

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Mgr. Petra Valášková

Antioxidační a protizánětlivé účinky bilirubinu

Antioxidant and antiinflammatory effects of bilirubin

Disertační práce

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

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28.6.2019

PETRA VALÁŠKOVÁ

Podpis

Identifikační záznam

VALÁŠKOVÁ, Petra. *Antioxidační a protizánětlivé účinky bilirubinu. [Antioxidant and antiinflammatory effects of bilirubin]*. Praha, 2019. 164 s., 3 příl. Disertační práce, Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, Vedoucí závěrečné práce Muchová, Lucie.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce **doc. MUDr. Lucie Muchové, Ph.D.** za zadání zajímavého tématu, za všestrannou pomoc při experimentální části práce, cenné připomínky, ochotu zodpovědět mé dotazy a za čas, který mi během spolupráce věnovala.

Mé poděkování patří celému kolektivu Laboratoře pro výzkum nemocí jater a metabolismu hemu. Velké díky patří **RNDr. Aleši Dvořákovi, Ph.D.**, dále **Mgr. Janě Jašprové, Ph.D.**, **MUDr. Martinovi Leníčkoví, Ph.D.**, **Mgr. Ivaně Markové** a **Ing. Kateřině Žížalové**.

Velké poděkování patří vedoucímu naší laboratoře **prof. MUDr. Liborovi Vítkoví, Ph.D., MBA**.

V neposlední řadě děkuji také laborantkám a všem, co se spolupodíleli na této disertační práci.

Obsah

OBSAH	5
ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1 ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY	11
1.1 METABOLISMUS BILIRUBINU	11
1.2 TRANSPORT BILIRUBINU	14
<i>1.3.1 Toxicita bilirubinu</i>	19
<i>1.3.2 Antioxidační účinky bilirubinu</i>	24
<i>1.3.3 Protizánětlivé účinky bilirubinu</i>	29
1.4 STANOVENÍ KONCENTRACE BILIRUBINU	35
2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	38
3 MATERIÁL A METODY	39
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A MATERIÁL	39
3.2 GENOTYPIZACE NORMO A HYPERBILIRUBINEMICKÝCH POTKANŮ	40
<i>3.2.1 Izolace gDNA</i>	40
<i>3.2.2 Polymerázová řetězová reakce-PCR</i>	40
<i>3.2.3 Štěpení DNA pomocí restrikční endonukleasy</i>	41
3.3 IN VIVO EXPERIMENTY	41
<i>3.3.1 Stanovení zánětlivých markerů</i>	42
<i>3.3.2 Stanovení cytokinů</i>	42
<i>3.3.3 Stanovení lymfocytů průtokovou cytometrií</i>	42
<i>3.3.4 Izolace mRNA</i>	43
<i>3.3.5 Kvantitativní real time PCR a stanovení exprese genů</i>	43
3.4 PURIFIKACE KOMERČNÍHO NEKONJUGOVANÉHO BILIRUBINU	44
3.5 ROZPOUŠTĚNÍ BILIRUBINU	45
3.6 IN VITRO EXPERIMENTY	45
<i>3.6.1 Izolace a kultivace primárních hepatocytů</i>	45
<i>3.6.2 Test viability MTT</i>	46
<i>3.6.3 Stanovení intracelulární koncentrace bilirubinu</i>	46
<i>3.6.4 Experimenty s buněčnými kulturami</i>	47
<i>3.6.5 Měření intracelulární produkce ROS</i>	48
<i>3.6.6 Izolace proteinových extraktů</i>	48
<i>3.6.7 Stanovení koncentrace proteinů</i>	48
<i>3.6.8 Elektroforetická separace proteinů</i>	49
<i>3.6.9 Western blot</i>	49
<i>3.6.10 Kvantitativní real time PCR a stanovení exprese genů</i>	50

4.1 STANOVENÍ KONCENTRACE BILIRUBINU A JEHO FOTOPRODUKTŮ METODOU LC-MS/MS.....	51
4.1.1 Příprava kalibračních roztoků	51
4.1.2 Příprava vzorků na LC-MS/MS analýzu	51
5.1 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	51
4 VÝSLEDKY	52
4.1 GENOTYPIZACE NORMO A HYPERBILIRUBINEMICKÝCH POTKANŮ.....	52
4.2 <i>IN VIVO</i> EXPERIMENTY	53
4.2.1 Stanovení zánětlivých markerů	53
4.2.2 Stanovení exprese mRNA a sérové koncentrace cytokinů	58
4.2.3 Stanovení exprese mRNA proteinu vázajícího LPS (LBP).....	62
4.3 <i>IN VITRO</i> EXPERIMENTY S PRIMÁRNÍMI HEPATOCYTY.....	63
4.3.1 Intracelulární koncentrace bilirubinu a buněčná viabilita	63
4.3.2 Exprese mRNA cytokinů v primárních hepatocytech	63
4.3.3 exprese mRNA LBP v primárních hepatocytech.....	67
4.3.4 Western blot dráhy NF- κ B	67
5.1 MĚŘENÍ INTRACELULÁRNÍ PRODUKCE ROS <i>IN VITRO</i>	68
5.1.2 Vliv bilirubinu na oxidační stres <i>in vitro</i>	68
5.3. STANOVENÍ KONCENTRACE BILIRUBINU A JEHO FOTOPRODUKTŮ METODOU LC-MS/MS.....	72
5.3.1 LC-MS/MS analýza	72
5.3.2 Validace metody.....	74
5 DISKUZE	78
6 ZÁVĚR	87
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	88
8 PŘÍLOHY.....	117

Abstrakt

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

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

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

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

Abstract

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

Gunn and heterozygous rats were treated with lipopolysaccharide (LPS, 6 mg/kg, IP) or vehicle (saline). After 12 hours, blood and organs were collected for analyses of inflammatory and hepatic injury markers. Primary rat hepatocytes were treated with BR and TNF- α , HepG2 and SH-SY5Y cell lines were treated with BR and chenodeoxycholic acid. LPS-treated Gunn rats had a significantly decreased inflammatory response and hepatic injury compared to LPS-treated normobilirubinemic controls. We found different profile of leukocytes subsets and decreased systemic mRNA expressions and concentrations of IL-6, TNF- α , IL-1 β and IL-10 in Gunn rats. Hepatic mRNA expression of LPS-binding protein was upregulated in Gunn rats before and after LPS treatment. In addition, activities of AST and ALT, markers of hepatocellular damage, were lower in Gunn rats as compared to LPS-treated controls. The exposure of primary hepatocytes to TNF- α resulted in the activation of the NF- κ B pathway and phosphorylation of its p65 subunit, however, the degree of p65 phosphorylation was significantly decreased by BR. BR also reduced chenodeoxycholic acid-induced oxidative stress *in vitro*. A LC-MS/MS method for the simultaneous determination of lumirubin and BR was linear up to 400 μ mol/L for BR and to 100 μ mol/L for lumirubin with submicromolar limits of detection, with validity parameters relevant for use in clinical chemistry.

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

Key words: bilirubin, hyperbilirubinemia, inflammation, LPS, NF- κ B, oxidative stress, LC-MS/MS

Seznam použitých zkratek

ABC	ATP binding cassette, ABC transportér
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferasa
AST	aspartátaminotransferasa
BCRP	breast cancer resistance protein
BHT	2,6-di-tert-butyl-4-methylfenol
BSA	bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
Bf	volný bilirubin
BR	bilirubin
BV	biliverdin
CDCA	chenodeoxycholová kyselina
CO	oxid uhelnatý
CV	variační koeficient
DMSO	dimetylsulfoxid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FBS	fetal bovine serum, fetální hovězí sérum
HMOX	hemoxygenasa
HPLC	high pressure liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSA	human serum albumin, lidský sérový albumin
LPS	lipopolysacharid
gDNA	genomová deoxynukleová kyselina
IL-1	interleukin 1
IL-2	interleukin 2
IL-6	interleukin 6

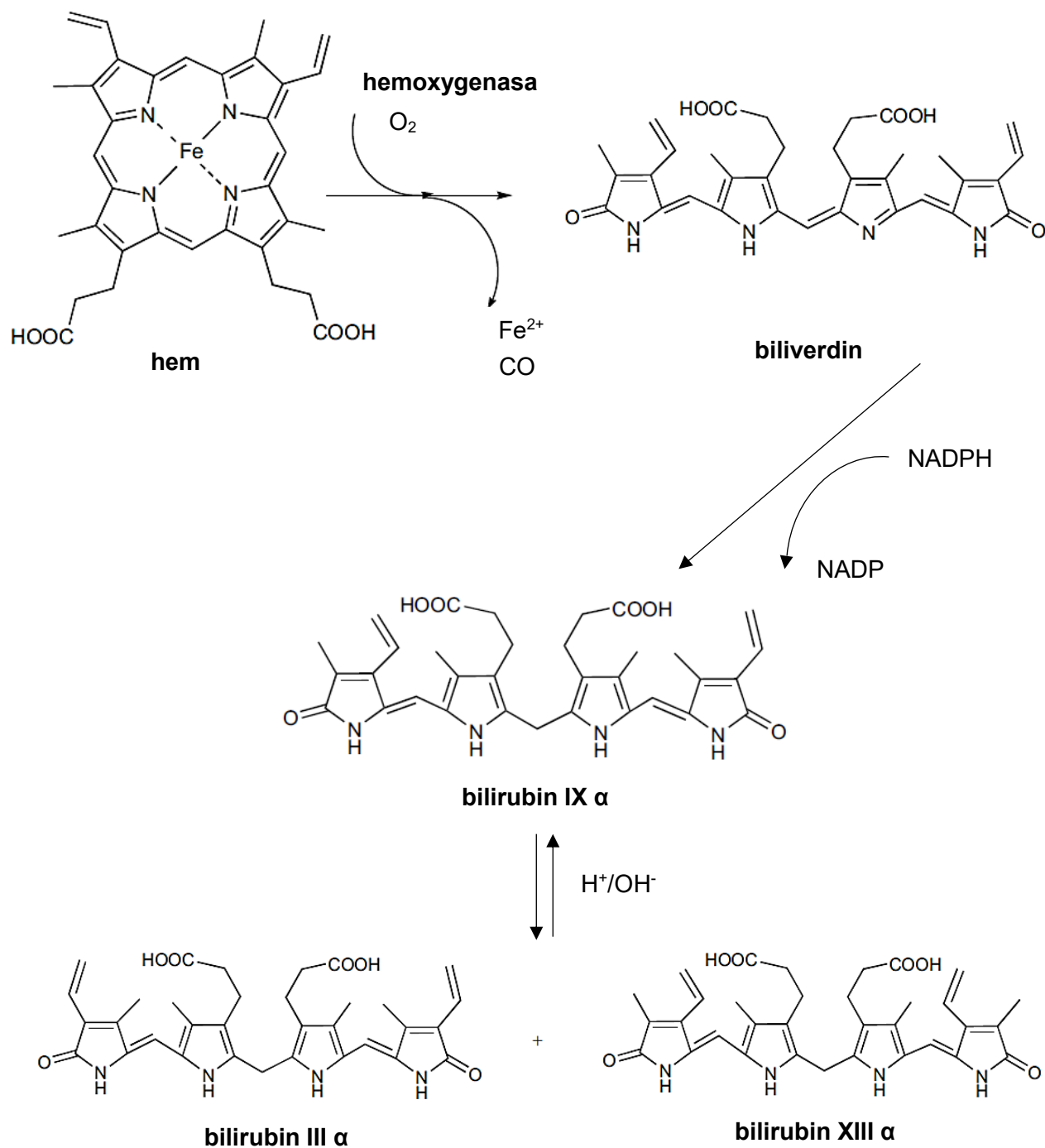
IL-10	interleukin 10
i.p.	intraperitoneálně
ISTD	vnitřní standard
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
LBP	protein vázající lipopolysacharid
LPS	lipopolysacharid
MBR	mezobilirubin
MEM	minimální esenciální médiu Eagle
MHC II	major histocompatibility komplex
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid
MRP2	multidrug resistance-associated protein-2
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaný
OATP	organic-anion transporting polypeptides
PBS	sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl
PCR	polymerázová řetězová reakce
PH	primární hepatocyty
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
ROS	reaktivní formy kyslíku
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný
TBA	tetra butyl amonium hydroxid
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)ethan
TNF- α	tumor nekrotický faktor α
UGT1A1	UDP glukuronozyl transferasa
WBC	celkový počet bílých krvinek

1 Úvod a přehled literatury

1.1 Metabolismus bilirubinu

Bilirubin (BR) je finální produkt katabolické dráhy hemu a denně se vytvoří v množství přibližně 4 mg/kg tělesné váhy u savců. Hem patří mezi nejvíce konzervované molekuly v rostlinné i živočišné říši a plní esenciální funkci v mnoha biologických reakcích, jež je určována vlastnostmi navázaného polypeptidu (*Dawson 1988*). Např. hemoglobin a myoglobin slouží k transportu a skladování kyslíku, zatímco cytochromy jsou zapojeny do přenosu elektronů a buněčné respirace (*Ponka 1999*). V erytroidních buňkách funguje hem jako pozitivní zpětnovazebný regulátor pro vlastní syntézu (*Sassa 1976*) a zároveň se uplatňuje i při kontrole exprese proteinů jako jsou globin (*Tahara, Sun et al. 2004*), cytochromy P450 (*Vinchi, Ingolia et al. 2014*), myeloperoxidasa (*Gidari and Levere 1977*), hemoxygenasa (HMOX) (*Taille, El-Benna et al. 2004*) či receptor pro transferin (*Ward, Jordan et al. 1984*). Hem také ovlivňuje regulaci, diferenciaci a proliferaci B-lymfocytů, neuroblastomových buněk, astrocytů, fibroblastů či tukových buněk (*Chen and London 1981, Verger, Sassa et al. 1983, Abraham 1991, Keel, Doty et al. 2008, Watanabe-Matsui, Muto et al. 2011*). Nicméně během patologických stavů se může hem z hemoproteinů uvolňovat. Volný hem působí cytotoxicky a vyvolává oxidační stres, a proto musí být z organismu rychle a účinně eliminován (*Kumar and Bandyopadhyay 2005*).

Hem je nejprve enzymaticky štěpen mikrosomální HMOX na biliverdin (BV), oxid uhelnatý (CO) a kation železa za spotřeby tří molekul kyslíku a redukčního ekvivalentu NADPH (*Tenhunen, Marver et al. 1972*), **Obr. 1**. Zatím byly v organismu detailně popsány dvě izoformy HMOX, inducibilní HMOX-1 (*Keyse and Tyrrell 1989*) (uplatňující se zejména v ochraně před oxidačním stresem) a konstitutivní forma HMOX-2 (regulující fyziologické buněčné funkce) (*Maines, Trakshel et al. 1986*).

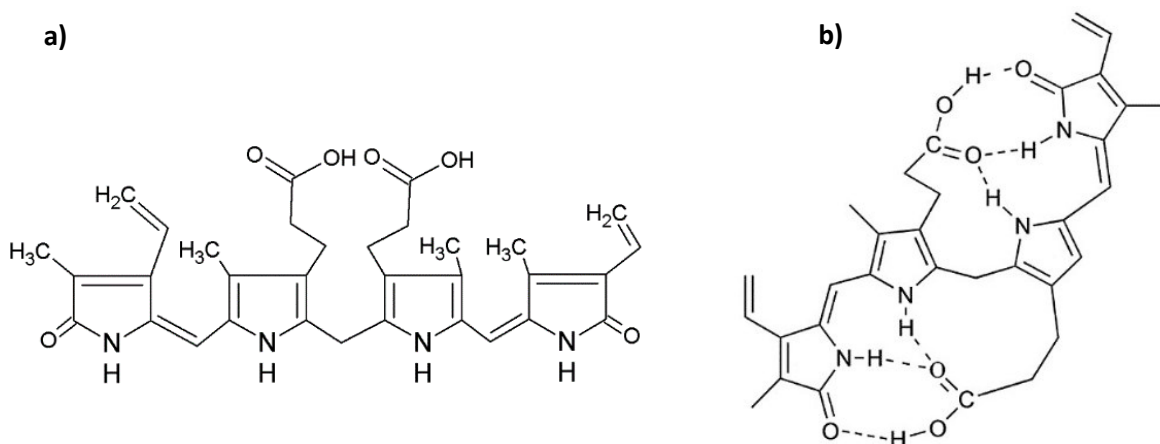


Obr. 1: Katabolismus hemu. HMOX katalyzuje oxidační degradaci hemu na BV za současného uvolnění CO a kationtu železa. BV je poté redukován biliverdin reduktasou na BR. Převzato a upraveno dle (Vitek and Ostrow 2009).

O třetí izoformě HMOX-3, jejíž gen byl sice popsán, se stále spekuluje jakožto o pseudogenu (Hayashi, Omata et al. 2004). Samotná HMOX patří mezi významné enzymy podílející se na obraně před oxidačním stresem (McMahon, Ding et al. 2018), CO je významnou signální molekulou (Huang, Ma et al. 2018) a BV je považován za důležitou antioxidační a protektivní látku (Kirkby and Adin 2006).

Ačkoliv je u některých obratlovců konečným produktem katabolické dráhy hemu právě BV jakožto netoxická a relativně polární molekula, je zejména u placentárních živočichů BV ihned přeměňován na nepolární BR převážně cytosolárním enzymem BR reduktasou (Tenhunen, Ross et al. 1970). Z evolučního hlediska se jedná o výhodný proces, jelikož BR, na rozdíl od BV, prochází placentární bariérou prostou difusí a nehromadí se tedy v těle plodu (Mcdonagh, Palma et al. 1981). Zároveň rovnováha přeměny BV na BR je součástí redoxního cyklu, kdy je BR oxidován na BV a zpětně redukován, což vede ke zvýšení jeho antioxidačního působení (Baranano, Rao et al. 2002).

Chemicky patří BR mezi tetrapyroly, kde jsou dva rigidní planární dipyroly spojeny metylenovými můstky, jak je uvedeno na **Obr. 2a**. Nejčastější konstituční izoforma BR vznikající převážně z hemu a hemových proteinů je BR IX α , nicméně minoritně se vyskytují i izomery III α a XIII α (lišící se polohou substituentů na tetrapyrolovém skeletu) (Ostrow, Mukerjee et al. 1994). Přestože ve struktuře BR lze nalézt polární skupiny, BR se chová jako hydrofobní molekula, která je při fyziologickém pH téměř nerozpustná ve vodě. Důvodem je tvorba vnitřních vodíkových můstků mezi karboxylovými skupinami kyseliny propionové a amino- a laktamovými skupinami postranních pyrolových kruhů (Bonnett, Davies et al. 1976), jak je uvedeno na **Obr. 2b**.



Obr. 2: a) planární struktura BR b) struktura BR s vyznačenými vodíkovými vazbami.

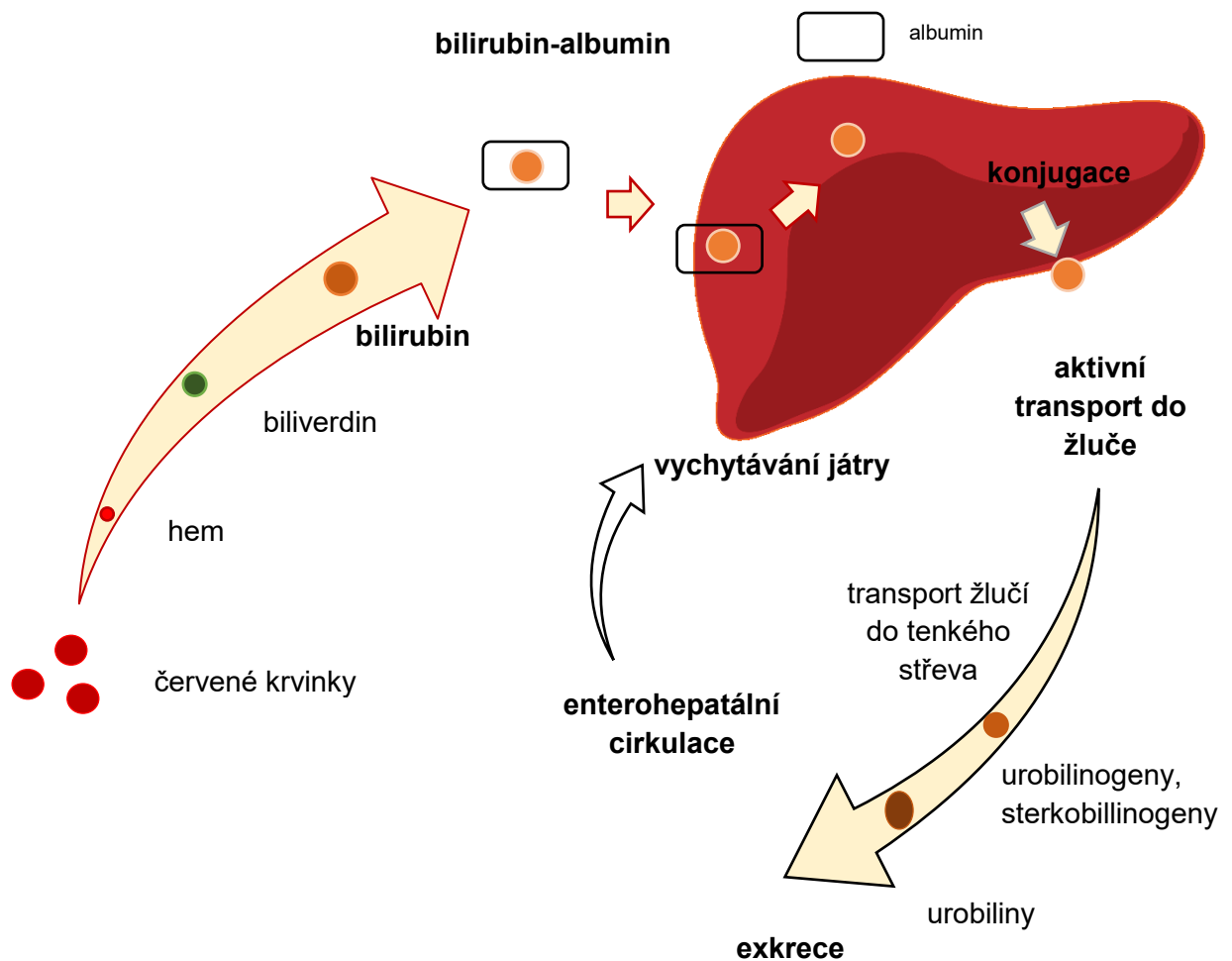
1.2 Transport bilirubinu

Vzhledem k hydrofobnímu charakteru BR je téměř 90 % celkového BR v cirkulaci u dospělých jedinců nekovalentně vázáno k albuminu (Jacobsen 1969), zbylých 10 % je navázáno zejména na apolipoprotein D (Goessling and Zucker 2000). U novorozenců převládá jako hlavní transportní složka α -fetoprotein (Berde, Nagai et al. 1979). V cirkulaci se vyskytuje pouze nepatrné množství (méně než 0,01 %) volného BR (Bf), jenž je přímo zodpovědný za biologické účinky v buňkách a tkáních v závislosti na koncentraci. Fyziologické koncentrace celkového BR jsou v současnosti udávány mezi 2,0-17,0 $\mu\text{mol/l}$ (Calligaris, Bellarosa et al. 2007).

Lidský albumin má na svém povrchu vysoce afinitní vazebné místo pro BR, ke kterému se váže iontovou vazbou, a další dvě vazebná místa s nižší afinitou (Berde, Hudson et al. 1979). Vazba s albuminem tedy nejenom že udržuje BR rozpuštěný v cirkulaci a plní funkci transportního systému, navíc ještě zabraňuje nadměrnému množství Bf procházet prostou difúzí přes membrány, hromadit se v buňkách a působit cytotoxicky (Lauff, Kasper et al. 1983).

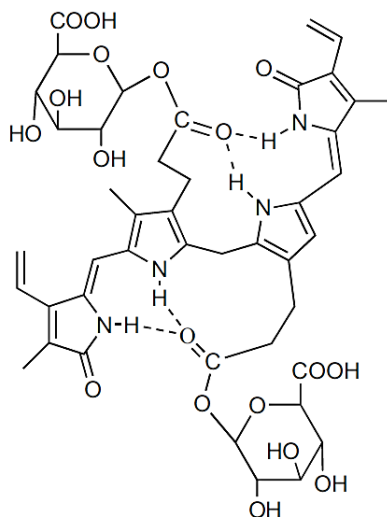
BR je tedy nejprve přenesen do jater, kde dochází k disociaci BR z albuminu a poté k translokaci BR přes bazolaterální membránu hepatocytu, jak je uvedeno na **Obr. 3**. Předpokládá se, že hlavním mechanismem transportu BR přes fenestrováný jaterní sinusoid do bazolaterální membrány hepatocytu je spontánní transmembránová difuze za pomoci specifických přenašečů lokalizovaných na bazolaterální membráně hepatocytu patřící do rodiny OATP (organic-anion transporting polypeptides) (*Adachi, Kamisako et al. 1996, Wolkoff 1996*). Jakmile je BR přenesen přes membránu do cytosolu jaterní buňky, dochází ihned k solubilizaci pomocí proteinu Y a Z (organic-anion binding proteins), což zabraňuje zpětné pasivní difuzi z buňky a vazbě BR na membránu (*Vander Jagt, Dean et al. 1983*).

V hladkém endoplazmatickém retikulu hepatocytu je BR konjugován nejčastěji s endogenní kyselinou glukuronovou vazbou na jednu nebo obě karboxylové skupiny (**Obr. 4**), což zvyšuje jeho polaritu a usnadňuje vylučování. Reakce je katalyzovaná mikrosomální UDP-glukuronosyl transferasou (UGT1A1) a konjugovaný BR je poté vyloučen do žluče aktivním transportem. Přesný mechanismus transportu konjugovaného BR z jaterního mikrosomu ke kanalikulární membráně není zcela objasněn. Uvažuje se o zapojení cytoskeletárního proteinu radixinu (*Kikuchi, Hata et al. 2002*), který ukotvuje kanalikulární přenašeče ke kanalikulární membráně. Aktivní transport do žluče je zprostředkovaný zejména ABC přenašečem MRP2 (Multidrug resistance-associated protein-2) (ABCC2) (*Crawford, Hauser et al. 1988*), **Obr. 5**. Zároveň se spekuluje i o transportéru patřící též do rodiny ABC a to BCRP (breast cancer resistance protein) (*Xu, Ling et al. 2016*). BCRP vykazuje podobnou substrátovou specifitu jako má výše zmíněný MRP2 (*Vlaming, Pala et al. 2009*).



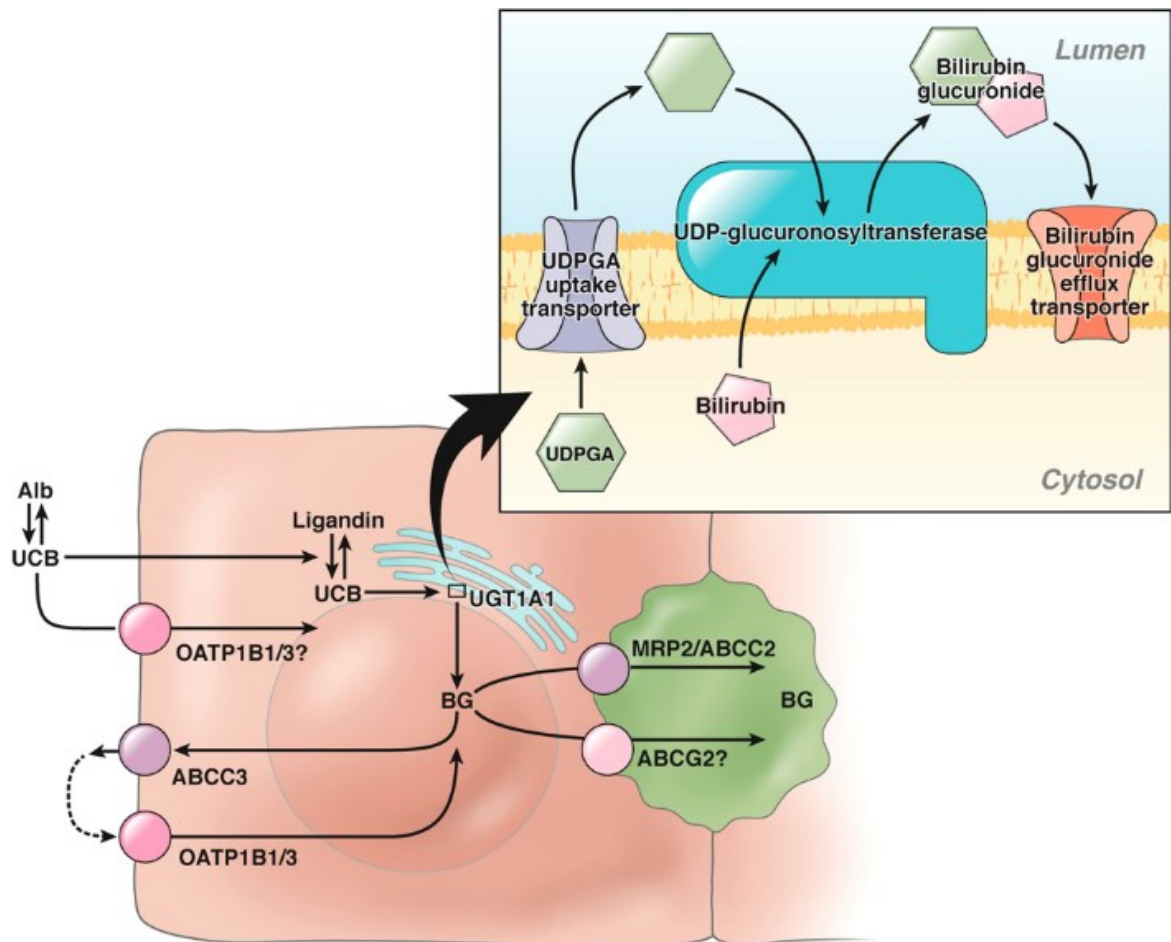
Obr. 3: Zjednodušené schéma transportu BR. BR se enzymaticky tvoří přes meziprodukt BV z hemu, pocházejícího z katabolismu červených krvinek v retikuloendoteliálním systému. V cirkulaci je BR navázán především na albumin a přenášen do jater, kde je konjugován a poté aktivně transportován do žluče a tenkého střeva. Tam dochází k degradaci na urobilinogeny a sterkobilinogeny a finální oxidaci na urobiliny. Část urobilinogenů je recyklována v enterohepatálním cyklu.

Vyřazením transportéru BCRP dochází u myši k mírné elevaci nekonjugovaného BR (Jonker, Buitelaar et al. 2002), což ho právě řadí mezi kandidátní spolupřenašeče BR do žluče.



Obr. 4: Konjugovaný BR (bisglukuronosyl bilirubin)

Konjugovaný BR poté prochází intra- a extrahepatálními žlučovody do lumen tenkého a dále do tlustého střeva, kde dochází k hydrolýze β -glukuronidasou a následně redukcí na deriváty BR (urobilinoidy) a neenzymové oxidaci na urobiliny (Gartner, Goeser et al. 1997). Část urobilinoidů se vstřebává ze střevního lumen do portálního řečiště a je resekretována játry (enterohepatální cirkulace, **Obr. 3**).



