

Byla provedena kyselá katalyzovaná izomerace bilirubinu dvěma způsoby, s kyselinou chlorovodíkovou a p-toluensulfonovou kyselinou viz. Experimentální část (Obr. 39). Výsledné izomery byly analyzovány pomocí TLC. Jednotlivé výsledky jsou na obrázku 40, pro izomeraci kyselinou chlorovodíkovou a 41 pro kyselinou p-toluensulfonovou. Z obou obrázků je patrné, že došlo k izomeraci bilirubinu XI- $\alpha$  na další dva izomery III a XIII- $\alpha$  zastoupeny v poměru asi 25 % a 25 % k 50 % IX- $\alpha$ .



Obr. 39 Schéma kyselá izomerace bilirubinu IX- $\alpha$



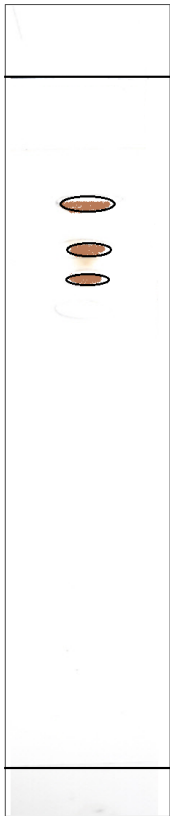
Obr. 40 TLC reakční směsi po izomeraci bilirubinu (kyselá katalýza konc. HCl), A)

BR IX- $\alpha$  B) směs izomerů

Stacionární fáze: silikagel

Mobilní fáze: benzen/Me-OH/ CHCl<sub>3</sub> v poměru (100:1,5:50) (Rf<sub>III- $\alpha$</sub> : 0,38;

Rf<sub>XIII $\alpha$</sub> : 0,52; Rf<sub>IX- $\alpha$</sub> : 0,46)



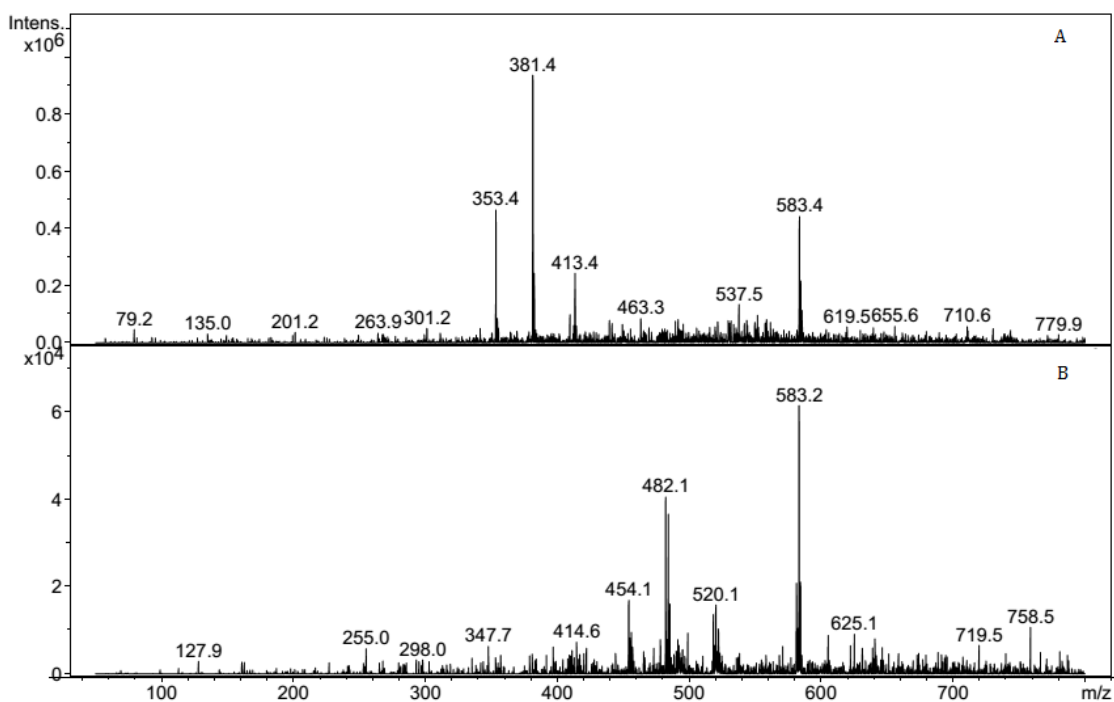
Obr. 41 TLC izomerů bilirubinu (kyselá katalýza *p*-toluensulfonová kyselina)

Stacionární fáze: silikagel

Mobilní fáze: 3 % roztok AcN v chloroformu ( $R_{f_{III-\alpha}}$ : 0,68;  $R_{f_{XIII-\alpha}}$ : 0,80;  $R_{f_{IX-\alpha}}$ : 0,72)

### 3.7 Modifikace izomerace bilirubinu IX- $\alpha$ s [ $^{14}\text{C}$ ]formaldehydem

Byla provedena kyselá katalyzovaná izomerace bilirubinu IX- $\alpha$  přidáním značeného [ $^{14}\text{C}$ ]formaldehydu. U TLC roztoku bylo analyzováno pomocí scintilačního detektoru, který nevykazoval zvýšenou radioaktivitu ve vzorku, z čehož vyplývá, že nedošlo k navázání radioaktivního methylu do polohy C-10. Vzorek byl dále analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie v negativním a pozitivním módu. Výsledný methyl derivát s hmotou  $m/z = 598$  nebyl ve spektru nalezen (Obr. 42). Ve spektru byla viditelná pouze hmota  $m/z = 583$ , která odpovídala hmotě bilirubinu.



