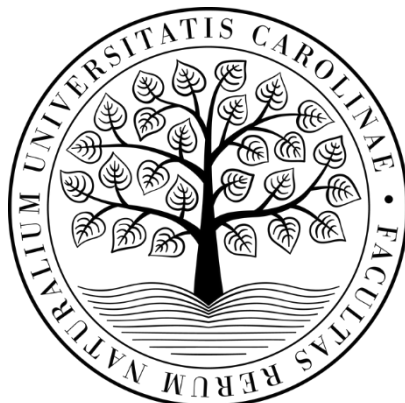


UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Denisa Plášilová

**STANOVENÍ ŽLUČOVÝCH KYSELIN V BRONCHOALVEOLÁRNÍ
LAVÁŽI PACIENTŮ PO TRANSPLANTACI PLIC**

**DETERMINATION OF BILE ACIDS IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE
OF PATIENTS AFTER LUNG TRANSPLANTATION**

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Praha 2024

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne _____

Podpis _____

Abstrakt

Transplantace plic je život zachraňující metodou léčby pro pacienty trpícím plicním selháním. Medián přežití pacientů po tomto zákroku je ovšem stále nízký (6 let). Hlavním důvodem je především plicní aloštěpová dysfunkce, která může vést až k odmítnutí transplantované štěpu. Mezi hlavní rizikové faktory této dysfunkce byl identifikován gastroezofageální reflux (některé studie uvádí i duodenogastroezofageální reflux), který se prokazatelně zhoršuje právě po transplantaci plic.

Mezi markery gastroezofageálního refluxu se může řadit bilirubin, pepsinogen II (některé studie uvádí pepsin), pH a žlučové kyseliny. Všechny tyto markery byly v této práci stanoveny na skupině vzorků bronchoalveolární laváže a porovnávány mezi sebou i s klinickými údaji, které klasifikují postupné zhoršení funkce plic po transplantaci. Po měření vzorků na LC-MS/MS bylo zjištěno, že celková koncentrace žlučových kyselin měřených enzymatickým testem neodpovídá celkové koncentraci žlučových kyselin měřených kapalinovou chromatografií. Vzorky byly podrobeny hydrolýze a solvolýze pro zjištění, zda není disproporce v obou metodách způsobena atypickou konjugovanou či sulfatovanou žlučovou kyselinou.

Byly zjištěny významné korelace mezi klinickými údaji a koncentrací žlučových kyselin a také mezi klinickými údaji a pH. Necílenou analýzou jsme ve vzorcích bronchoalveolárních laváží našli 3 ionty, které potenciálně tvoří jejich majoritní složku. Podle jejich velikosti se však pravděpodobně o žlučové kyseliny nejedná. Vzhledem k výsledkům hydrolýzy, jsme na LC-MS/MS měřili konjugáty kyseliny chenodeoxycholové s jednotlivými aminokyselinami.

Klíčová slova: žlučové kyseliny, bronchoalveolární laváž, enzymatický test, LC-MS/MS, hydrolýza, solvolýza.

Abstract

Lung transplantation is a life-saving treatment for patients suffering from lung failure. However, the median survival of patients after this procedure is still low (6 years). The main reason is mainly due to chronic lung allograft dysfunction, which can lead to graft rejection. Gastroesophageal reflux has been identified as a major risk factor for this dysfunction (some studies also report duodenogastroesophageal reflux), which has been shown to worsen after lung transplantation.

Markers of gastroesophageal reflux may include bilirubin, pepsinogen II (some studies report pepsin), pH and bile acids. In this study, all these markers were determined in a cohort of bronchoalveolar lavage samples and compared with each other and with clinical data that classify progressive deterioration of lung function after transplantation. After measuring the samples by LC-MS/MS, it was found that the total bile acid concentration measured by the enzymatic assay did not match the total bile acid concentration measured by liquid chromatography. The samples were subjected to hydrolysis and solvolysis to determine whether the disproportionation in the two methods was due to atypical conjugated or sulphated bile acids.

Significant correlations were found between clinical data and bile acid concentrations and between clinical data and pH. By nontargeted analysis, we found 3 ions in bronchoalveolar lavage samples that potentially constitute the majority component of the ions. However, based on their size, they are probably not bile acids. Considering the hydrolysis results, we measured the conjugates of chenodeoxycholic acid with individual amino acids on LC-MS/MS.

Key words: bile acids, bronchoalveolar lavage, enzymatic test, LC-MS/MS, hydrolysis, solvolysis.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Petru Kozlíkovi, PhD. za zprostředkování vypracování práce v Laboratoři pro výzkum nemocí jater a metabolismu hemu na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy. Dále bych chtěla poděkovat externímu školiteli Ing. Kateřině Žížalové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, věnovaný čas a neskonalou trpělivost při zpracování této diplomové práce. Mé další poděkování míří RNDr. Aleši Dvořákovi, PhD. za pomoc při měření obsahu bilirubinu a za udílení cenných rad po čas vypracovávání mé práce.

Další poděkování patří mé rodině a blízkým, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Obsah

Obsah	6
Seznam zkratek	8
Seznam symbolů	13
1. Úvod	14
2. Teoretická část	15
2.1. Gastroezofageální reflux a jeho markery	15
2.2. Žluč a žlučové kyseliny	17
2.2.1. Struktura a syntéza žlučových kyselin	18
2.2.2. Modifikace žlučových kyselin	21
2.2.3. Konjugace žlučových kyselin	21
2.2.4. Fyzikálně-chemické vlastnosti žlučových kyselin	22
2.3. Analýza žlučových kyselin	24
2.3.1. Chromatografické metody	24
2.3.2. Další analytické metody stanovení	28
2.3.3. Enzymatické metody stanovení	29
3. Experimentální část	32
3.1. Použité chemikálie a přístroje	32
3.2. Enzymatická analýza – celkové žlučové kyseliny	36
3.3. Extrakce na pevnou fázi	37
3.4. Hydrolýza	37
3.5. Solvolýza	38
3.6. LC-MS/MS	38
3.7. Stanovení bilirubinu	39
3.8. ELISA pepsinogenu	40
3.9. Měření pH a absorbance	41

4.	Výsledky a diskuze.....	42
4.1.	Markery gastroezofageálního refluxu.....	42
4.1.1.	Potenciální markery gastroezofageálního refluxu	43
4.2.	Hydrolýza a solvolýza	50
4.3.	Extrakce na pevnou fázi	56
4.4.	Měření absorbance žlučových kyselin.....	57
5.	Závěr.....	58
6.	Seznam použité literatury	59

Seznam zkratek

3 α -HSD	3 α -hydroxysteroid dehydrogenáza
<i>AlloCA</i>	kyselina <i>allocholová</i>
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (z anglického <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>)
BAL	bronchoalveolární laváž
BHT	2,6-di- <i>terc</i> -butyl-4-methyl fenol
BOS	syndrom bronchiolity obliterans (z anglického <i>Bronchiolitis Obliterans Syndrome</i>)
C18	oktadecylová stacionární fáze
CA	kyselina cholová
CDCA	kyselina chenodeoxycholová
CLAD	chronická plicní aloštěpová dysfunkce (z anglického <i>Chronic Lung Allograft Dysfunction</i>)
CMC	kritická micelární koncentrace (z anglického <i>Critical Micellization Concentration</i>)
D ₄ -CA	deuteriem značená kyselina cholová
D ₄ -CDCA	deuteriem značená kyselina chenodeoxycholová
DAPPZ	1-[(4-dimethylaminofenyl)karbonyl]piperazin
DCA	kyselina deoxycholová (z anglického <i>Deoxycholic Acid</i>)
DGER	duodenogastroezofageální reflux (z anglického <i>Duodenogastroesophageal Reflux</i>)
DMT-MM	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfolinium chlorid

ECD	detekce elektronového záchytu (z anglického <i>Electron Capture Detection</i>)
ELISA	enzymatický imunosorbentní test (z anglického <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
ESI	elektrosprejová ionizace (z anglického <i>Electrospray ionization</i>)
FAB	ionizace bombardováním rychlými atomy (z anglického <i>Fast Atom Bombardment</i>)
FEV1	nucený expirační objem za 1 sekundu (z anglického <i>Forced Expiratory Volume in 1 Second</i>)
FID	plamenová ionizační detekce (z anglického <i>Flame Ionization Detection</i>)
FTICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (z anglického <i>Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance</i>)
FXR	farnesoidní X receptor
GC	plynová chromatografie (z anglického <i>Gas Chromatography</i>)
GCA	kyselina glykocholová
GCDCA	kyselina glykochenodeoxycholová
GDCA	kyselina glykodeoxycholová
GERD	gastroezofageální refluxní choroba (z anglického <i>Gastroesophageal Reflux Disease</i>)
GLCA	kyselina glykolitocholová
GUDCA	kyselina glykoursodeoxycholová
HCA	kyselina hyocholová

HDCA	kyselina hyodeoxycholová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-MS/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
IC ₅₀	koncentrace inhibitoru, který způsobí 50% inhibici enzymu
icELISA	nepřímý kompetitivní enzymový imunosorbentní test (z anglického <i>Indirect Competitive Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
IPF	idiopatická plicní fibróza (z anglického <i>Idiopathic Pulmonary Fibrosis</i>)
IT	iontová past (z anglického <i>Ion Trap</i>)
IT-TOF	spojení iontové pasti a analyzátoru doby letu
LABW	výplach velkých dýchacích cest (z anglického <i>Large Airway Bronchial Wash</i>)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LCA	kyselina lithocholová
LIF	laserem indukovaná fluorescenční detekce (z anglického <i>Laser Induced Fluorescence</i>)
LLOQ	dolní mez kvantifikace (z anglického <i>Lower Limit of Quantification</i>)
LOQ	mez stanovitelnosti (z anglického <i>Limit of Quantification</i>)
MCA	kyselina muricholová

MDCA	kyselina murideoxycholová
MS	hmotnostní spektrometrie (z anglického <i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (z anglického <i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
NAD ⁺	oxidovaný nikotinamidadeninindinukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadeninindinukleotid
NMR	nukleární magnetická rezonanční spektrometrie (z anglického <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
OCA	kyselina obeticholová
pCEC	tlačená kapilární elektrochromatografie (z anglického <i>Pressurized Capillary Electrochromatography</i>)
PXR	pregnan X receptor
Q	kvadrupól
Q-TOF	spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu
QqQ	trojitý kvadrupól
S1PR2	sfingosin-1-fosfátový receptor 2
SFC	superkritická kapalinová chromatografie (z anglického <i>Supercritical Fluid Chromatography</i>)
SPME-LC-MS/MS	mikroextrakce na pevné fázi s kapalinovou chromatografií a tandemovou hmotnostní detekcí
SRM	sledování vybraných reakcí (z anglického <i>Selected Reaction Monitoring</i>)
TCA	kyselina taurocholová
TCDC	kyselina taurochenodeoxycholová

TDCA	kyselina taurodeoxycholová
TGR5	G proteinový receptor pro žlučové kyseliny
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z anglického <i>Thin-Layer Chromatography</i>)
TLCA-S	sulfatovaná kyselina taurolitocholová
TOF	analyzátor doby letu (z anglického <i>Time-of-Flight</i>)
TUDCA	kyselina tauroursodeoxycholová
UDCA	kyselina ursodeoxycholová
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>)
UV	ultrafialová oblast spektra (z anglického <i>Ultraviolet</i>)

Seznam symbolů

arb. j.	arbitrární jednotka [au]
c	koncentrace [mmol/l; $\mu\text{mol/l}$; mg/dl; $\mu\text{g/l}$; $\mu\text{g/ml}$]
G	tíhová síla [g]
l	délka [mm; μm]
m	hmotnost [mg; ng; pg]
p	tlak [Pa]
Q	průtok [ml/min; $\mu\text{l/min}$]
t	čas [h; min]
t	teplota [$^{\circ}\text{C}$]
U	elektrické napětí [V]
V	objem [l; ml; μl]
λ	vlnová délka [nm]

1. Úvod

Transplantace plic je důležitou léčebnou metodou pro pacienty trpící pokročilým plicním onemocněním, které již nelze neinvazivně léčit. Po této operaci je klíčové stálé sledování stavu pacientů pro úspěšnou rekonvalescenci a prevenci komplikací. Jedním z důležitých aspektů vedoucí k včasné diagnostice chronické plicní aloštěpové dysfunkce je nalezení nejvhodnějšího markeru gastroezofageálního refluxu.

Tato diplomová práce se zaměřila především na žlučové kyseliny v bronchoalveolární laváži a jejich stanovení enzymatickým testem a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí. Enzymatický test je založen na látkách obsahujících 3α -hydroxyskupinu, která je přítomna ve žlučových kyselinách. Nevýhodou této metody je ovšem poměrně vysoký cutt-off, proto se jako přesnější měření nabízí právě kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí. Touto metodou umíme kvantifikovat 21 žlučových kyselin, ovšem součet těchto koncentrací neodpovídá koncentraci celkových žlučových kyselin naměřenou enzymatickým testem. Cílem této práce je určit diagnostický význam jednotlivých žlučových kyselin a pokusit se nalézt analyt způsobující disproporci v koncentracích výše zmíněných metod.

2. Teoretická část

2.1. Gastroezofageální reflux a jeho markery

Transplantace plic se provádí u pacientů trpících různými formami pokročilého plicního onemocnění, které nereaguje na netransplantační léčbu. Přestože se přežití po plicní transplantaci zlepšuje, tak jsou zde komplikace, které stále významně ovlivňují přežití příjemců a dlouhodobý stav. Komplikace mohou být akutní, jako chirurgická komplikace při samotné transplantaci nebo primární dysfunkce štěpu. Další komplikace mohou být s opožděným nástupem, jako chronická plicní aloštepová dysfunkce a oportunní infekce^{1,2}.

Největší hrozbou u pacientů přežívajících déle než jeden rok, je již uvedená chronická plicní aloštepová dysfunkce (chronic lung allograft dysfunction, CLAD), která byla dříve nazývána jako obliterativní bronchiolitida. Následně se ukázalo, že existují dva hlavní fenotypy chronické plicní aloštepové dysfunkce, obstrukční CLAD (obliterativní bronchiolitida) a restriktivní CLAD (restriktivní aloštepový syndrom). Jako rizikový faktor aloštepové dysfunkce byla identifikována gastroezofageální refluxní choroba (gastroesophageal reflux disease, GERD)^{1,2}.

Pokud je člověk zdravý, tak u něj dochází pouze k malému refluxu duodenálního obsahu do žaludku nebo jícnu. Je tomu tak díky rozdílným tlakům v intragastrické (zde je tlak vyšší) a intraduodenální oblasti. Pacienti trpící poruchou gastroduodenální motility nebo dysfunkcí pyrolového svěrače mohou trpět gastroduodenálním refluxem, který následně vede ke gastroezofageálnímu refluxu³. Pacienti s GERD jsou vystaveni zvýšenému riziku aspirace obsahu žaludku či duodena, a to může mít za následek onemocnění jako chronický kašel, astma, pneumonii, fibrózu nebo výše zmíněné odmítnutí plicního štěpu⁴.

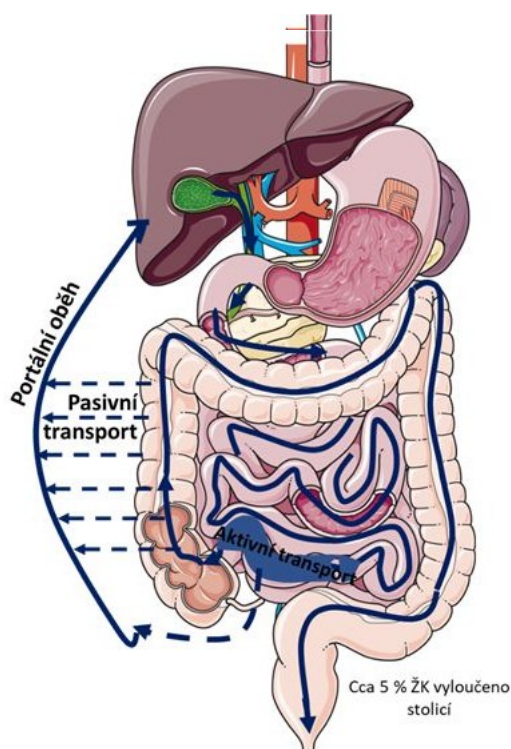
V dnešní době se stále hledá vhodný marker, který by GERD předpověděl včas. Vhodnou matricí pro diagnostiku refluxu se jeví bronchoalveolární laváž (bronchoalveolar lavage fluid, BAL)¹, ve které bylo nalezeno několik potenciálně vhodných markerů^{5, 6, 7}. Mezi tyto markery patří žlučové kyseliny^{8, 9, 10}, bilirubin, pepsinogen II^{5, 11} a v některých publikacích je zmiňován pepsin^{10, 7} a pH¹⁰.