Obr. 5: Schematický přehled transportu BR hepatocytem. BR je translokován přes bazolaterální membránu hepatocytu pasivním a aktivním transportem (OATP1 transportér), kde dochází k solubilizaci pomocí proteinu ligandin. V hladkém endoplasmatickém retikulu je konjugován s kyselinou glukuronovou a konjugovaný BR je přes kanalikulární membránu přenesen proteinem MRP2 do žluče. Uvažuje se i o zapojení proteinu ABCG2 (BCRP). Část konjugovaného BR může být přenesena transportérem ABCC3 zpět z hepatocytu a opět vychytávána transportérem OATP1. UCB- nekonjugovaný BR; Alb- albumin; BG- bisglukuronosyl BR. Převzato dle (Erlinger, Arias et al. 2014)

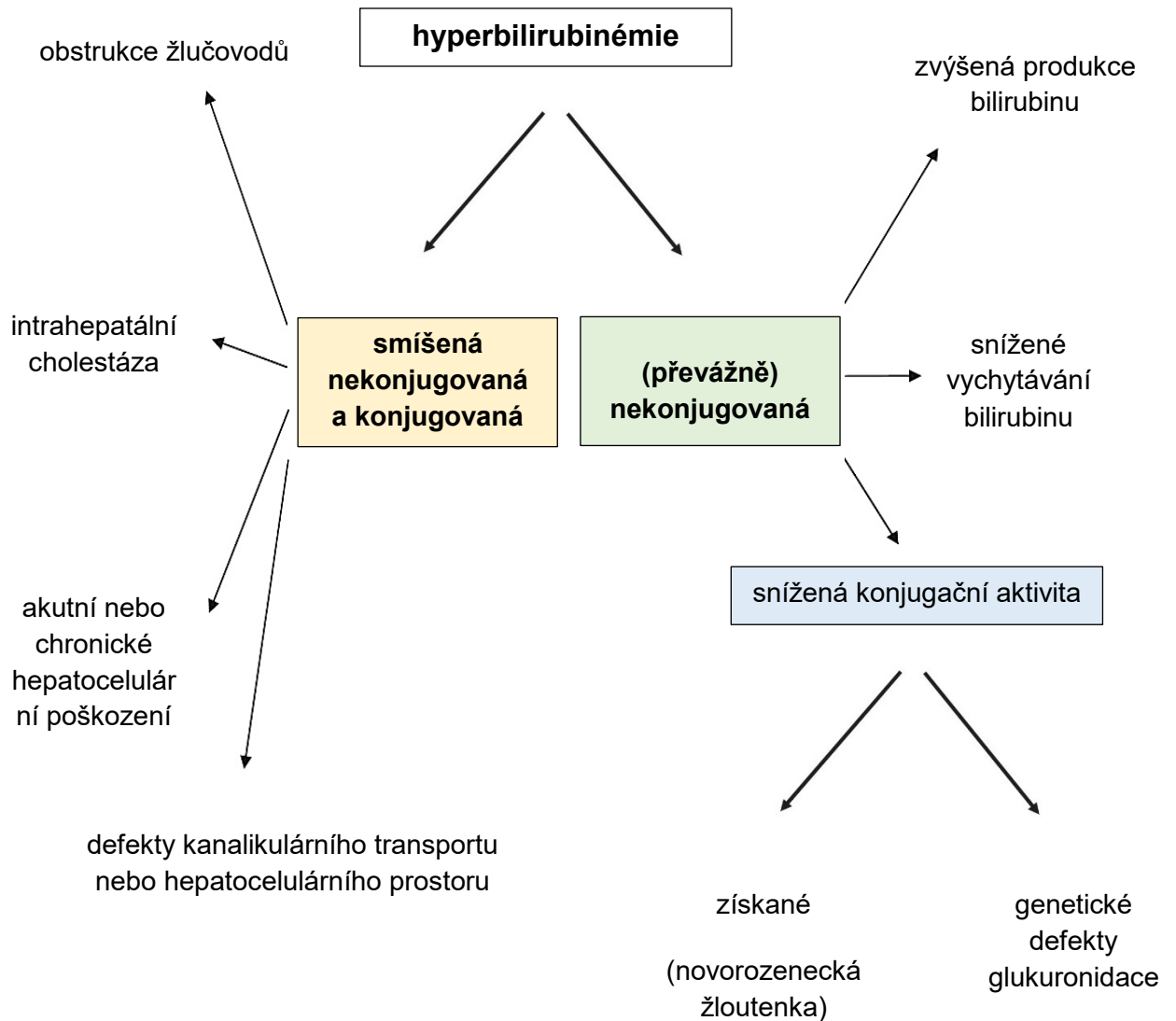
1.3 Biologické účinky bilirubinu

1.3.1 Toxicita bilirubinu

Ačkoliv mírně zvýšené systémové koncentrace BR lze dle posledních studií považovat za protektivní faktor (**kap. 1.3.2 a 1.3.3**) (Zelenka, Muchova et al. 2012), nadměrně zvýšené koncentrace (nad 340 $\mu\text{mol/l}$ podle typu poškození) jsou prokazatelně toxické (Watchko and Tiribelli 2013). Zvýšené koncentrace BR (nad 17 $\mu\text{mol/l}$) jsou nazývány hyperbilirubinémie, souvisí s poruchou jeho metabolismu a jsou klasifikovány na nekonjugované (premikrozomální), konjugované (postmikrozomální) a smíšené (Strassburg 2010) jak je uvedeno na **Obr. 6**.

Nekonjugované hyperbilirubinémie jsou způsobeny třemi hlavními patofyziologickými mechanismy, a to *nadprodukcí BR* (intra/extravaskulární hemolýza, fagocytóza erytrocytů při extravazaci, defektní inkorporace hemoglobinu do erytrocytů při patologických anemiích či jaterních onemocněních), *poruchou vychytávání BR hepatocytem* (při podání léčiv jako jsou rifamycinová antibiotika, probenecid, kyselina flavaspidová aj. či při cirhotických stavech) a *poruchou jeho konjugace* (snížená funkce UGT1A1 u Crigler-Najjarova syndromu typ I a II, Gilbertova syndromu či inhibice její funkce při podání antibiotik novobiocinu či antivirotika Atazanaviru) (Robinson, Vanier et al. 1962, Schaffner and Poper 1963, Kenwright and Levi 1974, Dhawan, Taylor et al. 2005, Roy-Chowdhury, Roy-Chowdhury et al. 2017). Konjugované hyperbilirubinémie jsou způsobeny *biliární obstrukcí* (extrahepatální cholestáza), *intrahepatální cholestázou* (virové a alkoholové hepatidy, stetohepatidy, potransplantační stavy, intrahepatální cholestáza těhotných aj.) a mezi smíšené hyperbilirubinémie řadíme *hepatocelulární poškození* (toxické, infekční, imunologické, systémové poškození, novotvary aj) (Shaw, Frohlich et al. 1982, Mendenhall, Anderson et al. 1984, Lee 1989, Stratta, Wood et al. 1989). Mezi vrozené hyperbilirubinémie

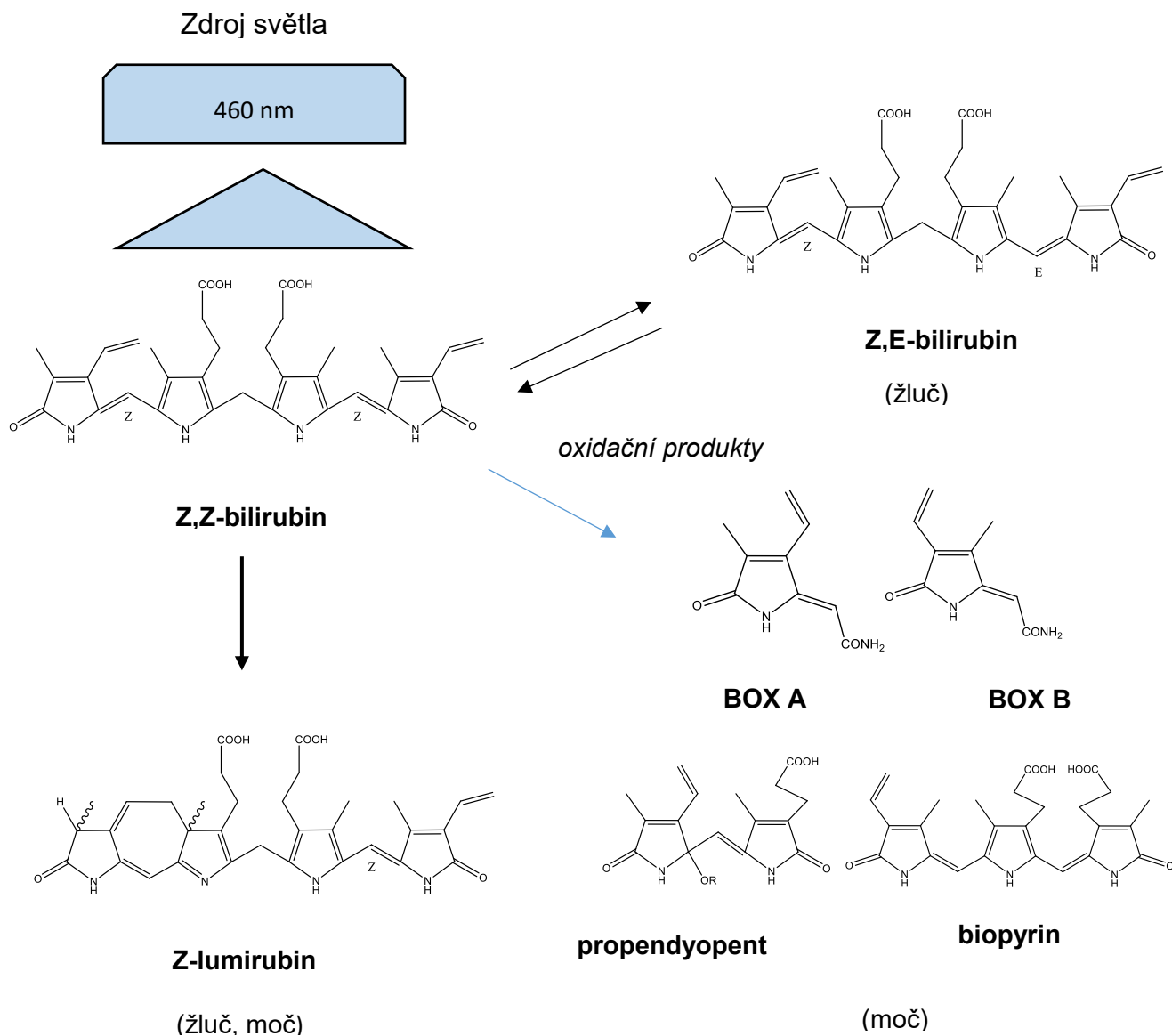
řadíme Gilbertův a Criglerův-Najjarův syndrom I. a II. typu (snížená funkce UGT1A1, nekonjugovaný typ) a Dubinův-Johnsonův a Rotorův syndrom (defekt transportu BR, konjugovaná hyperbilirubinémie) (Bosma, Chowdhury et al. 1995, Strassburg 2010).



Obr. 6: Diferenciální přístup k diagnostice hyperbilirubinémií, převzato a upraveno dle (Strassburg 2010).

Toxicitu BR můžeme pozorovat u jeho vysokých koncentrací, kdy je překročena vazebná kapacita albuminu a Bf prostupuje plazmatickou membránou do intracelulárního prostoru (Mancuso 2017). Zde může zasahovat do respiračního řetězce a inhibovat mitochondriální enzymy (Diamond 1970), což vede k uvolňování a hromadění cytochromu c v cytosolu, snížení mitochondriálního membránového potenciálu a narušení struktury membránových lipidů či proteinů, ústící až k indukci apoptózy (Rodrigues, Sola et al. 2002). Zároveň Bf může inhibovat syntézu DNA (Yamada, Sawasaki et al. 1977), neuronálních proteinů (Gurba and Zand 1974) a inhibicí proteinových kináz (závislých na cAMP/cGMP/Ca²⁺) ovlivňovat buněčnou fosforylaci (Hansen, Mathiesen et al. 1996).

Kromě výše uvedených toxických účinků může BR také inhibovat absorpci tyrosinu, což je dáno jeho afinitou k membránovým fosfolipidům (Amato, Kilguss et al. 1994). Dále bylo zjištěno, že vysoké koncentrace BR vedou k narušení neuroexcitačních signálů zejména ve sluchovém nervu či k inhibici iontové výměny a transportu vody v renálních buňkách (Dennery, Seidman et al. 2001). Selektivní toxicita BR na centrální nervový systém byla popsána *in vitro* u neuronů (Grojean, Koziel et al. 2000), astrocytů (Deliktas, Ergin et al. 2019) či na organotypických mozkových řezech (Dani, Pratesi et al. 2019) a její manifestaci *in vivo* lze pozorovat u Purkyňových buněk, v mozkové kůře, mozkovém kmeni, hipokampu či u bazálních ganglií (Ahdabbarmada and Moossy 1984, Ahlfors and Shapiro 2001, Watchko 2006, Ye, Xing et al. 2019).



Obr. 7: Mechanismus účinku fototerapie. BR je přeměněn na polárnější strukturní a konfigurační izomery či oxidační produkty, které jsou z organismu lépe vyloučeny. Převzato a upraveno dle (Maisels and McDonagh 2008).

Novorozenecká hyperbilirubinémie, známá jako novorozenecká žloutenka (koncentrace BR v prvních dnech 86-103 $\mu\text{mol/l}$) (Dennery, Seidman et al. 2001) postihuje až 87 % předčasně narozených i zdravých donošených dětí (Bhutani and Wong 2013) a na její manifestaci se podílí více faktorů (Calligaris, Bellarosa et al. 2007). Mezi hlavní patří nedozrálost hematoencefalické bariéry, která je proto více permeabilní pro Bf a nezralost jaterních transportérů a glukuronosylačních mechanismů, kdy organismus není schopen se rychle adaptovat na nadprodukcii BR krátce po narození. Fyziologická novorozenecká žloutenka má malý klinický význam a samovolně vymizí během několika dnů po narození, nicméně další rizikové faktory jako je nízká porodní hmotnost, akutní hemolytické stavy, defekty erytrocytů, nekompatibilita krevních skupin, předčasný odtok plodové vody, užívání některých léků v těhotenství či neonatální infekce jsou předpokladem pro manifestaci těžké novorozenecké hyperbilirubinémie (104-291 $\mu\text{mol/l}$), což může vyústit až k akutní bilirubinové encefalopatii (MacDonald 1995, Shapiro, Bhutani et al. 2006) a má již značný klinický význam (Ostrow, Pascolo et al. 2004).

Ke snížení toxických účinků BR je v klinické praxi u novorozenců stále běžně používaná fototerapie s cílem zejména snížit sérovou koncentraci BR či zabránit její zvyšování. Fotochemická energie modrozelené oblasti spektra světla (430-490 nm) je využita ke změně tvaru a struktury BR (McDonagh and Lightner 1985). Nepochopitelně BR je fyzikálně-chemicky přeměněn na polárnější žluté stereoizomery BR a bezbarvé deriváty s nižší molekulovou hmotností (fotoizomery BR a oxidační produkty), které mohou být rychleji vyloučeny z organismu žlučí či močí nezávisle na rychlosti konjugace, **Obr. 7**.

Časná indikace fototerapie vymýtila v rozvinutých zemích těžké bilirubinové encefalopatie a je celosvětově používána (doporučuje se u novorozenců, kteří mají 25-48 hodin po narození koncentraci BR větší než 256 $\mu\text{mol/l}$, ve věku 49-72 hodin >308 $\mu\text{mol/l}$

a novorozenci ve věku 72 hodin či starší $>342 \mu\text{mol/l}$ (Porter and Dennis 2002), nicméně je nutné mít na paměti i nežádoucí vedlejší účinky, kterými jsou poruchy termoregulace, minerální nerovnováha (Xiong, Qu et al. 2011) či zvýšené riziko alergických reakcí (Beken, Aydin et al. 2014). U novorozenců s velmi nízkou porodní váhou lze nalézt souvislost mezi fototerapií a zvýšeným rizikem střevní koliky (Raghavan, Thomas et al. 2005) či dokonce zvýšenou mortalitou (Tyson, Pedroza et al. 2012, Arnold, Pedroza et al. 2014).

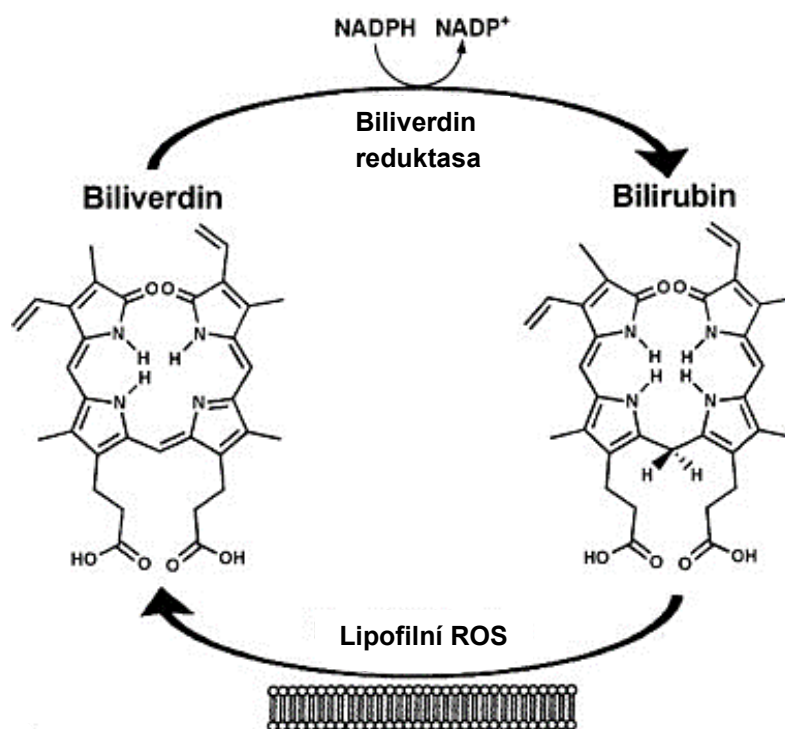
V poslední době jsou diskutovány i biologické účinky samotných fotoizomerů, a to zejména lumirubinu (Mreihil, McDonagh et al. 2010) v kontextu s jeho potenciálním prozánětlivým působením. Bylo zjištěno, že lumirubin v biologicky relevantních koncentracích signifikantně zvyšoval exprese mRNA prozánětlivých cytokinů i produkci TNF- α *in vitro* (Jasprova, Dal Ben et al. 2018). Zatím není znám komerčně dostupný standard lumirubinu, jehož získání by mohlo pomoci při studiu jeho dalších účinků (Jasprova, Dal Ben et al. 2016) a proto i v naší laboratoři je aktuálním tématem izolace lumirubinu a studium jeho vzniku, stability a zejména možnosti detekce v novorozeneckém séru.

1.3.2 Antioxidační účinky bilirubinu

Jak již bylo naznačeno v úvodní kapitole, BR vykazuje silné antioxidační účinky. Již v padesátých letech bylo poukázáno na to, že BR chrání před oxidací lipidů, jako je kyselina linolová a vitamin A (Bernhard, Ritzel et al. 1954), nicméně intenzivní výzkum antioxidačních účinků BR začal až přelomovou studií Rolanda Stockera v roce 1987, kdy bylo zjištěno, že BR brání oxidaci mastných kyselin (Stocker, Yamamoto et al. 1987). Antioxidační účinky jsou dány zejména přítomností C-10 metylenové skupiny tetrapyrolu, která ochotně poskytuje elektron reaktivním formám kyslíku (reactive oxygen species, ROS) a slouží jako tzv. lapač volných radikálů (free radical scavenger). Nicméně fyziologické

koncentrace BR jsou ve srovnání s jinými antioxidanty (glutathion, askorbát, kyselina močová) v organismu relativně nízké a nestačily by k tak silné antioxidační ochraně, která byla v souvislosti s BR pozorována v mnoha klinických i experimentálních studiích (McCarty 2007, Jansen and Daiber 2012, Gazzin, Vitek et al. 2016, DiNicolantonio, McCarty et al. 2018). Tato diskrepance je vysvětlována zejména existencí tzv. biliverdin-bilirubinového redoxního cyklu, kdy je BR oxidován ROS (peroxid vodíku, lipidové hydroperoxydy, peroxylové radikály aj.) zpět na BV a ten opět enzymaticky regenerován na BR (Baranano, Rao et al. 2002, Greenberg 2002, Sedlak, Saleh et al. 2009), **Obr. 8.** Zároveň BR inhibuje běžné izoformy enzymu NADPH-oxidasy, což jsou komplexy uvolňující v buňkách superoxid, a tím zvyšuje své antioxidační účinky (Kwak, Takeshige et al. 1991, Lanone, Bloc et al. 2005).

V dalších studiích bylo zjištěno, že BR zabraňuje peroxidaci nejen mastných kyselin, ale i fosfolipidů (Sedlak, Saleh et al. 2009), proteinů (Stocker and Ames 1987) či lipoproteinu LDL (Wu, Fung et al. 1994) a snižuje karboxylaci bílkovin. BR v nízkých koncentracích také chrání neuronální buňky před oxidačním stresem (Dore, Takahashi et al. 1999) či funguje jako antioxidant v lidských vaskulárních endoteliálních buňkách (Zibera, Martelanc et al. 2016). BR působí *in vitro* i *in vivo* také proti škodlivým účinkům prooxidantů včetně žlučových kyselin (Zelenka, Muchova et al. 2012) a zároveň snižuje oxidační poškození jater vyvolané nahromaděnými žlučovými kyselinami během cholestázy (Muchova, Vanova et al. 2011).



Obr. 8: Biliverdin-bilirubinový redoxní cyklus. ROS přímo oxidují BR na BV, který je biliverdin reduktasou za spotřeby NADPH redukován zpět na BR (Sedlak and Snyder 2004).

Role BR jakožto jednoho z nejsilnějších endogenních antioxidantů je známa i z klinické praxe (Gazzin, Vitek et al. 2016). Existuje dokonce souvislost mezi koncentrací BR a celkovou antioxidační kapacitou séra ovlivňující rozvoj ischemické choroby srdeční (Schwertner, Jackson et al. 1994). Konkrétně u jedinců středního věku s Gilbertovým syndromem byl výskyt ischemické choroby srdeční 2 % oproti běžné populaci ve stejné věkové skupině, kde toto riziko představovalo až 12 % (Sedlak and Snyder 2004).

Obecně mírně zvýšené systémové koncentrace BR jsou dnes již považovány za protektivní faktor. Například zvýšení koncentrace BR o 1 $\mu\text{mol/l}$ je spojeno se snížením rizika rozvoje aterosklerózy v populaci o 6 % (*Novotny and Vitek 2003*). Zvýšená koncentrace BR je spojená přímo se sníženou tvorbou aterosklerotických plátů u krčních tepen, což snižuje riziko mozkové příhody (*Ishizaka, Ishizaka et al. 2001*). Dalším příkladem je závislost mezi sníženou sérovou koncentrací BR a zvýšeným rizikem vzniku rozvoje systémových chorob spojených s vyšším oxidačním stresem (např. koncentrace BR nižší než 7 $\mu\text{mol/l}$ je již významný rizikový faktor) (*Wagner, Wallner et al. 2015*). Tento efekt koncentrace BR byl analogicky popsán např. i u astmatu (*Horsfall, Hardy et al. 2014*), hypertenze (*Wang and Bautista 2015*) schizofrenie (*Vitek, Novotna et al. 2010*), diabetu (*Abbasi, Deetman et al. 2015*) roztroušené sklerózy (*Peng, Deng et al. 2011*), systémového lupus erythematosus (*Vitek, Muchova et al. 2010*) či obezity (*DiNicolantonio, McCarty et al. 2018*). Koncentrace BR jsou také prokazatelně sniženy u onemocnění periferních cév (*Breimer, Spyropolous et al. 1994*). Jsou známy i studie, které dokládají snížené riziko úmrtnosti u pacientů s rakovinou, pokud u nich došlo ke zvýšení sérové koncentrace BR (*Temme, Zhang et al. 2001*).

Sérová koncentrace BR je tedy významný antioxidační marker a bývá ovlivněna mnoha faktory, například věkem (*Rosenthal, Pincus et al. 1984*), pohlavím (nižší koncentrace BR u žen), dietou (hladověním se zvyšuje sérový BR), kouřením (kouření výrazně snižuje koncentraci BR) a spotřebou léků či rostlinných produktů (*Vitek and Schwertner 2007*). Vybrané klinické příklady poukazující na korelaci mezi koncentrací BR a oxidačním stavem u pacientů jsou uvedeny v **Tab. 1**

Tab. 1: Vybraný souhrn studií, zabývajících se vztahem BR k onemocnění spojených s oxidačním stresem. Převzato a upraveno dle (Sedlak and Snyder 2004).

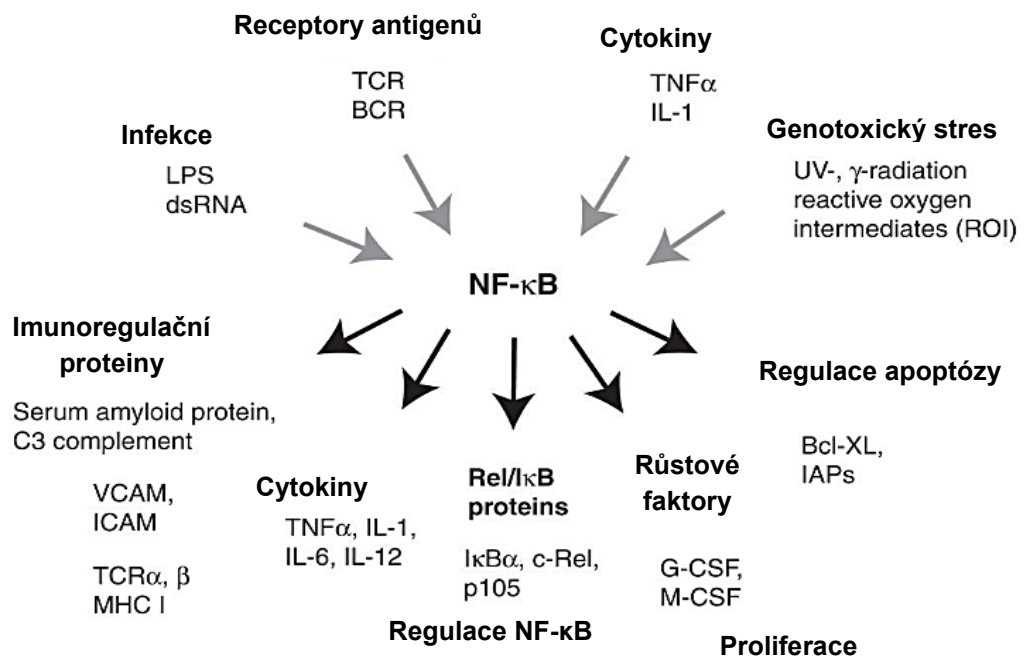
Klinický stav	Charakteristika	Reference
Antioxidační status u novorozenců	44 dětí s onemocněním způsobeným volnými radikály mělo signifikantně nižší vzestup sérového BR než zdraví novorozenci.	(Benaron and Bowen 1991)
	25 předčasně narozených dětí s onemocněním způsobeným ROS mělo signifikantně nižší koncentrace BR než 57 kontrolních případů.	(Hegyí, Goldie et al. 1994)
	Koncentrace BR v plazmě úzce korelovaly s koncentracemi antioxidantů u kojenců.	(Gopinathan, Miller et al. 1994)
	U 8 novorozenců s hyperbilirubinemií (250-435 μM) došlo po výměnné transfuzi ke snížení jak koncentrace BR, tak antioxidační kapacity plazmy.	(Belanger, Lavoie et al. 1997)
	U 28 předčasně narozených dětí korelovaly koncentrace antioxidantů BR a kyseliny močové s celkovými koncentracemi antioxidantů v plazmě.	(Drury, Nycyk et al. 1998)
Antioxidační status u dospělé populace	Po rozsáhlém tréninku a fyzickém cvičení bylo prokázáno u 31 mužských subjektů zvýšené koncentrace BR a snížená míra oxidačního poškození v séru.	(Chevion, Moran et al. 2003)
	Oxidační metabolity BR byly signifikantně zvýšeny v moči u 19 septických pacientů ve srovnání s 28 kontrolními subjekty.	(Otani, Shimizu et al. 2001)
	V souboru 5124 jedinců byly koncentrace BR nepřímo úměrné riziku infarktu myokardu a kardiovaskulárních onemocnění.	(Djousse, Rothman et al. 2003)
	U 31 jedinců s periferním vaskulárním onemocněním byly koncentrace BR významně nižší než u normální populace.	(Breimer, Spyropolous et al. 1994)
	Vyšší koncentrace celkového BR v séru byly asociovány se sníženou prevalencí mrtvice.	(Perlstein, Pande et al. 2008)

1.3.3 Protizánětlivé účinky bilirubinu

Zánět lze definovat jako fyziologickou reakci organismu na vnější či vnitřní poškození (zranění, poškození tkání, infekce atd.). Tato reakce zahrnuje mnoho systémových a metabolických projevů včetně zapojení širokého spektra chemických signálů (Zhang and An 2007). Během prvotní odpovědi dochází nejprve k aktivaci a posléze migraci leukocytů (neutrofilů, monocytů a eozinofilů) z krevního systému do místa poškození za spolupráce tkáňových žírných buněk. Během této akutní fáze zánětu (24 až 48 hodin od prvního impulzu) dochází také k diferenciaci monocytů na makrofágy, jež jsou hlavními zdroji cytokinů (Cousens and Werb 2002). Cytokiny jsou malé rozpustné proteiny (<40 kDa) syntetizované téměř všemi jadernými buňkami a jsou považovány za mediátory zánětu (Dinarello 2000). Sekrece cytokinů je přísně regulována zejména nukleárním faktorem NF- κ B, který patří mezi dimerické transkripční faktory. Je složený z proteinů rodiny Rel (RelA/p65, RelB, c-Rel, NF- κ B1 p50/p105, NF- κ B2 p52/p100). Aktivace NF- κ B, probíhající nejčastěji extracelulárním stimulem (stres, prozánětlivé cytokiny, patogeny, lipopolysacharidy atd.), hraje klíčovou roli v regulaci zánětlivé odpovědi (Obr. 9).