Obr. 42 Hmotnostní spektrum methyl derivátu BR ( $m/z = 598$ ) ve spektru chybí

A) Pozitivní mód

$U_{\text{na kapiláře}} = 106,7 \text{ V}$

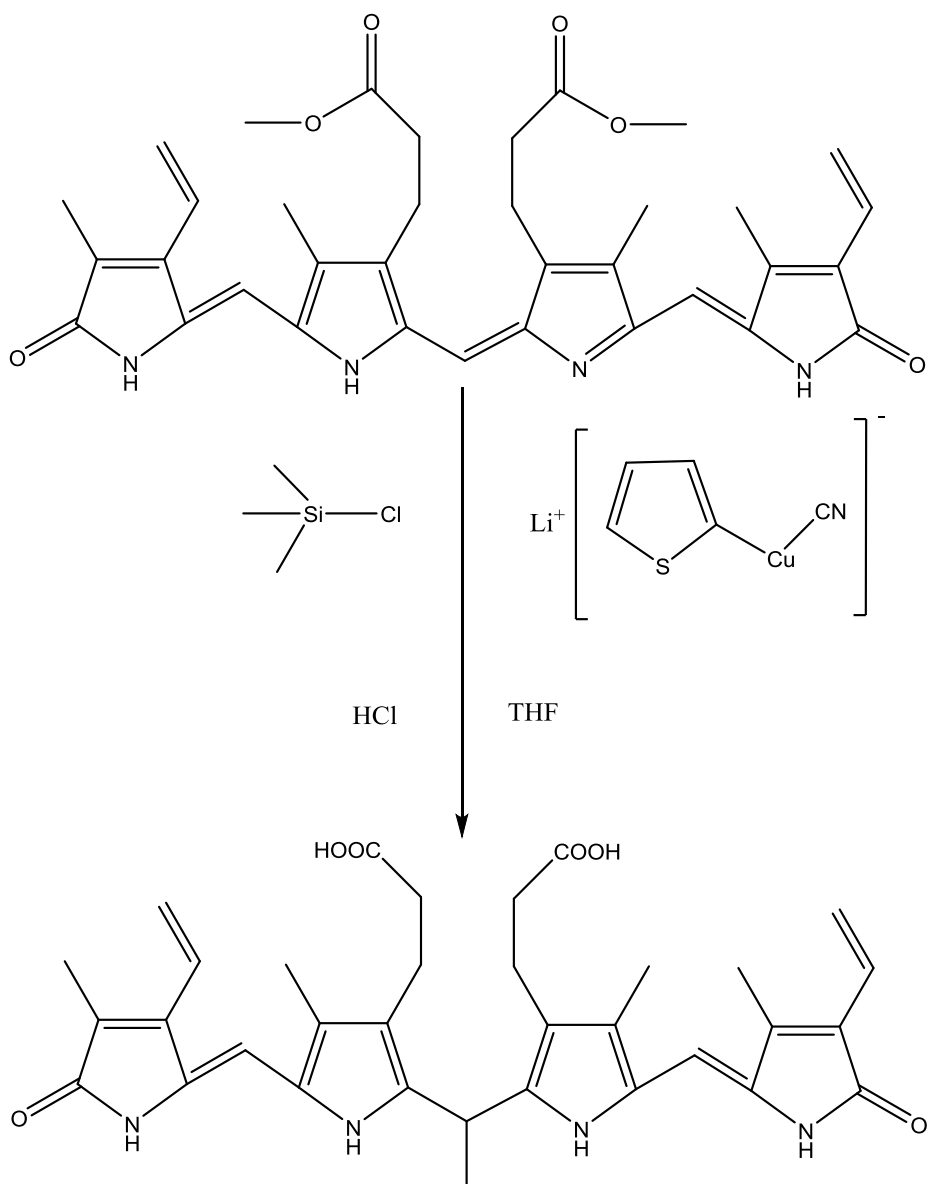
B) Negativní mód

$U_{\text{na kapiláře}} = -106,7 \text{ V}$

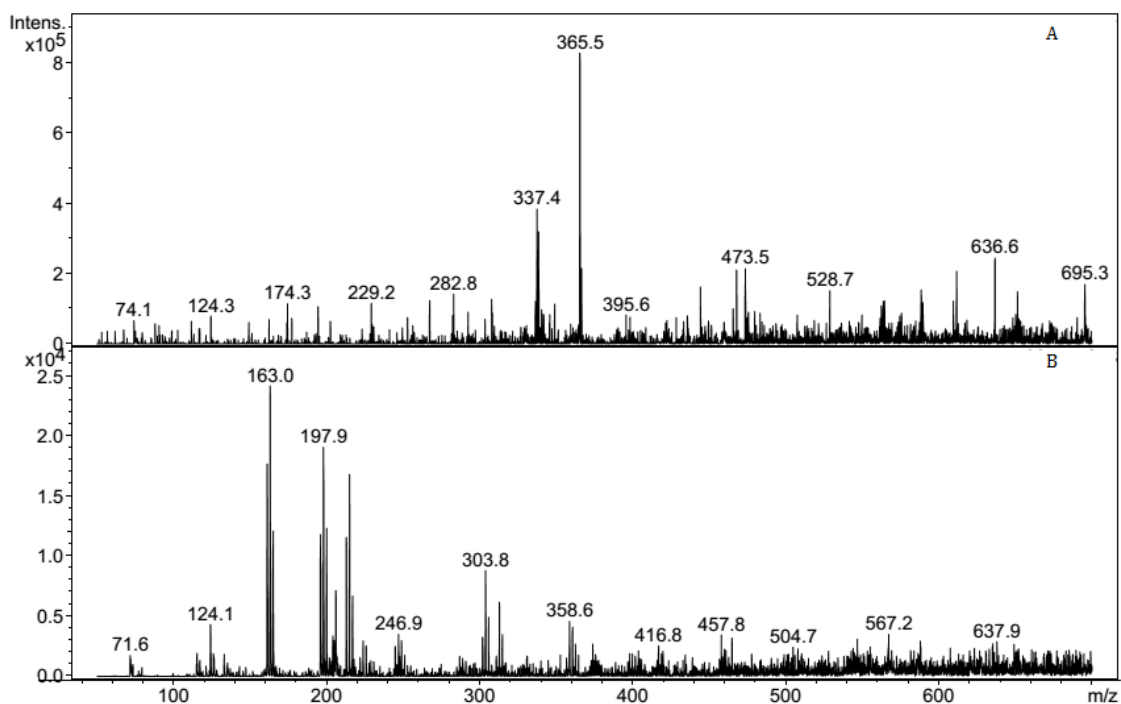
### 3.8 Adice alkylkuprátů na biliverdin dimethylester

Pro přípravu potenciálního methyl-derivátu bilirubinu na pozici C-10 byla modifikována metoda adice alkyl kuprátů na dimethylester biliverdinu. Strategie syntézy s kupráty byla zvolena záměrně, kvůli relativní rychlosti reakce a tedy potenciálnímu radioaktivnímu značení bilirubinu PETovským zářičem  $^{11}\text{C}$ . Teoretické předpoklady vzniku methyl-derivátu bilirubinu na pozici C-10 jsou také určující pro další experimenty na buňkách, protože fyzikálně-chemické vlastnosti takového derivátu by neměly být tolik odlišné od volného bilirubinu.

Byl připraven methyl derivát bilirubinu v poloze C-10 (Obr. 43). Vzniklá surová směs byla analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie v negativním a pozitivním módu. Výsledný methyl derivát s hmotou  $m/z = 598$  nebyl ve spektru nalezen (Obr. 44). Ve spektru byly viditelná pouze hmota  $m/z = 365,5$  a  $337,4$ , které odpovídají pravděpodobně vznikajícím degradačním produktům.



Obr. 43 Schéma reakce biliverdinu s thienylkupařaty



Obr. 44 Hmotnostní spektrum methyl derivátu BR ( $m/z = 598$ ) ve spektru chybí

A) Pozitivní mód

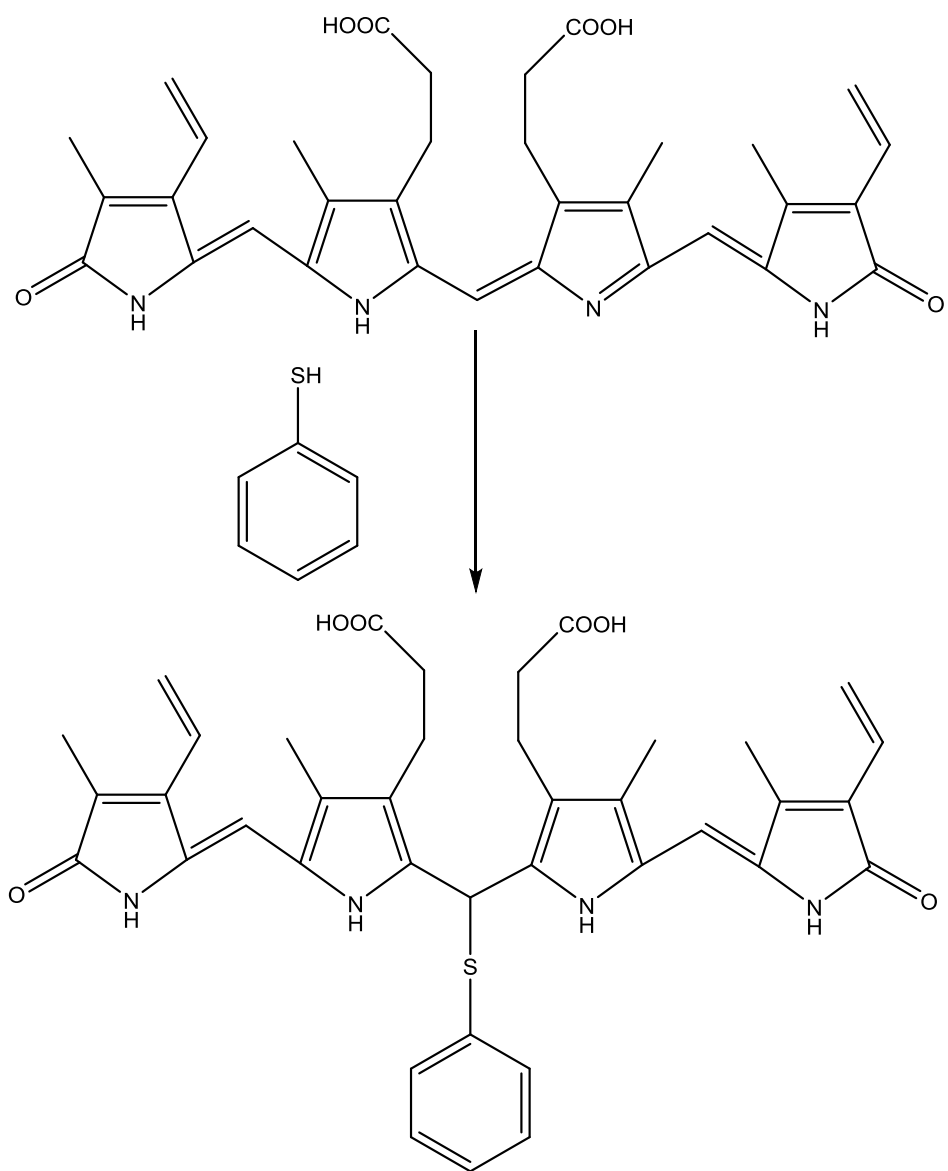
$U_{\text{na kapiláře}} = 116,0 \text{ V}$