Ve studii, jejíž hlavní autor je Eugenio De Corso, se zaměřili na duodenogastroezofageální reflux (z anglického duodenogastroesophageal reflux, DGER). Existují studie, které dokumentují klinický význam škodlivého působení DGER na gastroezofageální sliznici a jeho korelace se zánětlivými nebo preneoplastickými obrazy ¹². Některé aspirační studie ukázaly významnou korelaci mezi celkovým bilirubinem a hladinami žlučových kyselin, což podporuje domněnku, že jsou oba markery dobrým indikátorem DGER. Měřili tedy žlučové kyseliny a bilirubin ve slinách pacientů, kteří podstoupili gastrektomii, a předpokládali, že přítomnost těchto markerů může souviset s poškozením hrtanu. Jako marker žaludečního refluxu použili pepsinogen II. Zjistili, že pacienti s pozitivním testem na žlučové kyseliny a bilirubin měli výrazně vyšší riziko symptomatických projevů. To naznačuje potenciální klinický význam detekce žlučových kyselin a bilirubinu ve slinách jako markerů refluxu ³.

2.2. Žluč a žlučové kyseliny

Žluč je žluto-zelený vodnatý sekret, který je syntetizován játry organismu a tvoří ho z 95 % voda. Zbylá procenta jsou endogenní látky jako žlučové kyseliny, fosfolipidy, bilirubin, steroidy, cholesterol, aminokyseliny, vitaminy, enzymy, porfyriny a těžké kovy. Dále se žlučí vylučují exogenní léčiva, xenobiotika a toxiny z prostředí. Žlučové kyseliny tvoří asi 50–60 % organické složky žluči^{13,14}.

Denní produkce žluči játry je asi jeden litr. Zpětně se reabsorbuje přibližně 95 % žlučových kyselin a zbývajících 5 % je z těla vyloučeno stolicí. Většina žlučových kyselin se v těle pohybuje cyklicky tzv. enterohepatárním oběhem¹⁴. Enterohepatární oběh je transport žlučových kyselin přes hepatocyt a ileální enterocyt³. Po každém jídle dojde ke žlučnickové kontrakci, která je vyvolána hormonem cholexystokininem, díky němuž jsou žlučové kyseliny vyloučeny do dvanáctníku. V terminálním ileu se žlučové kyseliny reabsorbují a transportují do jater přes portální žílu (Obrázek 1)¹⁵.



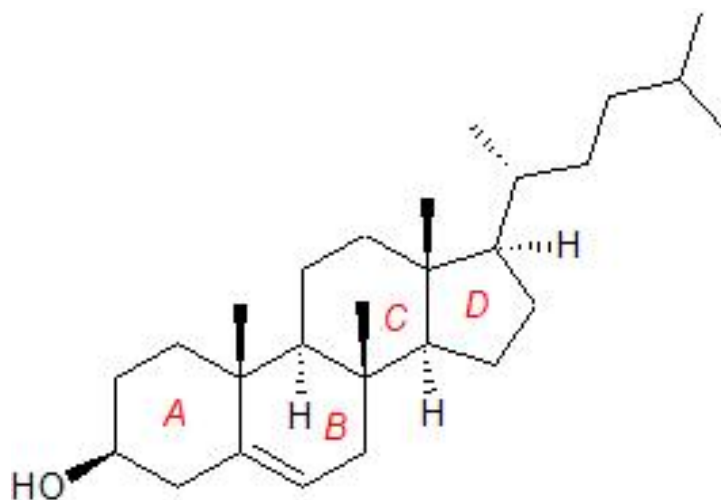
Obrázek 1: Schéma enterohepatálního oběhu žlučových kyselin (převzato z¹⁶)

Žlučové kyseliny jsou amfipatické látky steroidní povahy, které se přirozeně vyskytují v těle obratlovců. Jsou to konečné produkty metabolismu cholesterolu, které pomáhají při emulgaci a absorpci lipidů díky svým detergentním vlastnostem. Dále jsou klíčovými intermediátory mezi hostitelským a střevním mikrobiálním metabolismem, nebo působí jako signální molekuly, které indukují expresi určitých genů regulujících syntézu, transport, vychytávání a metabolismus žlučových kyselin ⁵.

Cirkulující hladina žlučových kyselin interaguje zejména s buňkami jater, žlučníku a střev. Žlučové kyseliny syntetizované přímo z cholesterolu jsou účinnými endogenními ligandy jaderného farnesoidního X receptoru (FXR) a sfingosin-1-fosfátového receptoru 2 (S1PR2) v játrech. Ve střevech aktivuje FXR kyselina taurocheodeoxycholová, zatímco kyselina taurolitocholová (nebo litocholová) a deoxycholová aktivují G proteinový receptor pro žlučové kyseliny (TGR5), pregnan X receptor (PXR) a receptor pro vitamin D3 (VDR) ¹⁷.

2.2.1. Struktura a syntéza žlučových kyselin

Žlučové kyseliny a žlučové alkoholy tvoří rozsáhlou a rozmanitou skupinu molekul. Jejich společným rysem je centrální steroidní jádro odvozené od cholesterolu (obrázek 2). Profil žlučových kyselin se u jednotlivých obratlovců liší a žluč každého živočišného druhu se skládá z několika žlučových kyselin ¹⁸. Systematické názvosloví žlučových kyselin je odvozeno od struktury a charakteristických vlastností molekuly. Například kyselina cholová je odvozena od alkoholu, ze kterého vzniká. Popis struktury zahrnuje informace o počtu uhlíků, umístění funkčních skupin, případné cyklické struktury nebo modifikace či substituce. Příkladem systematického názvosloví je 3 α ,7 β -dihydroxy-5 β -cholan-24-oová kyselina. Vzhledem ke složitosti názvosloví se častěji používá názvosloví triviální, které bývá často odvozené od živočicha, ze kterého byla daná kyselina poprvé izolována. Například výše zmíněná kyselina se podle triviálního názvosloví nazývá ursodeoxycholová, protože byla izolována ze žluči medvědu (latinský výraz slova medvěd je „ursus“) ³.



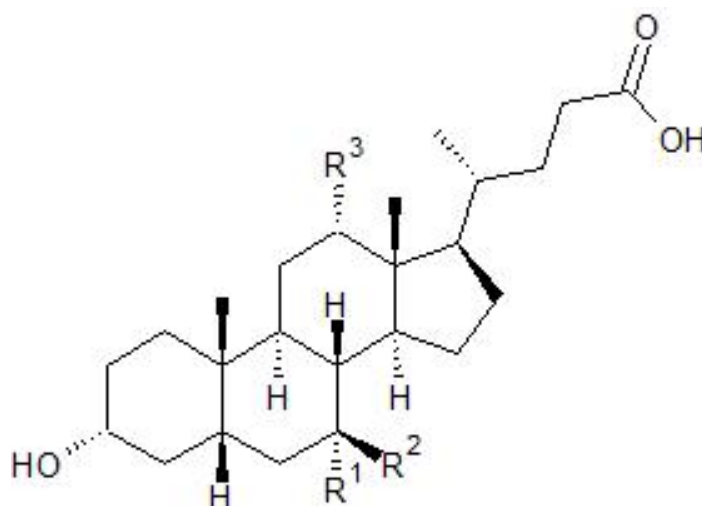
Obrázek 2: Struktura cholesterolu

Steroidní jádro žlučových kyselin se skládá ze tří hexanových (A, B a C) a pentanového kruhu (D). Toto jádro může mít prostorovou nebo planární strukturu, podle toho, zda je mezi kruhy A a B *cis*- nebo *trans*- konfigurace. U savců je ve většině případů spojení v *cis*- konfiguraci. Naproti tomu u nižších obratlovců se vyskytují žlučové kyseliny v *trans*- konfiguraci, takové nazýváme *allo*-žlučové kyseliny^{19,20}.

Žlučové kyseliny mají tři různé chemické aspekty, ve kterých se liší. Jsou to: struktura postranního řetězce, stereochemie kruhů A/B a stereochemie hydroxylových skupin na steroidním jádře²¹. Žlučové kyseliny mohou být sloučeniny o délce 24 uhlíků nebo 27 uhlíků, přičemž 24uhlíkaté žlučové kyseliny mají postranní řetězec o délce pěti uhlíků a 27uhlíkaté žlučové kyseliny mají postranní řetězec o délce osmi uhlíků. U savců jsou dominantní 24uhlíkaté žlučové kyseliny, které mají na konci postranního řetězce jedinou karboxylovou skupinu. U člověka jsou známy jen žlučové kyseliny o délce 24 uhlíků, které se od sebe liší pouze počtem a uspořádáním hydroxylových skupin³. V tabulce 1 jsou uvedeny odlišnosti v četnosti a pozici hydroxyskupin hlavních žlučových kyselin u člověka a na obrázku 3 je schéma struktury žlučové kyseliny.

Tabulka 1: Struktury hlavních žlučových kyselin

Název	Zkratka	R ¹	R ²	R ³
kyselina cholová	CA	OH	H	OH
kyselina chenodeoxycholová	CDCA	OH	H	H
kyselina deoxycholová	DCA	H	H	OH
kyselina lithocholová	LCA	H	H	H



Obrázek 3: Struktura žlučové kyseliny

Jak již bylo zmíněno, žlučové kyseliny jsou konečným produktem metabolismu cholesterolu. U savců existují dvě hlavní biosyntetické cesty, první z nich se nazývá „klasická“ nebo „neutrální“, druhá z nich je „alternativní“ nebo „kyselá“. Syntéza žlučových kyselin se skládá přibližně ze sedmnácti různých reakcí katalyzovaných enzymy. Odehrává se v cytoplazmě, endoplazmatickém retikulu, mitochondrii, a peroxisomu. Klasická cesta zajišťuje více než 90 % potřebných žlučových kyselin. Limitní reakcí této syntézy je přeměna cholesterolu na 7 α -hydroxycholesterol pomocí cholesterol 7 α -hydroxylasy. Hlavním produktem této dráhy je kyselina cholová. Klasická cesta může produkovat i kyselinu chenodeoxycholovou, to ovšem jenom

za předpokladu, že neproběhne hydroxylace na pozici C₁₂ pomocí sterol-12-hydroxylázy). Alternativní cesta může za normálních podmínek u lidí přispívat k celkovému množství syntetizovaných žlučových kyselin jen velmi málo. Naopak se může projevit jako hlavní biosyntetická dráha u pacientů s jaterními chorobami. Limitním krokem pro alternativní cestu je 7 α -hydroxylace pomocí 25-hydroxycholesterol 7 α -hydroxylasy. Produktem této dráhy je kyselina chenodeoxycholová^{22, 23, 24}.

2.2.2. Modifikace žlučových kyselin

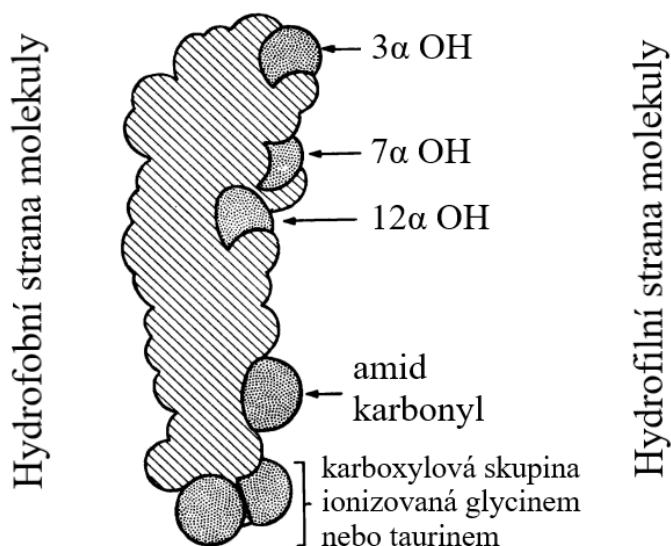
Žlučové kyseliny lze rozdělit na primární, sekundární a terciární. Žlučové kyseliny, které jsou syntetizovány přímo z cholesterolu, se nazývají primární. Obecně se mezi nejběžnější primární žlučové kyseliny řadí chenodeoxycholová (3 α , 7 α -dihydroxy) cholová (3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy), avicholová (3 α , 7 α , 16 α -trihydroxy), hyocholová (3 α , 6 α , 7 α -trihydroxy) a β -muricholová (3 α , 6 β , 7 β -trihydroxy). V lidském organismu se mezi primární žlučové kyseliny řadí kyselina cholová a chenodeoxycholová. Sekundární žlučové kyseliny vznikají z primárních pomocí modifikace bakteriálními enzymy. Za sekundární se považují ty, z kterých anaerobní bakterie ve slepém střevě odstraňují hydroxyskupinu na C₇ a vytvoří tzv. 7-deoxy žlučové kyseliny. Jejich nejběžnější zástupci jsou kyselina lithocholová (odvozená od kyseliny chenodeoxycholové) a kyselina deoxycholová (odvozená od kyseliny cholové). Sekundární žlučové kyseliny mohou dále podléhat strukturním modifikacím (glukuronidace, sulfatace, glukosidace, atd.) v játrech a střevech za vzniku terciárních žlučových kyselin^{3, 18, 25}.

2.2.3. Konjugace žlučových kyselin

Termínem konjugace je v případě žlučových kyselin nazývána *N*-acyl amidace s glycinem nebo taurinem. Konjugace zvyšuje rozpustnost žlučových kyselin. Výsledkem je plně ionizovaná molekula, která je v prostředí tenkého střeva (pH \approx 6-7) vysoce rozpustná a negativně nabitá. Je tedy nepropustná přes buněčnou membránu. Klíčovým faktorem podporujícím vysokou intraluminální koncentraci konjugovaných žlučových kyselin ve žlučových cestách a tenkém střevě je právě nepropustnost přes apikální část plazmatické membrány cholangiocyty, enterocyty a paracelulárních spojů mezi těmito buňkami^{3, 18}.

2.2.4. Fyzikálně-chemické vlastnosti žlučových kyselin

Jednou z nejdůležitějších fyziologických funkcí žlučových kyselin je transport lipidů díky jejich solubilizaci. To souvisí s jejich amfipatickou povahou, která je dána hydrofilní a hydrofobní stranou molekuly ²¹. Hydrofilní část molekuly obsahuje hydroxyskupiny a nazývá se jako strana α podle orientace hydroxyskupin. Hydrofobní strana neobsahuje žádné substituenty a je označována jako strana β ³. Polaritu žlučových kyselin ovlivňuje tedy pozice, četnost a orientace hydroxyskupin. Nejvíce je ale ovlivněna prostorovou orientací, protože pokud se hydroxyskupiny nachází v poloze α , tak je molekula ve výsledku více hydrofobní, než molekula s hydroxyskupinami orientovanými do β polohy ^{26, 27}. Schéma prostorového uspořádání kyseliny cholové je uvedeno na obrázku 4.



Obrázek 4: Schéma prostorového uspořádání hydrofilních skupin ve žlučové kyselině (převzato a upraveno ³)

V závislosti na pH tvoří žlučové kyseliny tzv. micely. K vytvoření micely dochází ale pouze v úzkém koncentračním rozsahu, jehož průměrná hodnota se nazývá kritická micelární koncentrace (critical micellization concentration – CMC). Souvisí s rozpustností žlučových kyselin (jak nekonjugovaných, tak i glycinem konjugovaných), která je v hodnotě kritické micelární koncentrace prakticky neomezená. Tato koncentrace roste se zvyšujícím se počtem hydroxy- nebo keto- skupin. Zároveň při stejném počtu substituentů jí zvyšuje nahrazení hydroxyskupiny ketoskupinou ²⁸. Dále je také důležitá poloha hydroxylových skupin. Kritická micelární koncentrace se zvýší, pokud se změní

poloha hydroxyskupiny z α na β . Hodnotu CMC také ovlivňují konjugáty, např. konjugáty glycinu a taurinu CMC snižují³.

Hodnoty pK_a žlučových kyselin jsou nižší z důvodu záporného indukčního efektu karbonylové skupiny na amidové vazbě. Glycinové konjugáty mají pK_a kolem 4 a pK_a taurinových konjugátů se pohybuje kolem hodnoty 1,5. Nekonjugované žlučové kyseliny mají pK_a 5-6²⁶. U žlučových kyselin hraje roli rozdíl v prostředí *in vivo* a *in vitro*. *In vitro* jsou konjugáty rozpustné při velmi nízkém pH. Rozpustnost glycinových konjugátů nebo nekonjugovaných žlučových kyselin se zvyšuje s rostoucím pH do hodnoty CMC, kdy se rozpustnost stane prakticky neomezenou. *In vivo* se žlučové kyseliny mohou vyskytovat v různých formách, například jako nerozpuštěná nebo rozpuštěná protonovaná kyselina, micela, aniont kyseliny, nebo nerozpustná vápenatá sůl²⁹.