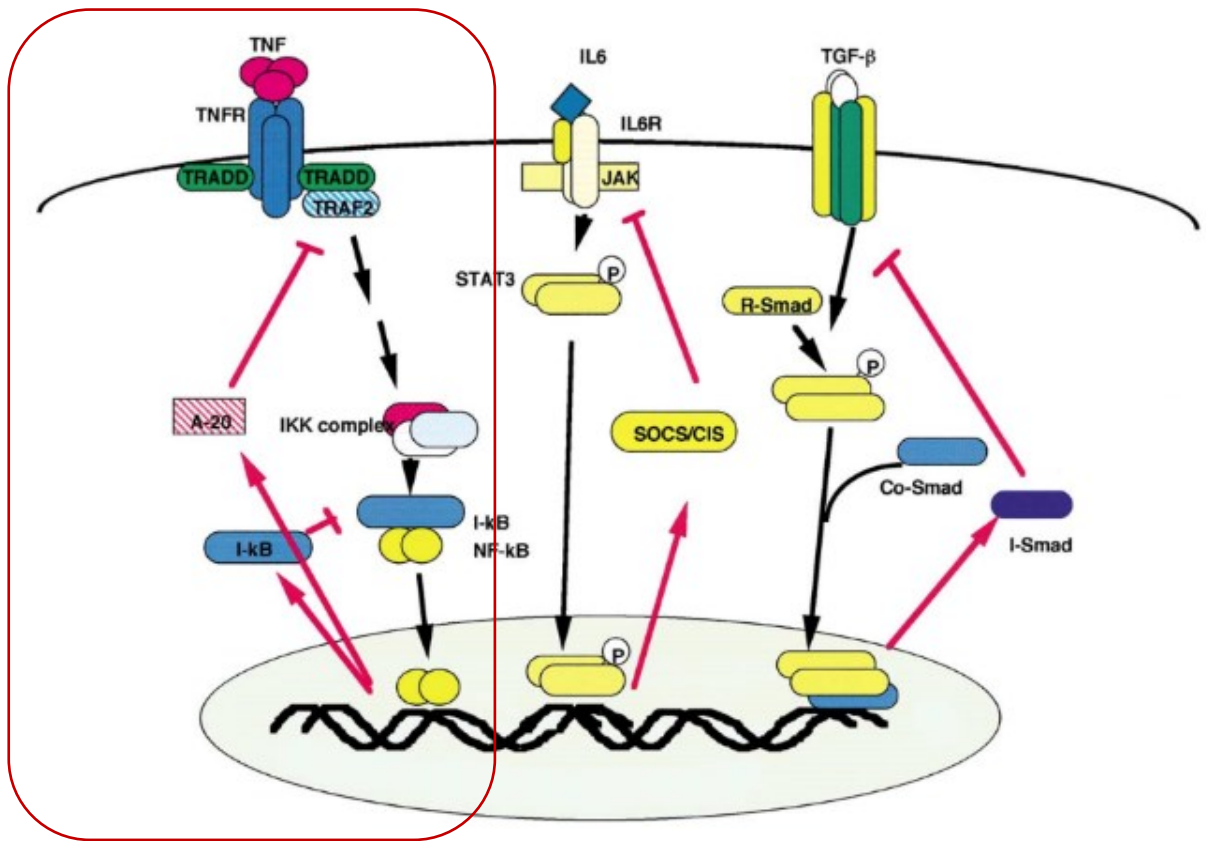
NF- κ B aktivuje zánětlivé geny a další faktory jako jsou adhezní molekuly, chemokiny, růstové faktory a inducibilní enzymy ovlivňující imunitní reakce, stresovou odpověď, vývoj B-lymfocytů aj. (Baldwin 1996). Komplex NF- κ B je ve své neaktivní formě lokalizován v cytoplasmě, vázán ke svému inhibitoru I κ B, jenž zabraňuje translokaci do jádra. V klasické dráze (kanonické) dochází po stimulaci nejprve k aktivaci (fosforylace Ser 176/180, 177/181) IKK komplexu (IKK β , IKK α a NEMO), což ústí ihned k fosforylaci I κ B (Ser 32). Fosforylovace vede k ubiquitinaci a proteosomální degradaci (za účasti 26S proteasomu) I κ B a k uvolnění a aktivaci NF- κ B (fosforylace Ser 536), který je následně

post-translačně modifikován (fosforylací, acetylací a glykosylací) a translokován do jádra, kde spouští transkripci klíčových zánětlivých genů (Siebenlist, Franzoso et al. 1994, Zandi, Chen et al. 1998), **Obr. 10**.



Obr. 9: *NF- κ B působí jako centrální mediátor imunitních a zánětlivých odpovědí a podílí se na stresových reakcích a regulaci buněčné proliferace a apoptózy. Převzato a upraveno dle (Oeckinghaus and Ghosh 2009).*

Nejnovější experimentální a klinické studie jasně hovoří o protizánětlivých účincích BR. V literatuře lze dohledat, že při nízkých koncentracích potlačuje BR právě sekreci prozánětlivých cytokinů (IL-2) a tím reguluje zánět *in vitro* (Haga, Tempero et al. 1996). Wallner a kol. zjistili, že zvýšené koncentrace BR vedly ke snížení hladiny IL-6 a C-reaktivního proteinu (CRP) (Wallner, Bulmer et al. 2013).



Obr. 10: Signální dráhy hlavních zánětlivých cytokinů se zaměřením na dráhu NF-κB. IKK komplex je aktivován např. TNF-α, dochází k fosforylaci IκB a uvolnění a translokaci NF-κB do jádra. Zpracováno dle (Hanada and Yoshimura 2002).

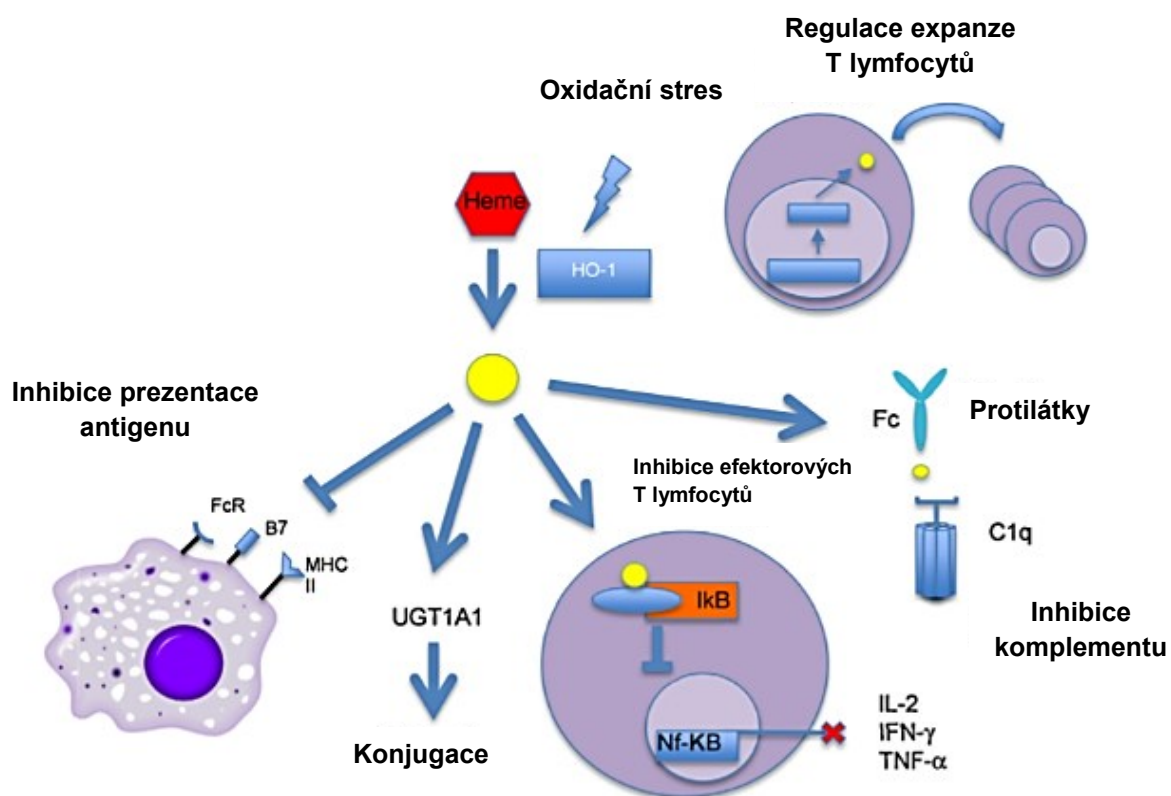
Nicméně první konzistentnější důkazy o protizánětlivém působení BR bylo možné pozorovat již téměř před 80 lety u pacientů s revmatoidní artritidou, u nichž docházelo k překvapivému zmírnění symptomů, a to díky zvýšené koncentraci BR v důsledku rozvoje jaterní choroby (Sidel N 1934, Hench 1938). Později bylo toto pozorování potvrzeno rozsáhlou epidemiologickou studií dokládající u pacientů přímou asociaci mezi sníženým rizikem rozvoje revmatoidní artritidy a vyšší celkovou koncentrací BR v séru (Fischman,

Valluri et al. 2010). Významné souvislosti lze dohledat i mezi zánětlivým onemocněním střev a koncentracemi BR. Pacienti s ulcerózní kolitidou či primární sklerotizující cholangitidou a hyperbilirubinémií mají mírnější kolitidu ve srovnání s pacienty s nízkými koncentracemi BR (*Papatheodoridis, Hamilton et al. 1998*). Zároveň jedinci s Gilbertovým syndromem mají sníženou predispozici pro rozvoj zánětlivého onemocnění střev (Crohnovy choroby) (*Lenicek, Duricova et al. 2014*).

Data z klinických studií jsou potvrzena i experimentálními *in vivo* a *in vitro* studiemi. Jedním z mechanismů může být inhibiční vliv BR na fosforylaci proteinů (*Hansen, Mathiesen et al. 1996*). V experimentálním modelu zánětlivé kolitidy u myši BR inhiboval migraci leukocytů a zabraňoval poškození střevní sliznice (*Zucker, Vogel et al. 2015*). Zároveň BR inhiboval transendotelovou migraci monocytů a leukocytů u zánětu dýchacích cest u myši (*Keshavan, Deem et al. 2005*) a zabraňoval vzniku aterosklerotických plátů analogickým mechanismem (inhibicí transendotelové migrace monocytů přes cévní stěnu) (*Vogel, Idelman et al. 2015*). V modelu zánětu indukovaném LPS u myši inhiboval BR zvýšení exprese syntasy oxidu dusnatého prostřednictvím inhibice TLR-4 receptorů (*Wang, Smith et al. 2004, Lanone, Bloc et al. 2005*). Novější studie dokládají, že BR zabraňuje potlačení vrozené imunity v *in vivo* podmínkách odmítnutí štepů při transplantaci (*Adin, VanGundy et al. 2017*). V loňském roce byla publikována studie dokládající snížení celkových zánětlivých parametrů a prevenci arteriální neointimální hyperplazie při použití koronárních stentů potažených BR (*Bae, Park et al. 2018*). Naše skupina již dříve prokázala, že mírná hyperbilirubinémie chrání před zánětem spojeným se stárnutím (*Zelenka, Dvorak et al. 2016*). Vybraný seznam protektivních účinků BR je uveden v **Tab. 2**.

Tab. 2: Vybraný seznam antioxidačních, protizánětlivých a cytoprotektivních vlastností BR. Převzato a upraveno dle (Thakkar, Edelenbos et al. 2019).

Mechanismus účinku	Efekt bilirubinu
Oxidační stres	Zvýšení celkové antioxidační kapacity
	Snížení oxidace LDL
	Snížení tvorby koncových produktů pokročilé glykace
	Snížení produkce superoxidu prostřednictvím inhibice NADPH oxidasy
Záněť	Snížení produkce prozánětlivých cytokinů
	Snížení hladiny CRP
	Regulace diferenciací T-regulačních lymfocytů
Metabolismus lipidů	Snížení LDL cholesterolu
	Snížení triacylglycerolů
	Zvýšení HDL cholesterolu
Metabolismus glukózy	Zachovávání homeostázy glukózy
	Zvýšení citlivosti na inzulín
	Snížení inzulínové rezistence
Krevní tlak	Snížení krevního tlaku
Obezita	Nižší koncentrace BR korelují s vyšší obezitou
Trombóza	Snížení středního objemu krevních destiček
	Zvýšení parciálního tromboplastinového času
Buněčná adheze	Snížení exprese VCAM-1/ICAM-1/E selektinu indukovanou TNF- α
	Snížení transendotheliální migrace leukocytů zprostředkovanou VCAM-1
Buněčná signalizace	Inhibice dráhy MAPK
	Inhibice translokace NF- κ B zprostředkovanou TNF- α



Obr. 11: Efekt bilirubinu na všech etážích imunitního systému. Převzato a upraveno dle (Jangi, Otterbein et al. 2013)

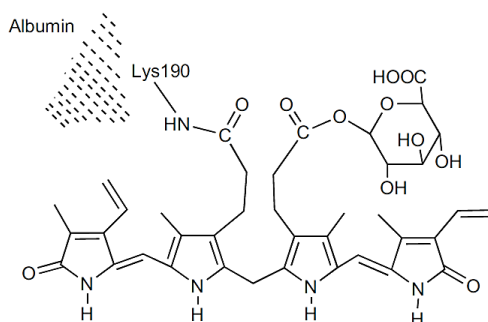
Data z posledních let přesvědčivě naznačují, že kromě výše uvedených antioxidačních a protizánětlivých účinků ovlivňuje BR mnoho etáží imunitního systému, a to jak na úrovni přirozené, tak i adaptivní imunity (Ollinger, Wang et al. 2007, Liu, Li et al. 2008, Jangi, Otterbein et al. 2013). První studie prováděné již v 70. letech zjistily, že BR významně potlačoval tvorbu protilátek proti záškrtu, tetanu a černému kašli u novorozenců (Nejedla 1970), což naznačuje úlohu BR ve vývoji imunitního systému. Vzhledem k propojení signálních drah a stále aktuálnějších poznatkům na poli imunologie je imunomodulační role BR značně rozmanitá a lze najít propojení s jeho protizánětlivým

působením (**Obr. 11**). Za zmínku stojí inhibiční vliv BR na komplementový systém, kde dochází k inhibici v kroku C1 klasické dráhy (*Basiglio, Arriaga et al. 2010*), interakce s Fc receptory makrofágů (*Vetvicka, Miler et al. 1985*), modifikace exprese MHC II glykoproteinů (*Liu, Li et al. 2008*) či ovlivnění diferenciací T buněk včetně T regulačních lymfocytů (*Rocuts, Zhang et al. 2010*). Aktivitu cytotoxických T-lymfocytů moduluje BR snížením syntézy DNA, expresí antigenu Tac (CD25) a expresí receptoru pro transferin (CD71) (*Haga, Tempero et al. 1996*).

1.4 Stanovení koncentrace bilirubinu

Vzhledem k výše uvedeným biologickým účinkům BR je nutné nejenom při rutinním laboratorním stanovení, ale i pro výzkumné účely stanovit přesnou analytickou koncentraci BR, zejména měřit nízké koncentrace. V klinických laboratořích je kladen důraz na jednoduché a rychlé analytické metody. Za zmínku stojí, že po mnoho let sloužilo k rychlému stanovení koncentrace BR pouhé porovnání barvy séra s barvou příslušného standardu. Pozdější metody byly založeny na stanovení oxidačního produktu (BV), spektrofotometrickém stanovením (*Jirsa and Jirsova 1959*) či na měření tzv. ikterického indexu (*Puppalwar 2012*). Dnes se v rutinní praxi BR stanovuje diazoreakcí, ve které BR reaguje s diazotovanou kyselinou sulfanilovou a to buď přímo, bez akcelérátoru (konjugovaný BR), anebo nepřímo (reaguje až po přidání akcelérátoru, nekonjugovaný) (*Watson 1961*). Používání pojmů volný BR (nekonjugovaný), konjugovaný BR, delta BR (**Obr. 12**), má tedy historický základ a nesouvisí s fyzikálně chemickými vlastnostmi BR. Již v roce 1980 bylo poukázáno na to, že přímou diazoreakci může poskytovat nejenom konjugovaný BR, ale i nepatrná část nekonjugovaného (*Killenberga, Stevens et al. 1980*). Ačkoliv diazoreakce patří mezi levné a rychlé stanovení a možnost falešně pozitivních

výsledků bývá zohledňována, referenční hodnoty vydané v různých laboratořích se mohou lišit až o desítky procent (zejména díky reakčnímu času, teplotě či promotoru diazoreakce) (Puppalwar 2012).



Obr. 12: Delta-bilirubin, kovalentně vázaný na albumin.

Z tohoto důvodu jsou s progresivním rozvojem detekčních technologií v posledních letech studovány a zaváděny alternativní metody stanovení koncentrace BR v biologické matrici. Za zmínku stojí enzymatické metody za použití enzymu křenové peroxidasy, který oxiduje BR na bezbarvé produkty. Koncentrace BR je pak stanovena z poklesu absorbance (Brodersen and Bartels 1969). U novorozenců se můžeme často setkat s neinvazivním fotometrickým transkutánním stanovením BR tzv. ikerometrem (bilirubinometr). Získaná koncentrace BR je čistě orientační, nicméně snižuje nutnost odběru krve novorozenců (Maisels 2015). Ovšem vzhledem k neurotoickým účinkům nekonjugované hyperbilirubinémie u novorozenců (**kap. 1.3.1**), kdy zejména u dětí s nízkou porodní váhou je znalost přesné koncentrace BR extrémně důležitá, je snaha mnoha laboratoří zavádět nové precizní analytické metody stanovení BR či jeho fotoizomerů v různých biologických materiálech, a to pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) či kapalinové

chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS), kde je potřebný objem vzorku minimální (v jednotkách do desítek μL).

Pro výzkumné účely byla v naší laboratoři zavedena metoda vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s UV/VIS detekcí umožňující stanovení BR v nanomolárních koncentracích (Zelenka, Lenicek et al. 2008). BR je možno stanovit v séru, v buňkách či v tkáních. Tato metoda je postavena na extrakci BR v několika krocích, a to nejprve systémem metanol/chloroform/hexan, poté je BR extrahován do emulzní kapky vytvořené v nepolárním hexanu. Značná výhoda této metody spočívá zejména v její citlivosti a opakovatelnosti a slouží k výzkumným účelům nejenom naší laboratoře, ale i evropských a světových institucí a ke studiu patofyziologické role BR. Nicméně nevýhodou stále zůstává její časová náročnost, cena spotřebního materiálu a větší objem vzorku.

Pro stanovení fotoizomerů BR ve žluči, séru a moči byly pro výzkumné účely již v 80. letech zavedeny HPLC metody (Onishi, Kawade et al. 1980, McDonagh, Palma et al. 1982), jež byly v průběhu let modifikovány (Agati, Fusi et al. 1998, Itoh, Isobe et al. 1999, McDonagh 2014), Klasické HPLC metody jsou poslední dobou nahrazovány LC-MS, kdy lze dosáhnout vyšší citlivosti a zrychlení analýzy vzorku.

S rozvojem vědy a techniky lze v literatuře nalézt i nejnovější fyzikálně-chemické metody na stanovení BR. BR zde funguje např. jako senzor reakce. Např. zapnutí fluorescence na nanoclusteru BSA-CuNCs/ Fe^{3+} v přítomnosti BR (Jayasree, Aparna et al. 2018) či luminiscenční detekce BR ve vodném prostředí s použitím kvantových částic Mn:ZnS/L-cystein (Abha, Nebu et al. 2019). V roce 2013 byl japonskými vědci izolován a charakterizován protein UnaG ze svalů sladkovodních úhořů, který po konjugaci s BR silně fluoreskuje (Kumagai, Ando et al. 2013) (Broichhagen and Trauner 2013).

2 Cíle disertační práce

Cílem předkládané disertační práce byl výzkum protektivních účinků BR na experimentálních *in vivo* a *in vitro* modelech ve vztahu k zánětu a oxidačnímu stresu.

V rámci této práce byly řešeny následující problematiky:

- ✓ Genotypizace normo- a hyperbilirubinemických potkanů.
- ✓ Vliv BR na systémový zánět vyvolaný lipopolysacharidem *in vivo*.
- ✓ Izolace primárních hepatocytů z normo- a hyperbilirubinemických potkanů a studium vlivu BR *in vitro*.
- ✓ Efekt BR na oxidační stres *in vitro*.

Dílčím cílem práce bylo stanovit a validovat analytickou LC-MS/MS metodu na stanovení koncentrace BR a jeho fotooxidačního produktu v séru.

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie a materiál

Bio-Rad, USA: 4x-Laemmli vzorkový pufr, akrylamid, bisakrylamid

Bio-Techne R&D Systems, USA: Rat TNF-alpha Quantikine ELISA Kit

BioTech, USA: králičí primární monoklonální protilátka proti: β -aktinu, NF-kappa-B p65 XP, I-kappa-B-alpha, phospho-I-kappa-B-alpha (Ser32), médium: MEM Ham's, F12, Kaighn's Modification SH30526.01., Kolagen from rat tail II, proteináza K, FBS, L-glutamin, penicilin/streptomycin

Frontier Scientific, USA: mezobilirubin

Chromservis, ČR: kolona 00F-4248-E0 Luna 3 μ m C8(2) 100A HPLC kolona 150 x 4,6 mm, předkolonky pro SecurityGuard, Gemini C6-phenyl 4 x 3 mm

Merck, Německo: chloroform, metanol, n-hexan, ethylacetát, acetonitril

Penta, ČR: chloroform, etanol, fenol, glycerol, isopropylalkohol, EDTA, H_3PO_4 , $KHCO_3$, NaCl, NaOH, $NaHCO_3$, TRIS, Na_2SO_4 , HCl

Sigma-Aldrich, USA: Tumor nekrotizující faktor- α , Interleukin-1 β , Inzulin, Williamsovo médium E, BSA, LPS z *Escheria Coli* 0114:B4, BHT, TBA, MTT, BR, RNAlater, NH_4Cl , NH_4F , DMSO, b-merkaptetanol, glycin, TEMED, persíran amonný, triton X-100, inhibitory fosfatáz a proteináz, PMSF, Tween, kyselinchenodeoxycholová a, HSA, RSA, kyselina askorbová

ThermoFisher scientific, USA: kit pro reverzní transkripci High-Capacity cDNA, reverzní transkriptáza MultiScribe™, Master Mix TaqMan® Fast Advanced, MicroAmp® Optical adhezní fólie, pufr (western blot Strip), marker GeneRuler 50 bp DNA Ladder, MVAI

3.2 Genotypizace normo a hyperbilirubinemických potkanů

Hyperbilirubinemičtí potkani kmene Gunn s kongenitálním deficitem enzymu UGT1A1 (homozygoti, Gunn-Ugt1a1j/Slc) mají trvale zvýšenou koncentraci BR. Potkani kmene Gunn a normobilirubinemické kontroly byly dlouhodobě rozlišovány pouze na základě fenotypu (barva séra, barva srsti, koncentrace BR). Kvůli zpřesnění, zrychlení a pro standardizaci zařazení nově narozených potkanů a celého chovu byla zavedena metoda restriční analýzy (polymorfismus délky restričních fragmentů, RFLP) pro genotypizaci experimentálních zvířat použitých pro *in vivo* i *in vitro* studie.

3.2.1 Izolace gDNA

Potkanům byl odebrán malý kousek tkáně (odstřížení části levého ucha) a izolace gDNA probíhala fenol/chloroformovou extrakcí s přidavkem proteinázy K. Vzorky byly centrifugovány při 15000g, 15 min při 4 °C a vzniklá peleta byla promyta ledovým 70 % etanolem, vysušena, rozpuštěna ve 100 µl TE pufru (1 M TRIS-Cl, 0,5 M EDTA). Koncentrace a čistota gDNA byly stanoveny spektrofotometricky.

3.2.2 Polymerázová řetězová reakce-PCR

Pro PCR a následnou restriční analýzu (RFLP) byly navrženy primery L (5'-CCATCCCGAGTTCCTACAATG-3') a R (5'-TGACAGTTTAAAGGGCGTTTTTC-3'). PCR mix obsahoval kromě 5 pmol primerů 0,2mM dNTPs (směs dinukleotidtrifosfátů), 2,5 mM MgCl₂, SO₄ pufr (pufr pro Aptamer Tag pomylerasu) a 1,25 U Aptamer Tag polymerasy a 25 ng DNA templátu. Reakce probíhala při podmínkách 3 min 95 °C, 35 cyklů (95 °C 30 s, 58 °C 20 s, 72 °C 25 s) a 3 min 72 °C.

3.2.3 Štěpení DNA pomocí restriční endonukleasy

Ke štěpení ve vybraných místech části UGT1A1 sekvence byl vybrán enzym MvaI, který štěpí v místech **CC(A/T)GG**. 5 ul PCR produktu (**kap 3.2.2**) bylo štěpeno restriční endonukleasou MvaI dle doporučení výrobce (po dobu 2 hodin při 37°C v příslušném pufru). Výsledné produkty štěpení byly rozděleny gelovou elektroforézou na 2 % agarose a délka získaných fragmentů byla 276, 45 bp pro homozygoty (potkani Gunn), 276, 232, 45 bp pro heterozygoty a 232, 45 bp pro wildtype.

3.3 *In vivo* experimenty

Hyperbilirubinemické samice potkanů kmene Gunn a kontroly (n=10, váha 160-220g, věk 6 měsíců) byly chovány při laboratorní teplotě 24±2 °C s přísunem vody a granulované stravy ad libitum. Experimenty byly realizovány v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (409/2008) a vyhláškou O chovu a využití pokusných zvířat (207/2004) v prostorách 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze (Centrum pro experimentální biomedicínu, U nemocnice 5, Praha 2). Projekt pokusů *Role bilirubinu v regulaci zánětlivé odpovědi č.j. MSMT-25538/2018-2* byl schválen Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy.

Potkani byli náhodně rozděleni do dvou skupin: pokusné skupině byl jednorázově intraperitoneálně (i.p.) aplikován roztok LPS (6 mg na jeden kilogram tělesné hmotnosti zvířete), který byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku, kontrolní skupině byl aplikován ve stejném objemu fyziologický roztok. Po 12 hodinách působení byla zvířata usmrcena a byla jim z břišní tepny odebrána krev na biochemické analýzy. Vybrané orgány byly opláchnuty ledovým PBS pufrům a následně zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -80 °C. Na mRNA analýzu bylo odebráno 100 mg tkáně a ihned uloženo v *RNAlateru* a dále zpracováno dle protokolu výrobce.

3.3.1 Stanovení zánětlivých markerů

Krevní obraz a diferenciál byly měřeny v Centrálních výzkumných laboratořích, 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze automatickým analyzátozem XN-1000 (Sysmex, USA). Sérové parametry jaterního poškození celkový BR a aktivita alaninaminotransferasy (ALT), alkalické fosfatasy (ALP) a aspartátaminotransferasy (AST) byly stanoveny na automatickém analyzátoru (Modular, Roche, Německo).

3.3.2 Stanovení cytokinů

Vybrané cytokiny byly měřeny v séru kontrolních i potkanů kmene Gunn pomocí komerčních ELISA Duo-Setů pro IL-1 β /IL-1F2, IL-10, TNF- α a IL-6 (Bio-Techne R&D Systems, USA) a finální detekce probíhala za použití DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kitu (Bio-Techne R&D Systems, USA) dle postupu uvedeného výrobcem.

3.3.3 Stanovení lymfocytů průtokovou cytometrií

Pro analýzu průtokovou cytometrií bylo potkanům odebráno 250 μ L plné krve do sterilních zkumavek obsahující 3 % EDTA. Červené krvinky byly nejprve 2x lyzovány s ACK pufrem (0,15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA, pH 7,3) po dobu 15 a 5 minut a promyty 2x PBS. Následně byly buňky barveny pro panel T buněk. Nejprve byly buňky barveny za použití protilátek: anti-CD45-FITC (OX-1, Thermo Fisher Scientific), anti-CD4-BV-786 (OX-35, BD Biosciences), anti-CD8 α -PerCP-e710 (OX-8, Thermo Fisher Scientific), anti-CD62L-PE (OX-85, SONY) a anti-CD45RC-Alexa Fluor 647 (OX-22, SONY). Poté byly buňky fixovány a permeabilizovány intracelulárním kitem Anti-Mouse/Rat Foxp3 Staining Set APC (Thermo Fisher Scientific), inkubovány s protilátkou proti Foxp3 v PBS a blokace probíhala 15 min s 2 % potkaním sérem. Suspenze buněk byly analyzovány průtokovým cytometrem (BD LSR II včetně FACS Flow Supply of the High Throughput Sampler System, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) a data byla vyhodnocena

pomocí „single cell” softwaru FlowJo RNDr. Janem Svobodou, Ph.D. z mikrobiologického ústavu Akademie Věd, v. v. i.

3.3.4 Izolace mRNA

Celková mRNA z tkání a buněk byla izolovaná kitem GenUP™ Total RNA Kit (Biotechrabbit, Německo) a celková mRNA z krve byla izolována kitem Total RNA Mini Kit (Generaid, Tajwan). Vzorky tkání na izolaci mRNA byly vyjmuty z RNAlateru, zváženy a přidány do lyzačního pufru, který byl součástí kitu a následně 30 s homogenizovány ručním homogenizátorem TissueRuptor. Buňky byly opláchnuty 2 x 0,5 ml ledového PBS a lyzovány přímo na misce s lyzačním roztokem s β -merkaptoetanolem. Plná nesrážlivá krev byla přímo pipetována do lyzačního roztoku. Izolace RNA probíhala dle příslušného protokolu. Čistota a koncentrace mRNA byla spektrofotometricky ověřena na spektrofotometru NanoDrop při 260 nm. mRNA byla následně přepsána do cDNA High capacity cDNA reverse transcription Kitem (Thermo Fisher, USA) a uložena v -20 °C.

3.3.5 Kvantitativní real time PCR a stanovení exprese genů

cDNA sloužila jako templát pro stanovení exprese genů. Real time PCR byla připravena dle instrukcí výrobce za použití TaqMan® Fast Advanced Master Mix. Stanoveny byly geny pro interleukin-6 (IL-6, Rn01410330_m1), tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α , Rn99999017_m1), interleukin-10 (IL-10, Rn00563409_m1), interleukin-1 β (Rn00580432_m1), LBP (Rn00567985_m1) a β -2 mikroglobulin (Rn005608865_m1) jako kontrolní „housekeeping“ gen. Výsledky byly vyjádřeny jako změna exprese příslušného genu ve srovnání s kontrolami.

3.4 Purifikace komerčního nekonjugovaného bilirubinu

Komerčně dostupný BR izolovaný ze žluče a žlučových kamenů je směs izomerů IX α , III α a XIII α BR, která obsahuje i nechtěné množství mastných kyselin a fosfolipidů, které mohou následně zeslabovat vazbu na albumin, proto je vhodné BR před používáním přečistit. V rámci disertační práce byl používán modifikovaný postup purifikace komerčně dostupného BR bez přítomnosti světla (*McDonagh and Assisi 1972*).

100 mg komerčního BR bylo rozpuštěno v 180 ml chloroformu v Erlenmayerově baňce a zahříváno 10 min na vodní lázni při 61 °C. Roztok byl poté ochlazen na pokojovou teplotu a přefiltrován přes chloroformem navlhčený filtrační papír, filtrát byl rovnoměrně rozdělen do šesti skleněných 50 ml centrifugačních zkumavek. Filtrát byl poté promyt v pořadí 1x destilovaná H₂O, 2x 0,1 M NaHCO₃, 1x 10 % NaCl, 4x destilovaná H₂O, kdy při každém promytí byl obsah zkumavek 50x intenzivně protřepán a po ustálení vodné a chloroformové fáze byla horní vodná fáze s precipitátem odebrána.

Pro promytí a přečištění byl obsah zkumavek s chloroformovou fází zkombinován a přenesen do 3 čistých skleněných zkumavek s přídavkem Na₂SO₄. Roztoky byly důkladně promíchány a následně centrifugovány 5 minut při 1800 rpm. Supernatant byl filtrován přes chloroformem navlhčený papír do čisté Erlenmayerovy baňky a zahříváním na vodné lázni odpařen až do doby, kdy začal BR krystalizovat na stěnách nádoby. Za stálého míchání bylo přidáno 16 ml metanolu. Roztok byl poté odstaven z vodní lázně a po 5 minutách bylo přidáno dalších 16 ml metanolu.

Takto upravený roztok byl přenesen do dvou čistých centrifugačních zkumavek, centrifugován 5 minut při 1800 rpm a dále bylo pracováno pouze s peletou. Peleta byla 3x promyta metanolem, stočena 5 minut při 1800 rpm a supernatant byl vždy odstraněn. Po posledním promytí byla peleta přenesena do čisté skleněné zkumavky a lyofilizovaná přes

noc. Vzniklý přečištěný vysušený BR byl uložen v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v temnu a byl používán na všechny *in vitro* experimenty.