B) Negativní mód

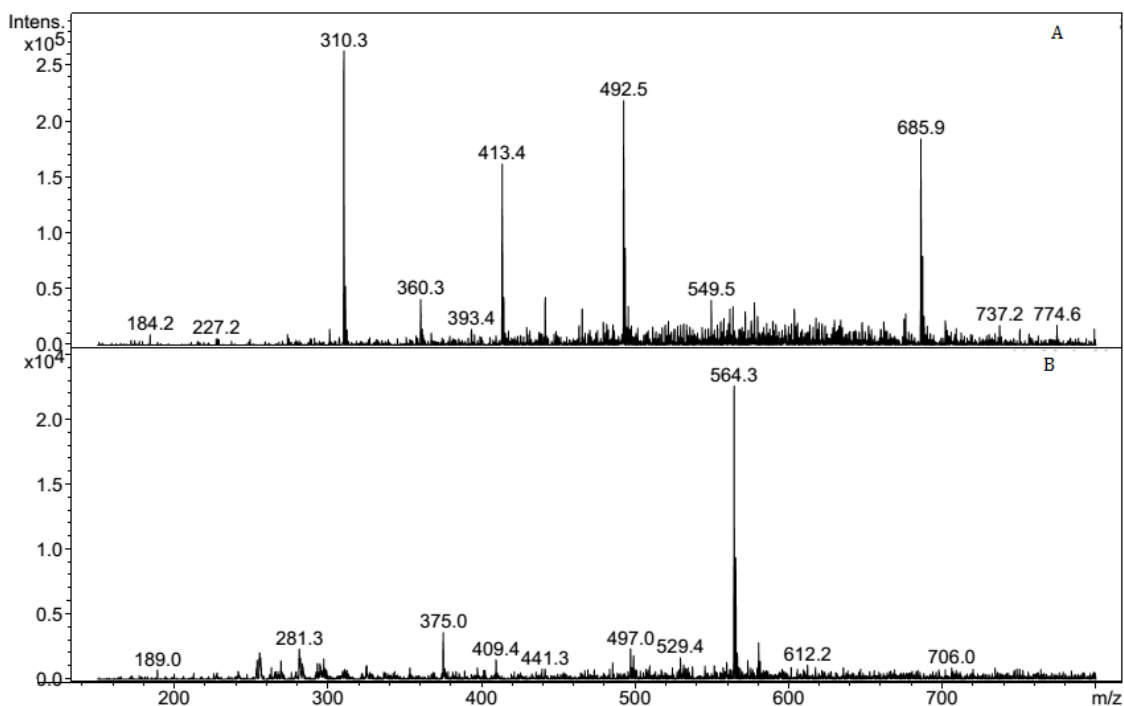
$U_{\text{na kapiláře}} = -116,0 \text{ V}$

### 3.9 Syntéza thiofenol derivátu bilirubinu

Další strategie pro označení bilirubinu vhodným izotopem pro nukleárně medicínské zobrazování byla směřována k navázání aromatického jádra na bilirubin do polohy C-10. Benzenové jádro by bylo vhodným kandidátem pro adici  $^{18}\text{F}$  využívaného, jako stěžejní izotop pro PET nebo jodací izotopy  $^{123,131}\text{I}$  vhodné pro SPECT. Byl připraven thiofenolový derivát bilirubinu v pozici C-10 dle postupu experimentální část (Obr. 45), jehož aromatický kruh by mohl sloužit, jako potenciální adiční cíl pro radioaktivní značení jodací, případně fluorací. Výsledný produkt byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie v negativním a pozitivním módu. Hmotnost ve spektru  $m/z = 585,9$  odpovídá připravenému derivátu (Obr. 46).



Obr. 45 Schéma reakce biliverdinu s thiofenolem



Obr. 46 Hmotnostní spektrum thiofenyl derivátu BR ( $m/z = 685,9$ )

A) Pozitivní mód

$U_{\text{na kapiláře}} = 127,3 \text{ V}$

$T_{\text{sušící}} = 330 \text{ °C}$

B) Negativní mód

$U_{\text{na kapiláře}} = -127,3 \text{ V}$

$T_{\text{sušící}} = 330 \text{ °C}$

### 3.10 Syntéza [ $^3\text{H}$ ]bilirubinu

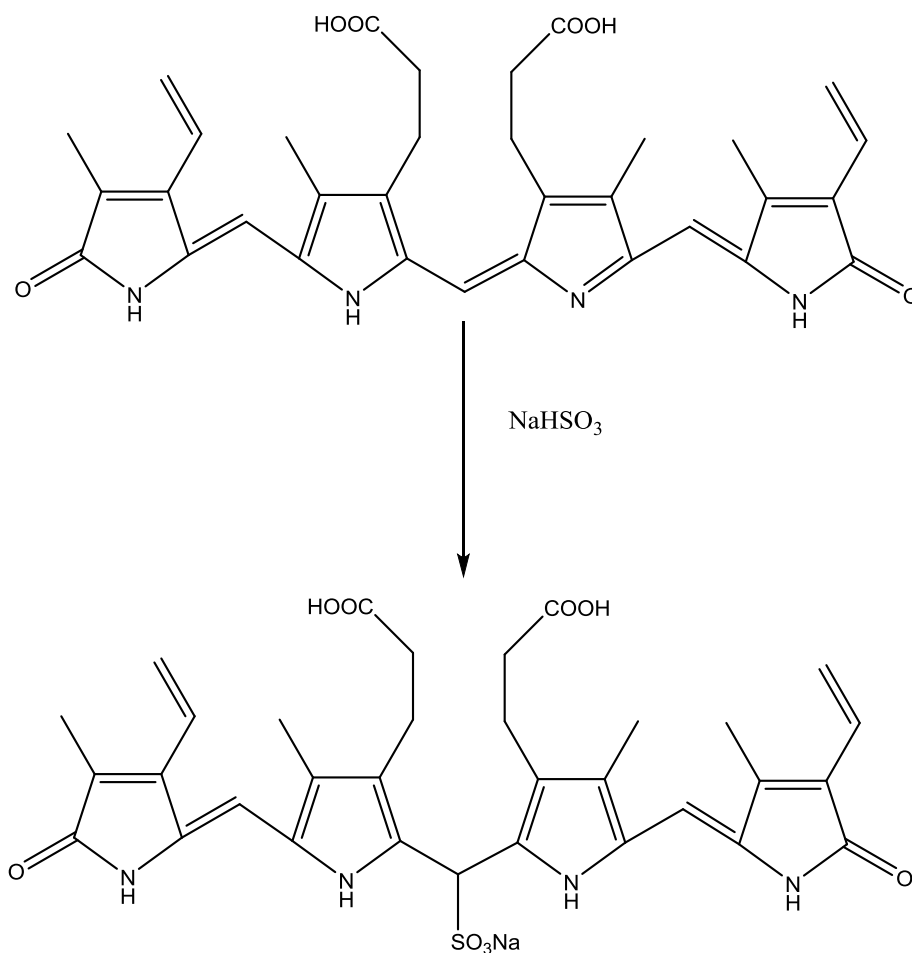
Byl připraven  $^3\text{H}$  značený bilirubin v pozici C-10 o měrné aktivitě 1102,5 Bq/mg bilirubinu. Aktivita byla zjišťována pomocí scintilačního detektoru a byla vztažena na hmotnost získaného bilirubinu. Celková aktivita roztoku byla 1832,1 Bq.

### 3.11 Syntéza ranarubinu

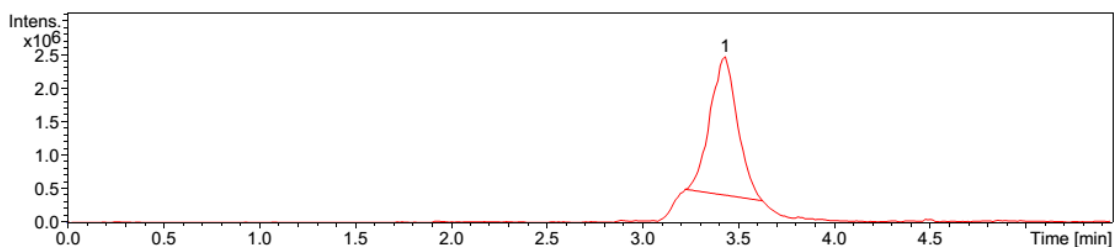
Ranarubin byl připraven několika modifikovanými metodami viz experimentální část, dle základního schématu reakce (Obr. 47). Byly analyzovány vzorky ranarubinu připraveného metodou dle Ma et al. (analyzováno i LC/MS) (Obr. 48,49), modifikovanou metodou s MTBE (Obr. 50), metodou bez butanolu srážený THF (Obr. 51) ,ethyl-acetátem (Obr. 52) a zrychlenou metodou s butanolem srážený diethyletherem (Obr. 53) a benzenem (Obr. 54). Analýzy byly



provedeny pomocí hmotnostní spektrometrie v negativním módu. Hmotnost ve spektru  $m/z = 663$  odpovídá hmotě ranarubinu. Jednotlivá spektra jsou zobrazena níže. Ze spekter vyplývá, že nejrychlejší a nejúčinnější metodou byla metoda modifikace urychlenou metodou s butanolem při srážení diethyletherem, tato metoda byla také dále používána na další experimenty. Metoda s přidavkem MTBE nebyla vhodnou, protože ve spektru nebyla viditelná hmotnost ranarubinu.



