

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Studijní program: Biochemie**

**Studijní obor: Biochemie**



**Ing. Barbora Hynková**

**Gangliosidy v játrech u cholestázy indukované  
podvázáním žlučovodu**

**Liver gangliosides in cholestasis induced by bile duct  
ligation**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí diplomové práce:

Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.

Školitel:

Doc. RNDr. František Šmíd, CSc.

**Praha, 2011**

## **Prohlášení:**

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

V Praze, dne 6.5.2011

Podpis:

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr Františku Šmídovi, CSc. za jeho odborné vedení a pomoc při zpracování této práce. Děkuji vedoucímu mé diplomové práce Prof. RNDr Gustavu Entlicherovi, CSc. za jeho cenné rady a připomínky. Dále děkuji Mgr. Tomáši Petrovi a MUDr. Václavu Šmídovi za pomoc při přípravě experimentů. Dík patří celému kolektivu Hepatologické laboratoře ÚKBLD 1.LF UK za vytvoření přátelské atmosféry. Děkuji PharmDr. Daliboru Černému z Farmakologického ústavu 1.LF UK za rady v oblasti molekulární biologie. Své rodině děkuji za podporu během mého studia.

Práce byla vypracována s podporou grantů: IGAMZ NR/9366-3 a GAUK 251207.

## Abstrakt

Gangliosidy patří mezi sfingolipidy obsahující kyselinu sialovou. Nachází se na buněčném povrchu všech typů živočišných buněk. Zde plní funkci receptorových molekul, dále se účastní mezibuněčných interakcí a díky své rigidní struktuře zpevňují buněčnou membránu a chrání tak buňku před škodlivými okolními vlivy.

Tato diplomová práce studuje vliv experimentální cholestázy na složení gangliosidů jaterní tkáně. Cholestáza byla vyvolána podvazem žlučvodů u potkanů kmene Wistar. V játrech zvířat s cholestázou ve srovnání s kontrolami byl zjištěn signifikantní nárůst celkové lipidní kyseliny sialové a gangliosidů *b*-série (GD1b, GT1b event. GD3). Tyto výsledky zjištěné u obstrukční cholestázy odpovídají výsledkům které publikoval Majer a spol. *Biomed. Chromatogr.*, 21, 446-450 (2007) u cholestázy vyvolané 17- $\alpha$ -ethinyloestradiolem, ale nárůst gangliosidů *b*-série je v naší studii mírnější.

Dále tato práce zkoumala vliv modulační aktivity hemoxygenasy 1 (HO-1) při cholestáze vyvolané podvazem žlučvodů (hemin jako aktivátor HO-1, Sn-mesoporfyrin jako inhibitor HO-1) na složení gangliosidů. U skupin zvířat s podávaným Sn-mesoporfyrinem bylo zjištěno zvýšení celkové kyseliny sialové, zatímco u některých gangliosidů *a*- i *b*- větve byl zjištěn pokles. U skupin zvířat s heminem aktivovanou HO-1 byla zvýšená celková lipidně vázaná kyselina sialová beze změn ve složení gangliosidů.

Expres mRNA pro sialyltransferasu syntetizující GD3 (SAT-2) jako klíčového enzymu v biosyntéze gangliosidů *b*-série výrazně vzrostla u zvířat s podávaným Sn-mesoporfyrinem.

## Abstract

Gangliosides are sialic acid-containing glycosphingolipids located on the cell surface of all animal cell types. They play a role as receptor molecules, share in cell-to-cell interaction and protect the cell against harmful environmental factors by increasing of rigidity of cell surface.

This diploma thesis studies an influence of experimental cholestasis on hepatic ganglioside composition. Cholestasis was induced by bile duct ligation in Wistar rats. A significant increase of total lipid bound sialic acid and *b*-series gangliosides (GD1b, GT1b, event. GD3) was found in cholestatic liver when compared with controls. These results found in obstructive cholestasis correspond with the results Majer et al. Biomed. Chromatogr., 21, 446-450 (2007), described in  $17\alpha$ -ethinylestradiol induced cholestasis, but the increase of *b*-series gangliosides was milder in our study.

As a second point, an effect of modulated heme-oxygenase 1 (HO-1) activity was investigated in cholestatis induced bile duct ligation (HO-1 activator- hemine, HO-1 inhibitor- Sn-mesoporphyrin). An increase of a total lipid sialic acid was found in Sn-mesoporphyrin treated animals, but a decrease of some *a*- and *b*- series gangliosides was observed. In group with activated HO-1 total sialic acid increased, but the composition of gangliosides was not changed.