3.5 Rozpouštění bilirubinu

Díky špatné rozpustnosti BR lze v literatuře najít jako hlavní rozpouštědlo DMSO, nicméně samotné DMSO může ovlivňovat expresi řady genů, diferenciaci a některé vlastnosti jaterních buněk (*Pal, Mamidi et al. 2012*). V rámci této disertační práce byl proto purifikovaný BR rozpouštěn dle (*Zelenka, Lenicek et al. 2008*) s malou modifikací, tedy 2,8 mg BR bylo rozpouštěno ve 2 ml 0,1 M NaOH a ihned zneutralizováno s 1 ml 0,1 M H_3PO_4 . BR byl poté smíchán s 7 ml roztoku BSA (660 μM). Tento zásobní roztok byl uložen v alikvotech při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pro další experimenty naředěn na pracovní koncentrace s 660 μM BSA ve fosfátovém pufru (pH=7).

3.6 *In vitro* experimenty

3.6.1 Izolace a kultivace primárních hepatocytů

Hyperbilirubinemičtí samci potkanů kmene Gunn a normobilirubinemické kontroly (n=4, váha 200-220g, věk 6 měsíců) byli chováni při laboratorní teplotě $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ s přísunem vody a granulované stravy ad libitum. Primární hepatocyty (PH) byly izolovány dvoufázovou kolagenázovou metodou dle (*Berry, Grivell et al. 1997*). Buněčná viabilita PH byla stanovena barvením trypanovou modří (75-85%) a izolované hepatocyty byly naředěny ve Williamsově médiu s přidavkem 1 % penicilinu/streptomycinu, 1 % L-glutaminu, 0,06 % insulinu a 5 % FBS. PH byly vysety na misky potažené kolagenem (Colagen from rat tail II) a 3 hodiny inkubovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 . Neuchycené buňky byly po 3 hodinách odstraněny promytím a přidavkem nového média. Druhý den byly PH kultivovány s kompletním médiem obsahující BR (10-100 μM) a TNF- α (12-100 ng/ml) po dobu 0-24 h. Buněčná viabilita byla měřena MTT testem (**kap. 3.6.2**) intracelulární koncentrace BR byla

měřena HPLC (**kap. 3.6.3**), dále byla měřena exprese mRNA cytokinů pomocí qPCR (**kap. 3.3.5**) a relevantních proteinů metodou Western blot (**kap. 3.6.9**).

3.6.2 Test viability MTT

Buněčná viabilita PH byla stanovena MTT testem (thiazolyl blue tetrazolium bromid, Sigma, USA). Buňky byly kultivovány v 96-jamkových destičkách po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách bylo kultivační médium odsáto a buňky inkubovány 1 hodinu s novým médiem obsahujícím MTT (v koncentraci 1 mg/ml). Médium bylo odstraněno a k obarveným buňkám byl poté přidán DMSO. Intenzita fialového formazanu odpovídá aktivitě mitochondriálních oxidoreduktas a tedy i buněčné viabilitě (*Ferrari, Fornasiero et al. 1990*). Absorbance byla měřena při vlnové délce 570 nm spektrofotometrem Sunrise (Tecan, Rakousko).

3.6.3 Stanovení intracelulární koncentrace bilirubinu

Pro stanovení intracelulární koncentrace BR metodou HPLC na reverzní fázi s UV/VIS detekcí (*Zelenka, Lenicek et al. 2008*) byl BR izolován z buněk. Izolace probíhala v temnu při laboratorní teplotě. Suspenze buněk (seškrábána z Petriho misek, stočena a sonikována) byla pipetována do plastové zkumavky. Ke vzorkům byl přidán 1 mg antioxidantu BHT a 50 μ l vnitřního standardu mezobilirubinu (5 μ M v DMSO). Vzorky byly extrahovány do 6 ml směsi metanol/chloroform/n-hexan (40:20:4 v/v/v) a mixovány 30 sekund. Poté bylo ke vzorkům přidáno 4,5 ml extrakčního pufru (50 mM fosfátový pufr, 150 mM NaCl a 5 mM EDTA) a směs byla dalších 30 sekund vortexována a následně stočena 5 min při 1000xg. Spodní organická fáze obsahující BR byla přenesena do nové čisté zkumavky s 2 ml n-hexanu a 50 μ l pufru (100 mM uhličitanový pufr, pH 10, 5 mM EDTA), promixována 30 s a centrifugována 2 minuty, 1000xg. Po centrifugaci byla na rozhraní organické fáze vytvořena vodní kapka, která byla nasáta do 100 μ l skleněné stříkačky

(Hamilton, Bonaduz, Switzerland) a ihned ručním nástřikem dávkována do 50 μ l smyčky HPLC kolony.

Separace probíhala na koloně Luna 3 μ m C8(2) 150 x 4,6 (předkolonka SecurityGuard, Gemini C6-phenyl 4 x 3 mm) izokraticky při průtoku 0,5 ml/min a teplotě 45 °C. Složení mobilní fáze odpovídalo 450 g metanolu, 300 g H₂O, 7,5 ml TBA, pH 9,2. Mobilní fáze byla připravena do skleněných lahví a před použitím byla přefiltrována a sonikována v ultrazvukové lázni. Detekce BR probíhala při 453 nm a plocha píku byla vztažena k ploše vnitřního standardu mezobilirubinu (5 μ M v DMSO).

3.6.4 Experimenty s buněčnými kulturami

Pro druhou část práce zabývající se rolí BR při oxidačním stresu byly použity dvě buněčné linie a to lidská neuroblastomová buněčná linie SH-SY5Y (ATCC, Manassas, VA, USA), která byla kultivována v minimálním esenciálním médiu Eagle (MEM) a Hamově F-12 médiu (1:1) s 15 % FBS a buněčná linie lidského hepatoblastomu HepG2 (ATCC, Manassas, VA, USA) v MEM s 10 % FBS, 5 % CO₂ při 37 °C ve zvlhčené atmosféře. Autentizace použitých buněčných linií byla potvrzena nezávislou laboratoří metodou založenou na akreditované analýze krátkého tandemového opakování.

Buňky SH-SY5Y a HepG2 byly nasazeny na 6-jamkové destičky v koncentraci 50 000 buněk/cm² a ovlivněny silným induktorem tvorby ROS kyselinou chenodeoxycholovou (CDCA) (80 μ M) a BR (1 μ M) po dobu 4 hodin. Po inkubační době byly buňky lyzovány a zpracovány pro další experimenty (**kap 3.6.6-3.6.9**).

3.6.5 Měření intracelulární produkce ROS

Produkce ROS byla stanovena s použitím fluorescenční sondy 5-(a-6) chlormethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceinu diacetátu acetylesteru (CM-H₂DCFDA, Life Technologies, USA). Buňky SH-SY5Y byly pěstovány ve 12-jamkových destičkách do 80 % konfluence. Poté byly buňky inkubovány s CDCA (80 μ M) nebo s antioxidantem BR (1 μ M) po dobu 24 hodin. Po inkubaci byly buňky 2x promyty PBS a k buňkám byl přidán 10 μ M CM-H₂DCFDA a následovala další inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C ve tmě. Prebytečné barvivo bylo odstraněno promytím PBS. Fluorescence byla měřena na fluorimetru při excitační (485 nm) a emisní (540 nm) vlnové délce (SynergyHTX, BioTek, USA). Buňky byly dále lyzovány (lyzační puf, Cell Signaling Technology, USA) a koncentrace proteinu byla měřena dle kap. 3.6.7. Data byla normalizována na obsah proteinu a vyjádřena jako % kontrol.

3.6.6 Izolace proteinových extraktů

Z PH a buněčných kultur SH-SY5Y a HepG2 byl izolován celkový proteinový extrakt a použit na analýzy pomocí Western blotu (**kap. 3.6.9**). Buňky na Petriho miskách byly 2x omyty ledovým PBS, pH 7,4 a k buňkám bylo přidáno 300 μ L lyzačního pufu (5M NaCl, 1M Tris pH=8, 10 % Triton-X 100, komplex inhibitorů fosfatů a proteinkinas, 0,01 mM PMSF). Buňky byly 10 minut inkubovány na ledu při mírném třepání (200 rpm) a poté seškrábány, sonikovány 5 sekund a následně centrifugovány 10 min, 14 000xg při 4 °C. Supernatant byl použit na stanovení koncentrace proteinů a následnou elektroforetickou separaci a Western blot.

3.6.7 Stanovení koncentrace proteinů

Celková koncentrace proteinů byla stanovena kitem Bio-Rad DC Protein Assay (Biorad, USA). Kalibrační křivka byla připravena ze zásobního roztoku BSA 2 mg/ml,

vzorky byly uchovávány na ledu. Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 5 μL bodu kalibrace (0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 BSA mg/ml) a příslušného vzorku v dubletu (ředění 10x, 25x 50x). Do každé jamky bylo přidáno 25 μL činidla A a následně 200 μL činidla B. Vzorky byly inkubovány 10 minut v temnu a třepány při 150 rpm. Spektrofotometrické stanovení probíhalo při 750 nm a celková koncentrace proteinu byla spočítána z rovnice regrese kalibrační přímky.

3.6.8 Elektroforetická separace proteinů

Vzorky (**kap 3.6.1 a 3.6.4**) byly nejprve naředěny na stejnou koncentraci proteinů pomocí lyzačního pufru (5M NaCl, 1M Tris pH=8, 10 % Triton-X 100, komplex inhibitorů fosfatas a proteinkinas, 0,01 mM PMSF) a ke vzorkům byl přidán pufr (4x Laemmli Sample buffer, Biorad) a $\frac{1}{4}$ objemu β -merkaptoetanolu. Vzorky byly denaturovány 10 minut při 95 $^{\circ}\text{C}$.

35-40 μg vzorku bylo rozděleno dle elektroforetické pohyblivosti pomocí elektroforesy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Separační gel 12 % (1,5 M TrisCl, pH 8,8; 30 % akrylamid/bisakrylamid 37,5:1; 10 % SDS; 25 μL persíran amonný, 5 μL TEMED) byl nalit mezi vertikální elektroforetická skla (1 mm, Bio-Rad) a převrstven vodou. Po polymeraci byl gel převrstven 4 % zaostřovacím gelem (0,5 M TrisCl, pH 6,8; 30 % akrylamid/bisakrylamid 37,5:1; 12,5 μL persíran amonný, 2,5 μL TEMED). Gely byly vloženy do elektroforetické vany a zality pufrem (25 mM Tris; 250 mM glycin; 3,5 mM SDS; pH 8,8). Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí 200 mV po dobu 60 minut.

3.6.9 Western blot

Rozdělené proteiny byly z gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu (Protran nitrocelulózová membrána, póry 0,45 μm , Whatman) pomocí elektropřenosu v blotovací

aparatuře firmy Bio-Rad v blotovacím Towbin pufru (25 mM Tris; 0,2 M glycin; 20% metanol). Elektropřenos probíhal na ledu po dobu 90 minut při konstantním napětí 100 mV a maximálním proudu 350 mA. Dále byly membrány blokovány v 5 % BSA v TTBS (1,0 M tris-HCl 1,5 NaCl 0,1 % tween-20) po dobu 1,5 hodiny a po promytí 10 minut v TTBS inkubovány s primárními protilátkami v 1 % BSA v TTBS anti phospho-NF- κ B p65 (Ser536) (ředění 1:2000), anti NF- κ B p65 (ředění 1:3500), anti I κ B- α (ředění 1:3500), anti phospho-I κ B- α (Ser132) (ředění 1:1500), anti IKK β (ředění 1:3500), anti phospho-IKK α/β (Ser176/180) (ředění 1: 1500) a anti β -aktin (ředění 1:5000) (všechny od Cell Signaling Technology, MA, USA) přes noc při 4 °C. Pro druhou část experimentů byla použita primární protilátka proti GM3 syntase (ředění 1:2000, Santa Cruz sc- 365329, USA) a P-aktin (1: 2000; Cell Signaling Technology, USA). Po promytí 3x10 minut v TTBS byly membrány inkubovány 1 hodinu s prasečí sekundární protilátkou anti-Rabbit IgG-HRP (ředění 1:3333, Dako, USA) nebo králičí anti-mouse IgGK BP-HRP (Santa Cruz, USA). K vizualizaci proteinů byl použit ECL Kit (LumiGlo, Cell Signaling Technology, USA) a ke kvantifikaci signálu detekční zařízení Fusion Fx7 se softwarem Bio-2D (Vilber Lourmat, France). Výsledky byly normalizovány na množství β -aktinu a P-aktinu.

3.6.10 Kvantitativní real time PCR a stanovení exprese genů

Vzorky PH a buněčných kultur byly skladovány v lyzačním pufru při teplotě -80 °C a celková RNA byla izolována za použití kitu PerfectPure RNA Cell Kit (5Prime, USA). Dále bylo se vzorky PH pracováno, jak je uvedeno v **kap. 3.3.4** a **3.3.5**. U buněčných kultur byla stanovena exprese mRNA GM3 syntasy (St3GalV, Mm00488237_m1) a HPRT (Hs01105379_m1) a data byla normalizována na kontrolní gen HPRT.

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

4.1.1 Příprava kalibračních roztoků

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

4.1.2 Příprava vzorků na LC-MS/MS analýzu

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

5.1 Statistické vyhodnocení

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

4 Výsledky

4.1 Genotypizace normo a hyperbilirubinemických potkanů

Hyperbilirubinemičtí potkani kmene Gunn mají recesivní mutaci (delece báze G na devátém chromosomu, ve čtvrtém exonu genu pro UGT1A1), což má za následek posun čtecího rámce a předčasný stop kodon, absenci enzymové aktivity UGT1A1 a hyperbilirubinémii. Vzhledem vysoké koncentraci BR jsou potkani kmene Gunn zvířecí model Criglerova-Najjarova syndromu typu I (*Iyanagi 1991*). Pro charakterizaci všech potkanů byla zavedena metoda genotypizace Gunn pomocí RFLP analýzy. Vybraná část sekvence genu UGT1A1, včetně sekvence primerů a restrikčního místa je uvedeno na **Obr. 13**. PCR produkty po restrikci MvaI pro homozygoty (276 bp), heterozygoty (276, 232 bp) a wildtype (232 bp) jsou uvedeny na **Obr. 14**.

```
cacttctctc tcccctcccc catccccgagt tcctacaatg atcacaggaa gataacagtc
cctgggggat tctcagaatc tagacattgt aagtctggac agctcatcga ccctctctgt
tgtgcttctc aggtcatcca aaggctcggg cgttcatcac aactcgggt tcccatggta
tttatgaagg aatatgcaat ggggttccaa tggatgatgat gcccttggtt ggtgatcaga
tggacaacgc caagcgcgatg gaaactcggg gagctggggt gaccctgaat gtcctg(g/-)aaa
tgactgccga tgatttgga aacgccctta aaactgtcat caataacaag aggtcagtaa
tagaaaagaa caaacgaaac caaaaaaatc caaaaaaaaa gaaaaagaaa aaactacttg
```

Obr. 13: a) Vybraná část sekvence genu UGT1A1. Červeně je zvýrazněno místo mutace, vybrané primery jsou zvýrazněny šedě. Restrikční místa enzymu MvaI jsou podtržena.



Obr. 14: PCR produkty po restrikci *MvaI*. 1) neštěpený produkt (320 bp, 45 bp), 2) marker 3) wild type homozygot (232 bp, 45 bp), 4) heterozygot (276 bp, 232 bp, 45 bp), 5) homozygot Gunn (276 bp, 45bp). Krátké fragmenty (45 bp) nejsou viditelné.

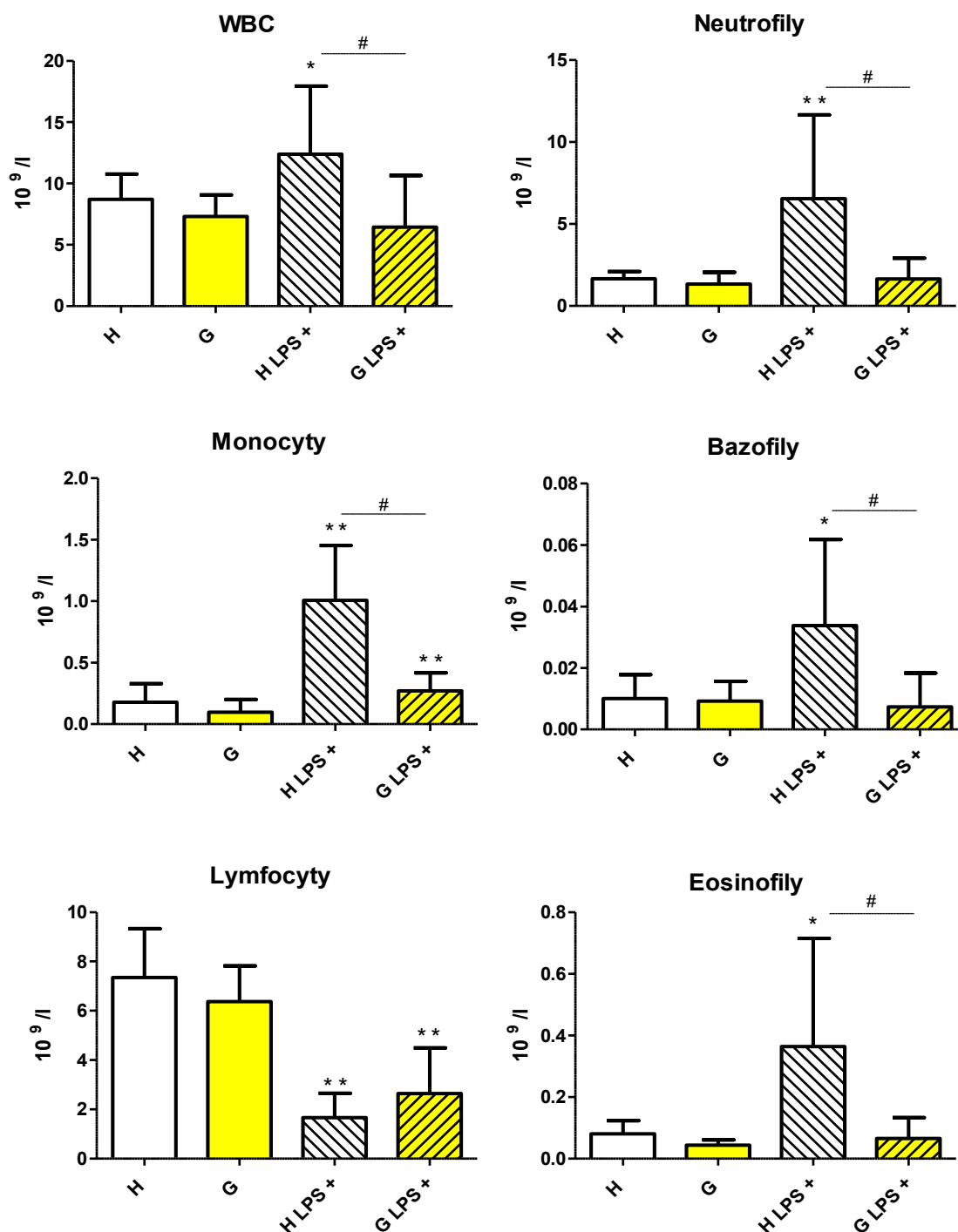
4.2 *In vivo* experimenty

4.2.1 Stanovení zánětlivých markerů

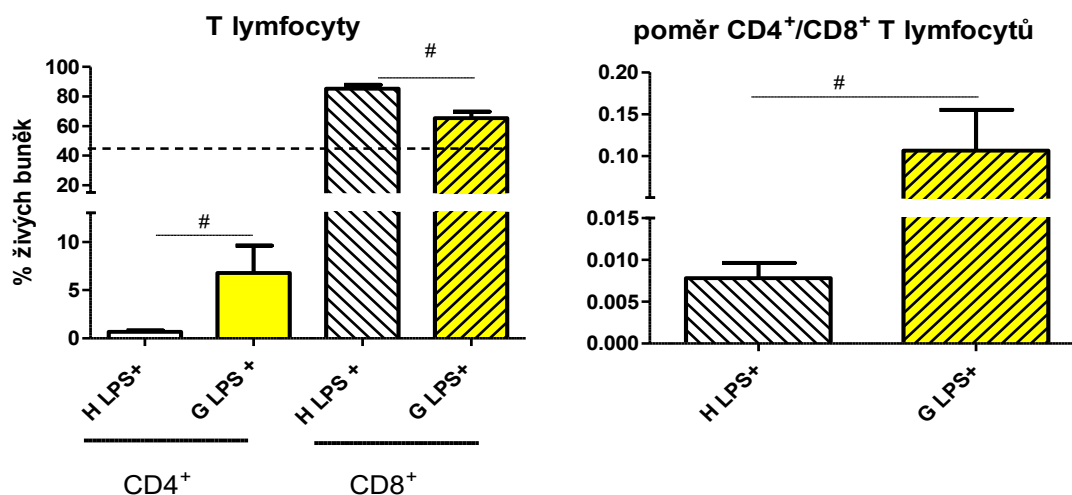
Pro vyhodnocení vlivu BR na systémový zánět byly z odebrané plné krve hyper a normobilirubinemických potkanů nejprve stanoveny markery systémového zánětu. Celkový počet bílých krvinek (WBC) byl zvýšen u kontrolních potkanů po aplikaci LPS (8.70 ± 1.94 vs. $12.39 \pm 5.26 \times 10^9 /l$, $p < 0,05$), zatímco u hyperbilirubinemických potkanů nebyl nárůst WBC po aplikaci LPS pozorován. Na zánět vyvolaný LPS reagovali kontrolní potkani signifikantním zvýšením počtu neutrofilů, monocytů, bazofilů, eozinofilů a snížením lymfocytů (396 ± 301 % $p < 0,01$; 565 ± 242 % $p < 0,01$; 338 ± 271 % $p < 0,05$; 448 ± 419 % $p < 0,05$ a 23 ± 13 % $p < 0,01$). Nicméně nárůst těchto parametrů byl u hyperbilirubinemických potkanů po aplikaci LPS významně slabší (neutrofilů 122 ± 91 % $p < 0,05$; monocytů 279 ± 147 % $p < 0,05$, eozinofilů, 149 ± 149 % $p < 0,5$ a lymfocyty 41 ± 28 %, $p < 0,08$) (**Obr. 15**).

Následně nás zajímal vliv BR na jednotlivé subpopulace T lymfocytů a jeho případný vliv na imunitní systém, proto byly měřeny změny v populaci krevních T lymfocytů u obou zvířecích modelů po aplikaci LPS. Po vyvolání zánětu jsme pozorovali nižší počet CD4⁺T buněk a vyšší počet CD8⁺T buněk u obou zvířecích modelů oproti kontrolám, nicméně tato změna byla u hyperbilirubinemických potkanů významnější oproti heterozygotům jak u CD4⁺T i u CD8⁺T buněk ($p < 0,05$, **Obr. 16**). Zároveň poměr CD4⁺/CD8⁺T, markeru imunitní aktivace (*Bruno, Saracino et al. 2017*), byl signifikantně vyšší u potkanů kmene Gunn oproti heterozygotům ($p < 0,05$) (**Obr. 16**).

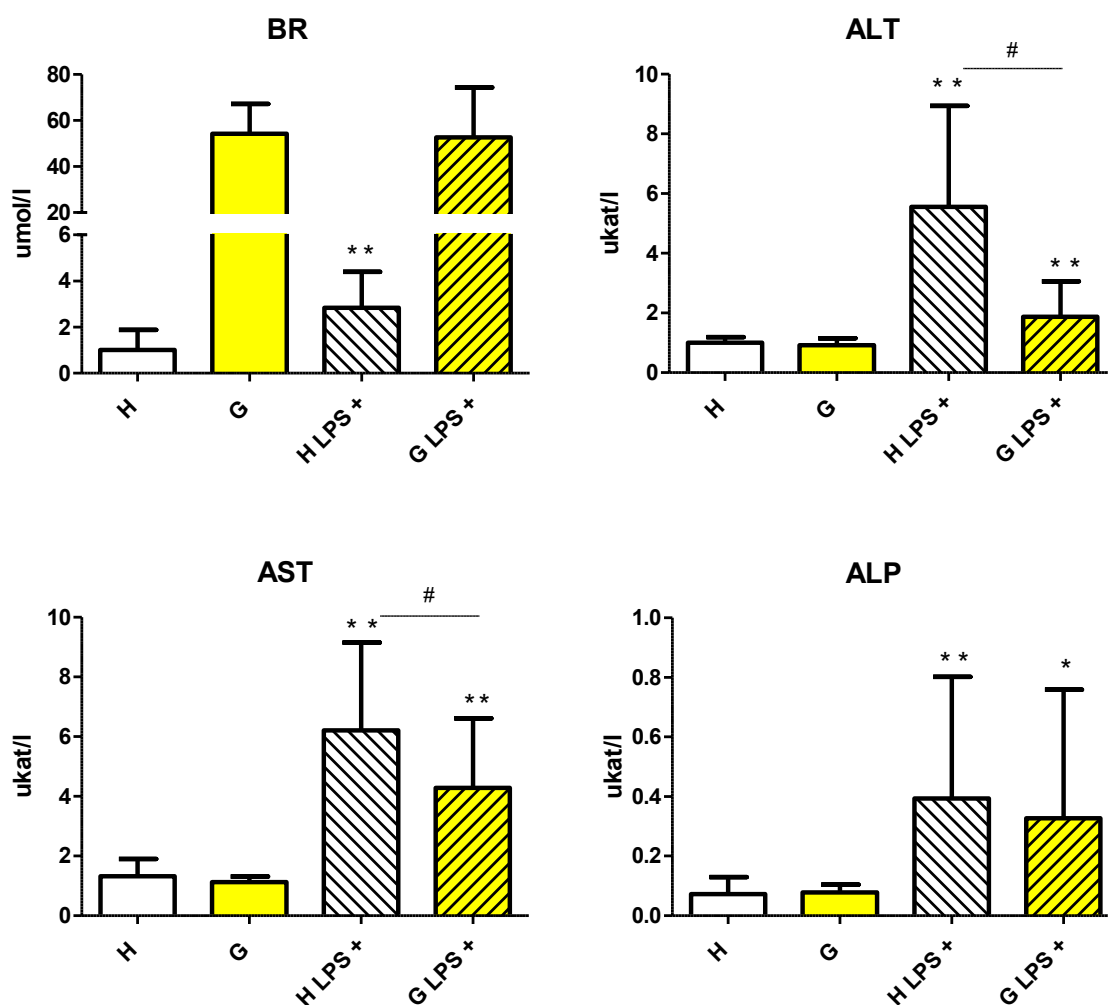
Ze séra výše uvedených potkanů byly dále stanoveny markery jaterního poškození. U normobilirubinemických potkanů došlo po aplikaci LPS k nárůstu celkové koncentrace BR ($1,01 \pm 0,83$ vs. $2,81 \pm 1,51$ $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,01$), zatímco u hyperbilirubinemických potkanů nebyl nárůst BR po aplikaci LPS pozorován ($54,53 \pm 11,22$ vs. $52,8 \pm 20,75$ $\mu\text{mol/l}$). Zvýšení aktivity ALT, markeru hepatocelulárního jaterního poškození, bylo po aplikaci LPS signifikantně oslabeno u hyperbilirubinemických potkanů ve srovnání s kontrolami ($1,87 \pm 1,14$ vs. $5,55 \pm 3,32$ $\mu\text{kat/l}$, $p < 0,05$), stejně tak jako aktivita AST, markeru nekrózy hepatocytu ($4,28 \pm 2,26$ vs. $6,22 \pm 2,88$ $\mu\text{kat/l}$, $p < 0,05$). Aktivita ALP, markeru cholestatického poškození, byla signifikantně zvýšená jak u normobilirubinemických tak i hyperbilirubinemických potkanů po aplikaci LPS, nicméně bez signifikantního rozdílu mezi oběma zvířecími modely (**Obr. 17**).



Obr. 15: Vliv zánětu a hyperbilirubinémie na krevní obraz s diferencíalem. Z plné krve normobilirubinemických kontrolních potkanů (H nebo H LPS+) a hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn (G nebo G LPS+) byly po 12 h aplikace LPS (6 mg/kg i.p.) nebo fyziologického roztoku stanoveny dané parametry. * $p < 0,05$ proti odpovídající kontrole, ** $p < 0,01$ proti odpovídající kontrole, # $p < 0,05$ proti skupině ovlivněné LPS.



Obr. 16: Vliv zánětu a hyperbilirubinémie na počet T lymfocytů a poměr CD4⁺/CD8⁺ T lymfocytů. Z plné krve normobilirubinemických kontrolních potkanů (H LPS+) a hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn (G LPS+) byly po 12 h aplikace LPS (6 mg/kg i.p.) stanoveny dané parametry. * $p < 0,05$ proti odpovídající kontrole, # $p < 0,05$ proti skupině ovlivněné LPS.



Obr. 17: Vliv zánětu a hyperbilirubinémie na markery jaterního poškození. Ze séra normobilirubinemických kontrolních potkanů (H nebo H LPS+) a hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn (G nebo G LPS+) byla po 12 h aplikace LPS (6 mg/kg i.p.) nebo fyziologického roztoku stanovena koncentrace BR a aktivity ALT, AST a ALP, * $p < 0,05$ proti odpovídající kontrole, ** $p < 0,01$ proti odpovídající kontrole, # $p < 0,05$ proti skupině ovlivněné LPS.

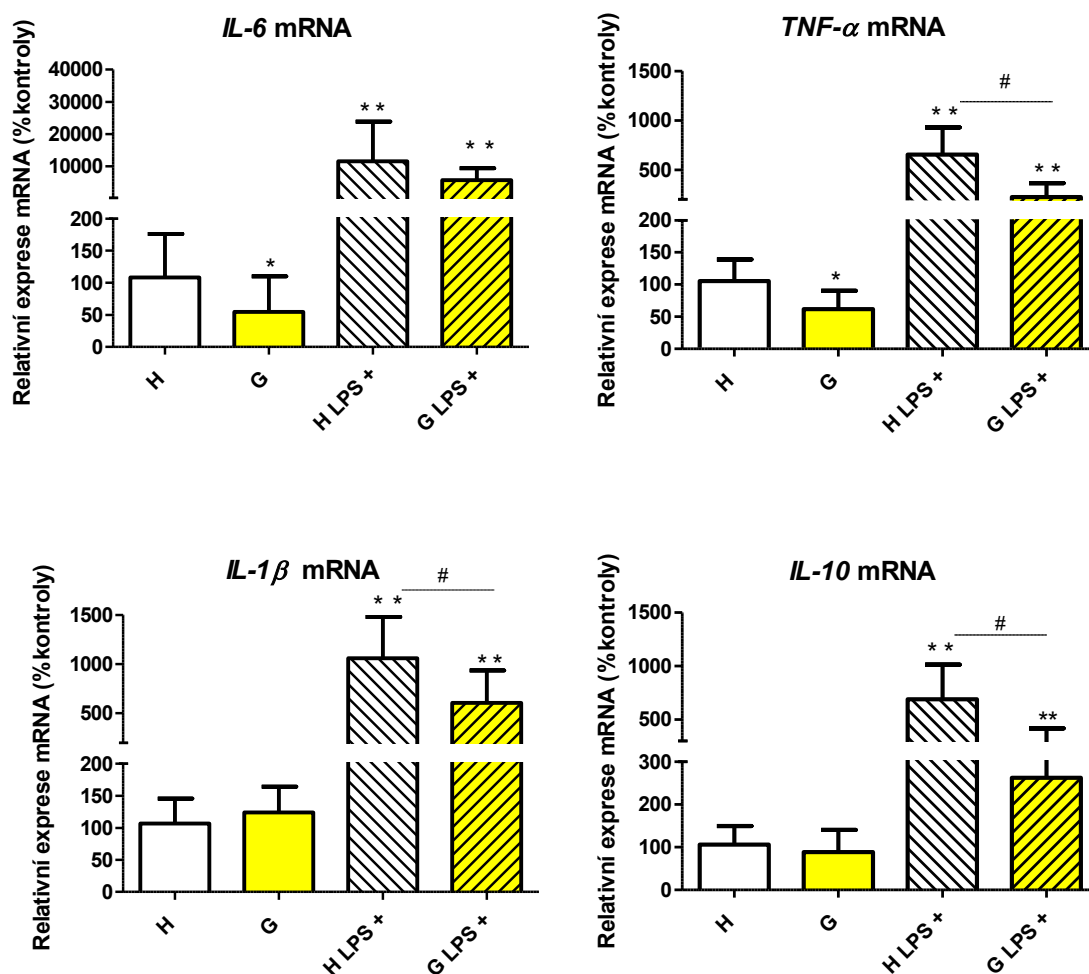
4.2.2 Stanovení exprese mRNA a sérové koncentrace cytokinů

Pro detailnější pochopení vlivu BR na systémový zánět byla měřena exprese mRNA vybraných zánětlivých cytokinů a to v játrech (**Obr. 18**) i z plné krve (**Obr. 19**) normobilirubinemických a hyperbilirubinemických potkanů. Zajímaly nás nejenom změny po vyvolání zánětu LPS, ale i případné rozdíly ve studovaných parametrech v bazálním stavu. U hyperbilirubinemických potkanů byla po 12 hodinách bez vlivu LPS v jaterní tkáni detekována nižší exprese mRNA prozánětlivých cytokinů IL-6 ($50 \pm 49 \%$, $p < 0,05$) a TNF- α ($59 \pm 26 \%$, $p < 0,05$) oproti normobilirubinemickým jedincům, u ostatních cytokinů nebyly tyto rozdíly pozorovány. Po 12 hodinách působení LPS bylo pozorováno významné zvýšení exprese mRNA prozánětlivých jaterních cytokinů TNF- α ($34 \pm 21 \%$, $p < 0,05$), IL1- β ($57 \pm 30 \%$, $p < 0,05$) a proti-zánětlivého IL-10 ($40 \pm 22 \%$, $p < 0,05$), nicméně tento nárůst byl signifikantně nižší u hyperbilirubinemických potkanů ve srovnání s normobilirubinemickými jedinci.