Obr. 47 Obecné schéma syntézy ranarubinu



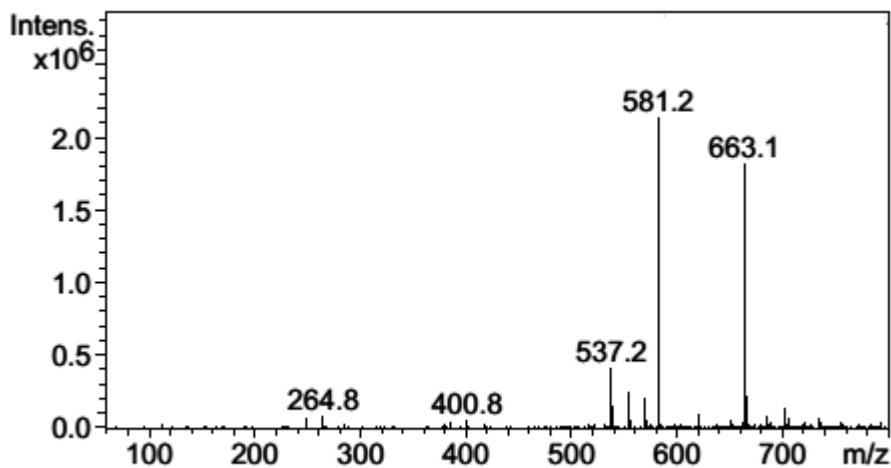
Obr. 48 LC/MS chromatogram s intenzitou hmoty  $m/z = 663$

Kolona: C-18 fenyl

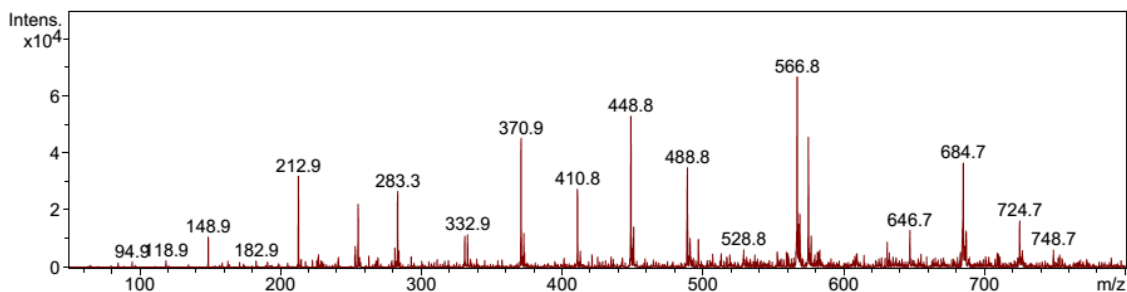
Mobilní fáze: Me-OH

Průtok: 0,5 ml/min

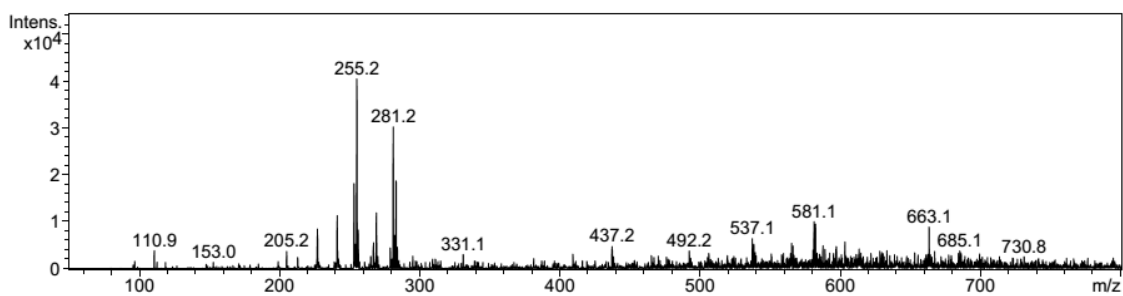
$\lambda = 435 \text{ nm}$



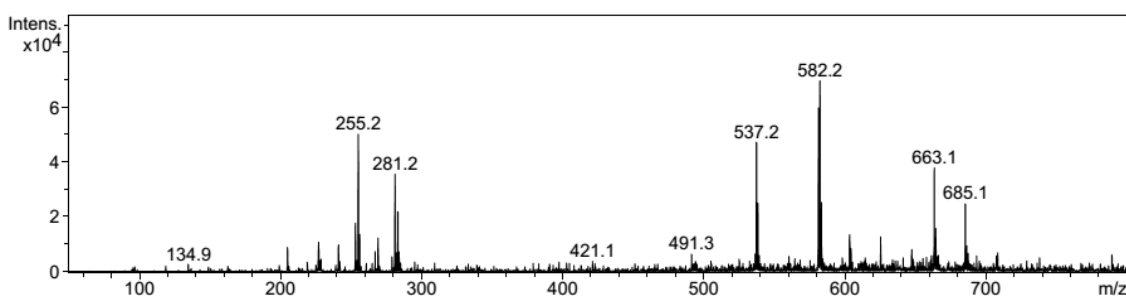
Obr. 49 Hmotnostní spektrum ranarubinu ( $m/z = 663,1$ ) připraveného modifikací metody dle Ma et al. ( $U_{\text{na kapiláře}} = -122,3 \text{ V}$ ;  $T_{\text{sušící}} = 330 \text{ °C}$ )



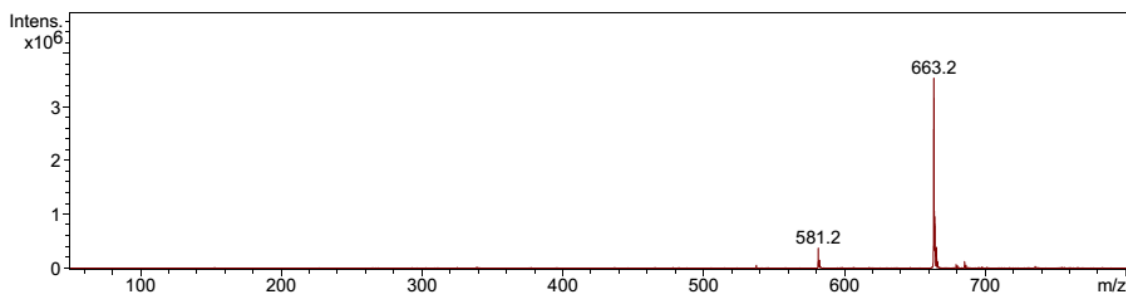
Obr. 50 Hmotnostní spektrum ranarubinu připraveného modifikací metodou s přidavkem MTBE ( $m/z = 663,1$ ), ve spektru chybí ( $U_{\text{na kapiláře}} = -106,7 \text{ V}$ )



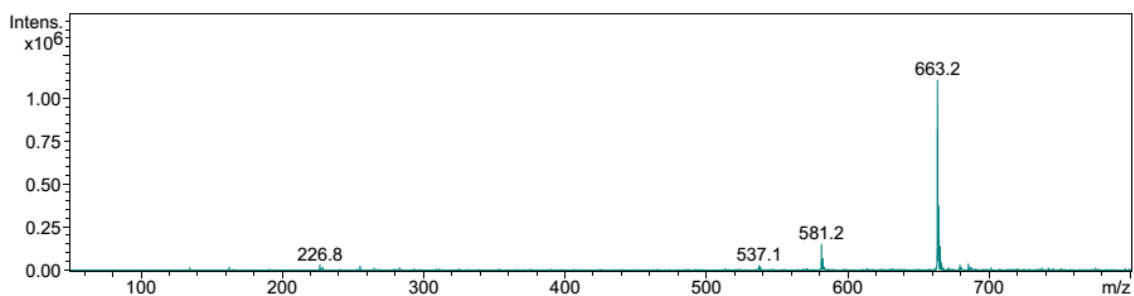
Obr. 51 Hmotnostní spektrum ranarubinu ( $m/z = 663,1$ ), připravený modifikací metodou bez butanolu po srážení THF ( $U_{\text{na kapiláře}} = -106,7 \text{ V}$ )



Obr. 52 Hmotnostní spektrum ranarubinu ( $m/z = 663,1$ ), připravený modifikací metodou bez butanolu po srážení ethyl-acetátem ( $U_{\text{na kapiláře}} = -106,7 \text{ V}$ )



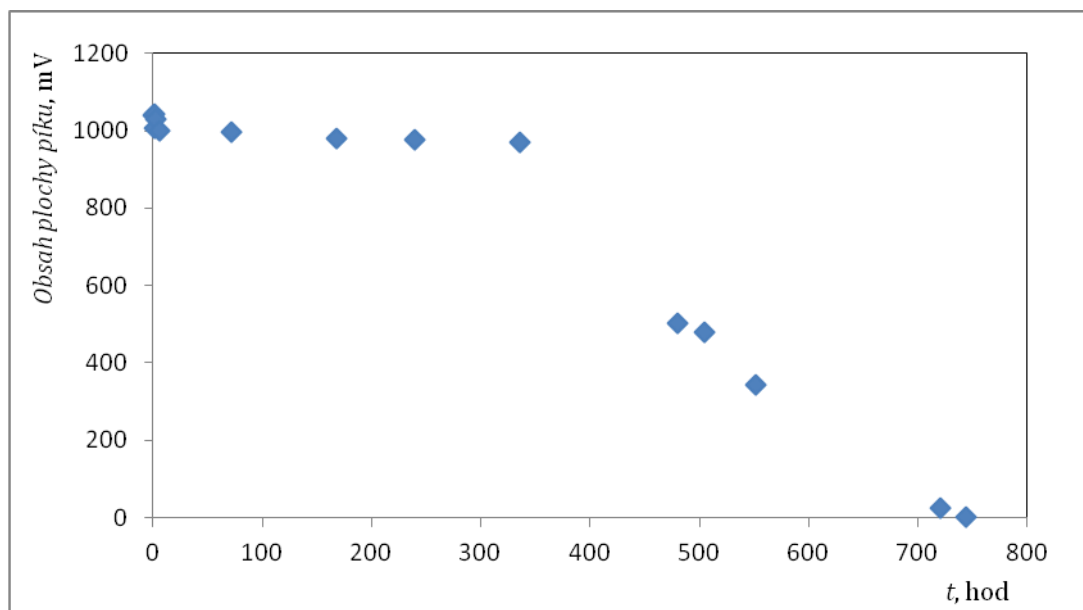
Obr. 53 Hmotnostní spektrum ranarubinu ( $m/z = 663,1$ ), připravený urychlenou metodou s butanolem po srážení diethyletherem ( $U_{\text{na kapiláře}} = -106,7 \text{ V}$ )