Žlučové kyseliny se v organismu uplatňují zejména v gastrointestinálním traktu (viz kapitola 2.2). Tyto molekuly je také možné využít jako farmaka u terapie nedostatečné tvorby žlučových kyselin, onemocnění jater nebo u rozpouštění žlučových kamenů. Jsou také studovány jako léčiva proti plísním, vysoké hladině cholesterolu nebo jako nosiče pro jaterní specifická farmaka³⁰. Dále mohou žlučové kyseliny být dobrými stavebními kameny pro konstrukci např. nových antibiotik³¹, chirálních šablon³², kationtových³³ a aniontových³⁴ receptorů, nových povrchově aktivních látek³⁵, nosičů cílených na léčiva³⁶ a dalších. Mimo farmakologii je využití žlučových kyselin předmětem výzkumu také v supramolekulární chemii, materiálové chemii a nanotechnologii²¹.

2.3. Analýza žlučových kyselin

Je několik principů, které popisují separaci nebo stanovení žlučových kyselin. Některé jsou jednoduché a robustní jako např. enzymatický imunisorbentní test (ELISA), enzymatické testy a tenkovrstvá chromatografie (TLC). Další metody lze zařadit mezi pokročilé analytické metody. Patří sem vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC), superkritická kapalinová chromatografie (SFC) a hmotnostní spektrometrie (MS) ^{25, 37}. Výše zmíněné metody jsou detailněji rozebrány v následujících podkapitolách.

2.3.1. Chromatografické metody

Analytickým základem chromatografických metod je separace s reverzní fází využívající stacionární fázi C18, která je vhodná pro separaci různého rozsahu hydrofobicity přítomné mezi žlučovými kyselinami ³⁸.

Při výběru vhodné chromatografické metody je třeba zohlednit typ analyzované žlučové kyseliny i možné interferující molekuly v matrici ²⁵.

2.3.1.1. Chromatografie na tenké vrstvě

Mezi první rutinně používané chromatografické metody ke stanovení žlučových kyselin se používala tenkovrstvá chromatografie. Používala se při analýze primárních a sekundárních žlučových kyselin. Také byla tato metoda v minulosti jediná, která umožňovala stanovení glycinových a taurinových konjugátů. Silikagel byl nejběžnějším adsorbentem při TLC s normální fází i při TLC s reverzní fází, kdy byl silikagel modifikován alkylovou skupinou. Tenkovrstvá chromatografie s reverzní fází byla používána hlavně při analýze izomerních dihydroxykyselin a jejich konjugátů ^{25, 39}. Pro zlepšení rozlišení byla užívána dvourozměrná tenkovrstevná chromatografie, protože zde byly použity 2 různé systémy rozpouštědel s různou selektivitou a všechny žlučové kyseliny byly zcela separovány. Detekce mohla být provedena přímo na TLC destičce aplikací roztoku kyseliny fosfomolybdenové nebo síranu ceričnoamonného na chromatogram a zahříváním na 110 °C po dobu 2-5 minut. Žlučové kyseliny byly pak detekovány jako modré skvrny. Kvantifikace se prováděla dezintometricky, kolorimetricky nebo fluorimetricky v závislosti na použitém činidle ³⁹.

Sjövall J. publikoval v roce 1959 jednu z prvních studií zabývajících se separací žlučových kyselin. Zabýval se složením žlučových kyselin u novorozenců a dětí do 10 let. Stanovil šest žlučových kyselin (kyselinu taurocholovou, taurochenodeoxycholovou, taurodeoxycholovou, glykocholovou, glykochenodeoxycholovou a glykodeoxycholovou) pomocí tenkovrstvé chromatografie. Stacionární fázi tvořila 70% kyselina octová a mobilní fázi tvořila směs chlorethanu a heptanu v poměru 50:50 (v/v). Detekce byla provedena na spektrofotometru. Zjistil, že průměrná celková koncentrace žlučových kyselin byla asi 10 mequiv/l (odpovídá 0,01 mmol/l) ⁴⁰.

V současné době se metoda používá v jiném uspořádání. Ve studii publikované v roce 2018 se Harris, S. a kolektiv zabývali oxidací žlučových kyselin pomocí bakterie *Eggerhella lenta*. Tenkovrstevnou chromatografií zde použili pro separaci žlučových kyselin a dalších metabolitů vytvořených touto bakterií. Byly použity TLC desky BakerFlex Silica B gel. Chromatografie probíhala po dobu 24 hodin v mobilní fázi o složení toluen:dioxan:ledová kyselina octová v poměru 75:20:2 (v/v/v). Analyty byly poté identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie a kvantifikovány pomocí kapalinové scintilační spektrometrie ⁴¹.

2.3.1.2. Plynová chromatografie

Další chromatografickou technikou pro stanovení žlučových kyselin je plynová chromatografie (GC). Je to separační technika, která se odvíjí od těkavosti složky v plynné fázi. Problém u žlučových kyselin je v obsahu hydroxy-, karboxy- a dalších oxofunkčních skupin, protože zvyšují schopnost tvoření vodíkových vazeb a tím snižují těkavost a tepelnou stabilitu. Vzorek je tedy třeba před samotnou analýzou upravit. Příprava vzorku může zahrnovat extrakci, purifikaci, hydrolyzu a derivatizaci, která těkavost a tepelnou stabilitu žlučových kyselin zlepšuje ^{25, 39}. V dnešní době se pomalu od této metody upouští, zejména kvůli výše zmíněným nevýhodám.

První popsanou metodu pro stanovení žlučových kyselin publikoval v roce 1953 Sjövall J. Separoval 9 derivátů žlučových kyselin metodou extrakce na aniontovém iontoměniči, poté byla amidová vazba hydrolyticky štěpena a následně přečištěna. Svým měřením zjistil, že přítomnost a četnost hydroxy-skupiny zrychlila eluci daného derivátu, naopak keto-skupina eluci zpomaluje ⁴².

K derivatizaci může dojít na karboxylové skupině např. esterifikací pomocí diazomethanu ⁴³. Zde je ale problém s toxicitou a také při reakci vzniká malé množství methyletherů. Alternativní cestou esterifikace může být použití methanolu s 5% kyselinou sírovou ⁴⁴ nebo 2,2-dimethoxypropanu s kyselinou chlorovodíkovou ⁴⁵. Také je možné využít vyšší homology alkoholů, jako jsou ethyl, isobutyl, *n*-butyl nebo *n*-propyl estery, protože zvýší retenční čas žlučových kyselin a tím je možné v některých případech zlepšit rozlišení. Hydroxylové skupiny jsou nejčastěji derivatizovány přeměnou na trimethylsilyl ether. Jako silylační činidlo se používá *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid v kombinaci s trimethylchlorsilanem nebo s trimethyljodosilanem. Je možné využívat i jiné silylační skupiny. Například deriváty dimethylethylsilylu a dimethylpropylsilyl etheru mají delší retenční časy než trimethylsilyl ether deriváty ⁴⁶. Kromě silyl etherů se mohou hydroxylové skupiny derivatizovat přeměnou na trifluoracetáty ⁴⁵, acetáty ⁴⁷ nebo mravenčany ⁴⁸.

U plynové chromatografie se používá řada stacionárních fází, jako je methylsilikon (SE-30, OV-1), kyanoalkyl silikon (XE-60) nebo fluoralkyl silikon (Q1, OV-210) ³⁹. Mezi detektory používané u této metody patří detekce elektronového záchytu (ECD), plamenová ionizační detekce (FID) a hmotnostní spektrometrie ^{25,39}.

2.3.1.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie odstranila potřebu derivatizace. Výhodou této metody je mnohem lepší citlivost, rychlost a separace analytů v biologické matici ^{37,39}.

První publikaci zaměřenou na separaci konjugátů žlučových kyselin pomocí HPLC napsali Shaw, R. a Elliott, W. v roce 1976 ³⁹. Měření bylo provedeno na přístroji se smyčkovým injektorem a diferenciálním refraktometrem. Žlučové kyseliny byly separovány z lidské žluči na koloně Corasil II (3,175 mm × 609,6 mm) nebo μ Porasil (6,35 mm × 304,8 mm). Mobilní fáze byla ve složení 2-propanol/ethylacetát/voda/NH₄OH v poměru 260:600:50:3 (v/v/v/v) s průtokem 2 ml/min. Takto složená mobilní fáze byla použita k rozdělení taurodihydroxy-, glykodihydroxy-, tauro- a glyko- skupin žlučových kyselin. Frakce obsahující glykodihydroxy- skupinu byla separována rechromatografií v mobilní fázi o složení acetonitril/kyselina octová v poměru 400:10 (v/v) s průtokem 2 ml/min. Frakce obsahující

taurodihydroxy- skupinu byla částečně separována rechromatografií za použití mobilní fáze acetonitril/kyselina octová/kyselina mravenčí (97%)/voda v poměru 500:10:5:10 (v/v/v/v) s průtokem 2 ml/min ⁴⁹.

Metody detekce jsou u vysokoúčinné kapalinové chromatografie různé. V minulém století se běžně používala refraktometrie, UV spektroskopie, fluorometrie nebo elektrochemická detekce. Tehdy byla nejcitlivější fluorometrická nebo UV detekce, ovšem před samotnou analýzou muselo dojít k předkolonové derivatizaci nebo postkolonové enzymatické reakci ⁵⁰.

Předkolonová derivatizace a UV detekce se stále ještě v některých laboratořích používá. Například Shi, Y. a kolektiv v roce 2015 vydali studii o kvantifikaci hlavních žlučových kyselin v žlučových kamenech dobytka. Jako derivatizační činidlo použily 2-brom-4-nitroacetofenon a 18-crown ether. Detekce probíhala při vlnové délce 363 nm. Metodu validovali s linearitou ($R^2 \geq 0,9980$), výtěžností (94,24 – 98,91 %), limitem detekce (0,25 – 0,31 ng) a limitem kvantifikace (0,83 – 1,02 ng), což značí, že vyvinutá metoda je přesná a precizní ⁵¹.

Dále Li, G. L. a kolektiv vyvinuli a validovali metodu HPLC s fluometrickou detekcí pro stanovení žlučových kyselin a volných mastných kyselin. Navrhli nové fluorescenční značkovací činidlo, 2-(7H-dibenzokarbazol-7-yl)ethyl 4-methylbenzensulfonát, které má silnější fotoluminiscenci. Separace proběhla na koloně Hypersil BDS-C8 (200 mm × 4,6 mm, 5 μm) od firmy Agilent. Složkou A mobilní fáze byla směs acetonitrilu a vody v poměru 1:1 (v/v) a složka B obsahovala čistý acetonitril. Byla provedena gradientová eluce (čas: 0-20-25-35-45 min, B: 25-45-85-100 %), průtok byl 1 ml/min a teplota kolony 35 °C ⁵².

V posledních letech je hojně používané spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem. HPLC nebo UHPLC (ultra-vysokotlaká kapalinová chromatografie) jsou nejcitlivější široce používanou analytickou metodou pro přesné kvalitativní i kvantitativní stanovení žlučových kyselin v biologické matrici ^{8,25}. Využívá se hlavně chromatografie na reverzní fázi, protože lze použít širší výběr průtoků a rozměrů kolony. Chromatografickou separaci a ionizační účinnost je možné ovlivnit pomocí pH mobilní fáze. Žlučové kyseliny konjugované s taurinem mají $pK_a \approx 1,5$; glycinové konjugáty mají $pK_a \approx 4,5$ a nekonjugované žlučové kyseliny mají $pK_a \approx 6$ ³⁷.

Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií pro stanovení žlučových kyseliny byla popsána s několika ionizačními technikami a hmotnostní analyzátory. Mezi používané ionizační techniky se řadí elektrosprejová ionizace (ESI)⁵³, bombardování rychlými atomy (FAB) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)⁵⁴. Iontová past (IT), analyzátor doby letu (TOF), kvadrupól (Q)⁵³ a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FTICR) jsou příklady používaných hmotnostních analyzátorů²⁵.

Další možností využití spojení LC-MS je tandemová hmotnostní spektrometrie, tedy spojení několika hmotnostních analyzátorů⁵⁵. Pro stanovení žlučových kyselin bylo popsáno několik tandemových uspořádání, např. trojitý kvadrupól (QqQ)⁵⁶, kvadrupól a analyzátor doby letu (Q-TOF)⁵⁷, iontová past a analyzátor doby letu (IT-TOF)⁵⁸ a další.

V této diplomové práci jsem použila metodu vytvořenou Laboratoří pro výzkum nemocí jater a metabolismu hemu na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy, která byla použita u studie zabývající se vlivem deplece železa na žlučové kyseliny v plazmě a moči. Konkrétní parametry této metody jsou uvedeny v kapitole 3.6. Žlučové kyseliny byly detekovány hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem v režimu SRM⁵⁹.

2.3.2. *Další analytické metody stanovení*

V dnešní době mezi okrajové metody stanovení žlučových kyselin patří tlačena kapilární elektrochromatografie (pCEC). Je to nový způsob, který spočívá v působení dodatečného tlaku na kolonu, aby se překonaly problémy s tvořením bublin a vysycháním kolon, což bránilo opakovatelnosti a šíří použití techniky. Mobilní fázi pohání jednak elektroosmotický tok, tak i dodatečný tlak, což umožní nastavitelnou selektivitu a rychlejší eluci. Pro detekci se při pCEC využívá amperometrická detekce, chemiluminiscenční detekce, hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetická rezonance a laserem indukovaná fluorescenční detekce (LIF)⁶⁰.

Ke stanovení žlučových kyselin může být použita i superkritická kapalinová chromatografie (SFC). Mezi její výhody patří zkrácení doby analýzy a vyšší transparentnost eluentu při nízkých UV vlnových délkách, nezáleží zde na tepelné stabilitě ani na těkavosti analytu. Mobilní fázi je při této metodě superkritický oxid uhličitý (SCCO₂), jeho nízká viskozita a vysoká difuzivita zlepšuje separaci žlučových

kyselin. Další výhodou superkritické mobilní fáze je variabilita polarita, což umožní eluci hydrofobních i hydrofilních sloučenin⁶¹.

Budoucností ve stanovení žlučových kyselin může být nukleární magnetická rezonanční spektrometrie. Hlavní výhodou je vysoká reprodukovatelnost a minimální příprava vzorku. Pro stanovení žlučových kyselin se hodí NMR spektroskopie s vysokým magnetickým polem¹⁹. Nebo pro stanovení kyseliny cholové, deoxycholové a chenodeoxycholové je vhodná metoda pomocí dvourozměrných spekter (1H-1H TOCSY nebo 1H-13C HSQC), jak uvedl Duarte, I. s kolegy. V porovnání s konvenčními analytickými technikami má NMR spektroskopie velkou výhodu při metabolickém profilování biokapalin. Dokládají to studie zabývající se plazmou a močí, naopak velký potenciál má například žluč. Nevýhodou je naopak dostupnost a cena instrumentace⁶².

2.3.3. Enzymatické metody stanovení

Enzymatické metody se využívají, protože jsou jednoduché a rychlé. To z nich dělá nejrozšířenější metody v klinických laboratořích. Při měření žlučových kyselin je hlavní limitací této enzymových metod to, že je měřena suma veškerých 3 α -hydroxysteroidů, nejen suma žlučových kyselin. Zároveň ale tyto metody neměří sulfatované nebo glukuronidované konjugáty žlučových kyselin^{20, 25, 39}.

První generace enzymových testů spočívala v oxidaci NAD⁺ dependentní steroidní dehydrogenázy s 3 α -hydroxysteroidními molekulami za vzniku NADH, který se měřil UV spektroskopií nebo fluorometricky. Tento postup ale neměl takovou citlivost, takže se tento postup spojil s reakcí, která využila redukci substrátu s následnou fluorometrickou detekcí. Tato detekce byla ovšem relativně nákladná, tudíž byl přidán další krok, kdy byla NADH převedena na nitrotetrazoliovou modř pomocí diaforázy (E.C.1.8.1.4.) za vzniku diformazanu, který bylo možné měřit při 540 nm (druhá generace enzymatických testů). Nevýhoda toho postupu byla v stále nízké citlivosti, proto byla spojena s 3-oxo-5- β - Δ 4-dehydrogenázou, která do jisté míry řešila problém s citlivostí (třetí generace testů)^{20, 25, 39, 63}.

Jelikož i třetí generace enzymatických testů neměla uspokojivou citlivost, vyvinul Zhang, G. H. s kolegy v roce 2005 novou enzymatickou cyklickou metodu. Provádí se v přítomnosti NADH, thio-NAD⁺ a 3 α -HSD. Měří se nárůst absorbance thio-NADH vzniklého při reakci v prostředí o teplotě 37 °C při 405/660 nm. Tato metoda je dostatečně

jednoduchá, specifická a citlivá, aby se mohla používat v biochemických automatických analyzátoch²⁰.