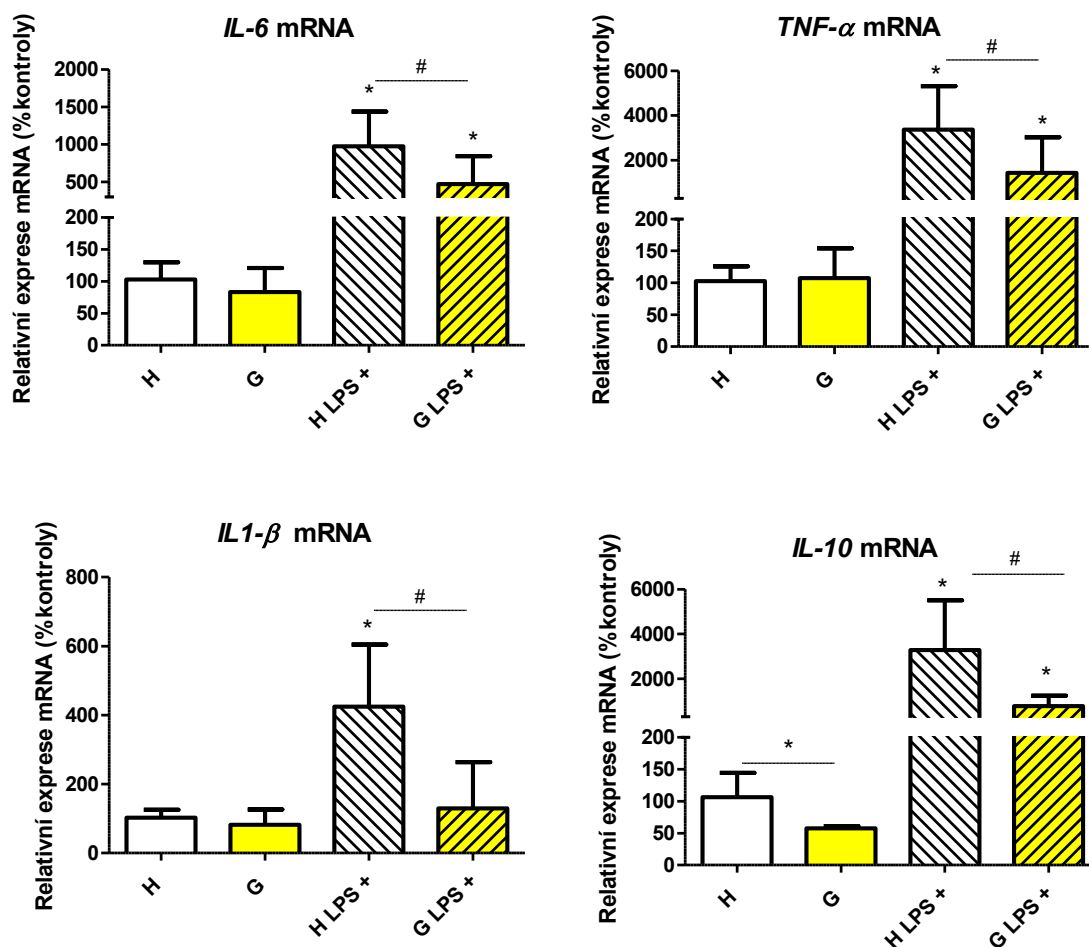
Podobné výsledky byly získány při měření exprese mRNA výše uvedených cytokinů z plné krve. U hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn byly exprese mRNA všech cytokinů IL-6, TNF- α , IL1- β a IL-10 po 12 hodinách působení LPS signifikantně nižší než u normobilirubinemických kontrol ($49 \pm 35 \%$, $43 \pm 43 \%$, $31 \pm 28 \%$ a $24 \pm 13 \%$, $p < 0,05$). Zároveň exprese mRNA protizánětlivého IL-10 byla u hyperbilirubinemických potkanů signifikantně snížena ($54 \pm 03 \%$, $p < 0,05$) i před aplikací LPS.

Abychom potvrdili, že výše pozorované změny na úrovni exprese mRNA proteinů odráží i jejich funkční vliv, stanovili jsme sérové koncentrace vybraných cytokinů z odebrané krve všech experimentálních potkanů. U neléčených normo- a hyperbilirubinemických skupin byla koncentrace všech vybraných cytokinů pod limitem detekce ELISA stanovení. Nicméně pozorované změny v koncentracích cytokinů po

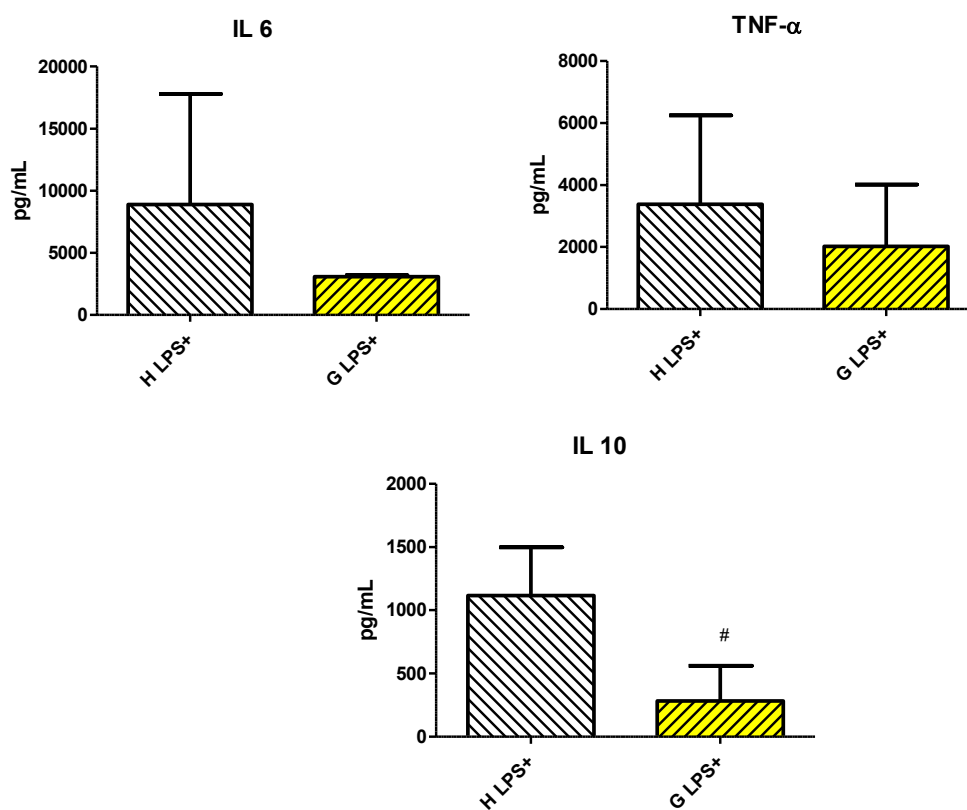
aplikaci LPS korelovaly s výsledky exprese mRNA daných proteinů (ačkoliv koncentrace cytokinu IL-1 β byla i po aplikaci LPS mimo limit detekce u obou experimentálních skupin). U hyperbilirubinemických potkanů byla změřena nižší koncentrace cytokinů IL-6 (35 \pm 1 %), TNF- α (60 \pm 56 %) i IL-10 (25 \pm 23 %, $p < 0,05$) ve srovnání s normobilirubinemickými kontrolami (**Obr. 20**)



Obr. 18: Vliv zánětu a hyperbilirubinémie na exprese mRNA jaterních cytokinů. Z jater normobilirubinemických kontrolních potkanů (H nebo H LPS+) a hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn (G nebo G LPS+) byly po 12 h aplikace LPS (6 mg/kg i.p.) nebo fyziologického roztoku stanoveny exprese mRNA IL-6, TNF- α , IL1- β a IL-10. * $p < 0,05$ proti odpovídající kontrole, ** $p < 0,01$ proti odpovídající kontrole, # $p < 0,05$ proti skupině ovlivněné LPS.



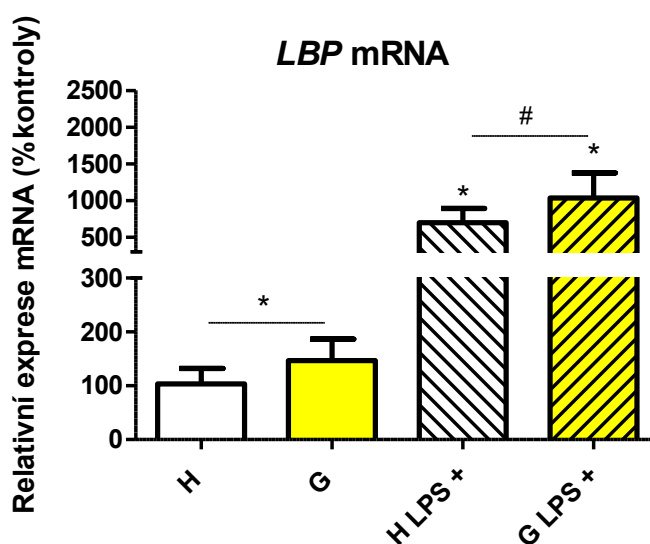
Obr. 19: Vliv zánětu a hyperbilirubinémie na exprese mRNA vybraných cytokinů stanovených z krve. Z plné krve normobilirubinemických kontrolních potkanů (H nebo H LPS+) a hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn (G nebo G LPS+) byly po 12 h aplikace LPS (6 mg/kg i.p.) nebo fyziologického roztoku stanoveny exprese mRNA IL-6, TNF- α , IL1- β a IL-10. * $p < 0,05$ proti odpovídající kontrole, ** $p < 0,01$ proti odpovídající kontrole, # $p < 0,05$ proti skupině ovlivněné LPS.



Obr. 20: Vliv zánětu a hyperbilirubinémie na koncentraci cytokinů v séru. Ze séra normobilirubinemických kontrolních potkanů (H nebo H LPS+) a hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn (G nebo G LPS+) byly po 12 h aplikace LPS (6 mg/kg i.p.) měřeny koncentrace IL-6, TNF- α a IL-10. # $p < 0,05$ proti skupině ovlivněné LPS.

4.2.3 Stanovení exprese mRNA proteinu vázajícího LPS (LBP)

Odezva organismu na systémový zánět vyvolaný LPS je modulována proteinem akutní fáze zánětu LBP, který je sekretován játry během kontaktu s LPS. Abychom zjistili, zda může hyperbilirubinémie ovlivnit produkci LBP, měřili jsme v játrech experimentálních zvířat exprese mRNA LBP. Zjistili jsme vyšší exprese LBP u hyperbilirubinemických potkanů před ($142 \pm 37 \%$, $p < 0,05$) i po aplikaci LPS ($148 \pm 48 \%$, $p < 0,05$) ve srovnání s normobilirubinemickými kontrolami, **Obr. 21**



Obr. 21: Vliv zánětu a hyperbilirubinémie na expresi mRNA LBP. Zjater normobilirubinemických kontrolních potkanů (H nebo H LPS+) a hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn (G nebo G LPS+) byly po 12 h aplikace LPS (6 mg/kg i.p.) nebo fyziologického roztoku stanoveny exprese mRNA LBP. * $p < 0,05$ proti odpovídající kontrole, ** $p < 0,01$ proti odpovídající kontrole, # $p < 0,05$ proti skupině ovlivněné LPS.

4.3 *In vitro* experimenty s primárními hepatocyty

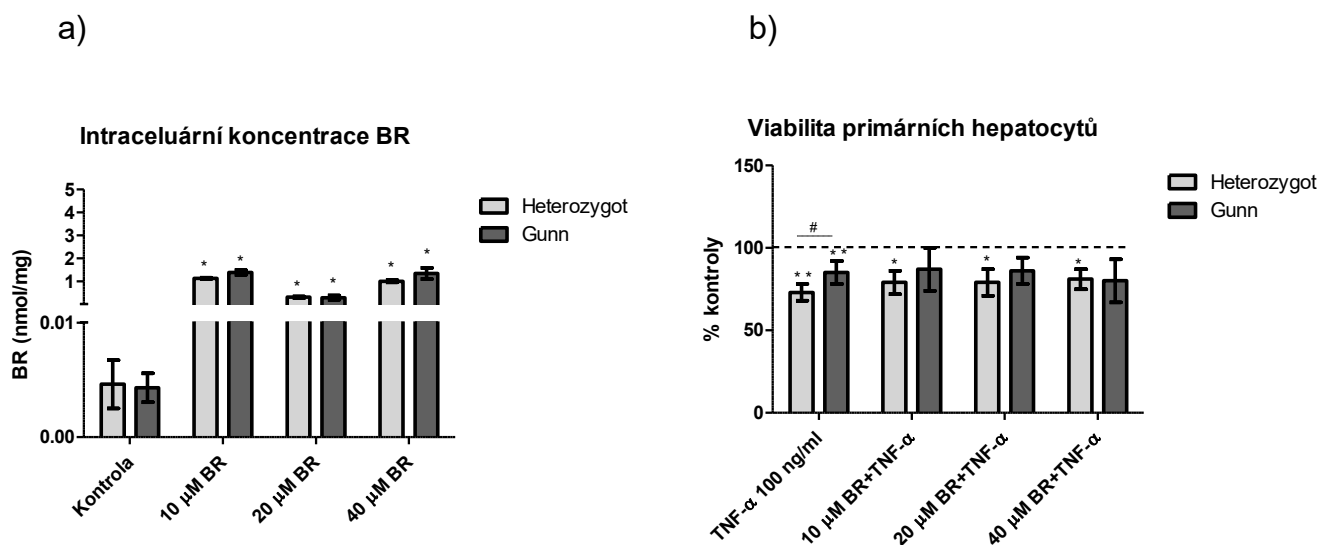
V další části práce jsme se věnovali detailnějšímu studiu protizánětlivých účinků BR za použití PH izolovaných z hyperbilirubinemických a normobilirubinemických potkanů.

4.3.1 Intracelulární koncentrace bilirubinu a buněčná viabilita

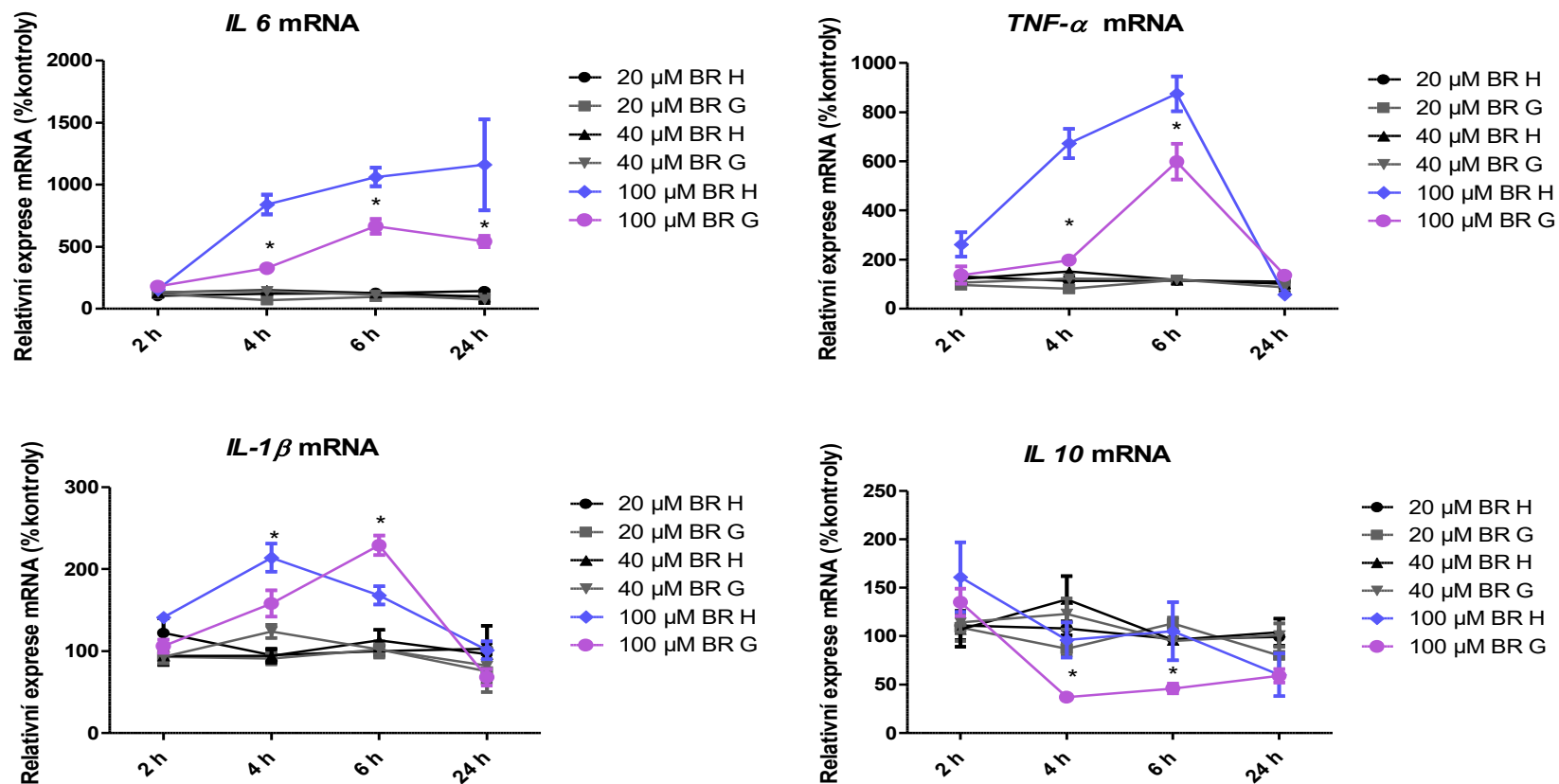
Nejprve byla měřena intracelulární koncentrace BR kvůli sledování případných rozdílů ve vychytávání BR. Intracelulární koncentrace BR byla stejná u obou typů PH nezávisle na přídavku BR, jak je uvedeno na **Obr. 22a**. Následně byly buňky PH ovlivněny prozánětlivým cytokinem TNF- α a bylo sledováno, zda přídavek BR ovlivní buněčnou viabilitu. Z výsledků vyplynulo, že PH izolované z hyperbilirubinemických potkanů byly odolnější vůči přídavku TNF- α oproti kontrolním primárním hepatocytům ($116 \pm 10 \%$, $p < 0,05$, **Obr. 22b**). Zároveň přídavek 10-40 μM BR zvyšoval buněčnou viabilitu u kontrolních PH oproti buňkám ovlivněných pouze TNF- α ($108 \pm 10 \%$, $108 \pm 11 \%$, $111 \pm 8 \%$, $p < 0,05$, **Obr. 22b**).

4.3.2 Expres mRNA cytokinů v primárních hepatocytech

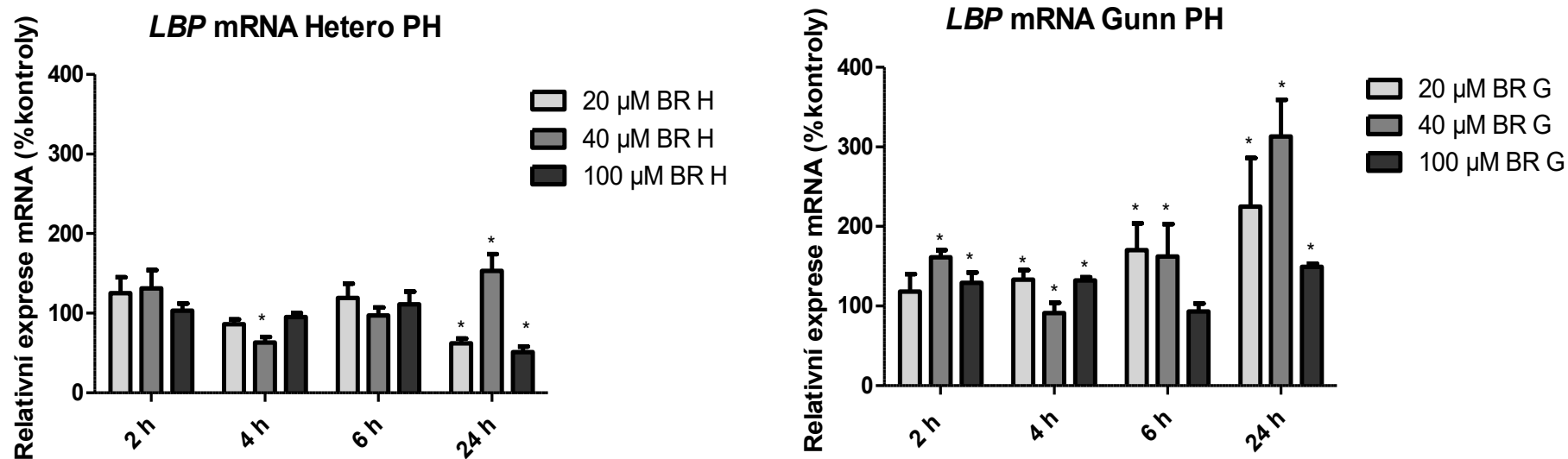
Na základě předchozích *in vivo* výsledků, poukazujících na sníženou zánětlivou odpověď u hyperbilirubinemických potkanů, byla měřena exprese mRNA cytokinů v PH po ovlivnění BR. Zajímalo nás, zda může samotný BR ovlivňovat produkci vybraných cytokinů (*IL-6*, *TNF- α* , *IL1- β* , *IL-10*). Nižší koncentrace BR (20-40 μM) neměla signifikantní vliv na expresi žádného z cytokinů. Nicméně 100 μM BR zvyšoval hladiny prozánětlivých cytokinů u obou zvířecích modelů s odlišnou kinetikou ($p < 0,05$, **Obr. 23**).



Obr. 22: Vliv BR a TNF- α na (a) intracelární koncentraci BR a (b) viabilitu primárních hepatocytů. PH izolované z normobilirubinemických kontrolních potkanů (Heterozygot) a hyperbilirubinemických potkanů (Gunn) byly 24 h inkubovány s BR nebo TNF- α . * $p < 0,05$ proti odpovídající kontrole, ** $p < 0,01$ proti odpovídající kontrole. # $p < 0,05$ proti kontrolním primárním hepatocytům.



Obr. 23: Vliv BR na exprese mRNA zánětlivých cytokinů. Primární hepatocyty izolované z hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn (G) a normobilirubineckých kontrol (H) byly inkubovány s BR (0-100 μmol/l) a byla měřena exprese mRNA IL-6, TNF-α, IL-1 β and IL-10 v čase 0-24 h. * $p < 0,05$ proti odpovídající kontrole.



Obr. 24: Vliv přidavku BR na expresi mRNA LBP v primárních hepatocytech. Primární hepatocyty (PH) izolované z hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn (G) a normobilirubineckých kontrol (H) byly inkubovány s BR (0-100 μmol/l) a byla měřena exprese mRNA LBP v čase 0-24 h. * $p < 0,05$ proti odpovídající kontrole

4.3.3 exprese mRNA LBP v primárních hepatocytech

Na základě výsledků *in vivo* experimentů, kdy v jaterní tkáni hyperbilirubinemických potkanů byla zvýšení exprese mRNA *LBP*, jsme chtěli zjistit, zda by samotný BR mohl ovlivnit produkci *LBP* v PH. U primárních hepatocytů izolovaných z hyperbilirubinemických potkanů jsme pozorovali signifikantní nárůst exprese mRNA *LBP* od 6 h inkubace při inkubaci buněk s 20 a 40 μM BR, zatímco vyšší koncentrace BR (100 μM) tento efekt nekopírovaly ($p < 0,05$). U kontrolních primárních hepatocytů nebyla v daných časových intervalech (kromě 40 μM BR po 24 h) detekována vyšší exprese mRNA *LBP*, dokonce byla exprese tohoto proteinu nižší (v čase 4 a 24 h) oproti buňkám neovlivněným BR, **Obr. 24**.

4.3.4 Western blot dráhy NF- κ B

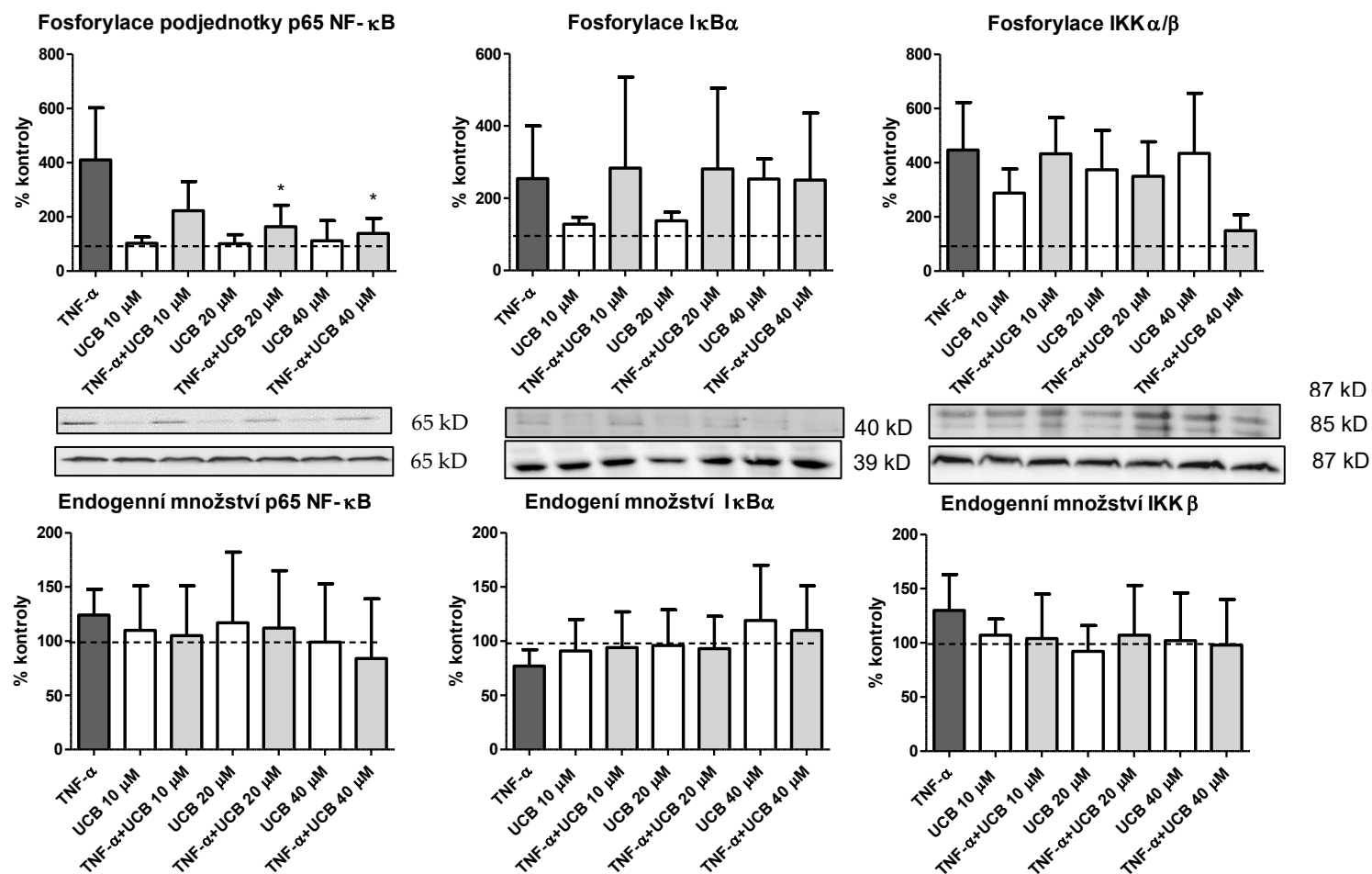
Abychom pochopili mechanismus protizánětlivého účinku BR *in vitro*, testovali jsme, zda přídavek BR může ovlivnit zánět *in vitro* vyvolaný TNF- α na úrovni modulace dráhy NF- κ B. Jelikož nebyl shledán žádný signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami PH, jsou uvedené výsledky prezentovány dohromady. PH byly inkubovány s 10-40 μM BR a poté vystaveny účinkům TNF- α . Sledovány byly rozdíly ve fosforylaci či celkovém množství vybraných podjednotek dráhy NF- κ B. Jak je z výsledků patrné (**Obr. 25**) TNF- α indukoval fosforylaci podjednotky NF- κ B p65, nicméně přídavek BR signifikantně fosforylaci snižoval ($p < 0,05$). Celkové množství NF- κ B p65 proteinu, IKK β proteinu ani inhibitoru I κ B α nebylo přídavkem BR či TNF- α ovlivněno. Zároveň fosforylace podjednotek IKK α/β a I κ B α vyvolaná TNF- α nebyla signifikantně ovlivněna BR.

5.1 Měření intracelulární produkce ROS *in vitro*

V další části práce jsme se zabývali antioxidačními účinky BR, které jsme zkoumali ve studii posuzující možnou úlohu enzymu HMOX při metabolismu gangliosidů ve vztahu k oxidačnímu stresu v jaterní tkáni při cholestáze. HMOX hraje klíčovou roli v ochraně před oxidačním poškozením (*Poss and Tonegawa 1997*) a gangliosidy mohou být dalším faktorem v ochraně jater před prooxidačním účinkem žlučových kyselin, které jsou při cholestáze akumulovány (*Gavella, Kveder et al. 2010, Petr, Smid et al. 2014*). Gangliosidy jsou přítomné ve všech tkáních, ale nejvíce jsou zastoupeny v nervovém systému (*Yu, Nakatani et al. 2009*), proto jsme pracovali s *in vitro* modelem neuroblastomových buněk. Abychom zjistili, zda BR ovlivňuje produkci ROS, byly buňky SH-SY5Y ovlivněny silným induktorem tvorby ROS kyselinou chenodeoxycholovou (CDCA), která se hromadí v játrech během cholestázy. Z výsledků vyplynulo, že CDCA zvyšovala oxidační stres *in vitro*, zatímco přídavek BR jakožto silného antioxidantu měl opačný efekt **Obr. 26**.

