

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Antioxidační a protizánětlivé účinky bilirubinu

Petra Valášková

2019

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: **Biochemie a Patobiochemie**

Předseda oborové rady: **prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.**

Školící pracoviště: **Laboratoř pro výzkum nemocí jater a metabolismu hemu, ÚLBLD,**
1 LF UK v Praze

Školitel: **doc. MUDr. Lucie Muchová, Ph.D.**

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Obsah	3
Abstrakt	4
Abstract	4
Seznam použitých zkratk	5
1 Úvod	6
1.1 Metabolismus a transport bilirubinu	6
1.2 Biologické účinky bilirubinu	6
1.2.1 Toxicita bilirubinu	6
1.2.2 Antioxidační účinky bilirubinu	7
1.2.3 Protizánětlivé účinky bilirubinu	7
1.3 Stanovení koncentrace bilirubinu	8
2 Hypotézy a cíle disertační práce	9
3 Materiál a metodika	9
4 Výsledky	11
4.1 Genotypizace normo a hyperbilirubinemických potkanů	11
4.2 <i>In vivo</i> experimenty	11
4.3 <i>In vitro</i> experimenty s primárními hepatocyty	13
4.4 Měření intracelulární produkce ROS a vliv bilirubinu na oxidační stres <i>in vitro</i> .	13
4.5. Stanovení koncentrace bilirubinu a jeho fotoproduktů metodou LC-MS/MS	13
5 Diskuze	14
6 Závěr	16
7 Seznam použité literatury	17
8 Seznam publikací	20

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.

Hyperbilirubinemickým 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 v lidském séru.

Abstract

For a long time, bilirubin (BR) has been considered a waste molecule with potential toxic effects especially on the central nervous system. Later, it was found that BR exhibited cytoprotective effects and mildly elevated BR levels showed antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory properties, however, exact mechanisms of the anti-inflammatory actions of BR have not been fully understood yet. The main aim of this study was to assess the protective effects of BR using experimental *in vivo* and *in vitro* models in relation to inflammation and oxidative stress. Partial goal was to establish validated analytical method for determination of BR and lumirubin.

Hyperbilirubinemic Gunn and heterozygous rats were treated with lipopolysaccharide (LPS, 6 mg/kg, IP) or vehicle (saline). After 12 hours, blood and organs were collected for analyses of inflammatory and hepatic injury markers. Primary rat hepatocytes were treated with

BR and TNF- α , HepG2 and SH-SY5Y cell lines were treated with BR and chenodeoxycholic acid. LPS-treated Gunn rats had a significantly decreased inflammatory response and hepatic injury compared to LPS-treated normobilirubinemic controls. We found different profile of leukocytes subsets and decreased systemic mRNA expressions and concentrations of IL-6, TNF- α , IL-1 β and IL-10 in Gunn rats. Hepatic mRNA expression of LPS-binding protein was upregulated in Gunn rats before and after LPS treatment. In addition, activities of AST and ALT, markers of hepatocellular damage, were lower in Gunn rats as compared to in LPS-treated controls. The exposure of primary hepatocytes to TNF- α resulted in the activation of the NF- κ B pathway and phosphorylation of its p65 subunit, however, the degree of p65 phosphorylation was significantly decreased by BR. BR also reduced chenodeoxycholic acid-induced oxidative stress *in vitro*. A LC-MS/MS method for the simultaneous determination of lumirubin and BR was linear up to 400 μ mol/L for BR and to 100 μ mol/L for lumirubin with submicromolar limits of detection, with validity parameters relevant for use in clinical chemistry.

In conclusion, our results indicate that hyperbilirubinemia in Gunn rats is associated with an attenuated systemic inflammatory response and decreased liver damage upon exposure to LPS. Simultaneously, we confirmed the role of BR in protecting cells against oxidative stress induced by chenodeoxycholic acid. A LC-MS/MS method for the simultaneous determination of BR and lumirubin in human serum was established and validated.

Seznam použitých zkratek

ALT	alaninaminotransferasa
AST	aspartátaminotransferasa
Bf	volný bilirubin
BR	bilirubin
BV	biliverdin
CDCA	chenodeoxycholová kyselina
HMOX	hemoxygenasa
HPLC	high pressure liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSA	human serum albumin, lidský sérový albumin
LPS	lipopolysacharid
gDNA	genomová deoxynukleová kyselina
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
LPS	lipopolysacharid
MBR	mezobilirubin
MEM	minimální esenciální médiu Eagle
TNF- α	tumor nekrotický faktor α
UGT1A1	UDP glukuronozyl transferasa

1 Úvod

1.1 Metabolismus a transport bilirubinu

Bilirubin (BR) je finální produkt katabolické dráhy hemu. Hem je nejprve enzymaticky štěpen mikrosomální hemoxygenasou (HMOX) na biliverdin (BV), oxid uhelnatý (CO) a kation železa za spotřeby tří molekul kyslíku a redukčního ekvivalentu NADPH (1). HMOX patří mezi významné enzymy podílející se na ochraně před oxidačním stresem (2), CO je významnou signální molekulou (3) a BV je považován za důležitou antioxidační a cytoprotektivní látku (4).

Chemicky patří BR mezi tetrapyroly, kde jsou dva rigidní planární dipyroly spojeny metylenovými můstky (5). Přestože ve struktuře BR lze nalézt polární skupiny, BR se chová jako hydrofobní molekula, která je při fyziologickém pH téměř nerozpustná ve vodě (6). Vzhledem k hydrofobnímu charakteru BR je téměř 90 % celkového BR v cirkulaci u dospělých jedinců nekovalentně vázáno k albuminu (7). V cirkulaci se vyskytuje pouze nepatrné množství (méně než 0,01 %) volného BR (Bf), jenž je přímo zodpovědný za biologické účinky v buňkách a tkáních v závislosti na koncentraci. Fyziologické koncentrace celkového BR jsou udávány mezi 2,0-17,0 $\mu\text{mol/l}$ (8).

BR je přenesen do jater, kde nejprve dochází k disociaci BR z albuminu a poté k translokaci BR přes bazolaterální membránu hepatocytu. Jakmile je BR přenesen přes membránu do cytosolu jaterní buňky, dochází ihned k jeho solubilizaci pomocí proteinů Y a Z, což zabraňuje zpětné pasivní difuzi z buňky a vazbě BR na membránu (9). V hladkém endoplazmatickém retikulu hepatocytu je BR konjugován nejčastěji s endogenní kyselinou glukuronovu vazbou na jednu nebo obě karboxylové skupiny, což zvyšuje jeho polaritu a usnadňuje vylučování. Reakce je katalyzovaná mikrosomální UDP- glukuronosyl transferasou (UGT1A1) a konjugovaný BR je poté vyloučen do žluče aktivním transportem. Aktivní transport do žluče je zprostředkovaný zejména ABC přenašečem MRP2 (Multidrug resistance-associated protein-2) (10).

Konjugovaný BR poté prochází intra- a extrahepatálními žlučovody do lumen tenkého a dále do tlustého střeva, kde dochází k hydrolýze β -glukuronidasou a následně redukci na deriváty BR (urobilinoidy) a neenzymové oxidaci na urobiliny (11). Část urobilinoidů se vstřebává ze střevního lumen do portálního řečiště a je resekretována játry (enterohepatální cirkulace).