Další komplikací limitující stanovení žlučových kyselin pomocí enzymatických testů může být biologická matrice, respektive koncentrace žlučových kyselin v matrici. Jelikož enzymatické testy jsou původně navrženy pro stanovení v séru, v roce 2013 Parikh, S. a kolektiv hodnotily citlivost dvou enzymatických testů stanovením žlučových kyselin v bronchoalveolární laváži. Byly použity 2 kity (kit 1: Bio-Quant Labs, San Diego, Kalifornie, nebo Trinity Biotech PLC, Co Wicklow, Irsko; kit 2: Alere San Diego Inc, San Diego, Kalifornie, nebo Bio-Stat Diagnostics Systems, Cheshire, Spojené království). Ukázalo se, že enzymatické soupravy nejsou dostatečně citlivé pro použití při koncentraci nižší než 5 $\mu\text{mol/l}$ ¹¹.

2.3.3.1. Enzymově vázaný imunosorbentní test

Další metodou pro stanovení může být enzymově vázaný imunosorbentní test (ELISA). V roce 2017 publikoval Liu, S. a spol. studii, kde vytvořili metodu nepřímého kompetitivního enzymového imunosorbentního testu (icELISA) pro stanovení pěti hlavních žlučových kyselin (cholové, deoxycholové, chenodeoxycholové, ursodeoxycholové a hyodeoxycholové kyseliny) v séru. Použili k tomu čtyři různé monoklonální protilátky. Linearita standardní křivky byla v rozmezí 0,2875 mmol/l až 9,2 mmol/l. Pokles aktivity enzymu byl stanoven na $IC_{50} = 1,85$ mmol/l a mez detekce byla stanovena na 0,73 mmol/l. Tyto hodnoty vypovídají o vysoké citlivosti testu. Dále bylo zjištěno, že průměrná obnovitelnost byla 112 % a maximální relativní směrodatná odchylka v rámci testu byla 2,99 %, což ukazuje, že je metoda přesná a dostatečně spolehlivá na to, aby mohla být použita v praxi. Získané hodnoty byly poté porovnány s enzymatickým testem, z čehož je možné soudit, že vyvinutou metodu lze použít pro stanovení celkových žlučových kyselin v biologických vzorcích, protože koncentrace celkových žlučových kyselin získaných metodou ELISA i enzymatickým testem se shodovaly⁶⁴.

Enzymově vázaný imunosorbentní test se dá využít i při stanovení jednotlivých žlučových kyselin nebo jejich konjugátů a derivátů. Kobayashi, N. a kolektiv vytvořili monoklonální protilátku specifickou pro sulfátové deriváty kyseliny glykolitocholové v moči. Zjistili, že detekční limit pro tuto metodu je 0,4 pg na analýzu, takže je možné

tuto metodu použít jako diagnostický nástroj pro jaterní funkce a hepatobiliární onemocnění. Sulfatované žlučové kyseliny mohou být produkovány v játrech jako součást mechanismu detoxikace a eliminace xenobiotik, případně mohou poukázat na patofyziologii v organismu ⁶⁵. Dalším příkladem je kyselina glykocholová jako selektivní biomarker hepatocelulárního karcinomu. Cui, X. a kolegové vytvořili nepřímý kompetitivní enzymově vázaný imunosorbentní test pro detekci GCA. Použili rekombinantní protilátku scFv-G11 označenou biotinem pomocí chemické, respektive enzymatické metody. Metoda dobře korelovala s výsledky získané pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií, což značí spolehlivost a přesnost použité metody ⁶⁶.

2.3.3.2. *Radioimunoanalýza*

Metoda, která byla vyvinuta za účelem analýzy konkrétních žlučových kyselin při velmi nízkých koncentracích, je radioimunoanalýza. Tento postup byl poprvé popsán v roce 1973 Simmondsem, W.J., a jeho kolegy ³⁹. Vyvinuli rychlou, citlivou a specifickou metodu radioimunoanalýzy konjugovaných žlučových kyselin. Metoda byla validována porovnáním s hodnotami získanými plynovou chromatografií. Rovnováha mezi [³H]cholylglycinem a protilátkou byla dosažena za jednu hodinu při 42 °C. Pomocí polyethylenglykolu byl navázaný antigen vysrážen a volný antigen byl stanoven kapalinovou scintilační spektrometrií ⁶⁷.

Běžně používané metody využívaly králičí polyklonální protilátky imunizované žlučovými kyselinami vázanými na proteiny. Radioimunoanalýza se využívala hlavně pro stanovení konjugovaných žlučových kyselin. Mezi výhody této metody patřila jednoduchost a citlivost. Nevýhodou byla poměrně vysoká cena a specifické požadavky pracovních podmínek. Alternativou radioimunoanalýzy může být enzymová imunoanalýza závisající na aplikaci protilátek a ne radioizotopů ³⁹.

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie a přístroje

Chemikálie

- Standardy žlučových kyselin
 - Kyselina cholová, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina chenodeoxycholová, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina glykocholová, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina deoxycholová, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina lithocholová, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina taurodeoxycholová, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina glykodeoxycholová, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina glykolitocholová, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina glykoursodeoxycholová, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina hyocholová, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina taurocholová, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina ursodeoxycholová, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina glykochenodeoxycholová, SantaCruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA)
 - Kyselina taurochenodeoxycholová, SantaCruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA)
 - Kyselina tauroursodeoxycholová, SantaCruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA)
 - Kyselina hyodeoxycholová, Supelco® (Bellefonte, Pensylvánie, USA)
- Standardy deuterovaných žlučových kyselin
 - Kyselina taurocholová D5, SantaCruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA)
 - Kyselina glykocholová D5, SantaCruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA)
 - Kyselina glykochenodeoxycholová D4, SantaCruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA)
 - Kyselina taurochenodeoxycholová D4, SantaCruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA)

- Kyselina chenodeoxycholová D4, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
- Kyselina lithocholová D4, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
- Kyselina cholová D4, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
- Kyselina ursodeoxycholová D4, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
- Kyselina deoxycholová D4, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
- Ostatní reagensy
 - Octan amonný, LC-MS Grade, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina mravenčí, LC-MS Grade, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Fetální bovinní sérum, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Acetonitril, Isocratic Grade, LiChrosolv®, Merck (Darmstadt, Germany)
 - Methanol, LC-MS Grade, Biosolve BV (Valkenswaard, the Netherlands)
 - Amoniak p.a., Penta s. r. o. (Praha, Česká republika)
 - Ethyl acetát, LC-MS Chromasolv®, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Kyselina chlorovodíková p.a. 35%, Penta s. r. o. (Praha, Česká republika)
 - Kyselina sírová p.a. 96%, Penta s. r. o. (Praha, Česká republika)
 - Ethanol absolutní p.a., Penta s. r. o. (Praha, Česká republika)
 - Chlorid sodný p.a., Penta s. r. o. (Praha, Česká republika)
 - Hydroxid draselný p.a., Penta s. r. o. (Praha, Česká republika)
 - Nekonjugovaný bilirubin, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - 2,6-di-*terc*-butyl-4-methylfenol ($\geq 99\%$), Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Mesobilirubin, Frontier Scientific (Newark, New Jersey, USA)
 - Kyselina askorbová, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
 - Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
- Namíchané roztoky
 - Ekvilibrovaný ethylacetát – 50 ml ethylacetátu s 50 ml 20% NaCl bylo upraveno na pH hodnotu ≈ 1 koncentrovanou H_2SO_4
 - Methanol s přísávkem antioxidantů – ve 450 ml methanolu bylo rozpuštěno 1350 mg 2,6-di-*terc*-butyl-4-methyl fenolu (BHT), 450 mg kyseliny askorbové a 2250 mg octanu amonného

- Zásobní roztok mesobilirubinu – komerční mesobilirubin byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu o koncentraci 0,5 mol/l. Zásobní roztok byl uchován při – 80 °C v 10 ml alikvotech.
- Zásobní roztok vodné složky mobilní fáze při stanovení žlučových kyselin kapalinovou chromatografií – deionizovaná voda s přidavkem octanu amonného o koncentraci 0,005 mol/l a kyseliny mravenčí o koncentraci 0,0012 %
- Zásobní roztok organické složky mobilní fáze při stanovení žlučových kyselin kapalinovou chromatografií – 100% methanol s přidavkem octanu amonného o koncentraci 0,005 mol/l a kyseliny mravenčí o koncentraci 0,0012 %
- Zásobní roztok složky A mobilní fáze při stanovení bilirubinu pomocí kapalinové chromatografie – acetonitril, methanol a voda (40/40/20 v/v/v) s přidavkem 0,1% kyseliny octové
- Zásobní roztok složky B mobilní fáze při stanovení bilirubinu pomocí kapalinové chromatografie – acetonitril, methanol a voda (45/45/10 v/v/v) s přidavkem 0,1% kyseliny octové
- Použité kity
 - Bile acids, 450-A, Trinity Biotech (Bray, Ireland)
 - Human Pepsinogen I (PGI) ELISA Kit, EHPGI, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
 - Human Pepsinogen II PGC ELISA Kit, EHPGC, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Přístroje

- Analytické váhy XPR105 Delta Range, Mettler – Toledo s. r. o. (Columbus, Ohio, USA)
- Centrifuga Jouan MR 23i, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
- Generátor dusíku Mistral LCMS Evolution, VICI DBS (Houston, Texas, USA)
- Hotbox Oven with fan Size 2, Gallenkamp (Cambridge, United Kingdom)
- HPLC Dionex UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
- Kolona Pinnacle DB C18 (100 × 2,1 mm; 3 µm), Restek (Bellefonte, Pennsylvania, USA)

- Kolona Poroshell 120 EC-C18 (3,0 × 100 mm; 2,7 μm), Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, California, USA)
- Kolonka SupelTM-Select HLB 1 ml, Supelco® (Ottawa, Canada)
- Lyofilizátor L4-110 PRO, Gregor instruments (Sázava, Česká republika)
- pH-metr pH50, XS Instruments (Capri, Italy)
- Tecan Infinite M200, Tecan Group Ltd. (Männedorf, Switzerland)
- Termostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha (Praha, Česká republika)
- Termovap TV 10+, ECOM s. r. o. (České Meziříčí, Česká republika)
- TSQ Quantum Access Max, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
- Vortex Genie-2, Scientific Industries Inc. (Bohemia, New York, USA)

Statistika

Při stanovení celkových žlučových kyselin, bilirubinu, pepsinogenu a pH byly vypočteny běžné statistické charakteristiky – průměr, medián a rozptyl. Dále na těchto skupinách vzorků byl vypočten Pearsonův korelační koeficient (v programu GraphPad) s hladinou významnosti $p > 0,05$. Výsledky nebyly korigovány na mnohočetné pozorování.

3.2. Enzymatická analýza – celkové žlučové kyseliny

Enzymatická analýza byla prováděna kitem od firmy Trinity Biotech. Navážka reagentu A byla 336,5 mg byla rozpuštěna v 5,6 ml deionizované vody. Navážka reagentu B byla 34,0 mg a byla rozpuštěna v 0,7 ml deionizované vody. Oba reagenty byly temperovány při 37 °C po dobu asi 20 minut. Pipetáž na mikrotitrační destičce jednotlivých roztoků byla následující: 50 μ l kalibračního roztoku nebo vzorku, 100 μ l reagentu A a 25 μ l reagentu B nebo deionizované vody v případě slepého vzorku. Po pipetáži byly vzorky opatrně promíchány a následně temperovány při 37 °C po dobu 5 minut. Po inkubaci bylo přidáno 25 μ l stop reagentu a byla odečtena absorbance při 530 nm.

Pro další analýzy byly připraveny vlastní kalibrátory (vzhledem k použité matici se jeví jako spolehlivější) z fyziologického roztoku a kyseliny glykochenodeoxycholové o koncentraci 1,63 mmol/l. Přesné složení kalibračních roztoků je uvedeno v tabulce 2.

Tento postup byl také použit u enzymatického stanovení žlučových kyselina na pětaticetičlenné kohortě pacientů (soubor 35 vzorků bronchoalveolární laváže od různých pacientů) a výsledky byly použity pro korelační analýzu.

Tabulka 2: Schéma složení kalibračních roztoků

c	V ₁	V ₂
μ mol/l	μ l	μ l
10	12	1988
20	25	1975
50	61	1939
75	92	1908
100	123	1877

c – koncentrace kalibračního roztoku; *V*₁ – objem zásobního roztoku GCDCA; *V*₂ – objem fyziologického roztoku

3.3. Extrakce na pevnou fázi

Extrakce na pevnou fázi byla provedena na směsném BALu, což je směs bronchoalveolárních laváží několika pacientů, jejichž enzymatický test byl vyhodnocen jako pozitivní (tzn. koncentrace byla vyšší než 8 $\mu\text{mol/l}$). Extrakce byla provedena na kolonce SupelTM – Select HLB SPE Tube o objemu 1 ml od firmy Supelco. Nejprve byly připraveny zásobní roztoky methanolu o koncentraci 5; 20; 40; 60 a 80 %. Na kolonku byly pipetovány roztoky v tomto pořadí: 1 ml 100% methanolu, 1 ml fyziologického roztoku, 2 ml vzorku směsného BALu a 1 ml 5% methanolu. Následně byla kolonka vysušena a postupně jímány frakce o objemu 1 ml od 20% až do 100% methanolu. Následně byly vzorky odpařeny pod dusíkem, rozpuštěny v 1 ml fyziologického roztoku (v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut) a následně byla provedena enzymatická analýza.

Postup extrakce na pevnou fázi byl upravován. První úprava se týkala rozpuštění odpařeného vzorku po SPE. Vzorky byly rozpuštěny v bovinním séru, místo fyziologického roztoku. Další změna byla centrifugace (5 min, 15000 \times g, 22 °C) frakcí po SPE.

Dalším krokem bylo po jímání frakcí zařadit lyofilizaci. Frakce byly rozděleny po 500 μl , lyofilizovány a poté byla jedna sada rozpuštěna ve 200 μl bovinního séra a druhá ve 200 μl fyziologického roztoku.

3.4. Hydrolýza

Na vzorku směsného BALu (a jeho pozitivní kontroly) a bovinního séra (a jeho pozitivní kontroly) byla provedena hydrolýza. Do skleněné zkumavky bylo pipetováno 50 μl směsného BALu nebo séra (v případě pozitivních kontrol byl k 50 μl analytu přidán 1 μl GDCA, výsledná koncentrace roztoku byla 32 $\mu\text{mol/l}$). Vzorek byl odpařen, poté byl rozpuštěn v 50 μl bovinního séra a opět odpařen. Dále byl vzorek rozpuštěn v 2,5 ml 10% KOH a inkubován 99 minut při teplotě 140 °C. Po samovolném ochlazení na laboratorní teplotu byly vzorky okyseleny kyselinou chlorovodíkovou na $\text{pH} \approx 1$. Dále bylo přidáno 12,5 ml fosfátového pufru. Vzorek byl zamíchán na vortexu a následně byla provedena extrakce na pevnou fázi. Na výše zmíněnou kolonku byl postupně pipetován 1 ml

100% methanolu, 1 ml fyziologického roztoku, vzorek, 1 ml 5% methanolu a 1 ml 20% methanolu. Dále byla kolonka vysušena a jímána frakce 100% methanolu o objemu 1 ml. Nakonec byly vzorky odpařeny a změřeny na LC-MS/MS.

