

Abstrakt

Bilirubin (BR) byl dlouho považován pouze za odpadní molekulu s potenciálně toxickými účinky zejména na centrální nervový systém. Později bylo zjištěno, že BR působí i cytoprotektivně a mírně zvýšené koncentrace BR vykazují antioxidační, protizánětlivé a imunomodulační účinky, nicméně přesné mechanismy jsou stále předmětem intenzivního výzkumu. Hlavním cílem této práce bylo studium protektivních účinků BR na experimentálních *in vivo* a *in vitro* modelech ve vztahu k zánětu a oxidačnímu stresu. Dílčím cílem práce bylo zavedení a validace analytické metody pro stanovení BR a lumirubinu.

Potkanům kmene Gunn a příslušným normobilirubinemickým kontrolám byl aplikován lipopolysacharid (LPS, 6 mg/ml, i.p.) nebo fyziologický roztok. Po 12 hodinách byla odebrána krev a vybrané orgány na analýzu markerů zánětu a jaterního poškození. Primární hepatocyty izolované z jater experimentálních potkanů byly ovlivněny BR a TNF- α , buněčné linie HepG2 a SH-SY5Y byly ovlivněny BR a kyselinou chenodeoxycholovou. Hyperbilirubinemičtí potkani měli po aplikaci LPS ve srovnání s normobilirubinemickými potkany signifikantně sníženou zánětlivou odpověď a stupeň jaterního poškození. U potkanů kmene Gunn jsme pozorovali odlišný profil podskupin leukocytů a zároveň snížení exprese mRNA a koncentrace cytokinů IL-6, TNF- α , IL-1 β a IL-10 ve srovnání s kontrolami. Exprese mRNA *LBP* (proteinu vázajícího LPS) byla u potkanů Gunn zvýšena před i po aplikaci LPS oproti kontrolám. Zároveň byla aktivita AST a ALT, markerů hepatocelulárního jaterního poškození, významně nižší u potkanů kmene Gunn ve srovnání s kontrolami ovlivněnými LPS. Expozice primárních hepatocytů TNF- α vedla k aktivaci dráhy NF- κ B a fosforylaci její podjednotky p65, BR stupeň fosforylace této podjednotky signifikantně snižoval. BR také snižoval oxidační stres vyvolaný kyselinou chenodeoxycholovou *in vitro*. Metoda LC-MS/MS pro současné stanovení BR a lumirubinu byla lineární až do 400 μ mol/l pro BR a 100 μ mol/l pro lumirubin se submikromolárními limity detekce a s parametry platnými pro relevantní použití v klinické chemii.

Závěrem lze říci, že hyperbilirubinémie u potkanů kmene Gunn je spojena se sníženým stupněm zánětu a nižším jaterním poškozením po expozici LPS. Současně jsme potvrdili úlohu BR při ochraně buněk před oxidačním stresem vyvolaným kyselinou chenodeoxycholovou. Byla zavedena a validována LC-MS/MS metoda pro současné stanovení BR a lumirubinu.

Klíčová slova: bilirubin, hyperbilirubinémie, zánět; LPS; NF- κ B, oxidační stres, LC-MS/MS