1.2 Biologické účinky bilirubinu

1.2.1 Toxicita bilirubinu

Ačkoliv mírně zvýšené systémové koncentrace BR lze dle posledních studií považovat za protektivní faktor (12), nadměrně zvýšené koncentrace (nad 340 $\mu\text{mol/l}$ podle typu poškození) jsou prokazatelně toxické (13). Zvýšené koncentrace BR (nad 17 $\mu\text{mol/l}$) jsou nazývány hyperbilirubinémie, souvisí s poruchou jeho metabolismu a jsou klasifikovány na nekonjugované (premikrozomální), konjugované (postmikrozomální) a smíšené (14).

Nekonjugované hyperbilirubinémie jsou způsobeny třemi hlavními patofyziologickými mechanismy, a to nadprodukcí BR, poruchou vychytávání BR hepatocytem a poruchou jeho konjugace. Konjugované hyperbilirubinémie jsou způsobeny zejména biliární obstrukcí a intrahepatální cholestázou. Mezi smíšené hyperbilirubinémie řadíme hepatocelulární poškození

(15-18). Mezi vrozené hyperbilirubinémie patří Gilbertův a Criglerův-Najjarův syndrom I. a II. typu (snížená funkce UGT, nekonjugovaný typ) a Dubinův-Johnsonův a Rotorův syndrom (defekt transportu BR, konjugovaná hyperbilirubinémie) (19, 20).

Novorozenecká hyperbilirubinémie, známá jako novorozenecká žloutenka (koncentrace BR v prvních dnech 86-103 $\mu\text{mol/l}$) (21), postihuje až 87 % předčasně narozených i zdravých donošených dětí (22) a na její manifestaci se podílí více faktorů (8). Mezi hlavní patří nedozrálост hematoencefalické bariéry a nezralost jaterních transportérů a glukuronosylačních mechanismů. Fyziologická novorozenecká žloutenka má malý klinický význam a samovolně vymizí během několika dnů po narození, nicméně další rizikové faktory jako je nízká porodní hmotnost, akutní hemolytické stavy, defekty erytrocytů, nekompatibilita krevních skupin, předčasný odtok plodové vody, užívání některých léků v těhotenství či neonatální infekce jsou předpokladem pro manifestaci těžké novorozenecké hyperbilirubinémie (104-291 $\mu\text{mol/l}$) (23, 24). Ke snížení toxických účinků BR je v klinické praxi běžně používaná fototerapie s cílem zejména snížit sérovou koncentraci BR či zabránit její zvyšování. Fotochemická energie modrozelené oblasti spektra světla (430-490 nm) je využita ke změně tvaru a struktury BR (25) na polárnější žluté stereoizomery BR a bezbarvé deriváty s nižší molekulovou hmotností (fotoizomery BR a oxidační produkty), které mohou být rychleji vyloučeny z organismu žlučí či močí nezávisle na rychlosti konjugace.

1.2.2 Antioxidační účinky bilirubinu

Antioxidační účinky BR jsou dány zejména přítomností C-10 methylenové skupiny tetrapyrolu, která ochotně poskytuje elektron reaktivním formám kyslíku (reactive oxygen species, ROS) a slouží jako tzv. lapač volných radikálů (free radical scavenger). Zároveň BR inhibuje běžné izoformy enzymu NADPH-oxidasy a tím zvyšuje své antioxidační účinky (26, 27). BR zabraňuje peroxidaci mastných kyselin, fosfolipidů (28), proteinů (29) či lipoproteinu LDL (30) a snižuje karboxylaci bílkovin. BR v nízkých koncentracích také chrání neuronální buňky před oxidačním stresem (31) či funguje jako antioxidant v lidských vaskulárních endoteliálních buňkách (32). BR působí *in vitro* i *in vivo* také proti škodlivým účinkům prooxidantů včetně žlučových kyselin (12) a zároveň snižuje oxidační poškození jater vyvolané nahromaděnými žlučovými kyselinami během cholestázy (33).

Role BR jakožto jednoho z nejsilnějších endogenních antioxidantů je známa i z klinické praxe (34). Existuje dokonce souvislost mezi koncentrací BR a celkovou antioxidační kapacitou séra ovlivňující rozvoj ischemické choroby srdeční (35). Obecně mírně zvýšené systémové koncentrace BR jsou dnes již považovány za protektivní faktor. Příkladem je závislost mezi sníženou sérovou koncentrací BR a zvýšeným rizikem vzniku rozvoje systémových chorob spojených s vyšším oxidačním stresem (36). Sérová koncentrace BR je tedy významný antioxidační marker a bývá ovlivněna mnoha faktory, například věkem (37), pohlavím (nižší koncentrace BR u žen), dietou (hladověním se zvyšuje sérový BR), kouřením (kouření výrazně snižuje koncentraci BR) a spotřebou léků či rostlinných produktů (38).

1.2.3 Protizánětlivé účinky bilirubinu

Zánět lze definovat jako fyziologickou reakci organismu na vnější či vnitřní poškození. (39). Během prvotní odpovědi dochází nejprve k aktivaci a posléze migraci leukocytů (neutrofilů, monocytů a eozinofilů) z krevního systému do místa poškození za spolupráce

tkáňových žírných buněk. Během této akutní fáze zánětu dochází také k diferenciaci monocytů na makrofágy, jež jsou hlavními zdroji cytokinů (40). Cytokiny jsou malé rozpustné proteiny syntetizované téměř všemi jadernými buňkami a jsou považovány za mediátory zánětu (41). Sekrece cytokinů je přísně regulována zejména nukleárním transkripčním faktorem NF- κ B. Aktivace NF- κ B hraje klíčovou roli v regulaci zánětlivé odpovědi. Komplex NF- κ B je ve své neaktivní formě lokalizován v cytoplasmě, vázán ke svému inhibitoru I κ B, jenž zabraňuje translokaci do jádra. V klasické dráze (kanonické) dochází po stimulaci nejprve k aktivaci IKK komplexu (IKK β , IKK α a NEMO), což ústí ihned k fosforylaci I κ B. Fosforylování vede k ubikvitinaci a proteazomální degradaci I κ B a k uvolnění a aktivaci NF- κ B, který je následně posttranslačně modifikován (fosforylací, acetylací a glykosylací) a translokován do jádra, kde spouští transkripci klíčových zánětlivých genů (42, 43).

V literatuře lze dohledat, že při nízkých koncentracích potlačuje BR právě sekreci prozánětlivých cytokinů (IL-2) a tím reguluje zánět *in vitro* (44). Během posledních let byla zjištěna přímá asociace mezi sníženým rizikem rozvoje revmatoidní artritidy a vyšší celkovou koncentrací BR v séru (45). Významné souvislosti lze dohledat i mezi zánětlivým onemocněním střev a koncentracemi BR. Zároveň jedinci s Gilbertovým syndromem mají sníženou predispozici pro rozvoj zánětlivého onemocnění střev (Crohnovy choroby) (46).

Data z klinických studií jsou potvrzena i experimentálními *in vivo* a *in vitro* studiemi. Jedním z mechanismů může být inhibiční vliv BR na fosforylaci proteinů (47). V experimentálním modelu zánětlivé kolitidy u myši BR inhiboval migraci leukocytů a zabraňoval poškození střevní sliznice (48). V modelu zánětu indukovaném LPS u myši inhiboval BR zvýšení exprese syntasy oxidu dusnatého prostřednictvím inhibice TLR-4 receptorů (27, 49). Novější studie dokládají, že BR zabraňuje potlačením vrozené imunity v *in vivo* podmínkách odmítnutí štepů při transplantaci (50). V loňském roce byla publikována studie dokládající snížení zánětlivých parametrů a prevenci arteriální neointimální hyperplazie při použití koronárních stentů potažených BR (51). Naše skupina již dříve prokázala, že mírná hyperbilirubinémie chrání před zánětem spojeným se stárnutím (52).