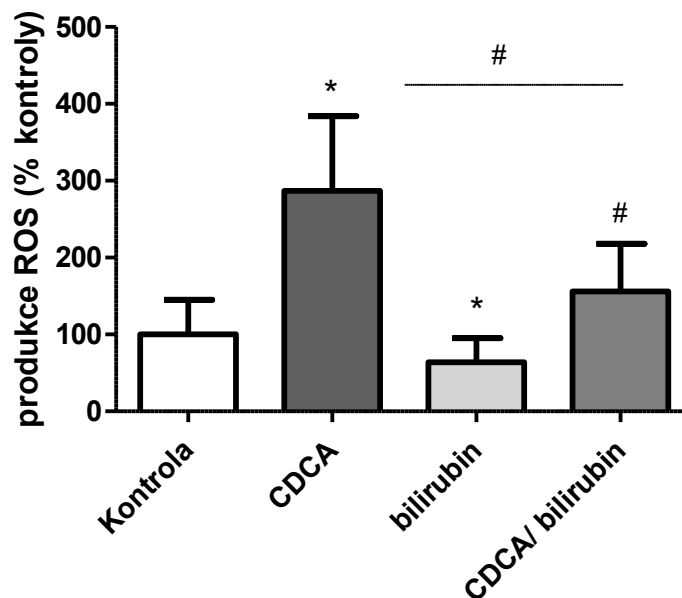
5.1.2 Vliv bilirubinu na oxidační stres *in vitro*

Abychom objasnili, zda oxidační stres vyvolaný CDCA ovlivňuje expresi GM3 syntasy, klíčového enzymu v metabolismu gangliosidů (*Smid, Suk et al. 2018*) *in vitro*, byly buněčné linie SH-SY5Y a HepG2 inkubovány s CDCA nebo bilirubinem po dobu 4 hodin. Výrazné zvýšení exprese mRNA GM3 syntasy bylo pozorováno při inkubaci s CDCA, zatímco BR expresi mRNA GM3 syntasy snižoval, a to jak u SH-SY5Y buněk (**Obr. 27 a**), tak i u HepG2 linie (**obr. 27 b**). Tyto výsledky byly potvrzeny i detekcí exprese proteinu GM3 syntasy v buněčné linii SH-SY5Y Western blotem (**obr. 27 c**).

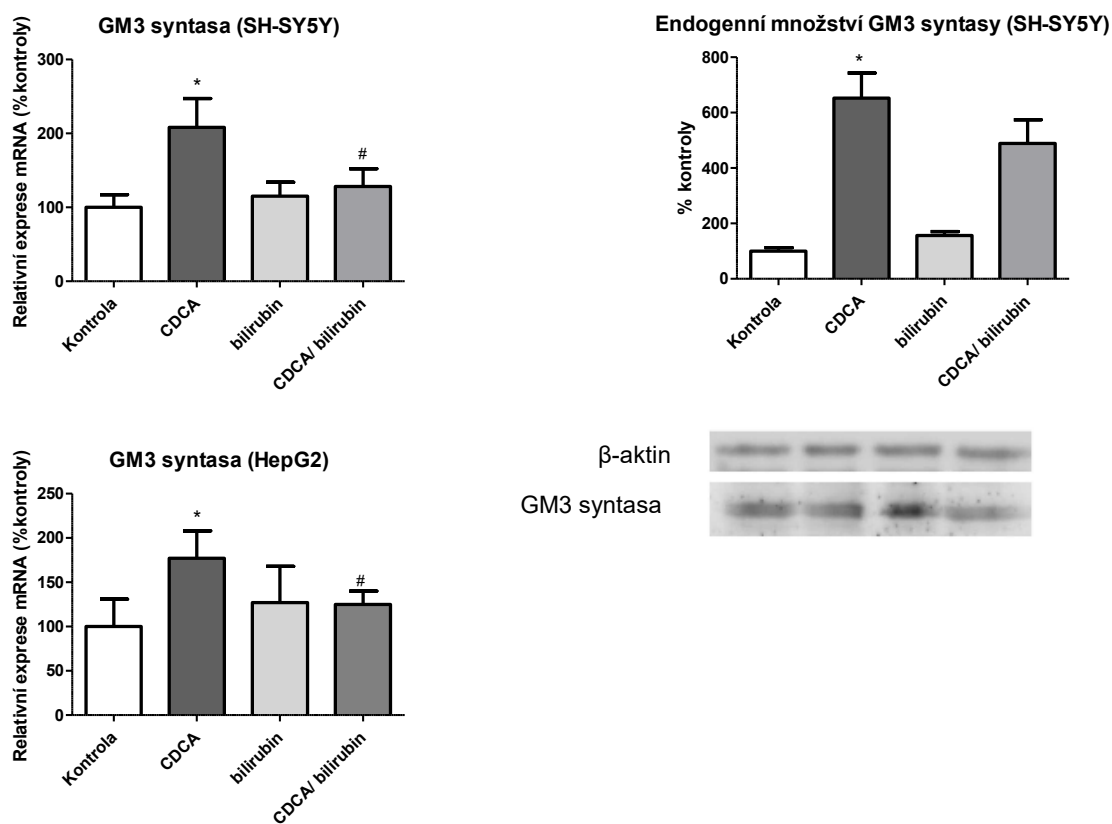


Obr. 25: Vliv přidavku BR na NF-κB dráhu. PH byly 2 h preinkubovány s bilirubinem (0-40 μM) a TNF-α (12 ng/ml) byl přidán po dobu 5 minut. Western blotem bylo měřené celkové množství a fosforylace NF-κB p65 podjednotky, IKKβ, IκBα, IKKα/β a IκBα. * $p < 0,05$ proti TNF-α.

Intracelulární produkce ROS v SH-SY5Y buňkách



Obr. 26: Efekt bilirubinu na oxidační stres indukovaný CDCA v buňkách SH-SY5Y. Buňky SH-SY5Y byly inkubovány s CDCA (80 μ M), bilirubinem (1 μ M) nebo s oběma látkami (CDCA/bilirubin) po dobu 24 hodin. Produkce ROS byla měřena za použití fluorescenční CM-H2DCFDA sondy. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontrol. * $p < 0,05$ proti kontrole, # $p < 0,05$ proti buňkám ovlivněným CDCA.



Obr. 27: Účinek CDCA a BR na regulaci exprese GM3 syntasy v buňkách SH-SY5Y a HepG2. (a) Relativní mRNA exprese GM3 syntasy byla stanovena v kontrolních buňkách (Kontrola) po 4 hodinách inkubace s kyselinou chenodeoxycholovou (CDCA) nebo BR v buňkách SH-SY5Y. (b) Relativní exprese proteinu GM3 syntasy byla stanovena pomocí Western blotu v kontrolních buňkách (Kontrola) po 4 hodinách inkubace s kyselinou chenodeoxycholovou (CDCA) a/nebo BR v buňkách SH-SY5Y. (c) Relativní mRNA exprese GM3 syntasy byla stanovena v kontrolních buňkách (Kontrola), po 4 hodinách inkubace s kyselinou chenodeoxycholovou (CDCA) a/nebo bilirubinem v buňkách HepG2. * $p < 0,05$ proti kontrole, # $p < 0,05$ proti buňkám ovlivněným CDCA.

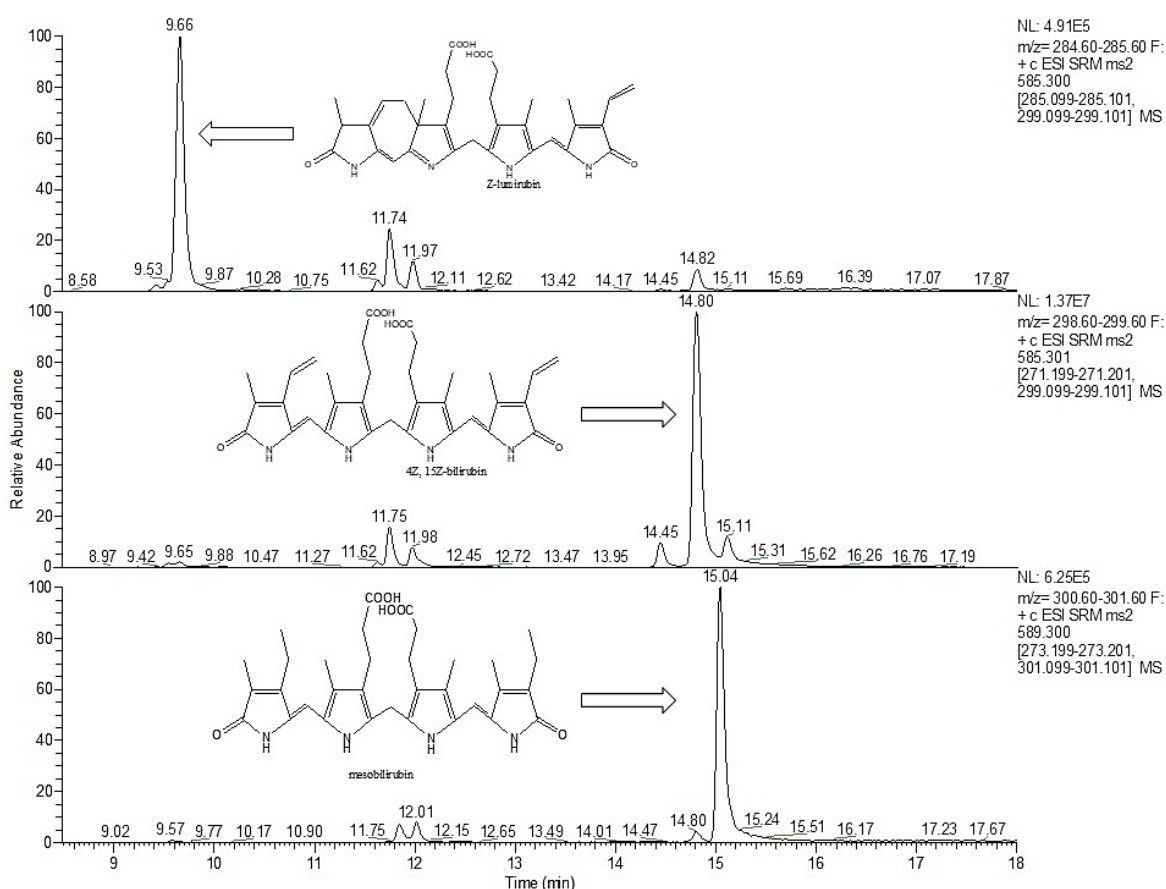
5.3. Stanovení koncentrace bilirubinu a jeho fotoproduktů metodou LC-MS/MS

Pro další výzkumnou činnost a klinické účely byla v naší laboratoři zavedena analytická metoda LC-MS/MS, umožňující velmi citlivé stanovení koncentrace BR a jeho degradačních produktů. Existence robustní, přesné a kvantitativní analytické metody pro stanovení koncentrace BR a produktů oxidace vznikajících během fototerapie nebyla do této doby k dispozici, jelikož tyto analyty nejsou dlouhodobě stabilní a zatím nejsou dostupné komerční standardy fotoizomerů. Naše metoda je proto využitelná pro stanovení koncentrace BR a jeho fotoproduktů v séru novorozenců.

5.3.1 LC-MS/MS analýza

Vzorky BR, lumirubinu a séra pacientů byly separovány pomocí HPLC (Dionex Ultimate 3000, Dionex Softron GmbH, Německo) na koloně Poroshell 120 EC-C18 (2.1 μm , 3.0 x 100 mm; Agilent, CA, USA). Byly použité dvě mobilní fáze v různém poměru (1 mmol/L NH_4F v H_2O (A) a CH_3OH (B)) s průtokem 0.4 ml/min a teplota kolony byla 30 °C. Počáteční izokratická eluce mobilní fáze byla: 0-3 min 40 % (B), poté následovala postupná změna 3-7 min 40-100 % (B), po dobu 3 min byla gradientová změna na 100 % (B) udržována 10 min (10-17 min). Složení mobilní fáze B bylo změněno na 60 % v průběhu 0,1 minuty (17-17.1 min), a udržováno na 60% (B) do konce programu (20 min). V čase 20-25 min došlo k ekvilibraci složení mobilní fáze na 40 % (B). Detekce analytů probíhala na trojitém kvadrupolu (TSQ Quantum Access Max s H-ESI II sondou, Thermo Fisher Scientific, USA) v pozitivním SRM modu, detekční okno bylo mezi 2-20 minutou.

Sledované přechody (odpovídající srážková energie) byly následující: BR [585,3 -> 299,1 (20 V); 585,3 -> 271,2 (18 V)], lumirubin [585,3 -> 299,1 (20 V); 585,3 -> 285,1 (18 V)] a MBR [589,3 -> 301,1 (20 V); 589,3 -> 273,2 (44 V)]. **Obr. 28** znázorňuje chromatogram B, lumirubinu a MBR v biologické matrici.



Obr. 28: LC-MS/MS chromatogramy standardů v biologické matrici (sérum). (A) lumirubin (10 μ M), retenční čas (RT) = 9,66 min; (B) BR (40 μ M), RT = 14,80 min; a (C) a MBR (vnitřní standard), RT=15,04 min jsou znázorněny šipkami. Menší peaky v blízkosti RT BR (14,45 min a 15,11) představují izomery BR. Chromatogramy A, B a C jsou prezentovány jako souhrn TIC dvou přechodů MRM (znázorněno vpravo).

5.3.2 Validace metody

Stabilita

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

Linearita

Linearita metody byla testována s použitím 8 kalibračních bodů připravených v triplicátech v rozsahu koncentrací 0,04-400 $\mu\text{mol/l}$ pro BR a 0,01-100 $\mu\text{mol/l}$ pro lumirubin, v daném pořadí (**Obr. 30**).

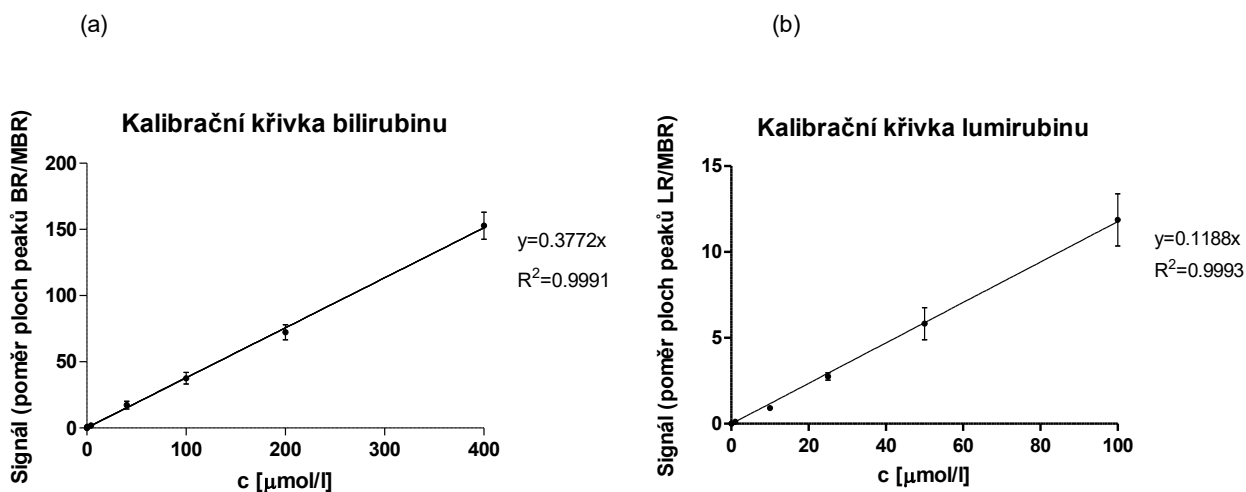
Mez detekce

Mez detekce byla stanovena jako koncentrace odpovídající signálu třem směrodatným odchylkám (SD) nad střední hodnotou pro kalibrátor bez analytu ($n=10$) a byla 100 pmol/l pro lumirubin a 80 pmol/l pro BR.

Mez kvantifikace

Mez kvantifikace byla stanovena jako koncentrace odpovídající signálu 10 SD nad střední hodnotou pro kalibrátor bez analytu ($n=10$) a byla 330 pmol/l pro lumirubin a

264 pmol/l pro BR. Hodnoty mezí detekce a kvantifikace byly potvrzeny analytickým softwarem Qual Browser Thermo Excalibur 2.2 SP1.48, kde byl vypočten poměr signál/šum.



Obr. 30: Kalibrační křivky BR (a) a LR (b). MBR- vnitřní standard mezobilirubin.

Opakovatelnost

Opakovatelnost byla měřena v jednom dni a byla určena jako CV z 10 měření 3 vzorků představujících tři zvýšené koncentrace (viz test stability) (**Tab. 3**).

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost měření byla měřena po dobu 2 měsíců a byl vypočítán CV pro 10 měření 3 vzorků (**Tab. 3**).

Průměrná výtěžnost

Průměrná výtěžnost byla vypočtena jako [(měřená koncentrace-počáteční koncentrace/přidaná koncentrace] pro hladiny sledovaných analytů použitých v testech opakovatelnosti a reprodukovatelnosti (n= 10, **Tab. 3**).

Tab. 3: *Opakovatelnost, reprodukovatelnost a průměrná výtěžnost pro klinicky relevantní koncentrace BR a lumirubinu. AC, průměrná výtěžnost; CV, variační koeficient; SD, směrodatná odchylka.*

Bilirubin [$\mu\text{mol/l}$]	Opakovatelnost CV [%]	Reprodukovatelnost CV [%]	Průměrná výtěžnost AC \pm SD [%]
4	11	25	118 \pm 30
40	18	20	108 \pm 20
400	6.5	9.9	101 \pm 5

Lumirubin [$\mu\text{mol/l}$]			
1	13	21	93 \pm 32
10	14	29	78 \pm 12
100	15	27	101 \pm 4

Selektivita metody

Selektivita metody byla stanovena jako výtěžek analytu přidaného do vzorků lidského séra obsahujících různé analyty či interferenty (hemoglobin, triacylglyceroly a bilirubin, **Tab. 4**).

Table 4: Výtěžky pro známé koncentrace BR a lumirubinu v rozdílných matricích.

Interference	Bilirubin	Lumirubin
Hyperbilirubinémie (50 µmol/l)	132 %	75 %
Hyperbilirubinémie (210 µmol/l)	108 %	72 %
Hypertriacylglycerolemie (2.88 mmol/l)	123 %	120 %
Hypertriacylglycerolemie (>11.3 mmol/l)	113 %	100 %
Hemolytické sérum (hemoglobin g/l)	80 %	74 %

5 Diskuze

V rámci této disertační práce byly studovány protektivní účinky BR ve vztahu k zánětu a oxidačnímu stresu. Po dlouhou dobu byl BR považován pouze za odpadní molekulu katabolické dráhy hemu. Ve vysokých koncentracích má BR cytotoxické účinky (*Watchko and Tiribelli 2013*), nicméně při fyziologických či mírně zvýšených koncentracích působí BR cytoprotektivně. Antioxidační účinky BR byly popsány *in vitro* i *in vivo* a pozorovány v řadě klinických i epidemiologických studií (*Wagner, Wallner et al. 2015, Gazzin, Vitek et al. 2016*). V literatuře je popsáno také protizánětlivé působení BR (Jangi, Otterbein et al. 2013), ovšem přesný mechanismus protizánětlivých a imunomodulačních účinků BR není zatím plně objasněn. V naší práci jsme se zaměřili zejména na studium potenciálních protizánětlivých účinků BR na modelu systémového zánětu vyvolaného LPS u hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn (se sérovou koncentrací BR kolem 60 $\mu\text{mol/l}$) ve srovnání s normobilirubinemickými kontrolami (BR 2 $\mu\text{mol/l}$). Zjistili jsme, že mírná nekonjugovaná hyperbilirubinémie byla v našem modelu systémového zánětu spojena se sníženou zánětlivou odpovědí.

Vyvolání sepse u hlodavců aplikací LPS je vhodným modelem pro studium komplexní zánětlivé a imunitní odpovědi (*Hamesch, Borkham-Kamphorst et al. 2015*). Na základě předchozích studií zabývajících se detailní kinetikou exprese zánětlivých cytokinů u potkanů (*Vanova, Suk et al. 2014*) a našich pilotních dat jsme zvolili pro naše experimenty 12 hodinové působení endotoxinu, které nebylo spojeno se zvýšenou mortalitou zvířat. Jelikož jsou v literatuře popsány časově a koncentračně podmíněné účinky LPS na aktivaci imunitního systému (*McDonald, Jenne et al. 2013, Hamesch, Borkham-Kamphorst et al. 2015*), použili jsme na základě našich předchozích dat (*Vanova, Suk et al. 2014*) stejnou jednorázovou dávku, a to 6 mg/kg váhy potkanů. Podání LPS bylo doprovázeno zvýšením WBC a relativního procentuálního zastoupení neutrofilů a monocytů spolu se snížením počtu

lymfocytů (*Yates, Loest et al. 2011, Hamesch, Borkham-Kamphorst et al. 2015*) v normobilirubinemických kontrolách. Tyto změny však byly významně mírnější u hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn značící oslabení zánětlivé odpovědi.

Zároveň byla aplikace LPS doprovázená podstatnými změnami v poměru CD4⁺T/CD8⁺T buněk, důležitého markeru imunitní aktivace (*Bruno, Saracino et al. 2017*). U hyperbilirubinemických potkanů vedla aplikace LPS k podstatně vyšší produkci CD4⁺T buněk a zároveň snížení počtu CD8⁺T buněk ve srovnání s normobilirubinemickými kontrolami. V několika klinických studiích bylo zjištěno, že nižší poměr CD4⁺T/CD8⁺T je spojen se zvýšeným cytotoxickým skóre a zvýšením rizika úmrtí při septických stavech (*Kalinkovich, Weisman et al. 1998, Sainz, Serrano-Villar et al. 2013, Lu, Mehraj et al. 2015*). Zároveň je produkce buněk CD8⁺T lymfocytů modulována aktivitou NADPH oxidasy (*Dhiman and Garg 2014*). Imunitní obranná reakce zprostředkovaná NADPH oxidasou spočívá ve využití NADPH jako donoru elektronů k redukci O₂ na superoxid (O₂⁻) a produkci dalších kyslíkových radikálů (např. H₂O₂ (*Panday, Sahoo et al. 2015*)). Vyšší poměr CD4⁺T/CD8⁺T buněk a tedy nižší cytotoxické skóre pozorované v naší studii u hyperbilirubinemických potkanů by proto mohlo být alespoň částečně způsobeno již dříve popsaným inhibičním účinkem BR na aktivitu NADPH oxidasy (*Wang, Smith et al. 2004*).

Hlavní hybnou silou mobilizace neutrofilů z kostní dřeně a dalších hematopoetických kompartmentů během sepse jsou prozánětlivé cytokiny (*Summers, Rankin et al. 2010*). Měření exprese mRNA klíčových cytokinů v játrech a jejich sérových koncentrací je vhodným markerem pro posouzení změny zánětlivé odpovědi. U hyperbilirubinemických potkanů jsme po vyvolání zánětu naměřili nižší exprese mRNA cytokinů v játrech a krvi i sérových koncentrací hlavních zánětlivých cytokinů IL-6, TNF- α a IL-1 β oproti normobilirubinemickým kontrolám. Neutrofilly rychle a účinně eliminují

bakteriální a plísňové infekce, nicméně v případě závažné sepse či chronického zánětlivého onemocnění může mít nadměrná produkce neutrofilů negativní účinky a poškodit zdravé tkáně (Summers, Rankin et al. 2010). Z našich výsledků vyplývá, že hyperbilirubinémie přispívá ke snížení zánětlivé odpovědi, což může souviset s regulací produkce neutrofilů a současně nižší produkcí prozánětlivých cytokinů. Význam oslabení zánětlivé odpovědi spojené s regulací produkce cytokinů potvrzují i některé studie, ve kterých byla pozorována nižší mortalita u potkanů vystavených LPS a léčených monoklonální protilátkou proti TNF- α (Ozer, Goktas et al. 2017). IL-1 β a IL-6 (Ohlsson, Bjork et al. 1990, Nullens, Staessens et al. 2016).

Zároveň spolu se sníženou expresí prozánětlivých cytokinů u hyperbilirubinemických potkanů po aplikaci LPS ve srovnání s normobilirubinemickými potkany byla pozorována také nižší produkce protizánětlivého IL-10. I když je IL-10 obecně považován za protizánětlivý cytokin (Stenvinkel, Ketteler et al. 2005), jeho nadprodukce může být pro organismus nepříznivá a může mít za následek imunosupresi (Steinhauser, Hogaboam et al. 1999). V klinických studiích bylo zjištěno, že sérové koncentrace IL-10 korelovaly se závažností sepse a mortalitou a zároveň byl vysoký poměr IL-10/TNF- α spojen se zvýšenou mortalitou (Gogos, Drosou et al. 2000). Z těchto dat vyplývá, že rovnováha mezi produkcí IL-10 a TNF- α je důležitá pro udržení imunitní homeostázy. To bylo prokázáno na modelech bakteriálních infekcí, např. u *Listeria* (Wang, Jeng et al. 1999), *Pseudomonas* (Steinhauser, Hogaboam et al. 1999), *Streptococcus* (van der Poll, Marchant et al. 1996) nebo *Mycobacterium* (Jacobs, Brown et al. 2000), kdy blokováním dráhy IL-10 docházelo ke zlepšení průběhu infekce. V našem modelu zánětu vyvolaného LPS byl poměr IL-10/TNF- α výrazně nižší u hyperbilirubinemických potkanů, což je v souladu s výsledky

studie Lanone a spol., ve které pozorovali zlepšení přežití potkanů kmene Gunn po podání LPS (Lanone, Bloc et al. 2005).

V souladu s těmito výsledky byly markery hepatocelulárního poškození jater (aktivity ALT a AST) signifikantně nižší u potkanů Gunn vystavených působení LPS ve srovnání s odpovídajícími kontrolami. Játra hrají klíčovou úlohu při odstraňování LPS (Nakao, Taki et al. 1994) a cholestatické i toxické poškození jater bývá závažnou komplikací sepse. Již dříve bylo v naší laboratoři zjištěno, že BR chrání játra před prooxidačními účinky žlučových kyselin při cholestáze (Muchova, Vanova et al. 2011). V literatuře lze dohledat hepatoprotektivní účinek hyperbilirubinémie po aplikaci LPS potkanům, kterým byl předtím intraperitoneálně podán BR (Lanone, Bloc et al. 2005). Nicméně u různých kmenů potkanů Gunn s velmi vysokými koncentracemi BR tento účinek pozorován nebyl (Wang, Smith et al. 2004, Lanone, Bloc et al. 2005). V naší studii nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi aktivitou ALP u hyperbilirubinemických potkanů a kontrolními zvířaty ovlivněných LPS, což naznačuje, že BR v našem modelu nemusí mít vliv na závažnost cholestázy během sepse.

Dále nás zajímaly faktory, které přispívají ke snížené zánětlivé odpovědi zprostředkované BR po aplikaci LPS. Zaměřili jsme se proto na expresi LBP v jaterní tkáni našich experimentálních zvířat. LBP, plazmatický protein produkovaný především hepatocyty, hraje klíčovou roli při rozpoznávání a signalizaci LPS a je považován za důležitý mediátor zánětlivé reakce (Su, Freeswick et al. 1994). I když je role LBP v aktivaci a inhibici zánětlivé odpovědi pravděpodobně dvojitá (Gutsmann, Muller et al. 2001), bylo popsáno, že vysoké hladiny LBP inhibují uvolňování cytokinů zprostředkované LPS a brání jaternímu selhání *in vivo* (Lamping, Dettmer et al. 1998). V naší studii byla exprese jaterního LBP významně zvýšena u hyperbilirubinemických potkanů před i po ovlivnění LPS. Kromě toho vedla inkubace primárních hepatocytů s BR ke zvýšené expresi LBP, což naznačuje, že BR

může ovlivnit produkci LBP a tak přispět k oslabení zánětlivé odpovědi u hyperbilirubinemických subjektů.

PH byly použity zejména pro studium mechanismu protizánětlivých účinků BR. Zajímalo nás, zda BR ovlivňuje pouze produkci cytokinů nebo také buněčnou odpověď, která je závislá na signalizaci vyvolanou cytokiny. Z našich výsledků vyplynulo, že primární hepatocyty z hyperbilirubinemických potkanů byly odolnější vůči cytotoxicitě indukované TNF- α , ačkoliv jsme ve srovnání s kontrolními buňkami nepozorovali změny v intracelulárních koncentracích BR. Zároveň fyziologické či mírně zvýšené koncentrace BR (10-40 μ M) neměly efekt na expresi vybraných cytokinů, tudíž tyto koncentrace nebyly prozánětlivé. Tato data naznačují, že nejen samotný BR, ale i tzv. „bilirubinový priming“, tedy změny v metabolismu buněk vystavených dlouhodobé hyperbilirubinémii, mohou spouštět adaptivní mechanismy podílející se na pozorované hepatoprotekci. K přesné identifikaci těchto mechanismů je zapotřebí dalšího výzkumu.

Zároveň produkce prozánětlivých cytokinů během sepse vede k aktivaci nukleárního transkripčního faktoru NF- κ B (*Perkins 2007*). Signální dráha NF- κ B reaguje na vnější stimuly (včetně LPS, TNF- α) prostřednictvím signální transdukce vedoucí k aktivaci buněčné odezvy prostřednictvím komplexu IKK. Komplex IKK aktivuje NF- κ B fosforylací jeho inhibitoru I κ B, což má za následek ubikvitinaci a proteozomální degradaci I κ B. Aktivovaný NF- κ B je poté translokován do jádra, kde spouští transkripci klíčových zánětlivých genů (*Karin and Ben-Neriah 2000*). Z našich výsledků s PH potkanů vyplynulo, že expozice BR vede ke snížení fosforylace podjednotky p65 proteinového komplexu NF- κ B, což může souviset jak s obecnými inhibičními účinky BR na fosforylaci proteinů (*Hansen, Mathiesen et al. 1996*), tak i s inhibicí fosforylace prostřednictvím potlačené signalizace TNF- α (*Mazzone, Rigato et al. 2009*). Pozorované protizánětlivé a

cytoprotektivní účinky BR mohou být tedy alespoň částečně způsobeny utlumením transkripce řízené NF- κ B. Na rozdíl od studie Liu a kol. jsme nezaznamenali inhibici fosforylace I κ B při mnohem vyšších koncentracích BR (150 μ M) (Liu, Li et al. 2008). Naše výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi, které prokázaly inhibici dráhy NF- κ B jak prostřednictvím BR (Soares, Seldon et al. 2004), tak i BV (Gibbs and Maines 2007, Nuhn, Mitkus et al. 2013). Za zmínku stojí, že poměr T lymfocytů CD4⁺/CD8⁺ je také regulován aktivitou NF- κ B (Jimi, Strickland et al. 2008).