3.5. Solvolýza

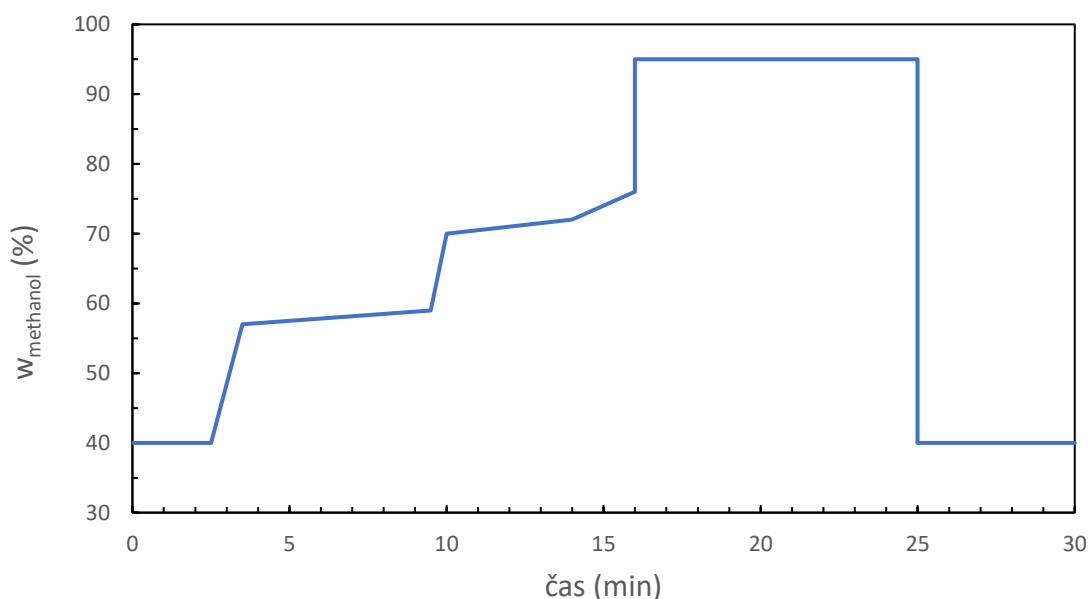
Byla provedena solvolýza směšného BALu i jeho pozitivní kontroly. Ke 400 μ l vzorku BALu (v případě pozitivní kontroly bylo přidáno 11 μ l TLCA-S, celková koncentrace roztoku byla 50 μ mol/l) bylo přidáno 1,6 ml ethanolu a 8 ml ekvilibrovaného ethylacetátu. Roztoky byly inkubovány 24 hodin při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly vzorky neutralizovány roztokem amoniaku a byly stočeny centrifugou (15 min, 13000 \times g, 22 $^{\circ}$ C) a odpařeny. Vzorky byly rozpuštěny v 1 ml fosfátového pufru a byla provedena extrakce na pevnou fázi, kdy na kolonku byly pipetovány následující roztoky: 1 ml 100% methanolu, 1 ml fyziologického roztoku, celý objem vzorku, 1 ml 5% methanolu a 1 ml 20% methanolu. Dále byla kolonka vysušena a frakce byla jímána 1 ml 100% methanolu. Poté byly vzorky centrifugovány (15 min, 13000 \times g, 22 $^{\circ}$ C). Supernatanty odpařeny a dále změřeny na LC-MS/MS.

3.6. LC-MS/MS

K odpařeným vzorkům z hydrolýzy i solvolýzy (v případě kohorty bylo pipetováno 50 μ l vzorku) bylo přidáno 160 μ l acetonitrilu a 10 μ l směsi deuterovaných standardů žlučových kyselin a následně byly vzorky míchány na vortexu. Poté byly centrifugovány (15 min, 13000 \times g, 22 $^{\circ}$ C) a supernatant byl vysušen při 60 $^{\circ}$ C pod dusíkem. Dále bylo přidáno 50 μ l 40% methanolu a vzorky byly umístěny přes noc do mrazáku při -20 $^{\circ}$ C. Další den byly vzorky centrifugovány (15 min, 15000 \times g, 4 $^{\circ}$ C) a supernatant byl převeden do vialek.

Byla použita kolona Pinnacle DB C18 (100 \times 2,1 mm; 3 μ m) od firmy Restek s příslušnou ochrannou kolonou. Mobilní fázi tvořila voda, methanol, octan amonný a kyselina mravenčí, přičemž koncentrace kyseliny mravenčí byla 0,0012 % a octanu amonného 0,005 mol/l (v/v). Průtok byl nastaven na 0,3 ml/min; teplota kolony byla 55 $^{\circ}$ C a objem nástřiku byl 10 μ l. Na obrázku 5 je znázorněn příslušný gradientový program. Poté byla kolona promývána 95% methanolem (s přítomností octanu amonného a kyseliny mravenčí) po dobu 9 minut a ekvilibrována 40% methanolem (s přítomností

octanu amonného a kyseliny mravenčí) po dobu 5 minut. Hmotnostní detekce proběhla v režimu SRM a sledované přechody byly následující: 375,3 → 375,3 pro monohydroxy žlučové kyseliny, 391,3 → 391,3 pro dihydroxy žlučové kyseliny a 407,3 → 407,3 pro trihydroxy žlučové kyseliny. Přechody 432,3 → 432,3 (432,3 → 74,1), 448,3 → 448,3 (448,3 → 74,1) a 464,3 → 464,3 (464,3 → 74,1) byly sledovány pro glycinem konjugované monohydroxy, dihydroxy a trihydroxy žlučové kyseliny. A pro taurinové konjugáty mono-, di- a trihydroxy žlučových kyselin byly sledovány přechody 482,3 → 482,3 (482,3 → 124,1), 498,3 → 498,3 (498,3 → 124,1), resp. 514,3 → 514,3 (514,3 → 124,1). Všechny přechody byly sledovány od 1 do 18 minut.



Obrázek 5: Zvolený gradientový program

3.7. Stanovení bilirubinu

Bilirubin byl stanoven vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí. K zásobnímu roztoku mesobilirubinu o objemu 10 µl bylo přidáno 990 µl methanolu s antioxidanty. Ke každému vzorku BALu o objemu 100 µl bylo přidáno 10 µl bilirubinu a 900 µl methanolu s antioxidanty. Vzorky byly zamíchány na vortexu a poté centrifugovány (20 min, 16000 × g, 5 °C). Dále byly připraveny kalibrační roztoky, které obsahovaly 10 µl mesobilirubinu, 50 µl biologické matrice

(obsahovala fyziologický roztok a sliny řešitelky této diplomové práce), 950 μ l methanolu s antioxidanty a bilirubin o objemu 0; 2; 4; 6; 8 nebo 10 μ l.

K analýze byla použita kolona Poroshell 120 EC-C18 (3,0 \times 100 mm; 2,7 μ m) od firmy Agilent s průtokem 0,3 ml/min a výhřevem na 50 °C. Mobilní fáze obsahovala acetonitril, methanol a vodu (40/40/20 v/v/v) s přidavkem 0,1% kyseliny octové (A) a druhá fáze obsahovala acetonitril, methanol a vodu (45/45/10 v/v/v) s přidavkem 0,1% kyseliny octové (B). Obsah mobilní fáze začínal na 100 % složky A, poté kontinuálně přešel na 100 % složky B, které byla udržována po dobu 19 minut. Dále opět kontinuálně převod na 100 % složky A. Promývací perioda trvala 11 minut. Do detektoru byl veden vzorek z HPLC v rozmezí 5 až 45 minut. Hmotnostní detekce proběhla v režimu SRM. Parametry pro hmotnostní spektrometrii byly: napětí spreje + 3200 V; teplota odpařovače 350 °C; plášťový plyn 40 arbitrárních jednotek (au); teplota kapiláry 320 °C; průtok pomocným ventilem 15 au a tlak kolizního plynu byl nastaven na 0,2 Pa. Byly sledované přechody pro bilirubin [585,3 \rightarrow 299,1 (20 V); 585,3 \rightarrow 271,2 (18 V)] a mesobilirubin [589,3 \rightarrow 301,1 (20 V); 589,3 \rightarrow 273,2 (44 V)]. Napětí na čočce bylo nastaveno na 83 V pro bilirubin a 85 V pro mesobilirubin.

3.8. ELISA pepsinogenu

Pro stanovení pepsinogenu II byl použit Human Pepsinogen II PGC ELISA kit od společnosti Thermo Fisher Scientific a pro stanovení pepsinogenu I byl použit Human Pepsinogen I (PGI) ELISA kit od téže společnosti. Všechny použité reagenty a roztoky byly připraveny podle návodu, kromě roztoků vzorků, které byly připraveny smícháním 5 μ l vzorku s 200 μ l ředěného roztoku assay diluent. Všechny vzorky kohorty pacientů i kalibrační křivka byla měřena 2x.

Postup samotné metody byl následující. Na příslušnou mikrotitrační destičku bylo pipetováno 100 μ l roztoku standardu nebo vzorku a za jemného míchání byla destička inkubována 2,5 hodiny při pokojové teplotě. Po uplynutí inkubace byly všechny jamky 3x promyty pomocí promývacího roztoku. Dále bylo přidáno 100 μ l roztoku konjugátu biotinu a inkubace při pokojové teplotě probíhala 1 hodinu. Poté byla destička promyta stejným způsobem a bylo přidáno 100 μ l roztoku streptavidinu-HRP. Inkubace při pokojové teplotě trvala 45 minut a poté byly jamky opět promyty. Následně bylo

přidáno 100 μ l substrátu TMB a inkubace probíhala 30 minut ve tmě. Po uplynutí této doby bylo přidáno 50 μ l stop roztoku a byla měřena absorbance při 450 nm.

3.9. Měření pH a absorbance

Bylo měřeno pH vzorků kohorty skleněnou elektrodou. Hodnoty byly zaznamenávány a později byly jedním z parametrů korelací. Byla měřena i absorbance v maximu hemoglobinu (540 nm) pro zjištění přítomnosti krve ve vzorcích bronchoalveolární laváže.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Markery gastroezofageálního refluxu

Jak již bylo v teoretické části zmíněno, existuje několik markerů, které mohou pomoci při diagnostice gastroezofageálního refluxu, který je rizikovým faktorem chronické plicní aloštěpové dysfunkce, která je největší hrozbou pro pacienty po transplantaci plic. Byly zkoumány čtyři markery – bilirubin, pepsinogen II, pH a žlučové kyseliny na kohortě pacientů, která obsahovala 35 vzorků bronchoalveolární laváže různých pacientů po transplantaci plic. Všechny tyto markery byly zkoumány za účelem zjištění, který z nich se může jevit jako nejspolehlivější pro včasnou diagnostiku gastroezofageálního refluxu. Markery byly následně porovnávány s klinickými údaji dodanými Fakultní nemocnicí v Motole (tabulka 3 a 4).

Klinické údaje reflektují škálu syndromu bronchiolitidy obliterans (neboli obstrukční chronické plicní aloštěpové dysfunkce), která se používá k hodnocení a klasifikaci postupného zhoršení funkce plic po transplantaci. Škála je definována jako procentuální pokles nuceného expiračního objemu za 1 sekundu (z anglického „forced expiratory volume in 1 second“, FEV1). Jde o měření objemu vzduchu, který je schopen pacient vydechnout za první sekundu expirace během spirometrického testu. FEV1 je důležitý parametr pro hodnocení funkce plic a je často používán k diagnostice a sledování různých plicních onemocnění, včetně syndromu bronchiolitidy obliterans (z anglického Bronchiolitis obliterans syndrome, BOS) u pacientů po transplantaci plic⁶⁸. Na základě této škály se jednotlivá stádia BOS definují takto:

Stádium 0 – stabilní po transplantační hodnota FEV1

Stádium 1 – pokles FEV1 o více než 20 % od základní hodnoty

Stádium 2 – pokles FEV1 o více než 30 % od základní hodnoty

Stádium 3 – pokles FEV1 o více než 50 % od základní hodnoty

Základní hodnota FEV1 je definována jako průměr dvou nejvyšších měření získaných nejméně tři týdny od sebe⁶⁹.

4.1.1. *Potenciální markery gastroezofageálního refluxu*

Bilirubin byl stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. Celková průměrná koncentrace byla 4,82 µg/l; medián 2,20 µg/l a rozptyl 44,87 (µg/l)². U tohoto analytu nebyla pozorována významná korelace mezi klinickými údaji a koncentrací bilirubinu. Korelační koeficient měl hodnotu 0,1143 a P-hodnota byla 0,5131. Naopak byla pozorována významná korelace mezi koncentracemi bilirubinu a pepsinogenu II (P = 0,0085) a také mezi koncentrací bilirubinu a pH (P = 0,0244).

Metodou ELISA byl měřen pepsinogen II. Celková průměrná koncentrace pepsinogenu II byla stanovena na 135,52 µg/ml, medián na 66,35 µg/ml a rozptyl na 33747,71 (µg/ml)². Zde také nebyla pozorována významná korelace mezi klinickými údaji a koncentrací pepsinogenu II. Korelační faktor měl hodnotu 0,1305 a P-hodnota byla 0,4551. Jak již bylo zmíněno výše, byla pozorována významná korelace mezi koncentracemi pepsinogenu II a bilirubinu (P = 0,0085). Dále byla pozorována významná korelace mezi koncentracemi pepsinogenu II a žlučovými kyselinami (P = 0,0009).

Měření pH bylo provedeno skleněnou elektrodou s průměrnou hodnotou 5,71; mediánem 5,54 a rozptylem 0,3110. Minimální hodnota byla 4,81 a maximální 6,98. Zde byla pozorována významná korelace mezi klinickými údaji a pH (P = 0,0072). Také byla pozorována již zmíněná významná korelace mezi koncentrací bilirubinu a pH (P = 0,0244).

Poslední analyt, který byl zahrnut do korelačních analýz, byly celkové žlučové kyseliny stanovené enzymatickým kitem od společnosti Trinity Biotech. Celková průměrná koncentrace byla 21,6 µmol/l; medián 13 µmol/l a rozptyl 434 (µmol/l)². Z hlediska procentuální stránky 31,4 % pacientů mělo koncentraci celkových žlučových kyselin pod 7,99 µmol/l, 31,4 % v rozmezí 8,0 až 19,99 µmol/l a 37,1 % nad 20,0 µmol/l. Dále byly statisticky vyhodnocovány absorbance slepých vzorků. V případě slepého vzorku byla pipetována deionizovaná voda místo reagentu B. Průměrná absorbance byla stanovena na 0,0656 ± 0,0103 s relativní směrodatnou odchylkou 15,7 %. Také zde byla pozorována významná korelace (P = 0,0021) mezi klinickými údaji a koncentrací celkových žlučových kyselin (obrázek 6). Další významná korelace (P = 0,0009) byla pozorována mezi již zmíněnou koncentrací žlučových kyselin a pepsinogenu II.

Tabulka 3: Naměřené hodnoty jednotlivých měření a základní statistické parametry

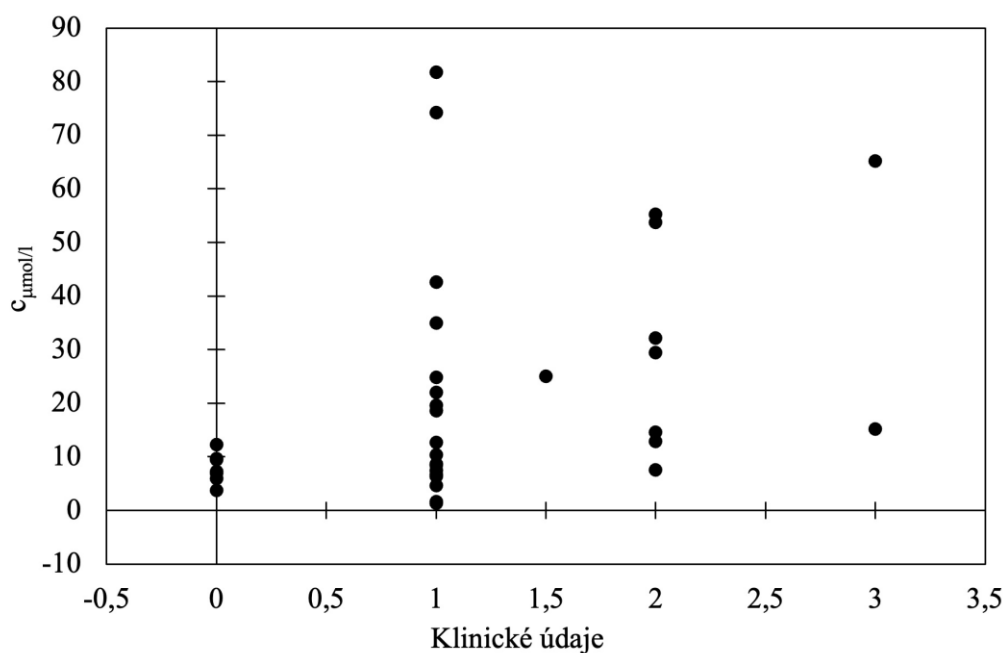
Číslo vzorku	FEV1	pH	Žlučové kyseliny $\mu\text{mol/l}$	Pepsinogen II $\mu\text{g/ml}$	Bilirubin $\mu\text{g/l}$
1	2,0	5,64	8	66,35	2,10
2	1,0	4,89	20	58,52	1,10
3	1,0	5,27	19	135,49	14,70
4	1,0	5,26	22	1038,26	2,70
5	2,0	6,76	54	65,23	1,40
6	2,0	6,49	13	232,39	8,00
7	1,0	6,14	10	97,06	3,60
8	1,0	5,85	35	60,81	0,40
9	1,0	5,51	9	50,38	4,60
10	2,0	6,89	55	55,22	1,30
11	1,0	6,62	13	121,82	12,40
12	2,0	6,41	32	57,65	6,60
13	2,0	6,07	30	72,75	4,20
14	0,0	5,31	7	113,14	1,20
15	2,0	5,58	15	77,57	1,50
16	0,0	5,06	10	56,59	0,70
17	1,0	6,19	9	78,04	3,00
18	0,0	5,63	12	304,94	16,60
19	1,0	5,22	74	506,56	3,50
20	1,0	5,94	25	209,98	5,20
21	3,0	5,35	65	127,89	2,70
22	1,0	5,46	82	358,56	2,80
23	1,5	6,33	25	102,60	30,50
24	3,0	5,95	15	52,06	0,80
25	1,0	5,34	42	67,55	1,40
26	0,0	5,85	10	62,43	0,40
27	0,0	4,81	6	45,82	1,20
28	1,0	5,30	8	52,50	0,80
29	1,0	5,54	2	51,94	0,40
30	1,0	5,34	6	56,36	1,90
31	1,0	5,03	7	94,99	0,90
32	1,0	5,53	5	54,46	2,50
33	0,0	6,75	7	48,11	23,20
34	1,0	5,37	1	54,85	2,20
35	0,0	5,20	4	54,49	2,10
\bar{x}		5,71	21,6	135,52	4,82
\tilde{x}		5,54	13	66,35	2,20
σ^2		0,3110	434	33747,71	44,87

\bar{x} – průměr; \tilde{x} – medián; σ^2 – rozptyl

Tabulka 4: Porovnání korelačních parametrů mezi jednotlivými analýzami

Analýza	Klinické údaje	pH	Žlučové kyseliny	Pepsinogen II	Bilirubin
Bilirubin	r = 0,1143 P = 0,5131	r = 0,3798 P = 0,0244	r = 0,2025 P = 0,2433	r = 0,4380 P = 0,0085	×
Pepsinogen II	r = 0,1305 P = 0,4551	r = 0,0245 P = 0,8888	r = 0,5361 P = 0,0009	×	
Žlučové kyseliny	r = 0,5031 P = 0,0021	r = 0,2663 P = 0,1216	×		
pH	r = 0,4461 P = 0,0072	×			
Klinické údaje	×				

r – korelační koeficient; *P* – hladina významnosti; Označené analýzy jsou ty, které mají mezi sebou významné korelace ($P < 0,05$). Výsledky nebyly korigovány na mnohočetné pozorování.