Data z posledních let přesvědčivě naznačují, že kromě výše uvedených antioxidačních a protizánětlivých účinků ovlivňuje BR mnoho etází imunitního systému, a to jak na úrovni přirozené, tak i adaptivní imunity (53-55). Za zmínku stojí inhibiční vliv BR na komplementový systém, kde dochází k inhibici v kroku C1 klasické dráhy (56), interakce s Fc receptory makrofágů (57), modifikace exprese MHC II glykoproteinů (54) či ovlivnění diferenciaci T buněk včetně T regulačních lymfocytů (58). Aktivitu cytotoxických T-lymfocytů moduluje BR snížením syntézy DNA, expresí antigenu Tac (CD25) a expresí receptoru pro transferin (CD71)(59).

1.3 Stanovení koncentrace bilirubinu

Vzhledem k výše uvedeným biologickým účinkům BR je nutné pro výzkumné účely stanovit přesnou analytickou koncentraci BR, zejména měřit nízké koncentrace. Dnes se v rutinní praxi BR stanovuje diazoreakcí, ve které BR reaguje s diazotovanou kyselinou sulfanilovou a to buď přímo, bez akcelérátoru (konjugovaný BR), anebo nepřímo (reaguje až po přidání akcelérátoru, nekonjugovaný) (60). Ačkoliv diazoreakce patří mezi levné a rychlé metody a možnost falešně pozitivních výsledků bývá zohledňována, referenční hodnoty vydané v různých laboratořích se mohou lišit až o desítky procent (61).

Z tohoto důvodu jsou v posledních letech studovány a zaváděny alternativní metody stanovení koncentrace BR v biologické matrici. Pro výzkumné účely byla v naší laboratoři zavedena vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s UV/VIS detekcí umožňující stanovení BR v nanomolárních koncentracích (62). BR je možno stanovit v séru, v buňkách či v tkáních. Klasické HPLC metody jsou poslední dobou nahrazovány LC-MS, kdy lze dosáhnout vyšší citlivosti a zrychlení analýzy vzorku.

2 Hypotézy a cíle disertační práce

Cílem předkládané disertační práce byl výzkum **protektivních účinků BR** na experimentálních *in vivo* a *in vitro* modelech **ve vztahu k zánětu a oxidačnímu stresu**. V rámci této práce byly řešeny následující problematiky: genotypizace normo- a hyperbilirubinemických potkanů, studium vlivu BR na systémový zánět vyvolaný lipopolysacharidem *in vivo*, izolace primárních hepatocytů z normo- a hyperbilirubinemických potkanů a studium efektu BR na oxidační stres *in vitro*. Dílčím cílem práce bylo zavedení nové **LC-MS/MS metody** na stanovení koncentrace BR a jeho fotooxidačního produktu lumirubinu v séru.

3 Materiál a metodika

Genotypizace normo a hyperbilirubinemických potkanů

Kvůli zpřesnění, zrychlení a pro standardizaci zařazení nově narozených potkanů a celého chovu byla zavedena metoda restriční analýzy (polymorfismus délky restričních fragmentů, RFLP) pro genotypizaci experimentálních zvířat použitých pro *in vivo* i *in vitro* studie. Izolována gDNA byla namnožena metodou PCR s použitím primerů L (5'-CCATCCCGAGTTCCTACAATG-3') a R (5'-TGACAGTTTTAAGGGCGTTTTTC-3'). Namnožená DNA byla štěpena enzymem MvaI a po restrikci byly získány fragmenty s délkou 276, 45 bp pro homozygoty a 276, 232, 45 bp pro heterozygoty.

In vivo experimenty

Hyperbilirubinemičtí a kontrolní potkani byly náhodně rozděleni do dvou skupin (1-LPS, 6 mg/kg, 2-fyziologický roztok). Po 12 hodinách byla zvířata usmrcena a byla jim odebrána krev a vybrané orgány na biochemické analýzy. Ze séra byly stanoveny parametry jaterního poškození celkový BR a aktivita ALT, ALP a AST, a dále cytokiny IL-1 β /IL-1F2, IL-10, TNF- α a IL-6. Z plné krve byly stanoveny počty T lymfocytů průtokovou cytometrií.

Z krve a jater byla izolovaná celková mRNA a přepsána do cDNA. Kvantitativní real time PCR byly stanoveny geny pro interleukin-6 (Rn01410330_m1), tumor nekrotizující faktor- α (Rn99999017_m1), interleukin-10 (Rn00563409_m1), interleukin 1- β (Rn00580432_m1), LBP (Rn00567985_m1) a β -2 mikroglobulin (Rn005608865_m1).

Purifikace a rozpouštění komerčního nekonjugovaného bilirubinu

V rámci disertační práce byl používán modifikovaný postup purifikace komerčně dostupného BR bez přítomnosti světla (63). Purifikovaný BR byl rozpuštěn dle (62) s malou

modifikací, tedy 2,8 mg BR bylo rozpuštěno ve 2 mL 0,1 M NaOH a ihned zneutralizováno s 1 mL 0,1 M H₃PO₄. BR byl poté smíchán s 7 mL roztoku BSA (660 μM).

***In vitro* experimenty**

Izolace a kultivace primárních hepatocytů

Primární hepatocyty (PH) byly izolovány dvoufázovou kolagenázovou metodou dle (64). Buněčná viabilita PH byla stanovena barvením trypanovou modří a izolované hepatocyty byly naředěny ve Williamsově médiu s přidavkem 1 % penicilinu/streptomycinu, 1 % L-glutaminu, 0,06 % insulinu a 5 % FBS. PH byly vysety na misky potažené kolagenem (Colagen from rat tail II) a 3 hodiny inkubovány při 37 °C, 5 % CO₂. Druhý den byly PH kultivovány s kompletním médiem obsahující BR (10-100 μM) a TNF-α (12-100 ng/ml) po dobu 0-24 h. Buněčná viabilita byla stanovena MTT testem. Intracelulární koncentrace BR byla stanovena dle (62).

Experimenty s buněčnými kulturami

Lidská neuroblastomová buněčná linie SH-SY5Y a buněčná linie lidského hepatoblastomu HepG2 byla kultivována v MEM s 10 % FBS, 5 % CO₂ při 37 °C. Buňky SH-SY5Y a HepG2 byly nasazeny na 6-jamkové destičky v koncentraci 50 000 buněk/cm² a ovlivněny silným induktorem tvorby ROS kyselinou chenodeoxycholovou (CDCA) (80 μM) a BR (1 μM) po dobu 4 hodin.

Měření intracelulární produkce ROS

Produkce ROS byla stanovena s použitím fluorescenční sondy 5-(a-6) chlormethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceinu diacetátu acetylésteru (CM-H₂DCFDA, Life Technologies, USA). Buňky SH-SY5Y byly inkubovány s CDCA (80 μM) nebo s antioxidantem BR (1 μM) po dobu 24 hodin. Po inkubaci byly buňky 2x promyty PBS a k buňkám byl přidán 10 μM CM-H₂DCFDA a následovala další inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C ve tmě. Přebytečné barvivo bylo odstraněno promytím PBS.