Fosforylace NF- κ B p65 podjednotky je však zprostředkována i p38 a dráhou ERK MAPK, které jsou řízeny oxidační signalizací (Reber, Vermeulen et al. 2009) a aktivitou HMOX, která je u hyperbilirubinemických potkanů snížena. Již dříve jsme zjistili, že BR působí nejen jako lapač volných radikálů, ale také moduluje redoxní stav buněk prostřednictvím oslabení produkce mitochondriálních ROS (Zelenka, Dvorak et al. 2016). Nutno tedy podotknout, že pozorované protizánětlivé a cytoprotektivní účinky hyperbilirubinémie v naší studii mohou být částečně vysvětleny také tímto efektem.

Zatímco úloha BR v kontextu zánětu a imunologického působení není stále plně objasněna, a proto ji v této práci byla věnována hlavní pozornost, antioxidantní působení BR je popsáno v mnoha výzkumných, klinických i epidemiologických studiích (Stocker, Yamamoto et al. 1987, Neuzil and Stocker 1993, Dennery, McDonagh et al. 1995, Novotny and Vitek 2003, DiNicolantonio, McCarty et al. 2018, Tsai and Tarnag 2018). Další část práce se zabývala studiem mechanismu změn metabolismu gangliosidů v kontextu oxidačního stresu, kdy nás zajímal především antioxidantní účinek BR a role enzymu HMOX. Gangliosidy hrají klíčovou roli v signálních transdukčních drahách, regulují mnoho různých buněčných funkcí (proliferace, diferenciace, adheze a buněčná smrt (Hakomori 2004, Schnaar 2004)) a jsou zapojeny i do diferenciace monocytů, angiogenní signalizace, obezity

vyvolané zánětem (*Hakomori and Igarashi 1995*) či i přímo do mechanismu zánětu (*Jou, Lee et al. 2006*). Zároveň se účastní ochrany před oxidačním stresem (*Gavella, Kveder et al. 2010, Petr, Smid et al. 2014*). Gangliosidy se nacházejí ve všech tkáních a nejhojněji jsou zastoupeny v nervovém systému (*Yu, Tsai et al. 2012*). Expresce gangliosidů se dramaticky mění během různých fyziologických a patologických stavů a to včetně buněčné smrti, proliferace, diferenciací, vývoje či onkogeneze (*Hakomori 2003, Bektas and Spiegel 2004, Ngamukote, Yanagisawa et al. 2007*) a při různých neurologických onemocněních (*Xu, Barnes et al. 2010, Lobasso, Tanzarella et al. 2017*). Tyto účinky jsou do značné míry přičítány změnám v expresi syntasy gangliosidů (*Ishii, Ikeda et al. 2007, Suzuki, Yanagisawa et al. 2011*). Abychom objasnili mechanismus změn metabolismu gangliosidů vyvolaného oxidačním stresem, zaměřili jsme se konkrétně na regulaci GM3 syntasy, hlavního enzymu v komplexní syntéze gangliosidů. V naší studii vyvolání oxidačního stresu u SH-SY5Y i HepG2 linie pomocí CDCA (*Fuentes-Broto, Martinez-Ballarín et al. 2009*) vedlo k významnému zvýšení množství gangliosidu GM3, zatímco přidání BR jakožto silného antioxidantu (*Vitek and Ostrow 2009*) vedlo k normalizaci obsahu uvedeného gangliosidu. Tyto výsledky jsou v souladu s naší předchozí studií, kdy BR působil proti prooxidačnímu účinku žlučových kyselin v modelu obstrukční cholestázy u potkanů (*Muchova, Vanova et al. 2011*).

Kromě studia výše uvedených protizánětlivých a antioxidantních účinků BR nás také zajímala kinetika přeměny BR na jeho degradační produkty a jejich biologická aktivita během fototerapie novorozenců. Poslední část naší práce se proto zabývala zavedením a validací analytické metody, která by umožnila stanovit přesné koncentrace BR a jeho degradačních produktů v séru pacientů a bylo by možné ji převést do běžné klinické praxe. Ačkoliv se fototerapie celosvětově běžně používá k léčbě novorozenecké žloutenky (a v zásadě nahradila dříve používanou výměnou transfúzi (*Drew, Marriage et al. 1976*)), není

stále známo, jaké koncentrace fotoproduktů BR lze nalézt u novorozenců před, během a po fototerapii. Nejen že tyto pigmenty nejsou dostatečně stabilní, zároveň nejsou komerčně dostupné ani standardy fotoizomerů BR a jejich oxidačních produktů. V literatuře lze najít pouze omezené údaje o jejich přípravě s různou čistotou a výtěžky (*Stoll, Zenone et al. 1979, Mcdonagh, Palma et al. 1982, Stoll, Vicker et al. 1982, Bonnett, Buckley et al. 1984*).

Zatím byla publikována pouze jedna kvalitativní (*Mcdonagh, Palma et al. 1982*) a jedna kvantitativní metoda (*Itoh, Isobe et al. 1999*) pro stanovení fotoproduktů BR v séru, ale žádná z nich není vhodná pro analýzu LC-MS/MS, a to kvůli použitým rozpouštědlům, které nejsou kompatibilní s detektory MS. Navíc v těchto metodách nebyly použity žádné vnitřní standardy, které by ověřily spolehlivost stanovení. V naší studii jsme jako první zavedli a validovali přesnou a citlivou analytickou metodu LC-MS/MS pro stanovení hlavního fotodegradačního produktu lumirubinu spolu s BR.

Validace LC-MS/MS metody byla rozdělena do několika kroků a byla provedena podle publikace (*Lenicek, Juklova et al. 2008*). Nejdůležitějším atributem celého procesu validace byla stabilita všech analytů (včetně vnitřního standardu MBR). Bylo zjištěno, že všechny vzorky mohou být skladovány při -80 °C po dobu minimálně 3 měsíců, ale během vlastní přípravy a analýzy mohou vzorky velmi rychle degradovat. Bez použití antioxidantů byl poměr koncentrace BR/lumirubin k ISTD snížen do šesti hodin a po 12-24 hodinách analyty degradovaly úplně. Tedy pro vlastní analýzu vzorků bylo nutné připravit optimální směs antioxidantů, která by zajišťovala dostatečně silnou ochranu vzorků, aniž by tato aditiva interferovala se vzorky BR, lumirubinu či MBR. Pro naše podmínky byly modifikovány koncentrace a poměr antioxidantů BHT a kyseliny askorbové (samotný vitamin C degraduje během několika hodin) dle dvou vybraných publikací (*Reddy and Lokesh 1992, Soares, Andreazza et al. 2003*) Takto připravené přísady antioxidantů

nejenom že umožnily mnohem větší stabilitu vzorku ale zároveň poměr mezi analyty a ISTD zůstal stejný po celou dobu měření.

Úspěšnost zavedení naší metody byla hodnoceny třemi parametry: opakovatelností, reprodukovatelností a průměrnou výtěžností, tyto parametry byly vyjádřeny jako CV. Naše výsledky naznačují relativně malé chyby (s ohledem na nestabilitu analytů), nicméně Zelenka a kol. naměřil během validace analýzy metody na stanovení koncentrace BR pomocí HPLC mnohem nižší nepřesnosti (Zelenka, Lenicek et al. 2008). Pravděpodobně hlavním důvodem jejich výsledků byla absence MS detektoru, který může způsobit další nepřesnost způsobenou ionizací vzorku. Tuto skutečnost je třeba vzít v úvahu při vyhodnocování nepřesností mezi validačními testy a dalších parametrů pro analýzu metodou LC-MS/MS. Posledním krokem validace bylo měření interferencí. Naše získaná data nenaznačují žádný vliv matrice, a proto tato metoda může být v budoucnu použitelná pro klinické vzorky.

6 Závěr

Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření znalostí o protektivních účincích BR ve vztahu k zánětu a oxidačnímu stresu *in vitro* i *in vivo*. Nejdůležitější získané poznatky lze shrnout následovně:

- ✓ Pro **genotypizaci normo- a hyperbilirubinemických potkanů** byla zavedena a optimalizována metoda **restrikční analýzy**. Díky této metodě dochází k eliminaci možných chyb při posuzování fenotypu experimentálních zvířat pouze na základě koncentrace bilirubinu a zároveň eliminuje nutnost opakovaných odběrů krve před experimentem.
- ✓ **Hyperbilirubinémie u potkanů kmene Gunn** po expozici LPS vedla ke **snížení systémové zánětlivé odpovědi** a hepatoprotekci. Tento efekt je pravděpodobně spojený s modulací vrozené imunity spolu se snížením produkce prozánětlivých cytokinů a modulací zánětlivé dráhy NF- κ B.
- ✓ Výsledky *in vitro* studií zabývající se možnou úlohu HMOX při metabolismu gangliosidů ve vztahu **k oxidačnímu stresu** potvrdily **antioxidační působení BR a vliv oxidačního stresu na metabolismus GM3 gangliosidu**. BR v těchto experimentech snižoval oxidační stres vyvolaný kyselinou chenodeoxycholovou.
- ✓ Byla zavedena **kvantitativní analytická LC-MS/MS** metoda umožňující stanovení **BR a lumirubinu** v séru a dalších biologických tkáních v jedné analýze. Díky této přesné metodě lze pozorovat změny v séru novorozence během fototerapie, snížit opakované odběry krve a množství vzorku potřebného pro analýzu.

7 Seznam použité literatury

Abbasi, A., P. E. Deetman, E. Corpeleijn, R. T. Gansevoort, R. O. Gans, H. L. Hillege, P. van der Harst, R. P. Stolk, G. Navis, B. Z. Alizadeh and S. J. Bakker (2015). "Bilirubin as a potential causal factor in type 2 diabetes risk: a Mendelian randomization study." Diabetes **64**(4): 1459-1469.

Abha, K., J. Nebu, J. S. A. Devi, R. S. Aparna, R. R. Anjana, A. O. Aswathy and S. George (2019). "Photoluminescence sensing of bilirubin in human serum using L-cysteine tailored manganese doped zinc sulphide quantum dots." Sensors and Actuators B-Chemical **282**: 300-308.

Abraham, N. G. (1991). "Molecular regulation--biological role of heme in hematopoiesis." Blood Reviews **5**(1): 19-28.

Adachi, Y., T. Kamisako, Y. Okuyama and H. Miya (1996). "Hepatic metabolism and transport of bilirubin and other organic anions." Nihon Rinsho **54**(8): 2276-2290.

Adin, C. A., Z. C. VanGundy, T. L. Papenfuss, F. Xu, M. Ghanem, J. Lakey and G. A. Hadley (2017). "Physiologic doses of bilirubin contribute to tolerance of islet transplants by suppressing the innate immune response." Cell Transplantation **26**(1): 11-21.

Agati, G., F. Fusi, S. Pratesi, P. Galvan and G. P. Donzelli (1998). "Bilirubin photoisomerization products in serum and urine from a Crigler-Najjar type I patient treated by phototherapy." Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology **47**(2-3): 181-189.

Ahdabbarmada, M. and J. Moossy (1984). "The neuropathology of kernicterus in the premature neonate - diagnostic problems." Journal of Neuropathology and Experimental Neurology **43**(1): 45-56.

Ahlfors, C. E. and S. M. Shapiro (2001). "Auditory brainstem response and unbound bilirubin in jaundiced (jj) Gunn rat pups." Biology of the Neonate **80**(2): 158-162.

Amato, M. M., N. V. Kilguss, N. L. Gelardi and W. J. Cashore (1994). "Dose-effect relationship of bilirubin on striatal synaptosomes in rats." *Biology of the Neonate* **66**(5): 288-293.

Arnold, C., C. Pedroza and J. E. Tyson (2014). "Phototherapy in ELBW newborns: Does it work? Is it safe? The evidence from randomized clinical trials." *Seminars in Perinatology* **38**(7): 452-464.

Bae, I. H., D. S. Park, S. Y. Lee, E. J. Jang, J. W. Shim, K. S. Lim, J. K. Park, J. H. Kim, D. S. Sim and M. H. Jeong (2018). "Bilirubin coating attenuates the inflammatory response to everolimus-coated stents." *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials* **106**(4): 1486-1495.

Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." *Annual Review of Immunology* **14**: 649-683.

Baranano, D. E., M. Rao, C. D. Ferris and S. H. Snyder (2002). "Biliverdin reductase: A major physiologic cytoprotectant." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(25): 16093-16098.

Basiglio, C. L., S. M. Arriaga, F. Pelusa, A. M. Almara, J. Kapitulnik and A. D. Mottino (2010). "Complement activation and disease: protective effects of hyperbilirubinaemia." *Clinical Science* **118**(1-2): 99-113.

Beken, S., B. Aydin, A. Zenciroglu, D. Dilli, E. Ozkan, A. Dursun and N. Okumus (2014). "The effects of phototherapy on eosinophil and eosinophilic cationic protein in newborns with hyperbilirubinemia." *Fetal and Pediatric Pathology* **33**(3): 151-156.

Bektas, M. and S. Spiegel (2004). "Glycosphingolipids and cell death." *Glycoconjugate Journal* **20**(1): 39-47.

Belanger, S., J. C. Lavoie and P. Chessex (1997). "Influence of bilirubin on the antioxidant capacity of plasma in newborn infants." *Biology of the Neonate* **71**(4): 233-238.

- Benaron, D. A. and F. W. Bowen (1991). "Variation of initial serum bilirubin rise in newborn-infants with type of illness." Lancet **338**(8759): 78-81.
- Berde, C. B., B. S. Hudson, R. D. Simoni and L. A. Sklar (1979). "Human serum albumin. Spectroscopic studies of binding and proximity relationships for fatty acids and bilirubin." Journal of Biological Chemistry **254**(2): 391-400.
- Berde, C. B., M. Nagai and H. F. Deutsch (1979). "Human alpha-fetoprotein. Fluorescence studies on binding and proximity relationships for fatty acids and bilirubin." The Journal of biological chemistry **254**(24): 12609-12614.
- Bernhard, K., G. Ritzel and K. U. Steiner (1954). "Über eine biologische Bedeutung der Gallenfarbstoffe Bilirubin und Biliverdin als Antioxydantien für das Vitamin-a und die essentiellen Fettsäuren." Helvetica Chimica Acta **37**(1): 306-313.
- Berry, M. N., A. R. Grivell, M. B. Grivell and J. W. Phillips (1997). "Isolated hepatocytes-past, present and future." Cell Biology and Toxicology **13**(4-5): 223-233.
- Bhutani, V. K. and R. J. Wong (2013). "Bilirubin neurotoxicity in preterm infants: risk and prevention." Journal of Clinical Neonatology **2**(2): 61-69.
- Bonnett, R., D. G. Buckley, D. Hamzesh, G. E. Hawkes, S. Ioannou and M. S. Stoll (1984). "Photobilirubin II." Biochemical Journal **219**(3): 1053-1056.
- Bonnett, R., J. E. Davies and M. B. Hursthouse (1976). "Structure of bilirubin." Nature **262**(5566): 326-328.
- Bosma, P. J., J. R. Chowdhury, C. Bakker, S. Gantla, A. Deboer, B. A. Oostra, D. Lindhout, G. N. J. Tytgat, P. L. M. Jansen, R. P. J. O. Elferink and N. R. Chowdhury (1995). "The genetic-basis of the reduced expression of bilirubin Udp-glucuronosyltransferase-1 in Gilbert's-syndrome." New England Journal of Medicine **333**(18): 1171-1175.

- Breimer, L. H., K. A. Spyropoulos, A. F. Winder, D. P. Mikhailidis and G. Hamilton (1994). "Is bilirubin protective against coronary artery disease?" Clinical Chemistry **40**(10): 1987-1988.
- Brodersen, R. and P. Bartels (1969). "Enzymatic oxidation of bilirubin." European Journal of Biochemistry **10**(3): 468-+.
- Broichhagen, J. and D. Trauner (2013). "Bilirubin in a new light." Angewandte Chemie-International Edition **52**(52): 13868-13870.
- Bruno, G., A. Saracino, L. Monno and G. Angarano (2017). "The revival of an "Old" marker: CD4/CD8 ratio." Aids Reviews **19**(2): 81-88.
- Calligaris, S. D., C. Bellarosa, P. Giraudi, R. P. Wennberg, J. D. Ostrow and C. Tiribelli (2007). "Cytotoxicity is predicted by unbound and not total bilirubin concentration." Pediatric Research **62**(5): 576-580.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-867.
- Crawford, J. M., S. C. Hauser and J. L. Gollan (1988). "Formation, hepatic metabolism, and transport of bile pigments: a status report." Seminars in liver disease **8**(2): 105-118.
- Dani, C., S. Pratesi, A. Ilari, D. Lana, M. G. Giovannini, D. Nosi, D. Buonvicino, E. Landucci, D. Bani, G. Mannaioni and E. Gerace (2019). "Neurotoxicity of unconjugated bilirubin in mature and immature rat organotypic hippocampal slice cultures." Neonatology **115**(3): 217-225.
- Dawson, J. H. (1988). "Probing Structure-Function Relations in Heme-Containing Oxygenases and Peroxidases." Science **240**(4851): 433-439.
- Deliktas, M., H. Ergin, A. Demiray, H. Akca, O. M. A. Ozdemir and M. B. Ozdemir (2019). "Caffeine prevents bilirubin-induced cytotoxicity in cultured newborn rat astrocytes." Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine **32**(11): 1813-1819.

Dennerly, P. A., A. F. McDonagh, D. R. Spitz, P. A. Rodgers and D. K. Stevenson (1995). "Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia." Free radical biology & medicine **19**(4): 395-404.

Dennerly, P. A., D. S. Seidman and D. K. Stevenson (2001). "Drug therapy: Neonatal hyperbilirubinemia." New England Journal of Medicine **344**(8): 581-590.

Dhawan, A., R. M. Taylor, P. Cheeseman, P. De Silva, L. Katsiyiannakis and G. Mieli-Vergani (2005). "Wilson's disease in children: 37-year experience and revised King's score for liver transplantation." Liver Transplantation **11**(4): 441-448.

Dhiman, M. and N. J. Garg (2014). "P47(phox^{-/-})mice are compromised in expansion and activation of CD8(+) T cells and susceptible to trypanosoma cruzi infection." Plos Pathogens **10**(12).

Diamond, I. F. (1970). "Studies on the neurotoxicity of bilirubin and the distribution of its derivatives." Birth defects original article series **6**(2): 124-127.

Dinarello, C. A. (2000). "Proinflammatory cytokines." Chest **118**(2): 503-508.

DiNicolantonio, J. J., M. F. McCarty and J. H. O'Keefe (2018). "Antioxidant bilirubin works in multiple ways to reduce risk for obesity and its health complications." Open Heart **5**(2): e000914.

Djousse, L., K. J. Rothman, L. A. Cupples, D. Levy and R. C. Ellison (2003). "Effect of serum albumin and bilirubin on the risk of myocardial infarction (the Framingham Offspring Study)." American Journal of Cardiology **91**(4): 485-488.

Dore, S., M. Takahashi, C. D. Ferris, R. Zakhary, L. D. Hester, D. Guastella and S. H. Snyder (1999). "Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury (vol 96, pg 2445, 1999)." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(19): 10944-10944.

Drew, J. H., K. Marriage, V. V. Bayle, E. Bajraszewski and J. M. McNammara (1976). "Phototherapy. Short and long-term complications." Archives of Disease in Childhood **51**(6): 454-458.

Drury, J. A., J. A. Nycyk, M. Baines and R. W. I. Cooke (1998). "Does total antioxidant status relate to outcome in very preterm infants?" Clinical Science **94**(2): 197-201.

Erlinger, S., I. M. Arias and D. Dhumeaux (2014). "Inherited disorders of bilirubin transport and conjugation: new insights into molecular mechanisms and consequences." Gastroenterology **146**(7): 1625-1638.

Ferrari, M., M. C. Fornasiero and A. M. Isetta (1990). "Mtt colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro." Journal of Immunological Methods **131**(2): 165-172.

Fischman, D., A. Valluri, V. S. Gorrepati, M. E. Murphy, I. Peters and P. Cheriya (2010). "Bilirubin as a protective factor for rheumatoid arthritis: An NHANES study of 2003 - 2006 data." Journal of Clinical Medicine Research **2**(6): 256-260.

Fuentes-Broto, L., E. Martinez-Ballarín, J. Miana-Mena, C. Berzosa, E. Piedrafita, I. Cebrian, R. J. Reiter and J. J. Garcia (2009). "Lipid and protein oxidation in hepatic homogenates and cell membranes exposed to bile acids." Free Radical Research **43**(11): 1080-1089.

Gartner, U., T. Goeser and A. W. Wolkoff (1997). "Effect of fasting on the uptake of bilirubin and sulfobromophthalein by the isolated perfused rat liver." Gastroenterology **113**(5): 1707-1713.

Gavella, M., M. Kveder and V. Lipovac (2010). "Modulation of ROS production in human leukocytes by ganglioside micelles." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **43**(10): 942-949.

Gavella, M., M. Kveder and V. Lipovac (2010). "Modulation of ROS production in human leukocytes by ganglioside micelles." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **43**(10): 942-949.

Gazzin, S., L. Vitek, J. Watchko, S. M. Shapiro and C. Tiribelli (2016). "A novel perspective on the biology of bilirubin in health and disease." Trends in Molecular Medicine **22**(9): 758-768.

Gazzin, S., L. Vitek, J. Watchko, S. M. Shapiro and C. Tiribelli (2016). "A novel perspective on the biology of bilirubin in health and disease." Trends in Molecular Medicine **22**(9): 758-768.

Gibbs, P. E. M. and M. D. Maines (2007). "Biliverdin inhibits activation of NF-kappa B: Reversal of inhibition by human biliverdin reductase." International Journal of Cancer **121**(11): 2567-2574.

Gidari, A. S. and R. D. Levere (1977). "Enzymatic formation and cellular regulation of heme synthesis." Seminars in Hematology **14**(2): 145-168.

Goessling, W. and S. D. Zucker (2000). "Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma." American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology **279**(2): G356-365.

Gogos, C. A., E. Drosou, H. P. Bassaris and A. Skoutelis (2000). "Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: A marker for prognosis and future therapeutic options." Journal of Infectious Diseases **181**(1): 176-180.

Gopinathan, V., N. J. Miller, A. D. Milner and C. A. Riceevans (1994). "Bilirubin and Ascorbate Antioxidant Activity in Neonatal Plasma." Febs Letters **349**(2): 197-200.

Greenberg, D. A. (2002). "The jaundice of the cell." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(25): 15837-15839.

Grojean, S., V. Koziel, P. Vert and J. L. Daval (2000). "Bilirubin induces apoptosis via activation of NMDA receptors in developing rat brain neurons." Experimental Neurology **166**(2): 334-341.

Gurba, P. E. and R. Zand (1974). "Bilirubin binding to myelin basic-protein, histones and its inhibition in vitro of cerebellar protein-synthesis." Biochemical and Biophysical Research Communications **58**(4): 1142-1147.

Gutsmann, T., M. Muller, S. F. Carroll, R. C. MacKenzie, A. Wiese and U. Seydel (2001). "Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells." Infection and Immunity **69**(11): 6942-6950.

Haga, Y., M. A. Tempero, D. Kay and R. K. Zetterman (1996). "Intracellular accumulation of unconjugated bilirubin inhibits phytohemagglutinin-induced proliferation and interleukin-2 production of human lymphocytes." Digestive diseases and sciences **41**(7): 1468-1474.

Haga, Y., M. A. Tempero and R. K. Zetterman (1996). "Unconjugated bilirubin inhibits in vitro cytotoxic T lymphocyte activity of human lymphocytes." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1317**(1): 65-70.

Hakomori, S. (2003). "Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane." Current Opinion in Hematology **10**(1): 16-24.

Hakomori, S. (2004). "Carbohydrate-to-carbohydrate interaction, through glycosynapse, as a basis of cell recognition and membrane organization." Glycoconjugate Journal **21**(3-4): 125-137.

Hakomori, S. and Y. Igarashi (1995). "Functional-role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling." Journal of Biochemistry **118**(6): 1091-1103.

Hamesch, K., E. Borkham-Kamphorst, P. Strnad and R. Weiskirchen (2015). "Lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in mice." Laboratory Animals **49**: 37-46.

Hanada, T. and A. Yoshimura (2002). "Regulation of cytokine signaling and inflammation." Cytokine & Growth Factor Reviews **13**(4-5): 413-421.

Hansen, T. W. R., S. B. W. Mathiesen and S. I. Walaas (1996). "Bilirubin has widespread inhibitory effects on protein phosphorylation." Pediatric Research **39**(6): 1072-1077.

Hayashi, S., Y. Omata, H. Sakamoto, Y. Higashimoto, T. Hara, Y. Sagara and M. Noguchi (2004). "Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene." Gene **336**(2): 241-250.

Hegyí, T., E. Goldie and M. Hiatt (1994). "The protective role of bilirubin in oxygen-radical diseases of the preterm infant." J Perinatol **14**(4): 296-300.

Hench, P. S. (1938). "Effect of jaundice on rheumatoid arthritis." British Medical Journal **2**(4050): 394-398.

Horsfall, L. J., R. Hardy, A. Wong, D. Kuh and D. M. Swallow (2014). "Genetic variation underlying common hereditary hyperbilirubinaemia (Gilbert's syndrome) and respiratory health in the 1946 British birth cohort." Journal of Hepatology **61**(6): 1344-1351.

Huang, Y., T. J. Ma, Z. Ye, H. Li, Y. Zhao, W. Q. Chen, Y. Fu, Z. Ye, A. Sun and Z. H. Li (2018). "Carbon monoxide (CO) inhibits hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress and the activation of NF-kappa B signaling in lens epithelial cells." Experimental Eye Research **166**: 29-39.

Chen, J. J. and I. M. London (1981). "Hemin enhances the differentiation of mouse 3T3 cells to adipocytes." Cell **26**(1 Pt 1): 117-122.

Chevion, S., D. S. Moran, Y. Heled, Y. Shani, G. Regev, B. Abbou, E. Berenshtein, E. R. Stadtman and Y. Epstein (2003). "Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(9): 5119-5123.

Ishii, A., T. Ikeda, S. Hitoshi, I. Fujimoto, T. Torii, K. Sakuma, S. Nakakita, S. Hase and K. Ikenaka (2007). "Developmental changes in the expression of glycogenes and the content of N-glycans in the mouse cerebral cortex." *Glycobiology* **17**(3): 261-276.

Ishizaka, N., Y. Ishizaka, E. Takahashi, M. Yamakado and H. Hashimoto (2001). "High serum bilirubin level is inversely associated with the presence of carotid plaque." *Stroke* **32**(2): 580-583.

Itoh, S., K. Isobe and S. Onishi (1999). "Accurate and sensitive high-performance liquid chromatographic method for geometrical and structural photoisomers of bilirubin IX alpha using the relative molar absorptivity values." *Journal of Chromatography A* **848**(1-2): 169-177.

Iyanagi, T. (1991). "Molecular basis of multiple UDP-glucuronosyltransferase isoenzyme deficiencies in the hyperbilirubinemic rat (Gunn rat)." *Journal of Biological Chemistry* **266**(35): 24048-24052.

Jacobs, M., N. Brown, N. Allie, R. Gulert and B. Ryffel (2000). "Increased resistance to mycobacterial infection in the absence of interleukin-10." *Immunology* **100**(4): 494-501.

Jacobsen, J. (1969). "Binding of bilirubin to human serum albumin - determination of the dissociation constants." *FEBS Lett* **5**(2): 112-114.

Jangi, S., L. Otterbein and S. Robson (2013). "The molecular basis for the immunomodulatory activities of unconjugated bilirubin." *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **45**(12): 2843-2851.

Jansen, T. and A. Daiber (2012). "Direct antioxidant properties of bilirubin and biliverdin. Is there a role for biliverdin reductase?" *Frontiers in Pharmacology* **3**: 30.

Jasprova, J., M. Dal Ben, D. Hurny, S. Hwang, K. Zizalova, J. Kotek, R. J. Wong, D. K. Stevenson, S. Gazzin, C. Tiribelli and L. Vitek (2018). "Neuro-inflammatory effects of photodegradative products of bilirubin." *Scientific Reports* **8**.

Jasprova, J., M. Dal Ben, E. Vianello, I. Goncharova, M. Urbanova, K. Vyroubalova, S. Gazzin, C. Tiribelli, M. Sticha, M. Cerna and L. Vitek (2016). "The biological effects of bilirubin photoisomers." *Plos One* **11**(2).

Jayasree, M., R. S. Aparna, R. R. Anjana, J. S. A. Devi, N. John, K. Abha, A. Manikandan and S. George (2018). "Fluorescence turn on detection of bilirubin using Fe (III) modulated BSA stabilized copper nanocluster; A mechanistic perception." *Analytica Chimica Acta* **1031**: 152-160.

Jimi, E., I. Strickland, R. E. Voll, M. X. Long and S. Ghosh (2008). "Differential role of the transcription factor NF-kappa B in selection and survival of CD4(+) and CD8(+) thymocytes." *Immunity* **29**(4): 523-537.

Jirsa, M. and V. Jirsova (1959). "Spectrophotometric behavior of azobilirubin and azotaurobilirubin." *Clinical Chemistry* **5**(6): 532-541.

Jonker, J. W., M. Buitelaar, E. Wagenaar, M. A. van der Valk, G. L. Scheffer, R. J. Scheper, T. Plosch, F. Kuipers, R. P. J. O. Elferink, H. Rosing, J. H. Beijnen and A. H. Schinkel (2002). "The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(24): 15649-15654.

Jou, I., J. H. Lee, S. Y. Park, H. J. Yoon, E. H. Joe and E. J. Park (2006). "Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia." *American Journal of Pathology* **168**(5): 1619-1630.

Kalinkovich, A., Z. Weisman, Z. Greenberg, J. Nahmias, S. Eitan, M. Stein and Z. Bentwich (1998). "Decreased CD4 and increased CD8 counts with T cell activation is associated with chronic helminth infection." *Clinical and Experimental Immunology* **114**(3): 414-421.

Keel, S. B., R. T. Doty, Z. Yang, J. G. Quigley, J. Chen, S. Knoblauch, P. D. Kingsley, I. De Domenico, M. B. Vaughn, J. Kaplan, J. Palis and J. L. Abkowitz (2008). "A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis." *Science* **319**(5864): 825-828.

Kenwright, S. and A. J. Levi (1974). "Sites of competition in the selective hepatic uptake of rifamycin-SV, flavaspidic acid, bilirubin, and bromsulphthalein." Gut **15**(3): 220-226.

Keshavan, P., T. L. Deem, J. M. Cook-Mills and S. D. Zucker (2005). "Unconjugated bilirubin inhibits VCAM-1-mediated leukocyte migration." Gastroenterology **128**(4): A216-A216.

Keyse, S. M. and R. M. Tyrrell (1989). "Heme oxygenase is the major 32-Kda stress protein-induced in human-skin fibroblasts by uva radiation, hydrogen-peroxide, and sodium arsenite." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **86**(1): 99-103.

Kikuchi, S., M. Hata, K. Fukumoto, Y. Yamane, T. Matsui, A. Tamura, S. Yonemura, H. Yamagishi, D. Keppler, S. Tsukita and S. Tsukita (2002). "Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes." Nature Genetics **31**(3): 320-325.

Killenberg, P. G., R. D. Stevens, R. F. Wildermann and N. M. Wildermann (1980). "The laboratory method as a variable in the interpretation of serum bilirubin fractionation." Gastroenterology **78**(5): 1011-1015.

Kirkby, K. A. and C. A. Adin (2006). "Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications." American Journal of Physiology-Renal Physiology **290**(3): F563-F571.

Kumagai, A., R. Ando, H. Miyatake, P. Greimel, T. Kobayashi, Y. Hirabayashi, T. Shimogori and A. Miyawaki (2013). "A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle." Cell **153**(7): 1602-1611.