Obr. 54 Hmotnostní spektrum ranarubinu ( $m/z = 663,1$ ), připravený urychlenou metodou s butanolem po srážení benzenem ( $U_{\text{na kapiláře}} = -106,7 \text{ V}$ )

### 3.12 Stabilitní studie ranarubinu

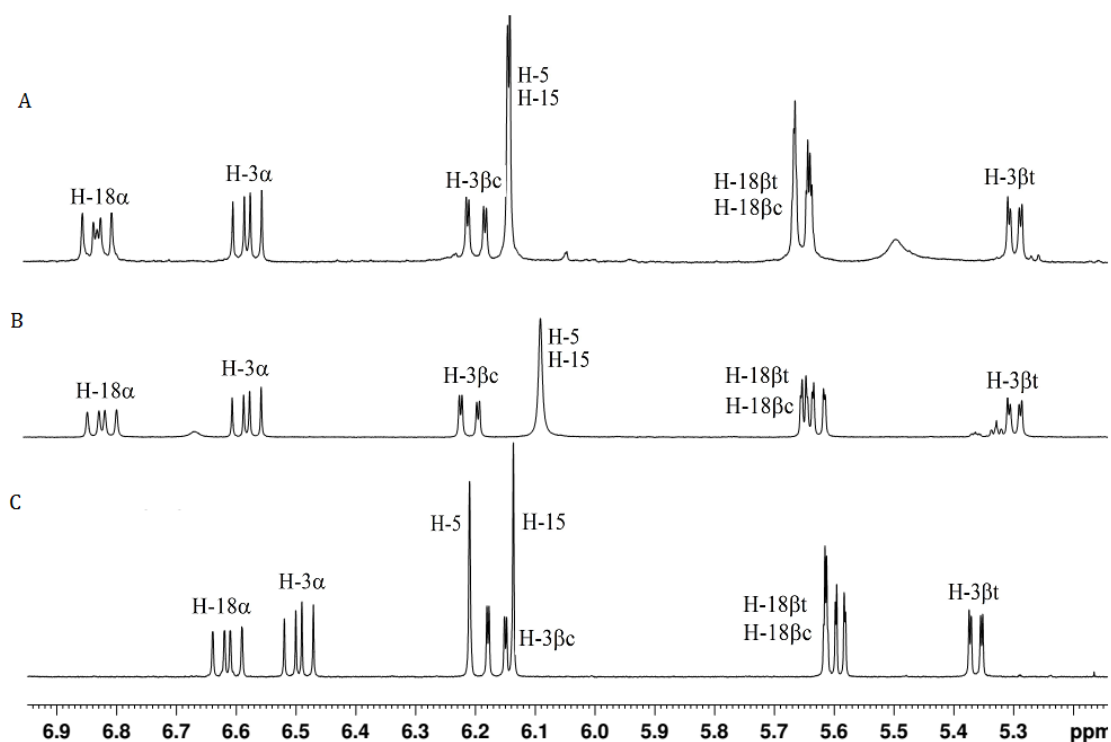
Byly analyzovány roztoky ranarubinu v methanolu v časovém horizontu jednoho měsíce pomocí HPLC. Z výsledných ploch píků byla vytvořena stabilitní časová závislost (Obr. 55), ze které vyplývá, že ranarubin byl v roztoku methanolu stabilní po dobu 14 dní od přípravy. Poté začalo docházet k degradaci ranarubinu, po 1 měsíci již došlo k úplnému rozpadu ranarubinu.



Obr. 55 Graf závislosti plochy píku ranarubinu na čase

### 3.13 NMR analýza bilirubinu a ranarubinu

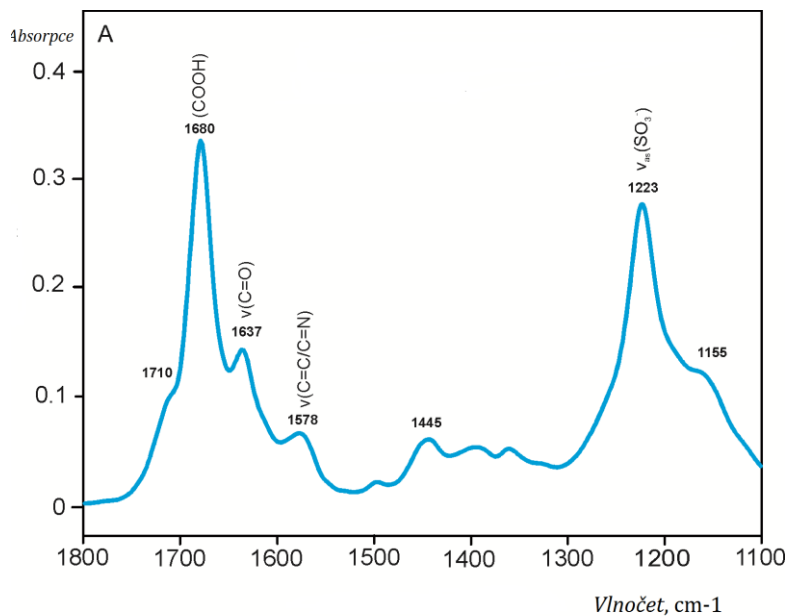
Byly provedeny analýzy NMR bilirubinu v DMSO a  $\text{CDCl}_3$  a ranarubinu v DMSO (Obr. 56). Z NMR spekter bylo zjištěno, že se ranarubin a bilirubin nechovají podobně, ale  $\text{SO}_3\text{H}$  skupina na C-10 ranarubinu má vliv na vodíkové můstky určující strukturu těchto molekul.



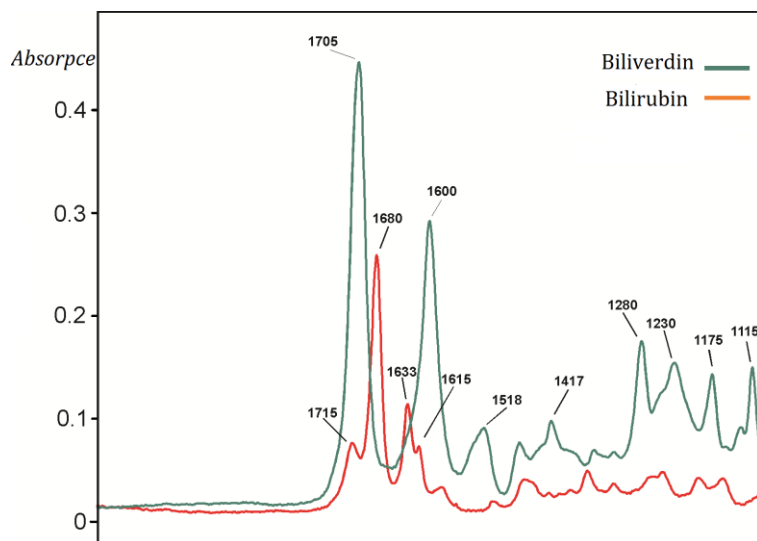
Obr. 56 NMR spektra A) ranarubin v DMSO B) bilirubin v DMSO a C) bilirubin v  $\text{CDCl}_3$

### 3.14 ECD analýza bilirubinu, biliverdinu a ranarubinu

Byly proměřeny elektronické cirkulární dichroismy s chirální maticí sérového albuminu. Jednotlivá spektra byla porovnána kvůli zjištění podobnosti vazných vlastností bilirubinu, biliverdinu a ranarubinu. Na obrázku 57 jsou ECD spektra s lidským sérovým albuminem a ranarubinem. Molární absorpční koeficienty pro ranarubin (Obr. 57) vychází nižší než pro bilirubin a biliverdin (Obr. 58)