Izolace proteinových extraktů a elektroforetická separace proteinů

Z PH a buněčných kultur SH-SY5Y a HepG2 byl izolován celkový proteinový extrakt a použit na analýzy pomocí Western blotu. Vzorky byly nejprve naředěny na stejnou koncentraci proteinů pomocí lyzačního pufru a ke vzorkům byl přidán pufr (4x Laemmli vzorkový pufr, Biorad) a ¼ objemu β-merkaptioetanolu. Vzorky byly denaturovány 10 minut při 95 °C. 35-40 μg vzorku bylo rozděleno dle elektroforetické pohyblivosti pomocí elektroforesy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí 200 mV po dobu 60 minut.

Western blot

Elektropřenos probíhal na ledu po dobu 90 minut při konstantním napětí 100 mV a maximálním proudu 350 mA. Dále byly membrány blokovány v 5 % BSA v TTBS po dobu 1,5 hodiny a po promytí 10 minut v TTBS inkubovány s primárními protilátkami v 1 % BSA v TTBS anti phospho-NF-κB p65 (Ser536) (ředění 1:2000), anti NF-κB p65 (ředění 1:3500), anti IκB-α (ředění 1:3500), anti phospho-IκB-α (Ser132) (ředění 1:1500), anti IKKβ (ředění 1:3500), anti phospho-IKKα/β (Ser176/180) (ředění 1: 1500) a anti β-aktin (ředění 1:5000)

(všechny od Cell Signaling Technology, MA, USA) přes noc při 4 °C. Pro druhou část experimentů byla použita primární protilátka proti GM3 syntase (ředění 1:2000, Santa Cruz sc-365329, USA) a P-aktin (1: 2000; Cell Signaling Technology, USA). Po promytí 3x10 minut v TTBS byly membrány inkubovány 1 hodinu s prasečí sekundární protilátkou anti-Rabbit IgG-HRP (ředění 1:3333, Dako, USA) nebo králičí anti-myší m-IgGK BP-HRP (Santa Cruz, USA).

Stanovení koncentrace bilirubinu a jeho fotoproduktů metodou LC-MS/MS

Příprava kalibračních roztoků

Izolovaný lumirubin byl zředěn s lidským sérovým albuminem (HSA) na konečnou koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ a smíchán s BR rozpuštěným v DMSO v koncentraci 800 $\mu\text{mol/l}$ (1: 1,v/v., zásobní roztok). Tento zásobní roztok byl následně zředěn HSA na konečnou koncentraci 0,01; 0,1; 1; 10; 25; 50 a 100 $\mu\text{mol/l}$ pro lumirubin a 0,04; 0,4; 4; 40; 100; 200 a 400 $\mu\text{mol/l}$ pro BR. Všechny kalibrační roztoky i vnitřní standard (ISTD) 5 $\mu\text{mol/l}$ mezobilirubinu (MBR) v DMSO byly skladovány při teplotě -80 °C a používány během 3 měsíců. 10 μL HSA (bod nula) nebo kalibračního roztoku lumirubinu/BR a 20 μL ISTD bylo smícháno dohromady a připraveno pro LC-MS/MS analýzu.

Příprava vzorků na LC-MS/MS analýzu

Deset μl vzorku séra bylo smícháno s 20 μl ISTD. Proteiny byly ze séra odstraněny smícháním vzorku s 1 ml metanolu obsahujícího antioxidanty 0,3 % BHT, 0,1 % kyseliny askorbové a 0,5 % $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a následnou centrifugací po dobu 40 minut při 16 000xg. Poté bylo odebráno 100 μl konečného supernatantu a do LC-MS/MS analyzátoru byly nastříknuty 3 μl .

Statistické vyhodnocení

Pro normálně distribuovaná data byl použit Studentův parametrický nepárový/párový *t*-test, data s nenormálním rozložením byla analyzována pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu. Pro porovnání více skupin byla použita ANOVA pro parametrické nebo Kruskal-Wallisova ANOVA pro neparametrické rozložení dat s post hoc analýzou (Dunnův test). V závislosti na normalitě a distribuci dat jsou výsledky vyjádřeny jako průměr \pm SD nebo medián (25-75 %). Rozdíly $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné

4 Výsledky

4.1 Genotypizace normo a hyperbilirubinemických potkanů

Pro charakterizaci potkanů a zavedení metody genotypizace byly navrženy primery **Gunn L** ccattccccgagttcctacaatg a **Gunn R** tgacagttttaaagggcggttttc a vybrán enzym **MvaI**. Byly získány PCR produkty po restrikci MvaI pro homozygoty (276 bp), heterozygoty (276, 232 bp) a wildtype (232 bp).

4.2 *In vivo* experimenty

Pro vyhodnocení vlivu BR na systémový zánět byly z odebrané plné krve hyper a normobilirubinemických potkanů nejprve stanoveny markery systémového zánětu. Celkový počet bílých krvinek byl zvýšen u kontrolních potkanů po aplikaci LPS ($p < 0,05$), zatímco u

hyperbilirubinemických potkanů nebyl nárůst WBC po aplikaci LPS pozorován. Na zánět vyvolaný LPS reagovali kontrolní potkani signifikantním zvýšením počtu neutrofilů, monocytů, bazofilů, eozinofilů a snížením lymfocytů ($p < 0,05$). Nicméně nárůst těchto parametrů byl u hyperbilirubinemických potkanů po aplikaci LPS významně slabší ($p < 0,05$).

Následně nás zajímal vliv BR na jednotlivé subpopulace T lymfocytů a jeho případný vliv na imunitní systém, proto byly měřeny změny v populaci krevních T lymfocytů u obou zvířecích modelů po aplikaci LPS. Po vyvolání zánětu jsme pozorovali nižší počet $CD4^+$ T buněk a vyšší počet $CD8^+$ T buněk u obou zvířecích modelů oproti kontrolám, nicméně tato změna byla u hyperbilirubinemických potkanů výraznější ($p < 0,05$). Zároveň poměr $CD4^+/CD8^+$ T, markeru imunitní aktivace (65), byl signifikantně vyšší u potkanů kmene Gunn oproti heterozygotům ($p < 0,05$).

Ze séra výše uvedených potkanů byly dále stanoveny markery jaterního poškození. U normobilirubinemických potkanů došlo po aplikaci LPS k nárůstu celkové koncentrace BR ($p < 0,01$), zatímco u hyperbilirubinemických potkanů nebyl nárůst BR po aplikaci LPS pozorován. Zvýšení aktivity ALT, markeru hepatocelulárního jaterního poškození, bylo po aplikaci LPS signifikantně oslabeno u hyperbilirubinemických potkanů ve srovnání s kontrolami, stejně tak jako aktivita AST, markeru nekrózy hepatocytu. Aktivita ALP, markeru cholestatického poškození, byla signifikantně zvýšená jak u normobilirubinemických tak i u hyperbilirubinemických potkanů po aplikaci LPS, nicméně bez signifikantního rozdílu mezi oběma zvířecími modely.