Kumar, S. and U. Bandyopadhyay (2005). "Free heme toxicity and its detoxification systems in human." Toxicology Letters **157**(3): 175-188.

Kwak, J. Y., K. Takeshige, B. S. Cheung and S. Minakami (1991). "Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADph oxidase in a neutrophil cell-free system." Biochimica Et Biophysica Acta **1076**(3): 369-373.

Lamping, N., R. Dettmer, N. W. J. Schroder, D. Pfeil, W. Hallatschek, R. Burger and R. R. Schumann (1998). "LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria." Journal of Clinical Investigation **101**(10): 2065-2071.

Lanone, S., S. Bloc, R. Foresti, A. Almolki, C. Taille, J. Callebert, M. Conti, D. Goven, M. Aubier, B. Dureuil, J. El-Benna, R. Motterlini and J. Boczkowski (2005). "Bilirubin decreases NOS2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats." Faseb Journal **19**(10): 1890-+.

Lanone, S., S. Bloc, R. Foresti, A. Almolki, C. Taille, J. Callebert, M. Conti, D. Goven, M. Aubier, B. Dureuil, J. El-Benna, R. Motterlini and J. Boczkowski (2005). "Bilirubin decreases nos2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats." FASEB J **19**(13): 1890-1892.

Lauff, J. J., M. E. Kasper and R. T. Ambrose (1983). "Quantitative liquid-chromatographic estimation of bilirubin species in pathological serum." Clinical Chemistry **29**(5): 800-805.

Lee, R. G. (1989). "Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients." Human Pathology **20**(6): 594-598.

Lenicek, M., D. Duricova, O. Hradsky, P. Dusatkova, A. Jiraskova, M. Lukas, P. Nachtigal and L. Vitek (2014). "The relationship between serum bilirubin and Crohn's disease." Inflammatory Bowel Disease **20**(3): 481-487.

Lenicek, M., M. Juklova, J. Zelenka, J. Kovar, M. Lukas, M. Bortlik and L. Vitek (2008). "Improved HPLC analysis of serum 7 alpha-hydroxycholest-4-en-3-one, a marker of bile acid malabsorption." Clinical Chemistry **54**(6): 1087-1088.

Liu, Y., P. Li, J. Lu, W. Xiong, J. Oger, W. Tetzlaff and M. Cynader (2008). "Bilirubin possesses powerful immunomodulatory activity and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis." Journal of immunology **181**(3): 1887-1897.

Lobasso, S., P. Tanzarella, D. Vergara, M. Maffia, T. Cocco and A. Corcelli (2017). "Lipid profiling of parkin-mutant human skin fibroblasts." Journal of Cellular Physiology **232**(12): 3540-3551.

Lu, W., V. Mehraj, K. Vyboh, W. Cao, T. S. Li and J. P. Routy (2015). "CD4:CD8 ratio as a frontier marker for clinical outcome, immune dysfunction and viral reservoir size in virologically suppressed HIV-positive patients." Journal of the International Aids Society **18**.

MacDonald, M. G. (1995). "Hidden risks: early discharge and bilirubin toxicity due to glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency." Pediatrics **96**(4 Pt 1): 734-738.

Maines, M. D., G. M. Trakshel and R. K. Kutty (1986). "Characterization of 2 constitutive forms of rat-liver microsomal heme oxygenase - only one molecular-species of the enzyme is inducible." Journal of Biological Chemistry **261**(1): 411-419.

Maisels, M. J. (2015). "Transcutaneous bilirubin measurement: Does it work in the real world?" Pediatrics **135**(2): 364-366.

Maisels, M. J. and A. F. McDonagh (2008). "Phototherapy for neonatal jaundice." New England Journal of Medicine **358**(9): 920-928.

Mancuso, C. (2017). "Bilirubin and brain: A pharmacological approach." Neuropharmacology **118**: 113-123.

Mazzone, G. L., I. Rigato, J. D. Ostrow and C. Tiribelli (2009). "Bilirubin effect on endothelial adhesion molecules expression is mediated by the NF-kappa B signaling pathway." Bioscience Trends **3**(4): 151-157.

McCarty, M. F. (2007). "Iatrogenic Gilbert syndrome"--a strategy for reducing vascular and cancer risk by increasing plasma unconjugated bilirubin." Medical Hypotheses **69**(5): 974-994.

McDonagh, A. F. (2014). "Bilirubin photo-isomers: regiospecific acyl glucuronidation in vivo." Monatshefte Fur Chemie **145**(3): 465-482.

McDonagh, A. F. and F. Assisi (1972). "Ready isomerization of bilirubin-Ix-alpha in aqueous-solution." Biochemical Journal **129**(3): 797-&.

McDonagh, A. F. and D. A. Lightner (1985). "Like a shrivelled blood orange'--bilirubin, jaundice, and phototherapy." Pediatrics **75**(3): 443-455.

Mcdonagh, A. F., L. A. Palma and R. Schmid (1981). "Reduction of biliverdin and placental-transfer of nilirubin and biliverdin in the pregnant guinea-pig." Biochemical Journal **194**(1): 273-282.

Mcdonagh, A. F., L. A. Palma, F. R. Trull and D. A. Lightner (1982). "Phototherapy for neonatal jaundice - configurational isomers of bilirubin." Journal of the American Chemical Society **104**(24): 6865-6867.

McDonald, B., C. N. Jenne, L. Zhuo, K. Kimata and P. Kubes (2013). "Kupffer cells and activation of endothelial TLR4 coordinate neutrophil adhesion within liver sinusoids during endotoxemia." American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology **305**(11): G797-806.

McMahon, M., S. Ding, L. P. Acosta-Jimenez, T. G. Frangova, C. J. Henderson and C. R. Wolf (2018). "Measuring in vivo responses to endogenous and exogenous oxidative stress using a novel haem oxygenase 1 reporter mouse." Journal of Physiology-London **596**(1): 105-127.

Mendenhall, C. L., S. Anderson, R. E. Weesner, S. J. Goldberg and K. A. Cronic (1984). "Protein-calorie malnutrition associated with alcoholic hepatitis. Veterans Administration

Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis." American Journal of Medicine **76**(2): 211-222.

Mreihil, K., A. F. McDonagh, B. Nakstad and T. W. R. Hansen (2010). "Early isomerization of bilirubin in phototherapy of neonatal jaundice." Pediatric Research **67**(6): 656-659.

Muchova, L., K. Vanova, J. Zelenka, M. Lenicek, T. Petr, M. Vejrazka, E. Sticova, H. J. Vreman, R. J. Wong and L. Vitek (2011). "Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver: implications for bile acid-mediated oxidative stress." Journal of Cellular and Molecular Medicine **15**(5): 1156-1165.

Nakao, A., S. Taki, M. Yasui, Y. Kimura, T. Nonami, A. Harada and H. Takagi (1994). "The fate of intravenously injected endotoxin in normal rats and in rats with liver-failure." Hepatology **19**(5): 1251-1256.

Nejedla, Z. (1970). "The development of immunological factors in infants with hyperbilirubinemia." Pediatrics **45**(1): 102-104.

Neuzil, J. and R. Stocker (1993). "Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin." FEBS Lett **331**(3): 281-284.

Ngamukote, S., M. Yanagisawa, T. Ariga, S. Ando and R. K. Yu (2007). "Developmental changes of glycosphingolipids and expression of glycogenes in mouse brains." Journal of Neurochemistry **103**(6): 2327-2341.

Novotny, L. and L. Vitek (2003). "Inverse relationship between serum bilirubin and atherosclerosis in men: A meta-analysis of published studies." Experimental Biology and Medicine **228**(5): 568-571.

Nuhn, P., T. Mitkus, G. O. Ceyhan, B. M. Kunzli, F. Bergmann, L. Fischer, N. Giese, H. Friess and P. O. Berberat (2013). "Heme oxygenase 1-generated carbon monoxide and biliverdin attenuate the course of experimental necrotizing pancreatitis." Pancreas **42**(2): 265-271.

Nullens, S., M. Staessens, C. Peleman, P. Plaeke, S. Malhotra-Kumar, S. Francque, J. G. De Man and B. Y. De Winter (2016). "Beneficial effects of anti-interleukin-6 antibodies on impaired gastrointestinal motility, inflammation and increased colonic permeability in a murine model of sepsis are most pronounced when administered in a preventive setup." PLoS One **11**(4): e0152914.

Oeckinghaus, A. and S. Ghosh (2009). "The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(4): a000034.

Ohlsson, K., P. Bjork, M. Bergenfeldt, R. Hageman and R. C. Thompson (1990). "Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin-shock." Nature **348**(6301): 550-552.

Ollinger, R., H. Wang, K. Yamashita, B. Wegiel, M. Thomas, R. Margreiter and F. H. Bach (2007). "Therapeutic applications of bilirubin and biliverdin in transplantation." Antioxidants & Redox Signaling **9**(12): 2175-2185.

Onishi, S., N. Kawade, S. Itoh, K. Isobe and S. Sugiyama (1980). "High-pressure liquid-chromatographic analysis of anaerobic photoproducts of bilirubin-Ix-alpha in vitro and its comparison with photoproducts In vivo." Biochemical Journal **190**(3): 527-532.

Ostrow, J. D., P. Mukerjee and C. Tiribelli (1994). "Structure and binding of unconjugated bilirubin: relevance for physiological and pathophysiological function." J Lipid Res **35**(10): 1715-1737.

Ostrow, J. D., L. Pascolo, D. Brites and C. Tiribelli (2004). "Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity." Trends in Molecular Medicine **10**(2): 65-70.

Otani, K., S. Shimizu, K. Chijiwa, K. Yamaguchi, S. Kuroki and M. Tanaka (2001). "Increased urinary excretion of bilirubin oxidative metabolites in septic patients: A new marker for oxidative stress in vivo." Journal of Surgical Research **96**(1): 44-49.

Ozer, E. K., M. T. Goktas, I. Kilinc, A. Toker, H. Bariskaner, C. Ugurluoglu and A. B. Iskit (2017). "Infliximab alleviates the mortality, mesenteric hypoperfusion, aortic dysfunction,

and multiple organ damage in septic rats." Canadian Journal of Physiology and Pharmacology **95**(7): 866-872.

Pal, R., M. K. Mamidi, A. K. Das and R. Bhonde (2012). "Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells." Archives of Toxicology **86**(4): 651-661.

Panday, A., M. K. Sahoo, D. Osorio and S. Batra (2015). "NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies." Cellular & Molecular Immunology **12**(1): 5-23.

Papatheodoridis, G. V., M. Hamilton, P. K. Mistry, B. Davidson, K. Rolles and A. K. Burroughs (1998). "Ulcerative colitis has an aggressive course after orthotopic liver transplantation for primary sclerosing cholangitis." Gut **43**(5): 639-644.

Peng, F., X. Deng, Y. Yu, X. Chen, L. Shen, X. Zhong, W. Qiu, Y. Jiang, J. Zhang and X. Hu (2011). "Serum bilirubin concentrations and multiple sclerosis." Journal of clinical neuroscience **18**(10): 1355-1359.

Perkins, N. D. (2007). "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappa B and IKK function." Nature Reviews Molecular Cell Biology **8**(1): 49-62.

Perlstein, T. S., R. L. Pande, M. A. Creager, J. Weuve and J. A. Beckman (2008). "Serum total bilirubin level, prevalent stroke, and stroke outcomes: NHANES 1999-2004." American Journal of Medicine **121**(9): 781-U749.

Petr, T., V. Smid, V. Kucerova, K. Vanova, M. Lenicek, L. Vitek, F. Smid and L. Muchova (2014). "The effect of heme oxygenase on ganglioside redistribution within hepatocytes in experimental estrogen-induced cholestasis." Physiological Research **63**(3): 359-367.

Petr, T., V. Smid, V. Kucerova, K. Vanova, M. Lenicek, L. Vitek, F. Smid and L. Muchova (2014). "The effect of heme oxygenase on ganglioside redistribution within hepatocytes in experimental estrogen-induced cholestasis." Physiological Research **63**(3): 359-367.

Ponka, P. (1999). "Cell biology of heme." *American Journal of the Medical Sciences* **318**(4): 241-256.

Porter, M. L. and B. L. Dennis (2002). "Hyperbilirubinemia in the term newborn." *American Family Physician* **65**(4): 599-606.

Poss, K. D. and S. Tonegawa (1997). "Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(20): 10925-10930.

Puppalar, P. V., Goswami, K., Dhok, A. (2012). "Review on evolution of methods of bilirubin estimation." *Journal of Dental and Medical Sciences* **1**(3): 17-28.

Raghavan, K., E. Thomas, S. Patole and R. Muller (2005). "Is phototherapy a risk factor for ileus in high-risk neonates?" *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* **18**(2): 129-131.

Reber, L., L. Vermeulen, G. Haegeman and N. Frossard (2009). "Ser276 phosphorylation of NF-kappa B p65 by MSK1 controls SCF expression in inflammation." *Plos One* **4**(2).

Reddy, A. C. P. and B. R. Lokesh (1992). "Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid-peroxidation of rat-liver microsomes." *Molecular and Cellular Biochemistry* **111**(1-2): 117-124.

Robinson, S., T. Vanier, J. F. Desforges and R. Schmid (1962). "Jaundice in thalassemia minor: a consequence of "ineffective erythropoiesis"." *New England Journal of Medicine* **267**: 523-529.

Rocuts, F., X. Y. Zhang, J. Yan, Y. A. Yue, M. Thomas, F. H. Bach, E. Czismadia and H. J. Wang (2010). "Bilirubin promotes de novo generation of T regulatory cells." *Cell Transplantation* **19**(4): 443-451.

Rodrigues, C. M. P., S. Sola and D. Brites (2002). "Bilirubin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in developing rat brain neurons." *Hepatology* **35**(5): 1186-1195.

Rosenthal, P., M. Pincus and D. Fink (1984). "Sex- and age-related differences in bilirubin concentrations in serum." Clinical Chemistry **30**(8): 1380-1382.

Roy-Chowdhury, J., N. Roy-Chowdhury, I. Listowsky and A. W. Wolkoff (2017). "Drug- and drug abuse-associated hyperbilirubinemia: experience with Atazanavir." Clinical Pharmacology in Drug Development **6**(2): 140-146.

Sainz, T., S. Serrano-Villar, L. Diaz, M. I. G. Tome, M. D. Gurbindo, M. I. de Jose, M. J. Mellado, J. T. Ramos, J. Zamora, S. Moreno and M. A. Munoz-Fernandez (2013). "The CD4/CD8 ratio as a marker T-cell activation, senescence and activation/exhaustion in treated HIV-infected children and young adults." Aids **27**(9): 1513-1516.

Sassa, S. (1976). "Sequential Induction of Heme Pathway Enzymes during Erythroid Differentiation of Mouse Friend Leukemia Virus-Infected Cells." Journal of Experimental Medicine **143**(2): 305-315.

Sedlak, T. W., M. Saleh, D. S. Higginson, B. D. Paul, K. R. Juluri and S. H. Snyder (2009). "Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(13): 5171-5176.

Sedlak, T. W. and S. H. Snyder (2004). "Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle." Pediatrics **113**(6): 1776-1782.

Shapiro, S. M., V. K. Bhutani and L. Johnson (2006). "Hyperbilirubinemia and kernicterus." Clinics in Perinatology **33**(2): 387-+.

Shaw, D., J. Frohlich, B. A. Wittmann and M. Willms (1982). "A prospective study of 18 patients with cholestasis of pregnancy." American Journal of Obstetrics and Gynecology **142**(6 Pt 1): 621-625.

Schaffner, F. and H. Poper (1963). "Capillarization of hepatic sinusoids in man." Gastroenterology **44**: 239-242.

- Schnaar, R. L. (2004). "Glycolipid-mediated cell-cell recognition in inflammation and nerve regeneration." Archives of Biochemistry and Biophysics **426**(2): 163-172.
- Schwertner, H. A., W. G. Jackson and G. Tolan (1994). "Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary-artery disease." Clinical Chemistry **40**(1): 18-23.
- Sidel N, A., MI (1934). "Jaundice in arthritis: its analgesic action." New England Journal of Medicine **210**(4): 181-182.
- Siebenlist, U., G. Franzoso and K. Brown (1994). "Structure, regulation and function of Nf-Kappa-B." Annual Review of Cell Biology **10**: 405-455.
- Smid, V., J. Suk, N. Kachamakova-Trojanowska, J. Jasprova, P. Valaskova, A. Jozkowicz, J. Dulak, F. Smid, L. Vitek and L. Muchova (2018). "Heme oxygenase-1 may affect cell signalling via modulation of ganglioside composition." Oxidative Medicine and Cellular Longevity.
- Soares, D. G., A. C. Andreazza and M. Salvador (2003). "Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(4): 1077-1080.
- Soares, M. P., M. P. Seldon, I. P. Gregoire, T. Vassilevskaia, P. O. Berberat, J. Yu, T. Y. Tsui and F. H. Bach (2004). "Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation." Journal of Immunology **172**(6): 3553-3563.
- Steinhauser, M. E., G. M. Hogaboam, S. L. Kunkel, N. W. Lukacs, R. M. Strieter and T. J. Standiford (1999). "IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense." Journal of Immunology **162**(1): 392-399.

Steinhauser, M. L., C. M. Hogaboam, S. L. Kunkel, N. W. Lukacs, R. M. Strieter and T. J. Standiford (1999). "IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense." The Journal of Immunology **162**(1): 392-399.

Stenvinkel, P., M. Ketteler, R. J. Johnson, B. Lindholm, R. Pecoits-Filho, M. Riella, O. Heimbürger, T. Cederholm and M. Girndt (2005). "IL-10, IL-6, and TNF-alpha: Central factors in the altered cytokine network of uremia - The good, the bad, and the ugly." Kidney International **67**(4): 1216-1233.

Stocker, R. and B. N. Ames (1987). "Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **84**(22): 8130-8134.

Stocker, R., Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer and B. N. Ames (1987). "Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance." Science **235**(4792): 1043-1046.

Stoll, M. S., N. Vicker, C. H. Gray and R. Bonnett (1982). "Concerning the structure of photobilirubin II." Biochemical Journal **201**(1): 179-188.

Stoll, M. S., E. A. Zenone, J. D. Ostrow and J. E. Zarembo (1979). "Preparation and properties of bilirubin photoisomers." Biochemical Journal **183**(1): 139-146.

Strassburg, C. P. (2010). "Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome)." Best Practice & Research, Clinical Gastroenterology **24**(5): 555-571.

Strassburg, C. P. (2010). "Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome)." Best Practice & Research Clinical Gastroenterology **24**(5): 555-571.

Stratta, R. J., R. P. Wood, A. N. Langnas, R. R. Hollins, K. J. Bruder, J. P. Donovan, D. A. Burnett, R. P. Lieberman, G. B. Lund, T. J. Pillen and et al. (1989). "Diagnosis and treatment

of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation." Surgery **106**(4): 675-683; discussion 683-674.

Su, G. L., P. D. Freeswick, D. A. Geller, Q. Wang, R. A. Shapiro, Y. H. Wan, T. R. Billiar, D. J. Tweardy, R. L. Simmons and S. C. Wang (1994). "Molecular-cloning, characterization, and tissue distribution of rat lipopolysaccharide-binding protein - evidence for extrahepatic expression." Journal of Immunology **153**(2): 743-752.

Summers, C., S. M. Rankin, A. M. Condliffe, N. Singh, A. M. Peters and E. R. Chilvers (2010). "Neutrophil kinetics in health and disease." Trends in Immunology **31**(8): 318-324.

Suzuki, Y., M. Yanagisawa, T. Ariga and R. K. Yu (2011). "Histone acetylation-mediated glycosyltransferase gene regulation in mouse brain during development." Journal of Neurochemistry **116**(5): 874-880.

Tahara, T., J. Sun, K. Nakanishi, M. Yamamoto, H. Mori, T. Saito, H. Fujita, K. Igarashi and S. Taketani (2004). "Heme positively regulates the expression of beta-globin at the locus control region via the transcriptional factor Bach1 in erythroid cells." Journal of Biological Chemistry **279**(7): 5480-5487.

Taille, C., J. El-Benna, S. Lanone, M. C. Dang, E. Ogier-Denis, M. Aubier and J. Boczkowski (2004). "Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b(558) expression via the reduction of heme availability." Journal of Biological Chemistry **279**(27): 28681-28688.

Temme, E. H., J. Zhang, E. G. Schouten and H. Kesteloot (2001). "Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population." Cancer Causes Control **12**(10): 887-894.

Tenhunen, R., H. Marver, N. R. Pimstone, W. F. Trager, D. Y. Cooper and R. Schmid (1972). "Enzymatic degradation of heme. Oxygenative cleavage requiring cytochrome P-450." Biochemistry **11**(9): 1716-1720.

Tenhunen, R., M. E. Ross, H. S. Marver and R. Schmid (1970). "Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase . Partial purification and characterization." Biochemistry **9**(2): 298-&.

Thakkar, M., J. Edelenbos and S. Dore (2019). "Bilirubin and ischemic stroke: rendering the current paradigm to better understand the protective effects of bilirubin." Molecular Neurobiology.

Tsai, M. T. and D. C. Tarng (2018). "Beyond a measure of liver function-bilirubin acts as a potential cardiovascular protector in chronic kidney disease patients." International Journal of Molecular Sciences **20**(1).

Tyson, J. E., C. Pedroza, J. Langer, C. Green, B. Morris, D. Stevenson, K. P. Van Meurs, W. Oh, D. Phelps, M. O'Shea, G. E. McDavid, C. Grisby, R. Higgins and E. K. S. N. Inst (2012). "Does aggressive phototherapy increase mortality while decreasing profound impairment among the smallest and sickest newborns?" Journal of Perinatology **32**(9): 677-684.

van der Poll, T., A. Marchant, C. B. Keogh, M. Goldman and S. F. Lowry (1996). "Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia." Journal of Infectious Diseases **174**(5): 994-1000.

Vander Jagt, D. L., V. L. Dean, S. P. Wilson and R. E. Royer (1983). "Regulation of the glutathione S-transferase activity of bilirubin transport protein (ligandin) from human liver. Enzymic memory involving protein-protein interactions." The Journal of biological chemistry **258**(9): 5689-5694.

Vanova, K., J. Suk, T. Petr, D. Cerny, O. Slanar, H. J. Vreman, R. J. Wong, T. Zima, L. Vitek and L. Muchova (2014). "Protective effects of inhaled carbon monoxide in endotoxin-induced cholestasis is dependent on its kinetics." Biochimie **97**: 173-180.

Verger, C., S. Sassa and A. Kappas (1983). "Growth-promoting effects of iron- and cobalt-protoporphyrins on cultured embryonic cells." Journal of Cellular Physiology **116**(2): 135-141.

Vetvicka, V., I. Miler, P. Sima, L. Taborsky and L. Fornusek (1985). "The effect of bilirubin on the Fc receptor expression and phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages." Folia Microbiologica **30**(4): 373-380.

Vinchi, F., G. Ingoglia, D. Chiabrando, S. Mercurio, E. Turco, L. Silengo, F. Altruda and E. Tolosano (2014). "Heme exporter FLVCR1a regulates heme synthesis and degradation and controls activity of cytochromes P450." Gastroenterology **146**(5): 1325-1338.

Vitek, L., L. Muchova, E. Jancova, S. Pesickova, D. Tegzova, V. Peterova, K. Pavelka, V. Tesar and H. Schwertner (2010). "Association of systemic lupus erythematosus with low serum bilirubin levels." Scandinavian Journal of Rheumatology **39**(6): 480-484.

Vitek, L., M. Novotna, M. Lenicek, L. Novotny, J. Eberova, J. Petrsek and M. Jirsa (2010). "Serum bilirubin levels and UGT1A1 promoter variations in patients with schizophrenia." Psychiatry Research **178**(2): 449-450.

Vitek, L. and J. D. Ostrow (2009). "Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects." Current pharmaceutical design **15**(25): 2869-2883.

Vitek, L. and H. A. Schwertner (2007). "The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases." Advances in Clinical Chemistry **43**: 1-57.

Vlaming, M. L., Z. Pala, A. van Esch, E. Wagenaar, D. R. de Waart, K. van de Wetering, C. M. van der Kruijssen, R. P. Oude Elferink, O. van Tellingen and A. H. Schinkel (2009). "Functionally overlapping roles of Abcg2 (Bcrp1) and Abcc2 (Mrp2) in the elimination of methotrexate and its main toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate in vivo." Clinical cancer research **15**(9): 3084-3093.

Vogel, M., G. Idelman and S. Zucker (2015). "Bilirubin inhibits the transmigration of monocytes across endothelial cell monolayers: implications for atherosclerosis prevention." Faseb Journal **29**.

Wagner, K. H., M. Wallner, C. Molzer, S. Gazzin, A. C. Bulmer, C. Tiribelli and L. Vitek (2015). "Looking to the horizon: the role of bilirubin in the development and prevention of age-related chronic diseases." Clinical Science **129**(1): 1-25.

Wallner, M., A. C. Bulmer, C. Molzer, E. Mullner, R. Marculescu, D. Doberer, M. Wolzt, O. F. Wagner and K. H. Wagner (2013). "Haem catabolism: a novel modulator of inflammation in Gilbert's syndrome." European Journal of Clinical Investigation **43**(9): 912-919.

Wang, L. and L. E. Bautista (2015). "Serum bilirubin and the risk of hypertension." International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics **44**(1): 142-152.

Wang, M. J., K. C. G. Jeng and L. I. Ping (1999). "Exogenous cytokine modulation or neutralization of interleukin-10 enhance survival in lipopolysaccharide-hyporesponsive C3H/HeJ mice with Klebsiella infection." Immunology **98**(1): 90-97.

Wang, W. Z. W., D. L. H. Smith and S. D. Zucker (2004). "Bilirubin inhibits iNOS expression and NO production in response to endotoxin in rats." Hepatology **40**(2): 424-433.

Ward, J. H., I. Jordan, J. P. Kushner and J. Kaplan (1984). "Heme regulation of heLa-cell transferrin receptor number." Journal of Biological Chemistry **259**(21): 3235-3240.

Watanabe-Matsui, M., A. Muto, T. Matsui, A. Itoh-Nakadai, O. Nakajima, K. Murayama, M. Yamamoto, M. Ikeda-Saito and K. Igarashi (2011). "Heme regulates B-cell differentiation, antibody class switch, and heme oxygenase-1 expression in B cells as a ligand of Bach2." Blood **117**(20): 5438-5448.

Watchko, J. F. (2006). "Neonatal hyperbilirubinemia - What are the risks?" New England Journal of Medicine **354**(18): 1947-1949.

Watchko, J. F. and C. Tiribelli (2013). "Bilirubin-induced neurologic damage--mechanisms and management approaches." New England Journal of Medicine **369**(21): 2021-2030.

Watson (1961). "Analytic methods for bilirubin in blood plasma." Clinical Chemistry **7**: 603-625.

Wolkoff, A. W. (1996). "Hepatocellular sinusoidal membrane organic anion transport and transporters." Seminars in liver disease **16**(2): 121-127.

Wu, T. W., K. P. Fung and C. C. Yang (1994). "Unconjugated bilirubin inhibits the oxidation of human low density lipoprotein better than Trolox." Life sciences **54**(25): P477-481.

Xiong, T., Y. Qu, S. Cambier and D. Z. Mu (2011). "The side effects of phototherapy for neonatal jaundice: what do we know? What should we do?" European Journal of Pediatrics **170**(10): 1247-1255.

Xu, P., Z. L. Ling, J. Zhang, Y. Li, N. Shu, Z. Y. Zhong, Y. Chen, X. Y. Di, Z. J. Wang, L. Liu and X. D. Liu (2016). "Unconjugated bilirubin elevation impairs the function and expression of breast cancer resistance protein (BCRP) at the blood-brain barrier in bile duct-ligated rats." Acta Pharmacologica Sinica **37**(8): 1129-1140.

Xu, Y. H., S. Barnes, Y. Sun and G. A. Grabowski (2010). "Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism." Journal of Lipid Research **51**(7): 1643-1675.

Yamada, N., Y. Sawasaki and H. Nakajima (1977). "Impairment of DNA-synthesis in Gunn rat cerebellum." Brain Research **126**(2): 295-307.

Yates, D. T., C. A. Loest, T. T. Ross, D. M. Hallford, B. H. Carter and S. W. Limesand (2011). "Effects of bacterial lipopolysaccharide injection on white blood cell counts, hematological variables, and serum glucose, insulin, and cortisol concentrations in ewes fed low- or high-protein diets." Journal of Animal Science **89**(12): 4286-4293.

Ye, H. B., Y. Z. Xing, L. Zhang, J. H. Zhang, H. Y. Jiang, D. L. Ding, H. B. Shi and S. K. Yin (2019). "Bilirubin-induced neurotoxic and ototoxic effects in rat cochlear and vestibular organotypic cultures." Neurotoxicology **71**: 75-86.

Yu, R. K., Y. Nakatani and M. Yanagisawa (2009). "The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain." Journal of Lipid Research **50 Suppl**: S440-445.

Yu, R. K., Y. T. Tsai and T. Ariga (2012). "Functional roles of gangliosides in neurodevelopment: an overview of recent advances." Neurochemical Research **37**(6): 1230-1244.

Zandi, E., Y. Chen and M. Karin (1998). "Direct phosphorylation of I kappa B by IKK alpha and IKK beta: Discrimination between free and NF-kappa B-bound substrate." Science **281**(5381): 1360-1363.

Zelenka, J., A. Dvorak, L. Alan, M. Zadinova, M. Haluzik and L. Vitek (2016). "Hyperbilirubinemia protects against aging-associated inflammation and metabolic deterioration." Oxidative Medicine and Cellular Longevity **2016**: 10.

Zelenka, J., A. Dvorak, L. Alan, M. Zadinova, M. Haluzik and L. Vitek (2016). "Hyperbilirubinemia protects against aging-associated inflammation and metabolic deterioration." Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Zelenka, J., M. Lenicek, L. Muchova, M. Jirsa, M. Kudla, P. Balaz, M. Zadinova, J. D. Ostrow, R. J. Wong and L. Vitek (2008). "Highly sensitive method for quantitative determination of bilirubin in biological fluids and tissues." Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **867**(1): 37-42.

Zelenka, J., L. Muchova, M. Zelenkova, K. Vanova, H. J. Vreman, R. J. Wong and L. Vitek (2012). "Intracellular accumulation of bilirubin as a defense mechanism against increased oxidative stress." Biochimie **94**(8): 1821-1827.

Zhang, J. M. and J. An (2007). "Cytokines, inflammation, and pain." International Anesthesiology Clinics **45**(2): 27-37.

Ziberna, L., M. Martelanc, M. Franko and S. Passamonti (2016). "Bilirubin is an endogenous antioxidant in human vascular endothelial cells." Scientific Reports **6**.

Zucker, S. D., M. E. Vogel, T. L. Kindel, D. L. H. Smith, G. Idelman, U. Avissar, G. Kakarlapudi and M. E. Masnovi (2015). "Bilirubin prevents acute DSS-induced colitis by inhibiting leukocyte infiltration and suppressing upregulation of inducible nitric oxide synthase." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **309**(10): G841-G854.

8 Přílohy

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

Rozpracovaná publikace

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

**Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta
Kateřinská 32, Praha 2**

**Prohlášení zájemce o nahlédnutí do závěrečné práce absolventa studijního programu
uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze**

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zpřístupněné závěrečné práce nemohou být použity k výdělečným účelům, ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.

Příjmení, jméno (hůlkovým písmem)	Číslo dokladu totožnosti vypůjčitele (např. OP, cestovní pas)	Signatura závěrečné práce	Datum	Podpis