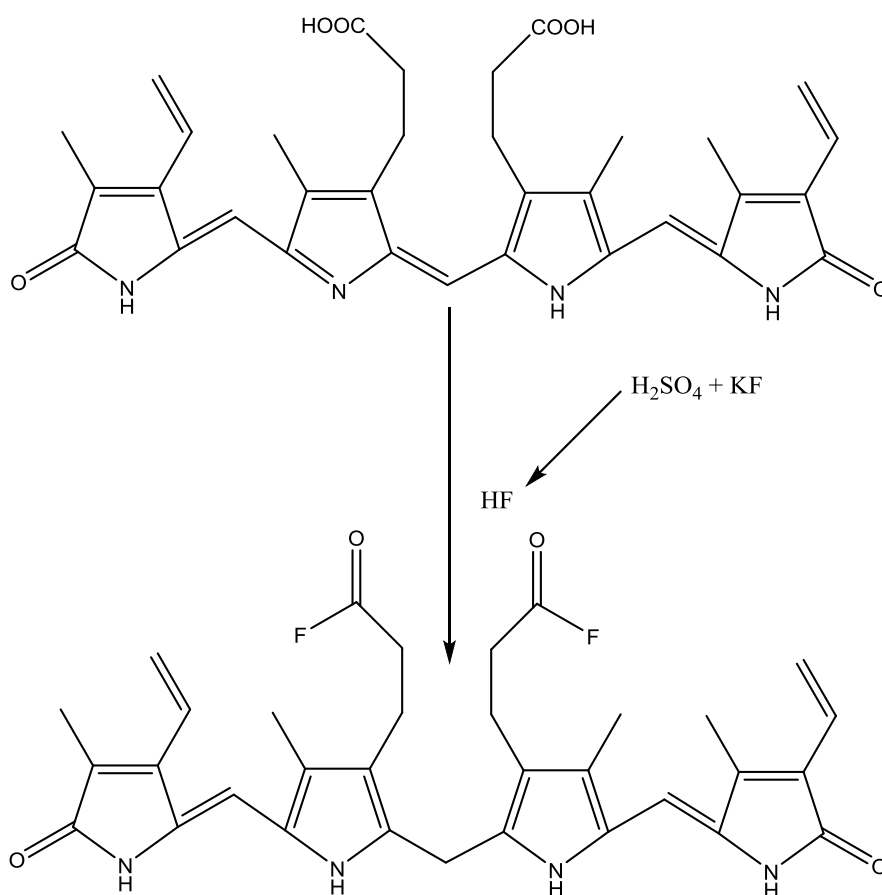
Obr. 57 ECD spektra ranarubinu v DMSO o  $c = 0,044 \text{ mol/l}$  s lidským sérovým albuminem (Kyveta: 0,05 mm)



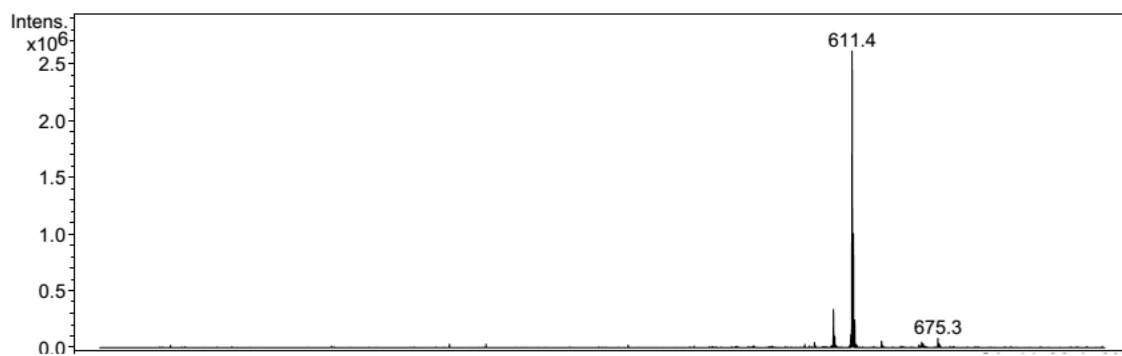
Obr. 58 ECD spektra biliverdinu a bilirubinu v DMSO o  $c = 0,075 \text{ mol/l}$  s lidským sérovým albuminem (Kyveta : 0,023 mm)

### 3.15 Syntéza fluorovaného derivátu bilirubinu

Byla proveden pokus o syntézu fluorovaného derivátu na C-10 pozici bilirubinu zaváděním plynného fluorovodíku do roztoku biliverdinu viz. Experimentální část (Obr. 59). Vzniklá surová směs byla analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie v pozitivním módu. Hmotnost  $m/z = 602$  ve spektru nalezena nebyla, ale bylo zjištěno simulací spekter, že v reakci vznikl pravděpodobně difluoro derivát navázáním fluoru na obě karboxylové skupiny. Výsledný pík odpovídá  $m/z = 611,4$  ( $M^+ + Na^+$ ) (Obr. 60).



Obr. 59 Schéma syntézy difluoderivátu bilirubinu



Obr. 60 Hmotnostní spektrum difluoroderivátu bilirubinu ( $m/z = 611,4$ ),  
( $U_{\text{na kapiláře}} = 124,6 \text{ V}$ )



## 4 ZÁVĚR

V první části diplomové práce byly purifikovány oba stěžejní žlučové pigmenty používané pro syntézu bilirubin a biliverdin. Čistota těchto prekurzorů byla dokazována pomocí hmotnostních spekter. Dále byly připraveny dimethylestery bilirubinu pomocí dvou metod a sice pomocí triazenu a diazomethanu. Byl také připraven dimethyl ester biliverdinu pomocí BF<sub>3</sub>-Me-OH. Všechny estery byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací a iontovou pastí, jako analyzátoru. Hmotnost biliverdinu dimethylesteru odpovídala  $m/z = 611,5$  v pozitivním módu a hmota bilirubinu dimethylesteru odpovídala hmotě  $m/z = 609,3$  v záporném módu.

V další části práce byla provedena syntéza biliverdinu s navázáním kyseliny thiobarbiturové, jako možný zdroj pro radioaktivní značení. Výsledný derivát bilirubinu s navázanou kyselinou thiobarbiturovou v pozici C-10 nebyl v hmotnostním spektru detegován.

Dále byla provedena kyselá izomerace bilirubinu pomocí kyseliny chlorovodíkové a p-toluensulfonové. V obou případech byly separovány pomocí TLC izomery bilirubinu III, IX a XIII- $\alpha$ . Rovněž byl proveden pokus o kyselou izomeraci bilirubinu s přidavkem radioaktivního [<sup>14</sup>C]formaldehydu, kterým se nepodařilo označit bilirubin v poloze C-10, jako methyl derivát bilirubinu, což bylo ověřeno kapalinovou scintilací z TLC vzniklých izomeru bilirubinu a následně MS spektry, které vykazovaly pouze hmoty bilirubinu  $m/z = 583$ .

Dalším pokusem o syntézu methylderivátu bilirubinu byla adice alkylkuprátu na dimethylester biliverdinu. Po reakci s kupráty byla provedena MS analýza, která nevykazovala hmotnostní pík  $m/z = 598$ , který by odpovídal methyl derivátu bilirubinu, nýbrž degradační spektra vzniklá reakcí alkylkuprátu s dimethylesterem biliverdinu.

V další části práce byl adován thiofenol na dvojnou vazbu biliverdinu v poloze 9,10. Což bylo ověřeno pomocí MS, pík  $m/z = 685,9$  odpovídá tomuto derivátu, což bylo potvrzeno i izotopy síry viditelné ve spektru. Tímto bylo na bilirubin vneseno aromatické jádro, které by mohlo být potenciálně jodováno, případně fluorováno radioaktivními izotopy.

Byl připraven bilirubin značený izotopem tritia v poloze C-10 o specifické aktivitě 1102,5 Bq/mg bilirubinu. Tento derivát může být využit pro biologické experimenty.

Velká část této diplomové práce byla zaměřena na optimalizaci syntézy ranarubinu. Jako nejvhodnější postup přípravy ranarubinu metoda s butanolem, jako srážecí činidlo byl použit diethylether. Tento postup vykazoval nejlepší čistotu produktu dle MS spektra pro ranarubin  $m/z = 663$  v negativním módu. Dále byla provedena stabilitní studie ranarubinu v roztoku methanolu pomocí HPLC v průběhu 1 měsíce. Bylo zjištěno, že ranarubin v roztoku methanolu je stabilní po dobu 14 dní, pak začíná docházet k degradacím. Byla také zjišťována vazebná schopnost ranarubinu, bilirubinu a biliverdinu na lidský sérový albumin pomocí elektronického cirkulárního dichroismu. Z těchto spekter bylo patrné, že vazebné vlastnosti všech tří pigmentů jsou podobné. Byla změřena  $^1\text{H-NMR}$  spektra ranarubinu v DMSO- $d_6$  a bilirubinu v DMSO- $d_6$  a  $\text{CDCl}_3$ . Při porovnání jednotlivých spekter bylo patrné, že prostorové stabilizace pomocí vodíkových můstků u bilirubinu a ranarubinu jsou rozdílné, což určuje nevhodnost použití ranarubinu, jako analoga pro *in vitro* případně *in vivo* studie bilirubinu. V poslední části této diplomové práce byl syntetizován difluoroderivát bilirubinu. Tato syntéza byla optimalizovaná pro časovou a pracovní nenáročnost pro potenciální značení bilirubinu PETovským zářičem  $^{18}\text{F}$ . Tato diplomová práce přinesla několik vhodných derivátů bilirubinu pro značení nukleárně medicínskými radionuklidy vhodnými pro molekulární zobrazování.