Obrázek 6: Bodový graf znázorňující korelaci mezi klinickými údaji a koncentrací celkových žlučových kyselin z enzymatického kitu.

Významné korelace se žlučovými kyselinami se v literatuře objevují s bilirubinem nebo pepsinogenem, případně pepsinem^{5,6,7}.

Skupina pod vedením C. S. Davise se zaměřila na identifikaci rizikových faktorů pro gastroezofageální refluxní chorobu. Předpokládali, že pacienti s idiopatickou plicní fibrózou (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) mají po transplantaci plic větší riziko obliterativní bronchiolitidy a aspirace obsahu žaludku. Měřili koncentraci pepsinu v bronchoalveolární laváži u skupiny pacientů po transplantaci plic a výsledky korelovali s vyhodnocením funkčního vyšetření jícnu, polykáním barya a vyprazdňováním žaludku, aby identifikovali rizikové faktory GERD. Koncentraci pepsinu měřili enzymatickým imunisorbčním testem, který byl vyvinut v jejich laboratoři s použitím monospecifické protilátky proti prasečímu pepsinu. Zjistili, že pacienti s IPF měli nejvyšší koncentrace pepsinu, ale neměli významně vyšší výskyt obliterativní bronchiolitidy při porovnání s jinými indikacemi po transplantaci plic. To znamená, že pepsin slouží spíše jako citlivý marker aspirace⁷. Toto bylo také podpořeno ve studii Blondeaua a kolegů, kteří zjistili, že přítomnost pepsinu a žlučových kyselin v BALu poskytují odlišné informace. Pepsin je obecným markerem aspirace žaludečního obsahu. Žlučové kyseliny jsou naopak specifičtější markerem, což může mít specifický vztah k patofyziologii obliterativní bronchiolitidy vyvolané aspirací⁶.

Detekci žlučových kyselin a bilirubinu se zabývala studie, jejíž hlavní autor je De Corso E. Měřili hladinu žlučových kyselin a bilirubinu ve slinách pacientů, kteří podstoupili žaludeční operaci. Jako marker žaludečního refluxu použily pepsinogen II. Žlučové kyseliny byly měřeny enzymatickým kolorimetrickým testem (Kit bile acid) od firmy Olympus pro stanovení celkových žlučových kyselin v lidském séru. Bilirubin byl měřen také kolorimetrickým testem (Total Bilirubin Kit) od firmy Olympus a koncentrace pepsinogenu II byla měřena enzymově vázaným imunisorbčním testem (EDITM Human Pepsinogen II ELISA kit). Pepsinogen II byl měřitelný ve všech pozitivních vzorcích žlučových kyselin s průměrnou koncentrací 1,3 ng/ml. Byla zaznamenána významná korelace mezi žlučovými kyselinami a pepsinogenem II ($P < 0,05$). Průměrná hodnota celkového bilirubinu ve slinách pacientů se žlučovým refluxem byla 0,17 mg/dl. Byl také zaznamenán významný korelační vztah ($P < 0,05$) mezi hladinou žlučových kyselin a celkového bilirubinu⁵. Avšak v této práci mezi těmito analyty nebyly významné korelace pozorovány.

Významná korelace mezi žlučovými kyselinami a klinickými údaji naměřená v této práci podporuje domněnku, že by žlučové kyseliny mohly být potenciálním markerem gastroezofageálního refluxu.

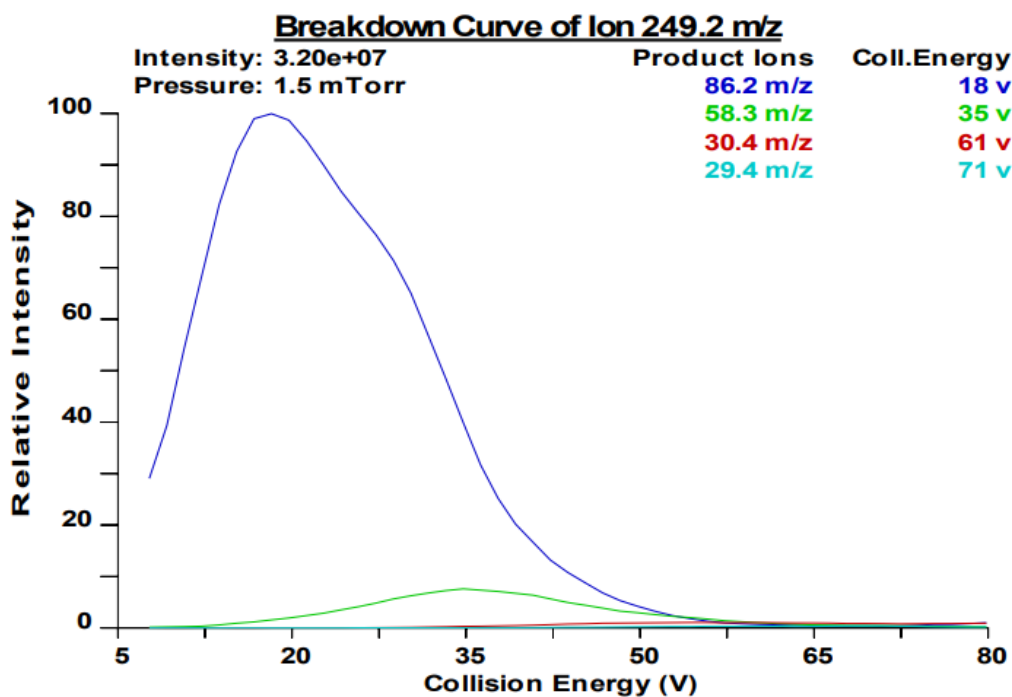
Ve studii, jejíž autorem je Zhang, C. a kolektiv⁹, předpokládali, že GERD odráží přítomnost žlučových kyselin v bronchoalveolární laváži tím, že vytváří protizánětlivé a škodlivé mikroprostředí v plicním aloštěpu. Vycházeli z předpokladu několika studií, které identifikovaly žlučové kyseliny jako potenciální marker GERD. Jedna ze studií došla k závěru, že žlučové kyseliny v BAL mají 67% senzitivitu a 80% specifitu pro gastroezofageální reflux, který měřili pH sondou⁷⁰. Pro ověření těchto předpokladů zjišťovali, zda jsou zvýšené žlučové kyseliny objektivním průkazem gastroezofageální refluxní choroby a zda tento problém vyřeší antirefluxní operace. Zjistili, že tři měsíce po transplantaci měli pacienti s GERD vyšší hladinu TCA. Dále bylo zjištěno, že hladiny TCA a GCA v bronchoalveolární laváži korelovaly se zánětlivými proteiny (IL-1 β , IL-12p70 a CCL5) během prvního roku po transplantaci. Zánětlivé proteiny a TCA byly také významně sníženy fundoplikací Nissen (antirefluxní operací). Taurocholová kyselina byla tedy spojena s GERD, zánětem plic a chirurgickou korekcí refluxu. Její hladiny v kombinaci s vybranými zánětlivými markery mohou poskytnout informace k objektivnímu důkazu gastroezofageálního refluxu a identifikaci těch, kteří mohou mít prospěch z včasné antirefluxní operace s cílem snížit mikroaspiraci žaludku a zánět aloštěpu⁹.

Její navazující studie⁷¹ se zabývala porovnáním bronchoalveolární laváže a výplachu velkých dýchacích cest (z angl. Large airway bronchial wash, LABW). Ve dřívějších studiích se LABW s BAL porovnávali pouze u několika onemocnění (např. u tuberkulózy, lymfangitní karcinomatózy nebo periferního karcinomu plic). Výsledkem bylo zjištění, že BAL má vyšší senzitivitu než LABW. Naopak LABW může být lepší matricí pro detekci plicní mikroaspirace způsobené gastroezofageální refluxní chorobou, než je BAL. Došli k závěru, že žlučové kyseliny (konkrétně TCA a GCA) jsou v LABW zastoupeny ve vyšších koncentracích než v BAL. Dále také zjistili, že vzorky žlučových kyselin a zánětlivých proteinů u LABW spolu vzájemně korelují, stejně tak korelují i u vzorků BAL z předchozí studie⁹. Také zjistili vzájemnou korelaci u TCA a GCA z LABW se zánětlivými proteiny z BAL (konkrétně se jednalo o IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-

8, CCL2 a CCL5). Naopak TCA a GCA z BAL korelovala jen s CCL2 a CCL5 z LABW. Než se však začne místo bronchoalveolární laváže používat výplach velkých dýchacích cest musí se tyto hypotézy nejprve potvrdit dalšími rozsáhlejšími studii ⁷¹.

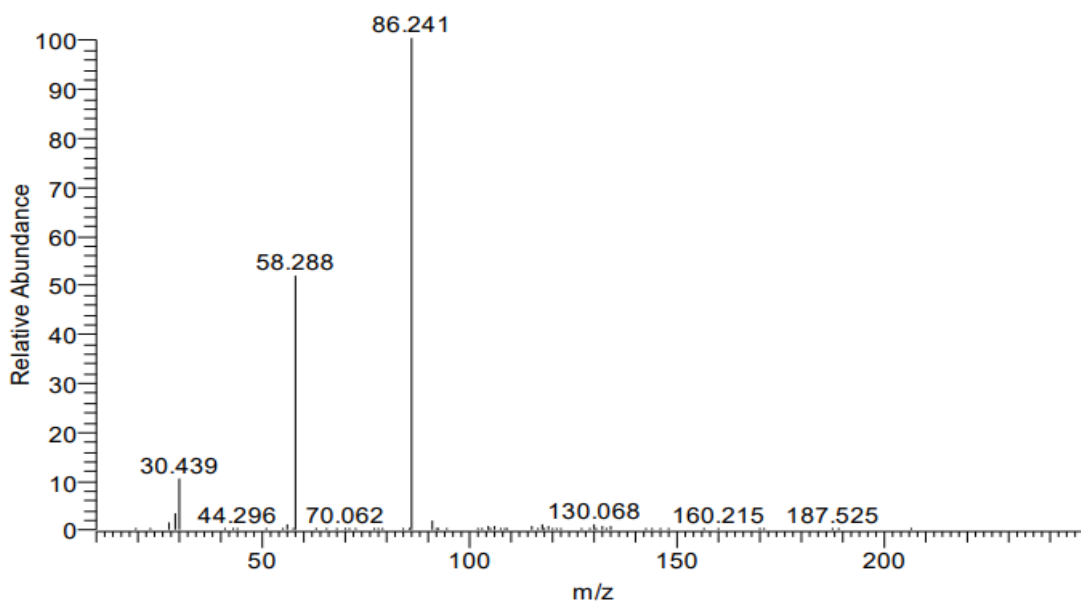
Pro zvýšení citlivosti výsledků, které byly naměřeny enzymatickým testem, byla kohorta měřena i na LC-MS/MS, a to následující žlučové kyseliny: kyselina lithocholová, murideoxycholová, ursodeoxycholová, hyodeoxycholová, chenodeoxycholová, deoxycholová, α -muricholová, β -muricholová, ω -muricholová, cholová, allocholová, glykolithocholová, obeticholová, glykoursodeoxycholová, glykochenodeoxycholová, glykodeoxycholová, glykocholová, taoursodeoxycholová, taurochenodeoxycholová, taurodeoxycholová a tauro- β -muricholová. Součet výše zmíněných koncentrací jednotlivých kyselin měl průměrnou hodnotu 0,04 $\mu\text{mol/l}$, medián také 0,04 $\mu\text{mol/l}$, minimální hodnotu 0,00 $\mu\text{mol/l}$ a maximální hodnotu 0,15 $\mu\text{mol/l}$. Je tedy zřejmé, že koncentrace měřené na LC-MS/MS neodpovídají koncentracím naměřených enzymatickým kitem. V dalších krocích byly zjišťovány důvody, proč tomu tak je.

Bylo předpokládáno, že důvodem může být žlučová kyselina nebo její derivát, který nepatří mezi měřené žlučové kyseliny na LC-MS/MS, protože enzymatickým testem jsou měřeny všechny steroidy, které ve své struktuře mají 3α -hydroxyskupinu. Byl vytvořen směsný BAL smícháním bronchoalveolární laváže šesti různých pacientů, kteří byli enzymatickou analýzou označeny za pozitivní. Dále byl směsný BAL charakterizován na LC-MS/MS pro zjištění m/z majoritní složky nebo složek ve vzorku. Byly nalezeny 3 mateřské ionty (249,2; 500,6 a 502,6), přičemž první a druhý sledovaný ion byly měřeny v pozitivním módu a třetí v negativním módu. Parametry nalezené u mateřského iontu 249,2 m/z jsou uvedeny na obrázku 7 a 8. U mateřského iontu 500,6 m/z v pozitivním režimu byl nalezen produktový ion 269,6 m/z s kolizní energií 16 V. A u mateřského iontu 502,6 m/z byla v negativním módu nalezen produktový ion 269,8 m/z s kolizní energií 17 V. Nalezené hodnoty produktových iontů byly využity při hledání analytu v on-line databázích sloučenin, ale toto hledání nepřineslo žádný výsledek.



Obrázek 7: Křivka rozpadu iontu 249,2 m/z.

S#: 3949 FULL: PRO: 249 CT: 0.59 #A: 9 3.02e6



Obrázek 8: Fragmentační spektrum iontu 249,2 m/z.

4.2. Hydrolýza a solvolýza

Při hledání analytu, který způsobuje rozdíl mezi hodnotami naměřenými enzymatickým kitem a LC-MS/MS, byla provedena na směsném BALu hydrolýza a solvolýza. Pokud by byl hledaný analyt konjugát nebo sulfát žlučové kyseliny, kterou jsme měřili na LC-MS/MS, tak by to proces hydrolýzy nebo solvolýzy odhalil.

Ještě před samotným procesem hydrolýzy a solvolýzy byl směsný BAL měřen na LC-MS/MS a součet všech měřených žlučových kyselin byl 0,07 $\mu\text{mol/l}$. Konkrétně se jednalo o 0,01 $\mu\text{mol/l}$ kyseliny lithocholové, 0,02 $\mu\text{mol/l}$ kyseliny chenodeoxycholové, 0,03 $\mu\text{mol/l}$ kyseliny deoxycholové a 0,01 $\mu\text{mol/l}$ kyseliny cholové. Pro porovnání byla provedena i enzymatická analýza celkových žlučových kyselin s průměrnou hodnotou 10,20 $\mu\text{mol/l}$ (SD \pm 1,66 $\mu\text{mol/l}$; RSD = 16,25 %).

Provedení hydrolýzy bylo nejprve podrobena optimalizaci podmínek.

Alkalickou hydrolýzu žlučových kyselin provedl v roce 1978 W. T. Beher s kolegy. Hydrolýzu provedli hydroxidem sodným o koncentraci 2 mol/l s inkubací při 122 °C po dobu tří hodin. Po uplynutí této doby hydrolýzu zastavili kyselinou chlorovodíkovou. Došli k závěru, že při procesu hydrolýzy došlo k minimální degradaci mono- i dihydroxy žlučových kyselin. Degradace trihydroxy žlučových kyselin proběhla asi jen z 10 %. Největšímu podílu degradace podlehly volné a konjugované 3-oxo-5 β -cholan-24-oové kyseliny⁷².