Expression of mRNA of key enzyme in biosynthesis *b*-series gangliosides, GD3 synthase significantly increased in Sn-mesoporphyrin treated animals.

„ (In Czech)“

## Obsah

Seznam zkratk	8
1. Úvod- Současný stav řešené problematiky	10
1.1. Glykosfingolipidy	11
1.2. Názvosloví glykosfingolipidů podle IUPAC- IUB	12
1.3. Biosyntéza glykosfingolipidů	14
1.3.1. Biosyntéza gangliosidů ganglio- série	15
1.3.2. Biosyntéza glykosfingolipidů lakto- a neolakto- série	16
1.3.3. Regulace biosyntézy	16
1.3.4. Výzkum úlohy gangliosidů pomocí genových mutací	19
1.4. Chemické vlastnosti gangliosidů	22
1.4.1. Prostorová konformace molekuly gangliosidů	22
1.4.2. Amfifilní vlastnosti gangliosidů	23
1.5. Molekulárně- fyziologická úloha glykosfingolipidů v biologických membránách	24
1.6. Žlučový systém	24
1.7. Hepatocyt a tvorba žluči	25
1.8. Cholestáza	26
1.9. Gangliosidy u cholestázy indukované ethinylestradiolem	27
1.10. Histologické změny v lokalizaci gangliosidů u cholestázy indukované ethinyl- estradiolem a cholestázy indukované podvázáním žlučvodů	29
1.11. Význam hemoxygenasy v hepatoprotekci	30
2. Cíl diplomové práce	33
3. Materiál a metodika	34
3.1. Materiál	34
3.1.1. Biologický materiál	34
3.1.2. Chemikálie	34
3.1.3. Přístrojové vybavení	35
3.2. Metodika	35
3.2.1. Experiment na zvířatech	35
3.2.2. Izolace gangliosidů	36
3.2.3. Fotometrické stanovení celkové kyseliny sialové	39
3.2.4. TLC gangliosidů	39
3.2.5. Denzitometrické vyhodnocení TLC chromatogramu	40

3.2.6. Stanovení exprese mRNA pro sialyltransferasu syntetizující GD3 (SAT-2)	40
3.2.7. Statistická analýza	41
4. Výsledky	42
4.1. Jaterní testy	42
4.2. Stanovení celkové lipidně vázané kyseliny sialové	45
4.3. Vyhodnocení TLC chromatogramů	47
4.4. Stanovení exprese mRNA pro sialyltransferasu syntetizující GD3 (SAT-2)	56
5. Diskuse	58
6. Souhrn	62
7. Seznam použité literatury	63

## Seznam zkratek

ALP	alkalická fosfatasa
ALT	alaninaminotransferasa
AST	aspartátaminotransferasa
BSEP	bile- salt export pump
CŽK	celkové žlučové kyseliny
cMOAT	canalicular multispecific organic-anion transporter, kanalikulární multispecifický transportér organických iontů
EE	17- $\alpha$ -ethinylestradiol
EE-cholestáza	cholestáza indukovaná 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem
GalT	galaktosyltransferasa
GalNAcT	N-acetylgalaktosamintransferasa
GlcT	glukosyltransferasa
GGT	$\gamma$ - glutamyltranspeptidasa
GSL	glykosfingolipid
HO-1	hemoxygenasa 1
HO-2	hemoxygenasa 2
HPTLC	tenkovrstvá chromatografie s vysokým rozlišením
CH	chloroform
M	methanol
MDR1	multidrug resistance P glycoprotein 1
MDR3	multidrug resistance P glycoprotein 3
MRP-2	multidrug resistance associated protein
NeuNAc	kyselina N-acetylneuraminová
NTCP	Na/Taurocholate cotransporting polypeptide- na sodíku závislý taurocholátový kotransportní protein
OATP	organic anion-transporting polypeptide, organický aniontový transportér
OCT1	organic cation transporter, organický kationtový transportér
PFIC	syndrom progresivní familiární intrahepatální cholestázy
RNA later	uchovávací medium pro RNA
SAT-1	sialyltransferasa 1 syntetizující GM3
SAT-2	sialyltransferasa 2 syntetizující GD3
SAT-3	sialyltransferasa 3 syntetizující GT3
V	voda (destilovaná)



### **Zkratky pro skupiny zvířat v experimentu**

aBDL skupina zvířat s podvazem žlučovéhoodu (**Bile Duct Ligation**) a HO-1 aktivovanou heminem, 5-denní

aC kontrolní skupina (**Controls**) zvířat slepě operovaných<sup>a</sup> s HO-1 aktivovanou heminem, 5-denní