Pro detailnější pochopení vlivu BR na systémový zánět byla měřena exprese mRNA vybraných zánětlivých cytokinů v játrech i z plné krve normobilirubinemických a hyperbilirubinemických potkanů. U hyperbilirubinemických potkanů byla po 12 hodinách bez vlivu LPS v jaterní tkáni detekována nižší exprese mRNA prozánětlivých cytokinů IL-6 ($p < 0,05$) a TNF- α ($p < 0,05$) oproti normobilirubinemickým jedincům, u ostatních cytokinů nebyly tyto změny pozorovány. Po 12 hodinách působení LPS bylo pozorováno významné zvýšení exprese mRNA prozánětlivých jaterních cytokinů TNF- α , IL1- β a proti-zánětlivého IL-10 ($p < 0,05$), nicméně tento nárůst byl signifikantně nižší u hyperbilirubinemických potkanů ve srovnání s normobilirubinemickými jedinci. Podobné výsledky byly získány při měření exprese mRNA výše uvedených cytokinů z plné krve. U hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn byly exprese mRNA všech cytokinů IL-6, TNF- α , IL1- β a IL-10 po 12 hodinách působení LPS signifikantně nižší než u normobilirubinemických kontrol ($p < 0,05$). Zároveň exprese mRNA protizánětlivého IL-10 byla u hyperbilirubinemických potkanů signifikantně snižena ($p < 0,05$) i před aplikací LPS. Dále jsme stanovili sérové koncentrace vybraných cytokinů z odebrané krve všech experimentálních potkanů. Pozorované změny v koncentracích cytokinů po aplikaci LPS korelovaly s výsledky exprese mRNA daných proteinů. U hyperbilirubinemických potkanů byla změřena nižší koncentrace cytokinů IL-6, TNF- α i IL-10 ($p < 0,05$) ve srovnání s normobilirubinemickými kontrolami.

Abychom zjistili, zda může hyperbilirubinémie ovlivnit produkci LBP, měřili jsme v játrech experimentálních zvířat exprese mRNA LBP. Zjistili jsme vyšší exprese LBP u hyperbilirubinemických potkanů před ($p < 0,05$) i po aplikaci LPS ($p < 0,05$) ve srovnání s normobilirubinemickými kontrolami.

4.3 *In vitro* experimenty s primárními hepatocyty

Nejprve byla měřena intracelulární koncentrace BR kvůli sledování případných rozdílů ve vychytávání BR. Intracelulární koncentrace BR byla stejná u obou typů PH nezávisle na přidavku BR. Následně byly buňky PH ovlivněny prozánětlivým cytokinem TNF- α . Z výsledků vyplynulo, že PH izolované z hyperbilirubinemických potkanů byly odolnější vůči přidavku TNF- α oproti kontrolním primárním hepatocytům ($p < 0,05$). Zároveň přídavek 10-40 μM BR zvyšoval buněčnou viabilitu u kontrolních PH oproti buňkám ovlivněným pouze TNF- α ($p < 0,05$).

Na základě předchozích *in vivo* výsledků byla měřena exprese mRNA *LBP*. U PH izolovaných z hyperbilirubinemických potkanů jsme pozorovali signifikantní nárůst exprese mRNA *LBP* od 6 h inkubace při inkubaci buněk s 20 a 40 μM BR, zatímco vyšší koncentrace BR (100 μM) tento efekt nekopírovaly ($p < 0,05$). U kontrolních PH nebyla v daných časových intervalech (kromě 40 μM BR po 24 h) detekována vyšší exprese mRNA *LBP*, dokonce byla exprese tohoto proteinu nižší (v čase 4 a 24 h) oproti buňkám neovlivněným BR.

PH byly dále inkubovány s 10-40 μM BR a poté vystaveny účinkům TNF- α . Sledovány byly rozdíly ve fosforylaci či celkovém množství vybraných podjednotek dráhy NF- κB . TNF- α indukoval fosforylaci podjednotky NF- κB p65, nicméně přídavek BR signifikantně fosforylaci snižoval ($p < 0,05$). Celkové množství NF- κB p65 proteinu, IKK β proteinu ani inhibitoru I $\kappa\text{B}\alpha$ nebylo přidavkem BR či TNF- α ovlivněno. Zároveň fosforylace podjednotek IKK α/β a I $\kappa\text{B}\alpha$, vyvolaná TNF- α nebyla signifikantně BR ovlivněna.

4.4 Měření intracelulární produkce ROS a vliv bilirubinu na oxidační stres *in vitro*

Abychom objasnili, zda oxidační stres vyvolaný CDCA ovlivňuje expresi GM3 syntasy byly buněčné linie SH-SY5Y a HepG2 inkubovány s CDCA nebo bilirubinem po dobu 4 hodin. Výrazné zvýšení exprese mRNA GM3 syntasy bylo pozorováno při inkubaci s CDCA, zatímco BR expresi mRNA GM3 syntasy snižoval jak u SH-SY5Y buněk, tak i u HepG2 linie. Tyto výsledky byly potvrzeny i detekcí exprese proteinu GM3 syntasy v buněčné linii SH-SY5Y Western blotem.

4.5. Stanovení koncentrace bilirubinu a jeho fotoproduktů metodou LC-MS/MS

Pro další výzkumnou činnost a klinické účely byla v naší laboratoři zavedena analytická metoda LC-MS/MS, umožňující velmi citlivé stanovení koncentrace BR a jeho lumirubinu. Pro určení stability byl do vzorků séra přidány vzorky BR a lumirubinu ve třech koncentracích (4, 40 a 400 μM pro BR a 1, 10 a 100 μM pro lumirubin) a byly opakovaně měřeny v průběhu delšího časového období. Každý vzorek byl měřen 10-krát za sebou (1 analýza za půl hodiny) a vzorky byly připraveny těsně před analýzou. Bez použití antioxidantů (BHT, kyselina askorbová) byla pozorována velmi rychlá degradace vnitřního standardu (pozorované intenzity signálu analytu se snížily během 2,5 hodiny), ale použití antioxidantů zlepšilo stabilitu vnitřního standardu. U lumirubinu a BR nebyla pozorována významná degradace během šestihodinového testování. Z výsledků vyplynulo, že vzorky plazmy pro analýzu lumirubinu a BR lze skladovat při teplotě -80 ° C po dobu nejméně tří měsíců.

Dále byly testovány parametry metody pro její validaci. Linearita metody byla testována s použitím 8 kalibračních bodů připravených v triplicátech v rozsahu koncentrací 0,04-400 $\mu\text{mol/l}$ pro BR a 0,01-100 $\mu\text{mol/l}$ pro lumirubin, v daném pořadí. Mez detekce byla 100 pmol/l pro lumirubin a 80 pmol/l pro BR. Mez kvantifikace byla 330 pmol/l pro lumirubin a 264 pmol/l pro BR.

5 Diskuze

V rámci této disertační práce byly studovány protektivní účinky BR ve vztahu k zánětu a oxidačnímu stresu. V naší práci jsme se zaměřili zejména na studium potenciálních protizánětlivých účinků BR na modelu systémového zánětu vyvolaného LPS u hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn (se sérovou koncentrací BR kolem 60 $\mu\text{mol/l}$) ve srovnání s normobilirubinemickými kontrolami (BR 2 $\mu\text{mol/l}$). Zjistili jsme, že mírná nekonjugovaná hyperbilirubinémie byla v našem modelu systémového zánětu spojena se sníženou zánětlivou odpovědí.