V této diplomové práci byla vždy měřena skupina vzorků: směsný BAL (a jeho pozitivní kontrola) a bovinní sérum (a jeho pozitivní kontrola). Do skleněné zkumavky bylo pipetováno 50 μl směsného BALu nebo séra (v případě pozitivních kontrol byl k 50 μl analytu přidán 1 μl GDCA, celková koncentrace roztoku byla 32 $\mu\text{mol/l}$). Vzorek byl odpařen, rozpuštěn v 2,5 ml 10% KOH a inkubován 99 minut při teplotě 140 °C. Po samovolném ochlazení na laboratorní teplotu byly vzorky okyseleny kyselinou chlorovodíkovou na pH \approx 1. Dále byla přidána směs methanol:chloroform (2:1 v/v) o celkovém objemu 12,5 ml. Vzorek byl zamíchán na vortexu a po rozdělení fází byla do zkumavek odebrána horní fáze, která byla centrifugována (15 min, 13000 \times g, 22 °C),

odpařena a poté měřena na LC-MS/MS. Výsledky tohoto měření ukázaly, že hydrolyza neproběhla v žádném vzorku.

Při dalším pokusu byly ke vzorkům pozitivní kontroly přidány 3 μl GDCA místo 1 μl . Ostatní parametry byly stejné jako u předchozího měření a výsledky ukázaly, že ve vzorcích BALu hydrolyza neproběhla a ve vzorcích se sérem proběhla, ale z celkové koncentrace 92,3 $\mu\text{mol/l}$ GDCA byla naměřena koncentrace 22,6 $\mu\text{mol/l}$ DCA a 9,1 $\mu\text{mol/l}$ GDCA.

Při opakování pokusu byl vzorek po prvotním odpaření rozpuštěn v 50 μl bovinního séra a následně zase odpařen. Dále byl postup totožný jako u předchozího měření. Po rozdělení fází byla na všech provedena SPE, která probíhala následovně: na výše zmíněnou kolonu byl postupně pipetován 1 ml 100% methanolu, 1 ml fyziologického roztoku, vzorek, 1 ml 5% methanolu a 1 ml 20% methanolu. Dále byla kolonka vysušena a jímána frakce 100% methanolu o objemu 1 ml. Nakonec byly vzorky odpařeny a změřeny na LC-MS/MS. Výsledky ukázaly, že rozpuštění v bovinním séru před začátkem samotné hydrolyzy mělo pozitivní výsledek a hydrolyza proběhla. Při kvantitativním pozorování žlučových kyselin v rozdělených fázích bylo nejednoznačné, ve které fázi bylo větší množství. Místo směsi methanol:chloroform bylo použito 12,5 ml fosfátového pufru. V tomto procesu hydrolyza proběhla.

Optimalizace provedení proběhla i u solvolýzy. Opět byla všechna měření provedena na směsném BALu (a jeho pozitivní kontroly) i na bovinním séru (a jeho pozitivní kontroly). Ke 400 μl vzorku BALu (v případě pozitivní kontroly bylo přidáno 11 μl TLCA-S, celková koncentrace v roztoku byla 50 $\mu\text{mol/l}$) bylo přidáno 8 ml ekvilibrovaného ethyl acetátu. Roztoky byly inkubovány 24 hodin při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly vzorky neutralizovány roztokem amoniaku a byly stočeny centrifugou (15 min, 13000 \times g, 22 $^{\circ}\text{C}$). Supernatant byl poté vysušen při 60 $^{\circ}\text{C}$ a dále měřen na LC-MS/MS. Tímto způsobem solvolýza neproběhla.

Za solvolýzu byla zařazena extrakce na pevnou fázi stejně jako po hydrolyze. Po centrifugaci vzorků byly na kolonku pipetovány následující roztoky: 1 ml 100% methanolu, 1 ml fyziologického roztoku, celý objem vzorku, 1 ml 5% methanolu a 1 ml 20% methanolu. Dále byla kolonka vysušena a frakce byla jímána 1 ml 100% methanolu. Poté byly vzorky centrifugovány (15 min, 13000 \times g, 22 $^{\circ}\text{C}$) a supernatanty odpařeny.

Vzorky s bovinním sérem byly příliš zasolené, tudíž nešla provést extrakce na pevnou fázi. Na vzorcích směsného BALu solvolýza stále neproběhla.

Při dalším pokusu byla po neutralizaci amoniakem přidána centrifugace (15 min, $13000 \times g$, $22\text{ }^{\circ}\text{C}$) a odpaření supernatantu. Vzorky byly následně rozpuštěny v 1 ml fosfátového pufru. Dále byl postup totožný s předchozím pokusem. Tímto způsobem solvolýza proběhla z poloviny, což bylo pro další měření vyhodnoceno jako dostatečné.

Po optimalizaci provedení byla u směsného BALu provedena hydrolyza. Celková koncentrace všech měřených žlučových kyselin byla po provedení hydrolyzy $8,95\text{ }\mu\text{mol/l}$. Jelikož se při hydrolyze přidávalo do směsného BALu $50\text{ }\mu\text{l}$ bovinního séra, bylo měřeno i samotné bovinní sérum. Celková koncentrace žlučových kyselin v bovinním séru byla $4,61\text{ }\mu\text{mol/l}$ a tato koncentrace byla od celkové koncentrace žlučových kyselin v BALu odečtena. Součet koncentrací žlučových kyselin v směsném BALu po odečtení bovinního séra byl $4,34\text{ }\mu\text{mol/l}$. Konkrétní hodnoty naměřených žlučových kyselin jsou uvedeny v tabulce 5. Výraznější nárůst koncentrace žlučových kyselin po hydrolyze je vidět u chenodeoxycholové kyseliny. To může znamenat přítomnost nějakého jiného konjugátu, který se standardně na LC-MS/MS neměří.

Jak bylo uvedeno výše, ve studii pod vedením C. Zhanga ⁹ zjistili, že pacienti měli tři měsíce po transplantaci plic vyšší hladinu TCA, což se liší od výsledků naměřených v této práci. Koncentrace kyseliny taurocholové byla ve vzorku směsného BALu po hydrolyze $0,02\text{ }\mu\text{mol/l}$. Také zjistili korelaci mezi TCA a GCA se zánětlivými proteiny, ty ale nebyly předmětem této práce, takže nelze tyto výsledky porovnat.

Na LC-MS/MS byly následně na směsném BALu měřeny konjugáty aminokyselin kyseliny chenodeoxycholové. Výsledné retenční časy a plochy píků jsou uvedeny v tabulce 6. Největší plochu píku měla kyselina s konjugovaným prolinem (402070). Dále měly výrazný pík konjugáty s lysinem, glutaminem, izoleucinem a alaninem. Pro zjištění koncentrace daných konjugátů bude potřeba vyrobit standardy. To by mohl být další krok výzkumu této problematiky. Touto problematikou se jako první věnoval Quinn a jeho kolegové a také popsal výrobu jednotlivých standardů ⁷³.

Aminokyselinami konjugované žlučové kyseliny se objevili v relativně nové studii pod vedením Y. Ma a kolektivu. Zaměřili se na vytvoření nového nástroje pro komplexní

popis aminokyselinových konjugátů se žlučovými kyselinami, protože nedávno bylo zjištěno, že lidský mikrobiom konjuguje žlučové kyseliny i s dalšími žlučovými kyselinami než jen s glycinem a taurinem. Vytvořili semi-empirickou MS/MS knihovnu pro žlučové kyseliny konjugované s 18 běžnými aminokyselinami. Tyto aminokyseliny byly chemicky konjugovány s kyselinou lithocholovou, deoxycholovou a cholovou. Vytvořili poloempirickou MS/MS knihovnu s obsahem 180 různých struktur. Pro důkaz svého konceptu analyzovali lidské, psí a potkaní fekálie a popsali celkem 171 žlučových kyselin konjugovaných s aminokyselinami. Z toho počtu jich celkem 105 validovali na základě retenčních časů se syntetizovanými sloučeninami ⁷⁴.

Tato knihovna by mohla být dobrým nástrojem i pro nalezení neznámého analytu způsobující disproporci mezi koncentracemi měřenými enzymatickým testem a kapalinovou chromatografií. Bohužel byla tato studie uveřejněna až při sepisování této práce. Nicméně by to mohl být slibný další krok k výzkumu spolehlivého diagnostického markeru gastroezofageálního refluxu.

Po optimalizaci podmínek provedení byla na směsném BALu provedena i solvolýza. Celková koncentrace všech měřených žlučových kyselin byla 1,51 $\mu\text{mol/l}$. Při tomto provedení nebylo přidáváno bovinní sérum, tudíž nebylo ani odečítáno, jako v případě hydrolyzy. Konkrétní naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5. V tabulce je vidět, že u kyselin TLCA-S a GCDCA-3S byla detekována malá koncentrace, což ukazuje, že solvolýza zde neproběhla ze 100 %. Také zde nebyl zaznamenán žádný výraznější nárůst koncentrace jednotlivých žlučových kyselin, tudíž lze říci, že ve vzorku směsného BALu není sulfatovaná žádná kyselina, kterou umíme měřit.

Tabulka 5 – Naměřené koncentrace jednotlivých žlučových kyselin

Žlučová kyselina	Směsný BAL po hydrolyze (μmol/l)	Bovinní sérum po hydrolyze (μmol/l)	Odečet BAL – bovinní sérum (μmol/l)	Směsný BAL po solvolýze (μmol/l)
LCA	0,88	0,27	0,61	1,02
MDCA	0,02	0	0,02	0,01
UDCA	0,01	0,01	0	0
HDCA	0,03	0	0,03	0
CDCA	4,31	2,76	1,55	0,05
DCA	1,44	0,62	0,82	0,05
α-MCA	0	0	0	0
β-MCA	0	0	0	0
ω-MCA	0	0	0	0
HCA	0	0	0	0
CA	0	0	0	0
AlloCA	0	0	0	0
GLCA	0,01	0,01	0	0,03
OCA	0	0	0	0
GUDCA	0,06	0,02	0,04	0,04
GCDCA	0,48	0,3	0,18	0,05
GDCA	0,08	0,03	0,05	0,02
GCA	0,07	0,04	0,03	0,1
TUDCA	0,11	0,02	0,09	0
TCDC	0,32	0,1	0,22	0,02
TDCA	0,12	0	0,12	0
Tβ-MCA	0,03	0	0,03	0
TCA	0,05	0,03	0,02	0,01
TLCA-S	0,36	0,14	0,22	0,09
GCDCA-3S	0,57	0,26	0,31	0,02

Tabulka 6 – Naměřené retenční časy a plochy píků jednotlivých konjugátů aminokyselin kyseliny chenodeoxycholové

Aminokyselina	Produktový ion (m/z)	Retenční čas (min)	Plocha píku
Gly	466,3	11,11	1962
Ala	480,30	13,28	129858
Val	508,3	10,31	5575
Ile	522,30	7,97	193951
Asp	524,30	7,96	14378
Asn	524,30	7,96	14378
Glu	538,30	8,37	99045
Gln	537,30	8,37	304392
Arg	565,30	11,13	2820
Lys	537,30	8,37	304392
His	546,30	13,31	1247
Phe	556,30	8,4	2463
Ser	496,30	13,27	26286
Thr	510,30	11,11	7131
Tyr	572,30	10,3	50024
Trp	595,30	10,33	927
Met	540,30	8,4	4809
Cys	512,30	10,13	999
Pro	506,30	10,27	402070
SeCys	559,30	2,17	1874

4.3. Extrakce na pevnou fázi

Extrakce na pevnou fázi byla do měření směsného BALu zařazena pro zjištění, v kolika procentním methanolu se dá očekávat výskyt neznámého analytu při měření vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí. Byly provedeny 2 sady testů. Jedna byla po lyofilizaci rozpuštěna ve fyziologickém roztoku, druhá v bovinním séru.

Koncentrace žlučových kyselin v jednotlivých frakcích methanolu byla měřena v dubletech, koncentrace ve fyziologickém roztoku a v séru také. Průměrná koncentrace celkových žlučových kyselin ve fyziologickém roztoku je 5,00 $\mu\text{mol/l}$, v bovinním séru 14,00 $\mu\text{mol/l}$. Průměrné koncentrace celkových žlučových kyselin ve směsném BALu byly následně odečteny od průměrných koncentrací celkových žlučových kyselin naměřených ve fyziologickém roztoku nebo bovinním séru a vyjádřeny v procentech. Vypočtené průměrné koncentrace a procentuální zastoupení koncentrace celkových žlučových kyselin v jednotlivých frakcích jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7 – průměrné koncentrace celkových žlučových kyselin, fyziologického roztoku a bovinního séra v jednotlivých frakcích methanolu

Rozpouštědlo po lyofilizaci: Fyziologický roztok			Rozpouštědlo po lyofilizaci: Bovinní sérum		
Frakce methanolu (%)	Koncentrace BALu ($\mu\text{mol/l}$)	Procentuální zastoupení (%)	Frakce methanolu (%)	Koncentrace BALu ($\mu\text{mol/l}$)	Procentuální zastoupení (%)
20	9,14	21,5	20	7,28	20,2
40	9,21	21,7	40	8,98	24,9
60	9,43	22,2	60	6,38	17,7
80	6,79	16,0	80	7,63	21,1
100	7,86	18,5	100	5,85	16,2

Koncentrace celkových žlučových kyselin v BALu je uvedena po odečtu od koncentrace celkových žlučových kyselin ve fyziologickém roztoku nebo v bovinním séru.

Z výsledků je patrné, že v žádné frakci není výrazné procentuální zastoupení celkových žlučových kyselin. Může to být způsobeno přítomností různých látek (steroidních hormonů, cholesterolu, a dalších) obsahujících 3 α -hydroxyskupinu.

4.4. Měření absorbance žlučových kyselin

Na kohortě pacientů byla mimo jiné měřena i absorbance v maximu hemoglobinu při 540 nm pro zjištění, zda bronchoalveolární laváž různých pacientů neobsahuje krev. Na všech 35 vzorcích byla naměřena hodnota absorbance 0,0000, což vyloučilo přítomnost krve ve vzorcích. V případě, že by se ve vzorcích bronchoalveolární laváže vyskytovala krev, mohlo by dojít k falešné pozitivitě, protože krev obsahuje žlučové kyseliny.

5. Závěr

Bylo provedeno měření a následné korelační hodnocení čtyř markerů gastroezofageálního refluxu s klinickými údaji dodanými Fakultní nemocnicí v Motole. S klinickými údaji významně korelovalo pH a koncentrace žlučových kyselin měřených enzymatickým testem. Dále byly provedeny korelační analýzy vzájemně mezi ostatními markery a byla zjištěna významná korelace mezi pH a bilirubinem, pepsinogenem II a žlučovými kyselinami a mezi bilirubinem a pepsinogenem.

Dále byly nalezeny 3 mateřské a jejich produktové ionty, které by mohly odpovídat disproporci v koncentracích žlučových kyselin měřenou enzymatickým testem a kapalinovou chromatografií. O jaké molekuly se jedná by mělo být předmětem dalšího výzkumu. Dvě z nich však mají příliš malou molekulovou hmotnost na to, aby se mohlo jednat o žlučovou kyselinu, a navíc se objevují v pozitivním módu.

Na vzorcích směsného BALu byla provedena hydrolýza a solvolýza za účelem zjištění, zda je neznámý analyt konjugován nebo sulfatován. Výsledky hydrolýzy poukazují na to, že hledaný analyt by mohl být konjugován jinou aminokyselinou, kterou běžně neměříme kapalinovou chromatografií. Byly tedy měřeny aminokyselinové konjugáty kyseliny chenodeoxycholové. Pro zjištění, zda je hledaný analyt konjugát s jinou aminokyselinou než s glycinem a taurinem, je ovšem potřeba další výzkum.