## 5 POUŽITÁ LITERATURA

1. Vítek, L., ed. *Bilirubin a interní choroby*. 2009, Grada Publishing, a.s.: Praha.
2. Tiribelli, C.a.O., J. D., *New concepts in bilirubin and jaundice: Report of the Third International Bilirubin Workshop, April 6-8, 1995, Trieste, Italy*. *Hepatology*, 1996. **24**(5): p. 1296.
3. Hutchinson, D.W.W., N. M. and Hilary, Y. N., *Tritium-labeled bilirubin and biliverdin*. *Journal of labell. comp. and radiopharm.*, 1981. **18**(10): p. 1401.
4. Monti, D.S., R. and Manitto, P., *Preparation of biliverdin and bilirubin labeled with isotopic hydrogen at the central bridge*. *Journal of labell. comp. and radiopharm.*, 1981. **18**(8): p. 1237.
5. Plieninger, H.E.-B., F.; Ehl, K.; Kohler, R. and McDonagh, A. F., *New Synthesis and <sup>14</sup>C-mark of bilirubin IX-a*. *Liebigs Ann. Chem.*, 1972. **758**: p. 195.
6. Ostrow, J.D.M., P., *Solvent partition of <sup>14</sup>C-unconjugated bilirubin to remove labeled polar contaminants*. *Translational Research*, 2007. **149**(1): p. 37.
7. Ma, J.S.Y., F.; Wang, C, Q. and Chen, J. H., *Addition of sodium bisulfite to biliverdin*. *Chin. Chem. Lett.*, 1990. **1**: p. 171.
8. Colletti, P.M., *Clinical Nuclear Medicine: a new editor-in-chief*. *Clin Nucl Med*, 2010. **35**(12): p. 917.
9. Riklund, K.A., *PET/CT: nuclear medicine imaging in the future*. *Radiat Prot Dosimetry*, 2010. **139**(1-3): p. 8-11.
10. Dunphy, M.P. and J.S. Lewis, *Radiopharmaceuticals in preclinical and clinical development for monitoring of therapy with PET*. *J Nucl Med*, 2009. **50 Suppl 1**: p. 106S-21S.
11. Anderson, C.J., et al., *Design of targeted cardiovascular molecular imaging probes*. *J Nucl Med*, 2010. **51 Suppl 1**: p. 3S-17S.
12. Koukourakis, G., et al., *Overview of positron emission tomography chemistry: clinical and technical considerations and combination with computed tomography*. *J BUON*, 2009. **14**(4): p. 575-80.
13. Padhani, A., *PET imaging of tumour hypoxia*. *Cancer Imaging*, 2006. **6**: p. S117-21.
14. Riemann, B., et al., *Small animal PET in preclinical studies: opportunities and challenges*. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2008. **52**(3): p. 215-21.
15. Xiong, K.L., et al., *The role of positron emission tomography imaging of beta-amyloid in patients with Alzheimer's disease*. *Nucl Med Commun*, 2010. **31**(1): p. 4-11.
16. Takano, A., *The application of PET technique for the development and evaluation of novel antipsychotics*. *Curr Pharm Des*, 2010. **16**(3): p. 371-7.
17. West, C.M., T. Jones, and P. Price, *The potential of positron-emission tomography to study anticancer-drug resistance*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(6): p. 457-69.
18. Li, Z. and P.S. Conti, *Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010. **62**(11): p. 1031-51.
19. Shoghi, K.I., *Quantitative small animal PET*. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2009. **53**(4): p. 365-73.

20. Kumakura, Y. and P. Cumming, *PET studies of cerebral levodopa metabolism: a review of clinical findings and modeling approaches*. *Neuroscientist*, 2009. **15**(6): p. 635-50.
21. Schmidt, K.C. and F.E. Turkheimer, *Kinetic modeling in positron emission tomography*. *Q J Nucl Med*, 2002. **46**(1): p. 70-85.
22. Smith, M.F., *Advances in rubidium PET and integrated imaging with CT angiography*. *Curr Cardiol Rep*, 2008. **10**(2): p. 135-41.
23. Serdons, K., A. Verbruggen, and G.M. Bormans, *Developing new molecular imaging probes for PET*. *Methods*, 2009. **48**(2): p. 104-11.
24. Miller, P.W., et al., *Synthesis of <sup>11</sup>C, <sup>18</sup>F, <sup>15</sup>O, and <sup>13</sup>N radiolabels for positron emission tomography*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008. **47**(47): p. 8998-9033.
25. Andersson, J.D., et al., *Radiosynthesis of the candidate beta-amyloid radioligand [(11)C]AZD2184: Positron emission tomography examination and metabolite analysis in cynomolgus monkeys*. *Synapse*, 2010. **64**(10): p. 733-41.
26. van Waarde, A., et al., *Synthesis and preliminary evaluation of (S)-[<sup>11</sup>C]-exaprolol, a novel beta-adrenoceptor ligand for PET*. *Neurochem Int*, 2008. **52**(4-5): p. 729-33.
27. Blažek O., a.k., *Radiologie a nukleární medicína* 1989, Praha: Avicenum.
28. Powsner, R.A.P.E.R., *Essential Nuclear Medicine Physics*, 2006, Blackwell Publishnig: Massachusetts.
29. Ullmann, V. *AstroNuklFyzika* 2012; Available from: <http://astronuklfyzika.cz/Scintigrafie.htm>.
30. Bailey, D.L., Parker, J. A., *Nuclear medicine in clinical diagnosis and treatment: Single photon emission computed tomography* 1994, Edinburgh: Churchill Livingstone.
31. Fahey, F.H., Harkness, B. A., *Nuclear medicine: SPECT imaging with rotation gamma camera systems* 1996: Mosby Year Book.
32. Jaszcek, J., Tsui, M. W., , *Principles of nuclear medicine: Single photon emission computed tomography* 1995: W. R. Saunders Company.
33. Kupka, K., Kubinyi, J., Šámal, M., *Nukleární medicína* 2007, Příbram: P3K.
34. Campus, H.H. *Design principles of the <sup>99</sup>Mo → <sup>99m</sup>Tc radionuclide generator*. 2012; Available from: <http://nucleus.iaea.org/HHW/Radiopharmacy/VirRad/Eluting the Generator/Generator Module/Design principles/index.html>.
35. Grimes, J., et al., *The accuracy and reproducibility of SPECT target volumes and activities estimated using an iterative adaptive thresholding technique*. *Nucl Med Commun*, 2012. **33**(12): p. 1254-66.
36. Izadyar, S., S. Saber, and A. Gholamrezanezhad, *Assessment of clinical impact in the application of Chang attenuation correction to lung ventilation/perfusion SPECT*. *J Nucl Med Technol*, 2011. **39**(4): p. 290-4.
37. Blaha, K.D., V.; Leseticky, L.; Veres, K., *Chem. Listy*, 1983. **77**: p. 74.
38. Kroeger, M.F., G., J. *Labelled Comp. Radiopharm.*, 2000. **43**: p. 217-227.
39. Turner, H.S.T., S. L., *Synthesis of Isotopically Labelled Compounds*. *Quart. Rev.*, 1953. **7**: p. 407.