Na základě předchozích studií zabývajících se detailní kinetikou exprese zánětlivých cytokinů u potkanů (66) a našich pilotních dat jsme zvolili pro naše experimenty 12 hodinové působení endotoxinu, které nebylo spojeno se zvýšenou mortalitou zvířat. Podání LPS bylo doprovázeno zvýšením WBC a relativního procentuálního zastoupení neutrofilů a monocytů spolu se snížením počtu lymfocytů (67, 68) v normobilirubinemických kontrolách. Tyto změny však byly významně mírnější u hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn značící oslabení zánětlivé odpovědi. Zároveň byla aplikace LPS doprovázena podstatnými změnami v poměru $\text{CD4}^+\text{T}/\text{CD8}^+\text{T}$ buněk, důležitého markeru imunitní aktivace (65). U hyperbilirubinemických potkanů vedla aplikace LPS k podstatně vyšší produkci $\text{CD4}^+\text{T}$ buněk a zároveň snížení počtu $\text{CD8}^+\text{T}$ buněk ve srovnání s normobilirubinemickými kontrolami. V několika klinických studiích bylo zjištěno, že nižší poměr $\text{CD4}^+\text{T}/\text{CD8}^+\text{T}$ je spojen se zvýšeným cytotoxickým skóre a zvýšením rizika úmrtí při septických stavech (69-71). Zároveň je produkce buněk $\text{CD8}^+\text{T}$ lymfocytů modulována aktivitou NADPH oxidasy (72). Vyšší poměr $\text{CD4}^+\text{T}/\text{CD8}^+\text{T}$ buněk a tedy nižší cytotoxické skóre pozorovaný v naší studii u hyperbilirubinemických potkanů, by proto mohl být alespoň částečně způsoben již dříve popsáním inhibičním účinkem BR na aktivitu NADPH oxidasy (49).

Hlavní hybnou silou mobilizace neutrofilů z kostní dřeně a dalších hematopoetických kompartmentů během sepse jsou prozánětlivé cytokiny (73). U hyperbilirubinemických potkanů jsme po vyvolání zánětu naměřili nižší exprese mRNA cytokinů v játrech a krvi i sérových koncentrací hlavních zánětlivých cytokinů IL-6, TNF- α a IL-1 β oproti normobilirubinemickým kontrolám. Z našich výsledků vyplývá, že hyperbilirubinémie přispívá ke snížení zánětlivé odpovědi, což může souviset s regulací produkce neutrofilů a současně nižší produkcí prozánětlivých cytokinů. Význam oslabení zánětlivé odpovědi spojené s regulací produkce cytokinů potvrzují i některé studie, ve kterých byla pozorována nižší mortalita u potkanů vystavených LPS a léčených monoklonální protilátkou proti TNF- α (74). IL-1 β a IL-6 (75, 76).

Zároveň spolu se sníženou expresí prozánětlivých cytokinů u hyperbilirubinemických potkanů po aplikaci LPS ve srovnání s normobilirubinemickými potkany byla pozorována také nižší produkce protizánětlivého IL-10. I když je IL-10 obecně považován za protizánětlivý cytokin (77), jeho nadprodukce může být pro organismus nepříznivá a může mít za následek imunosupresi (78). V klinických studiích bylo zjištěno, že sérové koncentrace IL-10 korelovaly se závažností sepse a mortalitou a zároveň byl vysoký poměr IL-10/TNF- α spojen se zvýšenou mortalitou (79). Z těchto dat vyplývá, že rovnováha mezi produkcí IL-10 a TNF- α je důležitá pro udržení imunitní homeostázy. V našem modelu zánětu vyvolaného LPS byl poměr IL-10/TNF- α výrazně nižší u hyperbilirubinemických potkanů, což je v souladu s výsledky studie Lanone a spol., ve které pozorovali zlepšení přežití potkanů kmene Gunn po podání LPS (80).

V souladu s těmito výsledky byly markery hepatocelárního poškození jater (aktivity ALT a AST) signifikantně nižší u potkanů Gunn vystavených působení LPS ve srovnání s odpovídajícími kontrolami. Játra hrají klíčovou úlohu při odstraňování LPS (81) a cholestatické i toxické poškození jater bývá závažnou komplikací sepse. Již dříve bylo v naší laboratoři zjištěno, že BR chrání játra před prooxidačními účinky žlučových kyselin při cholestáze (33). V literatuře lze dohledat hepatoprotektivní účinek hyperbilirubinémie po aplikaci LPS potkanům, kterým byl předtím intraperitoneálně podán BR (27). Nicméně u různých kmenů potkanů Gunn s velmi vysokými koncentracemi BR tento účinek pozorován nebyl (49, 80). V naší studii nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi aktivitou ALP u hyperbilirubinemických potkanů a kontrolními zvířaty ovlivněných LPS, což naznačuje, že BR v našem modelu nemusí mít vliv na závažnost cholestázy během sepse.

Dále nás zajímaly faktory, které přispívají ke snížené zánětlivé odpovědi zprostředkované BR po aplikaci LPS. Zaměřili jsme se proto na expresi LBP v jaterní tkáni našich experimentálních zvířat. I když je role LBP v aktivaci a inhibici zánětlivé odpovědi pravděpodobně dvojí (82), bylo popsáno, že vysoké hladiny LBP inhibují uvolňování cytokinů zprostředkované LPS a brání jaternímu selhání *in vivo* (83). V naší studii byla exprese jaterního LBP významně zvýšena u hyperbilirubinemických potkanů před i po ovlivnění LPS. Kromě toho vedla inkubace primárních hepatocytů s BR ke zvýšené expresi LBP, což naznačuje, že BR může ovlivnit produkci LBP a tak přispět k oslabení zánětlivé odpovědi u hyperbilirubinemických subjektů.

PH byly použity zejména pro studium mechanismu protizánětlivých účinků BR. Zajímalo nás, zda BR ovlivňuje pouze produkci cytokinů nebo také buněčnou odpověď, která je závislá na signalizaci vyvolanou cytokiny. Z našich výsledků vyplynulo, že primární hepatocyty z hyperbilirubinemických potkanů byly odolnější vůči cytotoxicitě indukované TNF- α , ačkoliv jsme ve srovnání s kontrolními buňkami nepozorovali změny v intracelulárních koncentracích BR. Tato data naznačují, že nejen samotný BR, ale i tzv. „bilirubinový priming“, tedy změny v metabolismu buněk vystavených dlouhodobé hyperbilirubinémii, mohou spouštět adaptivní mechanismy podílející se na pozorované hepatoprotekci. K přesné identifikaci těchto mechanismů je zapotřebí dalšího výzkumu.

Zároveň produkce prozánětlivých cytokinů během sepse vede k aktivaci nukleárního transkripčního faktoru NF- κ B (84). Z našich výsledků s PH potkanů vyplynulo, že expozice BR vede ke snížení fosforylace podjednotky p65 proteinového komplexu NF- κ B, což může souviset jak s obecnými inhibičními účinky BR na fosforylaci proteinů (47),

tak i s inhibicí fosforylace prostřednictvím potlačené signalizace TNF- α (85). Pozorované protizánětlivé a cytoprotektivní účinky BR mohou být tedy alespoň částečně způsobeny utlumením transkripce řízené NF- κ B. Na rozdíl od studie Liu a kol. jsme nezaznamenali inhibici fosforylace I κ B při mnohem vyšších koncentracích BR (150 μ M) (54). Naše výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi, které prokázaly inhibici dráhy NF- κ B jak prostřednictvím BR (86), tak i BV (87, 88). Za zmínku stojí, že poměr T lymfocytů CD4⁺/CD8⁺ je také regulován aktivitou NF- κ B (89).

Další část práce se zabývala studiem mechanismu změn metabolismu gangliosidů v kontextu oxidačního stresu, kde jsme se zaměřili konkrétně na regulaci GM3 syntasy, hlavního enzymu v komplexní syntéze gangliosidů. V naší studii vyvolání oxidačního stresu u SH-SY5Y i HepG2 linie pomocí CDCA (90) vedlo k významnému zvýšení množství gangliosidu GM3, zatímco přidání BR jakožto silného antioxidantu (91) vedlo k normalizaci obsahu uvedeného gangliosidu. Tyto výsledky jsou v souladu s naší předchozí studií, kdy BR působil proti prooxidačnímu účinku žlučových kyselin v modelu obstrukční cholestázy u potkanů (33).