6. Seznam použité literatury

1. Zhang, C. Y, K., M., Huszti, E., Levy, L., Hunter, S. E., Boonstra, K. M., Moshkelgosha, S., Sage, A. T., Azad, S., Zamel, R., Ghany, R., Yeung, J. C., Crespin, O. M., Frankel, C., Budev, M., Shah, P., Reynolds, J. M., Snyder, L. D., Belperio, J. A., Singer, L. G., ... CTOT-20 investigators (2020). Bronchoalveolar bile acid and inflammatory markers to identify high-risk lung transplant recipients with reflux and microaspiration. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 39(9), 934–944.
2. Meyer K. C. (2018). Recent advances in lung transplantation. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1684.
3. Hofmann, A. F., & Hagey, L. R. (2008). Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(16), 2461–2483.
4. Leung, J. H., Chang, J. C., Foltz, E., Bell, S. M., Pi, C., Azad, S., Everett, M. L., Holzkecht, Z. E., Sanders, N. L., Parker, W., Davis, R. D., Keshavjee, S., & Lin, S. S. (2016). Clearance of bile and trypsin in rat lungs following aspiration of human gastric fluid. *Experimental lung research*, 42(1), 37–43.
5. De Corso, E., Baroni, S., Agostino, S., Cammarota, G., Mascagna, G., Mannocci, A., Rigante, M., & Galli, J. (2007). Bile acids and total bilirubin detection in saliva of patients submitted to gastric surgery and in particular to subtotal Billroth II resection. *Annals of surgery*, 245(6), 880–885.
6. Blondeau, K., Mertens, V., Vanaudenaerde, B. A., Verleden, G. M., Van Raemdonck, D. E., Sifrim, D., & Dupont, L. J. (2008). Gastro-oesophageal reflux and gastric aspiration in lung transplant patients with or without chronic rejection. *The European respiratory journal*, 31(4), 707–713.
7. Davis, C. S., Mendez, B. M., Flint, D. V., Pelletiere, K., Lowery, E., Ramirez, L., Love, R. B., Kovacs, E. J., & Fisichella, P. M. (2013). Pepsin concentrations are elevated in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis after lung transplantation. *The Journal of surgical research*, 185(2), e101–e108.

8. Bessonneau, V., Bojko, B., Azad, A., Keshavjee, S., Azad, S., & Pawliszyn, J. (2014). Determination of bronchoalveolar lavage bile acids by solid phase microextraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry in combination with metabolite profiling: comparison with enzymatic assay. *Journal of chromatography. A*, 1367, 33–38.
9. Zhang, C. Y. K., Ahmed, M., Huszti, E., Levy, L., Hunter, S. E., Boonstra, K. M., Moshkelgosha, S., Sage, A. T., Azad, S., Zamel, R., Ghany, R., Yeung, J. C., Crespin, O. M., Frankel, C., Budev, M., Shah, P., Reynolds, J. M., Snyder, L. D., Belperio, J. A., Singer, L. G., ... CTOT-20 investigators (2020). Bronchoalveolar bile acid and inflammatory markers to identify high-risk lung transplant recipients with reflux and microaspiration. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 39(9), 934–944.
10. Starosta, V., Kitz, R., Hartl, D., Marcos, V., Reinhardt, D., & Griese, M. (2007). Bronchoalveolar pepsin, bile acids, oxidation, and inflammation in children with gastroesophageal reflux disease. *Chest*, 132(5), 1557–1564.
11. Parikh, S., Brownlee, I. A., Robertson, A. G., Manning, N. T., Johnson, G. E., Brodli, M., Corris, P. A., Ward, C., & Pearson, J. P. (2013). Are the enzymatic methods currently being used to measure bronchoalveolar lavage bile salt levels fit for purpose?. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 32(4), 418-423.
12. Sharma, P., & Sampliner, R. (1997). GERD, DGER, or both in Barrett's esophagus?. *The American journal of gastroenterology*, 92(5), 903–904.
13. Boyer J. L. (2013). Bile formation and secretion. *Comprehensive Physiology*, 3(3), 1035–1078.
14. Horáčková, Š., Mühlhansová, A., Plocková, M. (2017). Interakce žlučových kyselin a probiotických mikroorganismů. *Chemické listy*. 111, 246-250.
15. Chiang, J., (2009). Regulation of Bile Acid and Cholesterol Metabolism by PPARs. *PPAR Research*. 2009, 1-15.

16. Žižalová, Kateřina. Metabolické účinky žlučových lipidů. Dizertační práce, vedoucí Leníček, Martin. Praha: Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, 2023.
17. Chiang, J. Y. L., & Ferrell, J. M. (2018). Bile Acid Metabolism in Liver Pathobiology. *Gene expression*, 18(2), 71–87.
18. McGlone, E. R., & Bloom, S. R. (2019). Bile acids and the metabolic syndrome. *Annals of clinical biochemistry*, 56(3), 326–337.
19. Ijare, O. B., Somashekar, B. S., Gowda, G. A., Sharma, A., Kapoor, V. K., & Khetrpal, C. L. (2005). Quantification of glycine and taurine conjugated bile acids in human bile using ¹H NMR spectroscopy. *Magnetic resonance in medicine*. 53(6), 1441–1446.
20. Zhang, G. H., Cong, A. R., Xu, G. B., Li, C. B., Yang, R. F., & Xia, T. A. (2005). An enzymatic cycling method for the determination of serum total bile acids with recombinant 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemical and biophysical research communications*. 326(1), 87–92.
21. Monte, M. J., Marin, J. J., Antelo, A., & Vazquez-Tato, J. (2009). Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World journal of gastroenterology*, 15(7), 804–816.
22. Russell D. W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annual review of biochemistry*, 72, 137–174.
23. Chiang J. Y. (2004). Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *Journal of hepatology*, 40(3), 539–551.
24. di Gregorio, M. C., Cautela, J., & Galantini, L. (2021). Physiology and Physical Chemistry of Bile Acids. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1780.
25. Dutta, M., Cai, J., Gui, W., & Patterson, A. D. (2019). A review of analytical platforms for accurate bile acid measurement. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411(19), 4541–4549.
26. Mukhopadhyay, S., & Maitra, U. (2004). Chemistry and biology of bile acids. *Current Science*, 87(12), 1666–1683.

27. Thomas, C., Pellicciari, R., Pruzanski, M., Auwerx, J., & Schoonjans, K. (2008). Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(8), 678–693.
28. Roda, A., Hofmann, A. F., & Mysels, K. J. (1983). The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions. *The Journal of biological chemistry*, 258(10), 6362–6370.
29. Hofmann, A. F., & Mysels, K. J. (1992). Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH, and Ca²⁺ ions. *Journal of lipid research*, 33(5), 617–626.
30. Hofmann, A. F., & Roda, A. (1984). Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *Journal of lipid research*, 25(13), 1477–1489.
31. Savage B. P. (2002). Cationic Steroid Antibiotics. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents*. 1(3), 293-304.
32. Bandyopadhyaya, A. K., Sangeetha, N. M., & Maitra, U. (2000). Highly diastereoselective synthesis of the 1,1'-binaphthol unit on a bile acid template. *The Journal of organic chemistry*. 65(24), 8239–8244.
33. Nath, S., & Maitra, U. (2006). A simple and general strategy for the design of fluorescent cation sensor beads. *Organic letters*. 8(15), 3239–3242.
34. Davis, Anthony & Joos, Jean-Baptiste. (2003). Steroids as organising elements in anion receptors. *Coordination Chemistry Reviews*. 240, 143-156.
35. Alvarez Alcalde, M., Jover, A., Meijide, F., Galantini, L., Pavel, N. V., Antelo, A., & Vázquez Tato, J. (2008). Synthesis and characterization of a new gemini surfactant derived from 3alpha,12alpha-dihydroxy-5beta-cholan-24-amine (steroid residue) and ethylenediaminetetraacetic acid (spacer). *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 24(12), 6060–6066.
36. Sievänen E. (2007). Exploitation of bile acid transport systems in prodrug design. *Molecules*. 12(8), 1859-89.
37. Griffiths, W. J., & Sjövall, J. (2010). Bile acids: analysis in biological fluids and tissues. *Journal of lipid research*. 51(1), 23–41.

38. Ikawa, S., Miyake, M., Mura, T., & Ikeguchi, M. (1987). High-performance liquid chromatographic-fluorescence determination of human faecal bile acids. *Journal of chromatography*. 400, 149–161.
39. Kandrac, J., Kevresan, S., Gu, J. K., Mikov, M., Fawcett, J. P., & Kuhajda, K. (2006). Isolation and determination of bile acids. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 31(3), 157–177.
40. Sjoval, J. (1959). The determination of bile acids in bile and duodenal contents, by quantitative paper chromatography. *Clinica Chimica Acta – CLIN CHIM ACTA*. 4, 652-664.
41. Harris, S. C., Devendran, S., Méndez-García, C., Mythen, S. M., Wright, C. L., Fields, C. J., Hernandez, A. G., Cann, I., Hylemon, P. B., & Ridlon, J. M. (2018). Bile acid oxidation by *Eggerthella lenta* strains C592 and DSM 2243T. *Gut microbes*. 9(6), 523–539.
42. Sjoval, J. (1953). On the Separation of Bile Acids by Partition Chromatography. *Acta Physiologica Scandinavica*. 29, 232-240.
43. VandenHeuvel, W.J.A., Sweeley, C.C., Horning, E.C. (1960). Microanalytical separations by gas chromatography in the sex hormone and bile acid series. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 3(1), 33-36.
44. Ross, P. E., Pennington, C. R., & Bouchier, I. A. (1977). Gas-liquid chromatographic assay of serum bile acids. *Analytical biochemistry*. 80(2), 458-465.
45. Karlaganis, G., & Paumgartner, G. (1979). Determination of bile acids in serum by capillary gas-liquid chromatography. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 92(1), 19–26.
46. Batta, A. K., & Salen, G. (1999). Gas chromatography of bile acids. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*. 723(1-2), 1–16.
47. Almé, B., & Sjövall, J. (1980). Analysis of bile acid glucuronides in urine. Identification of 3 alpha, 6 alpha, 12 alpha-trihydroxy-5 beta-cholanoic acid. *Journal of steroid biochemistry*. 13(8), 907–916.
48. Yousef, I. M., Fisher, M. M., Myher, J. J., & Kuksis, A. (1976). Superior gas-liquid chromatography of methyl cholanoate acetates on

- cyanopropylphenylsiloxane liquid phases. *Analytical biochemistry*. 75(2), 538–544.
49. Shaw, R., & Elliott, W. H. (1976). Bile acids. XLVIII. Separation of conjugated bile acids by high-pressure liquid chromatography. *Analytical biochemistry*. 74(2), 273–281.
50. Street, J. M., & Setchell, K. D. (1988). Chromatographic methods for bile acid analysis. *Biomedical chromatography : BMC*. 2(6), 229–241.
51. Shi, Y., Xiong, J., Sun, D., Liu, W., Wei, F., Ma, S., & Lin, R. (2015). Simultaneous quantification of the major bile acids in artificial Calculus bovis by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and its application in quality control. *Journal of separation science*. 38(16), 2753–2762.
52. Li, G. L., Chen, G., Liu, Y. Q., Jing, N. H., & You, J. M. (2012). A sensitive and selective HPLC-FLD method with fluorescent labeling for simultaneous detection of bile acid and free fatty acid in human serum. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 895-896. 191–195.
53. Ikegawa, S., Okuyama, H., Oohashi, J., Murao, N., Goto, J. (1999). Separation and Detection of Bile Acid 24- Glucuronides in Human Urine by Liquid Chromatography Combined with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Sciences*. 15(7), 625–31.
54. Goto, J., Murao, N., Nakada, C., Motoyama, T., Oohashi, J., Yanagihara, T., Niwa, T., & Ikegawa, S. (1998). Separation and characterization of carboxyl-linked glucuronides of bile acids in incubation mixture of rat liver microsomes. *Steroids*. 63(4), 186–192.
55. Sadílek, M. (2020). Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy*. 114, 133-144.
56. Ye, L., Liu, S., Wang, M., Shao, Y., & Ding, M. (2007). High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 860(1), 10–17.

57. Haag, M., Hofmann, U., Mürdter, T. E., Heinkele, G., Leuthold, P., Blank, A., Haefeli, W. E., Alexandrov, A., Urban, S., & Schwab, M. (2015). Quantitative bile acid profiling by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry: monitoring hepatitis B therapy by a novel Na(+)-taurocholate cotransporting polypeptide inhibitor. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 407(22), 6815–6825.
58. Qiao, X., Ye, M., Liu, C. F., Yang, W. Z., Miao, W. J., Dong, J., & Guo, D. A. (2012). A tandem mass spectrometric study of bile acids: interpretation of fragmentation pathways and differentiation of steroid isomers. *Steroids*. 77(3), 204–211.
59. Prasnicka, A., Cermanova, J., Hroch, M., Dolezelova, E., Rozkydalova, L., Smutny, T., Carazo, A., Chladek, J., Lenicek, M., Nachtigal, P., Vitek, L., Pavek, P., & Micuda, S. (2017). Iron depletion induces hepatic secretion of biliary lipids and glutathione in rats. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*. 1862(12), 1469–1480.
60. Wu Y., Wang X., Wu Q., Wu X., Lin X., Xie Z. (2010). Separation and determination of structurally related free bile acids by pressurized capillary electrochromatography coupled to laser induced fluorescence detection. *Analytical Methods*. 2(12), 1927–1933.
61. Taguchi, K., Fukusaki, E., & Bamba, T. (2013). Simultaneous and rapid analysis of bile acids including conjugates by supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1299, 103–109.
62. Duarte, I. F., Legido-Quigley, C., Parker, D. A., Swann, J. R., Spraul, M., Braumann, U., Gil, A. M., Holmes, E., Nicholson, J. K., Murphy, G. M., Vilca-Melendez, H., Heaton, N., & Lindon, J. C. (2009). Identification of metabolites in human hepatic bile using 800 MHz ¹H NMR spectroscopy, HPLC-NMR/MS and UPLC-MS. *Molecular bioSystems*. 5(2), 180–190.
63. Iwata, T., Yamasaki, K. (1964). Enzymatic determination and thin-layer chromatography of bile acids in blood. *Journal of biochemistry*. 56, 424-431.
64. Liu, S., Zhang, Y., Qu, B., Qin, G., Cheng, J., Lu, F. (2017). Detection of total bile acids in biological samples using an indirect competitive ELISA based on four monoclonal antibodies. *Analytical Methods*. 9(4), 625-633.

65. Kobayashi, N., Katsumata, H., Uto, Y., Goto, J., Niwa, T., Kobayashi, K., & Mizuuchi, Y. (2002). A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of glycolithocholic acid sulfate in human urine for liver function test. *Steroids*, 67(10), 827-833.
66. Cui, X., Vasylieva, N., Shen, D., Barnych, B., Yang, J., He, Q., Jiang, Z., Zhao, S., & Hammock, B. D. (2018). Biotinylated single-chain variable fragment-based enzyme-linked immunosorbent assay for glycocholic acid. *The analyst*, 143(9), 2057-2065.
67. Simmonds, W. J., Korman, M. G., Go, V. L., & Hofmann, A. F. (1973). Radioimmunoassay of conjugated cholyl bile acids in serum. *Gastroenterology*, 65(5), 705–711.
68. Burton, C. M., Iversen, M., Carlsen, J., Mortensen, J., Andersen, C. B., Steinbrüchel, D., & Scheike, T. (2009). Acute cellular rejection is a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome independent of post-transplant baseline FEV1. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 28(9), 888–893.
69. Estenne, M., Maurer, J. R., Bohler, A., Egan, J. J., Frost, A., Hertz, M., Mallory, G. B., Snell, G. I., & Yousem, S. (2002). Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 21(3), 297–310.
70. Reder, N. P., Davis, C. S., Kovacs, E. J., & Fisichella, P. M. (2014). The diagnostic value of gastroesophageal reflux disease (GERD) symptoms and detection of pepsin and bile acids in bronchoalveolar lavage fluid and exhaled breath condensate for identifying lung transplantation patients with GERD-induced aspiration. *Surgical endoscopy*, 28(6), 1794–1800.
71. Zhang, C. Y. K., Ahmed, M., Huszti, E., Levy, L., Hunter, S. E., Boonstra, K. M., Moshkelgosha, S., Sage, A. T., Azad, S., Ghany, R., Yeung, J. C., Crespín, O. M., Singer, L. G., Keshavjee, S., & Martinu, T. (2022). Utility of bile acids in large airway bronchial wash versus bronchoalveolar lavage as biomarkers of microaspiration in lung transplant recipients: a retrospective cohort study. *Respiratory research*, 23(1), 219.

72. Beher, W. T., Stradnieks, S., Beher, G. R., & Lin, G. J. (1978). The hydrolysis of bile acid conjugates. *Steroids*, 32(3), 355–363.
73. Quinn, R. A., Melnik, A. V., Vrbanac, A., Fu, T., Patras, K. A., Christy, M. P., Bodai, Z., Belda-Ferre, P., Tripathi, A., Chung, L. K., Downes, M., Welch, R. D., Quinn, M., Humphrey, G., Panitchpakdi, M., Weldon, K. C., Aksenov, A., da Silva, R., Avila-Pacheco, J., Clish, C., ... Dorrestein, P. C. (2020). Global chemical effects of the microbiome include new bile-acid conjugations. *Nature*, 579(7797), 123–129.
74. Ma, Y., Cao, Y., Song, X., Xu, W., Luo, Z., Shan, J., & Zhou, J. (2023). Integration of semi-empirical MS/MS library with characteristic features for the annotation of novel amino acid-conjugated bile acids. *The Analyst*, 148(21), 5380–5389.