40. Murray, A.W., L. D., *Organic Synthese with Isotopes* 1958, New York: Interscience Publisher Inc.
41. Leseticky, L., *Metody přípravy izotopicky značených sloučenin* 1977, Praha: Karolinum.
42. Crabtree, R.H.L., M.; Bonneviot, L., J. Am. Chem. Soc., 1986. **108**: p. 4032-4037.
43. Hesk, D.D., P. R.; Evans, B., J. Labelled Comp. Radiopharm., 1995. **36**: p. 497.
44. Shu, A.Y.L.C., W.; Heys, J. R., J. Organomet. Chem., 1996. **87**: p. 524.
45. Horak, T., *Studium přípravy N-[14C-CH3]methylproteinů, Diplomová práce.* 1991.
46. Ganguli, P.C., et al., *The half-life (T and one-half) of synthetic human gastrin I in human subjects.* Clin Sci, 1971. **40**(3): p. 10P.
47. Greenwood, F.C., W.M. Hunter, and J.S. Glover, *The Preparation of I-131-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity.* Biochem J, 1963. **89**: p. 114-23.
48. Knight, L.C. and M.J. Welch, *Sites of direct and indirect halogenation of albumin.* Biochim Biophys Acta, 1978. **534**(2): p. 185-95.
49. Krohn, K.A., et al., *Differences in the sites of iodination of proteins following four methods of radioiodination.* Biochim Biophys Acta, 1977. **490**(2): p. 497-505.
50. Salacinski, P.R., et al., *Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 alpha,6 alpha-diphenyl glycoluril (Iodogen).* Anal Biochem, 1981. **117**(1): p. 136-46.
51. Pennisi, F. and U. Rosa, *Preparation of radioiodinated insulin by constant current electrolysis.* J Nucl Biol Med, 1969. **13**(1): p. 64-70.
52. Krohn, K.A. and M.J. Welch, *Studies of radioiodinated fibrinogen. II. Lactoperoxidase iodination of fibrinogen and model compounds.* Int J Appl Radiat Isot, 1974. **25**(7): p. 315-23.
53. Holowka, D., *N-chloroacetyl-[125I]iodotyramine: an alkylating agent with high specific activity.* Anal Biochem, 1981. **117**(2): p. 390-7.
54. Gabel, C.A. and B.M. Shapiro, *[125I]diiodofluorescein isothiocyanate: its synthesis and use as a reagent for labeling proteins and cells to high specific radioactivity.* Anal Biochem, 1978. **86**(2): p. 396-406.
55. Bissel D. M., *Bile Pigments and Jaundice. Molecular, Metabolic and Medical Aspects* Ostrow J. D., ed. ed 1986, New York.
56. Rodgers, P.A. and D.K. Stevenson, *Developmental biology of heme oxygenase.* Clin Perinatol, 1990. **17**(2): p. 275-91.
57. Marilena, G., *New physiological importance of two classic residual products: carbon monoxide and bilirubin.* Biochem Mol Med, 1997. **61**(2): p. 136-42.
58. Pascolo, L., et al., *Mechanisms for the transport of unconjugated bilirubin in human trophoblastic BeWo cells.* FEBS Lett, 2001. **495**(1-2): p. 94-9.
59. Stoll, M.S. and C.H. Gray, *The preparation and characterization of bile pigments.* Biochem J, 1977. **163**(1): p. 59-101.
60. Mosqueda, L., K. Burnight, and S. Liao, *The life cycle of bruises in older adults.* J Am Geriatr Soc, 2005. **53**(8): p. 1339-43.
61. Falk H., *Bile Pigments and Jaundice. Molecular, Metabolic and Medical Aspects* 1986, New York.

62. Boron W., B.E., *Medical Physiology: a cellular and molecular approach* 2005, USA: Elsevier Saunders. 984-986.
63. Bulmer, A.C., et al., *The anti-mutagenic properties of bile pigments*. *Mutat Res*, 2008. **658**(1-2): p. 28-41.
64. Stocker, R., et al., *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. *Science*, 1987. **235**(4792): p. 1043-6.
65. Bonnett, R., et al., *The structure of bilirubin*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1978. **202**(1147): p. 249-68.
66. Nichol, A.W. and D.B. Morell, *Tautomerism and hydrogen bonding in bilirubin and biliverdin*. *Biochim Biophys Acta*, 1969. **177**(3): p. 599-609.
67. von Döbeneck, H. and E. Brunner, [*On a classification of dipyrromethene and on the betaine structure of bilirubin. XI. On the Stokvis reaction*]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1965. **341**(4): p. 157-66.
68. Fog, J. and E. Jellum, *Structure of bilirubin*. *Nature*, 1963. **198**: p. 88-9.
69. Hutchinson, D.W., B. Johnson, and A.J. Knell, *Tautomerism and hydrogen bonding in bilirubin*. *Biochem J*, 1971. **123**(3): p. 483-4.
70. Kuenzle, C.C., M.H. Weibel, and R.R. Pelloni, *The reaction of bilirubin with diazomethane*. *Biochem J*, 1973. **133**(2): p. 357-64.
71. McDonagh, A.F. and F. Assisi, *The ready isomerization of bilirubin IX- in aqueous solution*. *Biochem J*, 1972. **129**(3): p. 797-800.
72. McDonagh, A.F. and D.A. Lightner, *Influence of conformation and intramolecular hydrogen bonding on the acyl glucuronidation and biliary excretion of acetylenic bis-dipyrinones related to bilirubin*. *J Med Chem*, 2007. **50**(3): p. 480-8.
73. Sai, K., et al., *UGT1A1 haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese patients with cancer*. *Clin Pharmacol Ther*, 2004. **75**(6): p. 501-15.
74. Adachi, Y., et al., *Bilirubin diglucuronide as the main source for in vitro formation of delta bilirubin*. *J Clin Lab Anal*, 1991. **5**(5): p. 331-4.
75. Lumsden, J.H., R.M. Jacobs, and P. Physick-Sheard, *Contribution of delta bilirubin to the interpretation of hyperbilirubinemia in the horse - a pilot study*. *Can Vet J*, 1991. **32**(3): p. 169-72.
76. Beuhler, J.R.P., R. C. Friedman, L. and Siegelman, M. W., *Cleavage of phycocyanobilin from C-phycocyanin. Separation and mass spectral identification of the products*. *J. Biol. Chem.*, 1976. **251**: p. 2405.
77. Schram, B.L.a.K., H. H., *Structure of phycocyanobilin*. *Eur. J. Biochem.*, 1971. **19**: p. 581.
78. Stocker, R., *Antioxidant activities of bile pigments*. *Antioxid Redox Signal*, 2004. **6**(5): p. 841-9.
79. Cole, K.D.a.L., G. H., *Bile pigments and bilirubin UDP-glucuronyl transferase during the metamorphosis of Rana catesbeiana tadpoles*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1983. **76**(B): p. 503.
80. USGS. *Rana catesbeiana*. 2013 6.4.2013; Available from: [http://fl.biology.usgs.gov/armi/Guide to Tadpoles/species/rana catesbeiana/rana catesbeiana.html](http://fl.biology.usgs.gov/armi/Guide%20to%20Tadpoles/species/rana%20catesbeiana/rana%20catesbeiana.html).
81. Cole, K.D.a.L., G. H., *UDP-glucuronosyltransferase activity and bilirubin conjugation in the bullfrog*. *Biochem. J.*, 1983. **212**: p. 265.

82. McDonagh, A.F.a.A., F., *Direct evidence for the acid-catalyzed isomeric scrambling of bilirubin IX-a*. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1972. **3**: p. 117.
83. White, E.H.a.S., H., *The triazene method for the deamination of aliphatic amines*. Tetrahedron lett., 1961: p. 758.
84. Hutchinson, D.W.J., B. and Knell, A. J., *The synthesis of esters of bilirubin*. Biochem. J., 1973. **133**: p. 493.
85. Backer, d.B.a., *Prepd by the action of nitrous acid on p-tolylsulfonylmethylamide*. Rec. trav. chim., 1954. **73**: p. 229.
86. Gutsche, C.D., *The reaction of diazomethane and its derivates with aldehydes and ketones*. Org. reactions, 1954. **8**: p. 391.
87. Cole, W.J., D.J. Chapman, and H.W. Siegelman, *The structure and properties of phycocyanobilin and related bilatrienes*. Biochemistry, 1968. **7**(8): p. 2929-35.
88. Mannito, P.a.M., D., *Oxidation of bilirubin with chloranil. A simple method for preparing isomerically pure biliverdin*. Via Saldini 1978. **50**(I): p. 20133.
89. Ravi, S.M., K. M.; Padmanabhan, V. K.; Unny, V. K. P. and Sivaprasad, N., *A facile synthesis of [<sup>14</sup>C]pyrithiobac-sodium*. J. Labelled Comp. Radiopharm., 2006. **49**: p. 339.
90. Manitto, P.a.M., D., *Reaction of biliverdins with thiobarbituric acid. A novel fragmentation reaction of bilin-1,19(21H,24H)-diones*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1980. **4**: p. 178.
91. McDonagh, A.F.a.A., F., *Direct evidence for the acid-catalyzed isomeric scrambling of bilirubin IX-α*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1972. **3**: p. 117.
92. Manitto, P. and D. Monti, *Acid-catalyzed addition of alcohols and thiols to bilirubin*. Experientia, 1973. **29**(2): p. 137-9.
93. Neu, H.B., T. A. and Langstrom, B, *Lithium[<sup>11</sup>C]methyl(2-thienyl)cuprate LiCN in 1,4-Additions to a,b-Unsaturated Ketones. <sup>11</sup>C and <sup>13</sup>C Labelling of androgen Mesterolone*. Journal of labell. comp. and radiopharm., 1997. **XLI**(3): p. 227.
94. Ravi, S.M., M. K.; Padmanabhan, D.; Unny, P. K. V. and Sivaprasad, *A facile synthesis of [<sup>14</sup>C] pyrithiobac-sodium*. Journal of labell. comp. and radiopharm., 2006. **49**: p. 339.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Poděkovat bych chtěl především panu doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., prof. MUDr. Liborovi Vítkovi, PhD., MBA a RNDr. Martinu Štíchovi za poskytnuté informace k experimentální části práce, proniknutí do dané problematiky a odborné rady při psaní diplomové práce. Také bych chtěl poděkovat RNDr. Martinu Dračinskému, Ph.D. za pomoc při měření NMR spekter a Prof. RNDr. Marii Urbanové, CSc. za pomoc s měřením ECD spekter. Dále bych chtěl poděkovat Katedře organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze za poskytnutí odborného pracoviště pro vypracování této diplomové práce. Chtěl bych také poděkovat své přítelkyni za podporu při psaní této práce.