Poslední část naší práce se proto zabývala zavedením a validací analytické metody, která by umožnila stanovit přesné koncentrace BR a jeho degradačních produktů v séru pacientů a bylo by možné ji převést do běžné klinické praxe. Validace LC-MS/MS metody byla rozdělena do několika kroků a byla provedena podle publikace (92). Nejdůležitějším atributem celého procesu validace byla stabilita všech analytů (včetně vnitřního standardu MBR). Bylo zjištěno, že všechny vzorky mohou být skladovány při -80 °C po dobu minimálně 3 měsíců, ale během vlastní přípravy a analýzy mohou vzorky velmi rychle degradovat. Bez použití antioxidantů byl poměr koncentrace BR/lumirubin k ISTD snížen do šesti hodin a po 12-24 hodinách analyty degradovaly úplně. Přidávky antioxidantů nejenom že umožnily mnohem větší stabilitu vzorku ale zároveň poměr mezi analyty a ISTD zůstal stejný po celou dobu měření. Úspěšnost zavedení naší metody byla hodnocena třemi parametry: opakovatelností, reprodukovatelností a průměrnou výtěžností, tyto parametry byly vyjádřeny jako CV. Naše výsledky naznačují relativně malé chyby (s ohledem na nestabilitu analytů). Posledním krokem validace bylo měření interferencí. Naše získaná data nenaznačují žádný vliv matrice, a proto tato metoda může být v budoucnu použitelná pro klinické vzorky.

6 Závěr

Závěrem lze konstatovat, že byla zavedena a optimalizována **metoda restriční analýzy pro genotypizaci normo- a hyperbilirubinemických potkanů**. Zároveň **hyperbilirubinémie u potkanů kmene Gunn po expozici LPS vedla ke snížení systémové zánětlivé odpovědi a hepatoprotekci**. Tento efekt je pravděpodobně spojený s modulací vrozené imunity spolu se snížením produkce prozánětlivých cytokinů a modulací zánětlivé dráhy NF- κ B. Výsledky *in vitro* studií zabývající se možnou úlohou HMOX při metabolismu gangliosidů ve vztahu k oxidačnímu stresu potvrdily **antioxidační působení BR a vliv oxidačního stresu na metabolismus GM3 gangliosidu**. V neposlední řadě byla zavedena **kvantitativní analytická LC-MS/MS metoda** umožňující stanovení **BR a lumirubinu** v séru a dalších biologických tkáních v jedné analýze.

7 Seznam použité literatury

1. Tenhunen R, Marver H, Pimstone NR, Trager WF, Cooper DY, Schmid R. 1972. *Biochemistry* 11: 1716-20
2. McMahon M, Ding S, Acosta-Jimenez LP, Frangova TG, Henderson CJ, Wolf CR. 2018. *Journal of Physiology-London* 596: 105-27
3. Huang Y, Ma TJ, Ye Z, Li H, Zhao Y, et al. 2018. *Experimental Eye Research* 166: 29-39
4. Kirkby KA, Adin CA. 2006. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 290: F563-F71
5. Ostrow JD, Mukerjee P, Tiribelli C. 1994. *J Lipid Res* 35: 1715-37
6. Bonnett R, Davies JE, Hursthouse MB. 1976. *Nature* 262: 326-8
7. Jacobsen J. 1969. *FEBS Lett* 5: 112-4
8. Calligaris SD, Bellarosa C, Giraudi P, Wennberg RP, Ostrow JD, Tiribelli C. 2007. *Pediatric Research* 62: 576-80
9. Vander Jagt DL, Dean VL, Wilson SP, Royer RE. 1983. *The Journal of biological chemistry* 258: 5689-94
10. Crawford JM, Hauser SC, Gollan JL. 1988. *Seminars in liver disease* 8: 105-18
11. Gartner U, Goeser T, Wolkoff AW. 1997. *Gastroenterology* 113: 1707-13
12. Zelenka J, Muchova L, Zelenkova M, Vanova K, Vreman HJ, et al. 2012. *Biochimie* 94: 1821-7
13. Watchko JF, Tiribelli C. 2013. *New England Journal of Medicine* 369: 2021-30
14. Strassburg CP. 2010. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 24: 555-71
15. Mendenhall CL, Anderson S, Weesner RE, Goldberg SJ, Crolic KA. 1984. *American Journal of Medicine* 76: 211-22
16. Lee RG. 1989. *Human Pathology* 20: 594-8
17. Stratta RJ, Wood RP, Langnas AN, Hollins RR, Bruder KJ, et al. 1989. *Surgery* 106: 675-83; discussion 83-4
18. Shaw D, Frohlich J, Wittmann BA, Willms M. 1982. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 142: 621-5
19. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, Deboer A, et al. 1995. *New England Journal of Medicine* 333: 1171-5
20. Strassburg CP. 2010. *Best Practice & Research, Clinical Gastroenterology* 24: 555-71
21. Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. 2001. *New England Journal of Medicine* 344: 581-90
22. Bhutani VK, Wong RJ. 2013. *Journal of Clinical Neonatology* 2: 61-9
23. Shapiro SM, Bhutani VK, Johnson L. 2006. *Clinics in Perinatology* 33: 387-+
24. MacDonald MG. 1995. *Pediatrics* 96: 734-8
25. McDonagh AF, Lightner DA. 1985. *Pediatrics* 75: 443-55
26. Kwak JY, Takeshige K, Cheung BS, Minakami S. 1991. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1076: 369-73
27. Lanone S, Bloc S, Foresti R, Almolki A, Taille C, et al. 2005. *FASEB J* 19: 1890-2
28. Sedlak TW, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH. 2009. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 5171-6
29. Stocker R, Ames BN. 1987. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 8130-4
30. Wu TW, Fung KP, Yang CC. 1994. *Life sciences* 54: P477-81
31. Dore S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, et al. 1999. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 10944-

32. Ziberna L, Martelanc M, Franko M, Passamonti S. 2016. *Scientific Reports* 6
33. Muchova L, Vanova K, Zelenka J, Lenicek M, Petr T, et al. 2011. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15: 1156-65
34. Gazzin S, Vitek L, Watchko J, Shapiro SM, Tiribelli C. 2016. *Trends in Molecular Medicine* 22: 758-68
35. Schwertner HA, Jackson WG, Tolan G. 1994. *Clinical Chemistry* 40: 18-23
36. Wagner KH, Wallner M, Molzer C, Gazzin S, Bulmer AC, et al. 2015. *Clinical Science* 129: 1-25
37. Rosenthal P, Pincus M, Fink D. 1984. *Clin Chem* 30: 1380-2
38. Vitek L, Schwertner HA. 2007. *Advances in Clinical Chemistry* 43: 1-57
39. Zhang JM, An J. 2007. *International Anesthesiology Clinics* 45: 27-37
40. Coussens LM, Werb Z. 2002. *Nature* 420: 860-7
41. Dinarello CA. 2000. *Chest* 118: 503-8
42. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. 1994. *Annual Review of Cell Biology* 10: 405-55
43. Zandi E, Chen Y, Karin M. 1998. *Science* 281: 1360-3
44. Haga Y, Tempero MA, Kay D, Zetterman RK. 1996. *Digestive diseases and sciences* 41: 1468-74
45. Fischman D, Valluri A, Gorrepati VS, Murphy ME, Peters I, Cheriya P. 2010. *Journal of Clinical Medicine Research* 2: 256-60
46. Lenicek M, Duricova D, Hradsky O, Dusatkova P, Jiraskova A, et al. 2014. *Inflammatory Bowel Disease* 20: 481-7
47. Hansen TWR, Mathiesen SBW, Walaas SI. 1996. *Pediatric Research* 39: 1072-7
48. Zucker SD, Vogel ME, Kindel TL, Smith DLH, Idelman G, et al. 2015. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 309: G841-G854
49. Wang WZW, Smith DLH, Zucker SD. 2004. *Hepatology* 40: 424-33
50. Adin CA, VanGundy ZC, Papenfuss TL, Xu F, Ghanem M, et al. 2017. *Cell Transplantation* 26: 11-21
51. Bae IH, Park DS, Lee SY, Jang EJ, Shim JW, et al. 2018. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials* 106: 1486-95
52. Zelenka J, Dvorak A, Alan L, Zadinova M, Haluzik M, Vitek L. 2016. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*
53. Jangi S, Otterbein L, Robson S. 2013. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45: 2843-51
54. Liu Y, Li P, Lu J, Xiong W, Oger J, et al. 2008. *Journal of immunology* 181: 1887-97
55. Ollinger R, Wang H, Yamashita K, Wegiel B, Thomas M, et al. 2007. *Antioxidants & Redox Signaling* 9: 2175-85
56. Basiglio CL, Arriaga SM, Pelusa F, Almara AM, Kapitulnik J, Mottino AD. 2010. *Clinical Science* 118: 99-113
57. Vetvicka V, Miler I, Sima P, Taborsky L, Fornusek L. 1985. *Folia Microbiologica* 30: 373-80
58. Rocuts F, Zhang XY, Yan J, Yue YA, Thomas M, et al. 2010. *Cell Transplantation* 19: 443-51
59. Haga Y, Tempero MA, Zetterman RK. 1996. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1317: 65-70
60. Watson. 1961. *Clinical Chemistry* 7: 603-25
61. Puppawar PV, Goswami, K., Dhok, A. 2012. *Journal of Dental and Medical Sciences* 1: 17-28
62. Zelenka J, Lenicek M, Muchova L, Jirsa M, Kudla M, et al. 2008. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 867: 37-42

63. McDonagh AF, Assisi F. 1972. *Biochemical Journal* 129: 797-&
64. Berry MN, Grivell AR, Grivell MB, Phillips JW. 1997. *Cell Biology and Toxicology* 13: 223-33
65. Bruno G, Saracino A, Monno L, Angarano G. 2017. *Aids Reviews* 19: 81-8
66. Vanova K, Suk J, Petr T, Cerny D, Slanar O, et al. 2014. *Biochimie* 97: 173-80
67. Hamesch K, Borkham-Kamphorst E, Strnad P, Weiskirchen R. 2015. *Laboratory Animals* 49: 37-46
68. Yates DT, Loest CA, Ross TT, Hallford DM, Carter BH, Limesand SW. 2011. *Journal of Animal Science* 89: 4286-93
69. Kalinkovich A, Weisman Z, Greenberg Z, Nahmias J, Eitan S, et al. 1998. *Clinical and Experimental Immunology* 114: 414-21
70. Lu W, Mehraj V, Vyboh K, Cao W, Li TS, Routy JP. 2015. *Journal of the International Aids Society* 18
71. Sainz T, Serrano-Villar S, Diaz L, Tome MIG, Gurbindo MD, et al. 2013. *Aids* 27: 1513-6
72. Dhiman M, Garg NJ. 2014. *Plos Pathogens* 10
73. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. 2010. *Trends in Immunology* 31: 318-24
74. Ozer EK, Goktas MT, Kilinc I, Toker A, Bariskaner H, et al. 2017. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 95: 866-72
75. Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC. 1990. *Nature* 348: 550-2
76. Nullens S, Staessens M, Peleman C, Plaeke P, Malhotra-Kumar S, et al. 2016. *PLoS One* 11: e0152914
77. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, et al. 2005. *Kidney International* 67: 1216-33
78. Steinhauser ME, Hogaboam GM, Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Standiford TJ. 1999. *Journal of Immunology* 162: 392-9
79. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. 2000. *Journal of Infectious Diseases* 181: 176-80
80. Lanone S, Bloc S, Foresti R, Almolki A, Taille C, et al. 2005. *Faseb Journal* 19: 1890-+
81. Nakao A, Taki S, Yasui M, Kimura Y, Nonami T, et al. 1994. *Hepatology* 19: 1251-6
82. Gutschmann T, Muller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A, Seydel U. 2001. *Infection and Immunity* 69: 6942-50
83. Lamping N, Dettmer R, Schroder NWJ, Pfeil D, Hallatschek W, et al. 1998. *Journal of Clinical Investigation* 101: 2065-71
84. Perkins ND. 2007. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 49-62
85. Mazzone GL, Rigato I, Ostrow JD, Tiribelli C. 2009. *Bioscience Trends* 3: 151-7
86. Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP, Vassilevskaia T, Berberat PO, et al. 2004. *Journal of Immunology* 172: 3553-63
87. Gibbs PEM, Maines MD. 2007. *International Journal of Cancer* 121: 2567-74
88. Nuhn P, Mitkus T, Ceyhan GO, Kunzli BM, Bergmann F, et al. 2013. *Pancreas* 42: 265-71
89. Jimi E, Strickland I, Voll RE, Long MX, Ghosh S. 2008. *Immunity* 29: 523-37
90. Fuentes-Broto L, Martinez-Ballarín E, Miana-Mena J, Berzosa C, Piedrafita E, et al. 2009. *Free Radical Research* 43: 1080-9
91. Vitek L, Ostrow JD. 2009. *Current pharmaceutical design* 15: 2869-83
92. Lenicek M, Juklova M, Zelenka J, Kovar J, Lukas M, et al. 2008. *Clinical Chemistry* 54: 1087-8

8 Seznam publikací

Podklad disertace

1. **Valášková, P.**; Dvořák, A.; Leníček, M.; Žížalová, K.; Kutinová-Canová, N.; Zelenka, J.; Cahová, M.; Vítek, L.; Muchová, L. Hyperbilirubinemia in Gunn Rats Is Associated with Decreased Inflammatory Response in LPS-Mediated Systemic Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 2306. **IF=4,18**
2. Šmíd V, Šuk J, Kachamakova-Trojanowska N, Jašprová J, **Valášková P**, Józkwicz A, Dulak J, Šmíd F, Vítek L, Muchová L. Heme Oxygenase-1 May Affect Cell Signalling via Modulation of Ganglioside Composition. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Sep 19; 2018. **IF=4, 94**

Rozpracovaná publikace

3. Jašprová J, Dvořák A, Vecka M, Leníček M, Lacina O, **Valášková P**, Zapadlo M, Plavka R, Vítek L :Novel accurate quantitative LC-MS/MS method for lumirubin determination.

Bez IF

4. **Valášková, P.**, Muchová, L.: Metabolism of bilirubin and its biological properties *Klin. Biochem. Metab.*, 24 (45), 2016, No. 4, p. 198–202.

Bez vztahu k disertaci

Rozpracovaná publikace

Schoor L.W.W., Verkade H.J, Wit S, Mennillo E , Rettenmeier E, Valášková P, Jašprová J, Struik D, Bloks V.W, Chen S, Schreuder A.B., Vítek L, Tukey R.H
Jonker J.W: Potential of therapeutic bile acids in the treatment of neonatal hyperbilirubinemia.