BDL skupina zvířat s podvazem žlučovéhoodu (**Bile Duct Ligation**) 5-denní

iBDL skupina zvířat s podvazem žlučovéhoodu (**Bile Duct Ligation**) 5-denní, a HO-1 inhibovanou Sn-mesoporfyrinem,

C kontrolní skupina (**Controls**) zvířat slepě operovaných

iC kontrolní skupina (**Controls**) zvířat slepě operovaných s HO-1 inhibovanou Sn-mesoporfyrinem, 5-denní

BDL<sup>18</sup> skupina zvířat s podvazem žlučovéhoodu, 18-denní

C<sup>18</sup> kontrolní skupina zvířat slepě operovaných, 18-denní

---

<sup>a</sup> pojem slepě operovaných – viz kap 3.2.1

## 1. Úvod- Současný stav řešené problematiky

Diplomová práce „Gangliosidy v játrech u cholestázy indukované podvázáním žlučovodu“ je pokračováním výzkumu řešeného v Hepatologické laboratoři Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty UK (Grant IGAMZ NR/9366-3 a GAUK 251207). Diplomová práce navazuje na předchozí publikaci laboratoře, zejména na práci popisující dramatický vzestup některých gangliosidů v játrech potkana u estrogeny indukované cholestázy<sup>1</sup>. Jedním z možných výkladů byl vliv estrogenů na tyto gangliosidy.

Tato diplomová práce sleduje s použitím stejných metod složení gangliosidů u cholestázy indukované podvazem žlučovodů. Porovnání obou typů cholestáz má přispět k posouzení, do jaké míry je vzestup těchto gangliosidů způsoben vlivem estrogenů či vlivy genetickými, případně jinými. Poněvadž vzestup gangliosidů je zřejmě způsoben aktivací určitých glykosyltransferas, je v úvodu připojeno podrobné pojednání o biosyntéze gangliosidů a její regulaci.

Chromatografické analýzy byly dávány do souvislosti s histochemickým sledováním změn v lokalizaci gangliosidu GM1 u cholestázy indukované estrogeny a toto sledování upozornilo na kumulaci GM1 gangliosidu do sinusoidální membrány v případě, že je jaterní buňka při cholestáze ohrožena detergentním působením vysokých koncentrací žlučových kyselin v krvi<sup>2</sup>. A právě gangliosidům je připisována schopnost zpevnování membrány vzhledem k jejich rigidnější struktuře ve srovnání s fosfolipidy a u cholestázy byl vzestup rigidity membrány popsán. Proto je podrobně pojednáváno o chemických vlastnostech gangliosidů a o jejich fyziologické úloze při zpevnování vnější vrstvy plazmatické membrány.

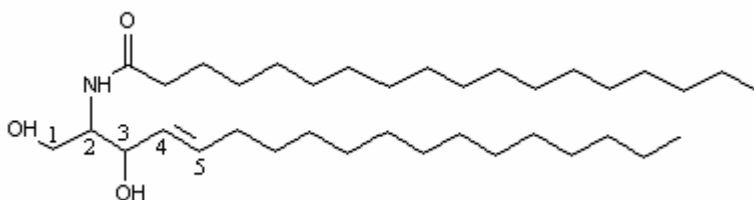
Podobně jsou v této diplomové práci u cholestázy indukované podvazem chromatografické analýzy spolu se stanovením mRNA příslušných glykosyltransferas dávány do souvislosti s histologickými nálezy, popisovanými v diplomové práci Václava Šmída, obhájené na 1.LF UK<sup>3</sup>.

Kromě sledování vlivu cholestázy na složení gangliosidů je zkoumán ještě vliv hepatoprotekčního enzymu hemoxygenasy.

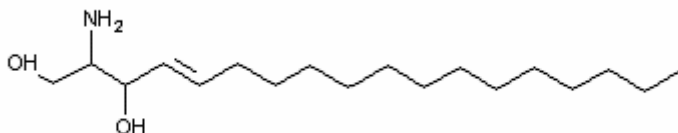
## 1.1. Glykosfingolipidy

Glykosfingolipidy jsou komplexní sloučeniny patřící do skupiny glykolipidů. Obsahují hydrofilní sacharidovou a hydrofobní lipidovou složku.

Lipidová část se nazývá ceramid. Ceramidy jsou N-acylované sfingoidní báze (viz. Obr. 1). Sfingoidní báze (long chain bases- LCB) neboli sfingoidy (viz. Obr. 2) jsou víceuhlíkaté alifatické aminoalkoholy odvozené od sfinganinu (D-erythro-2-amino-1,3-oktadekandiol). Bývají to jeho homology, stereoizomery, hydroxyderiváty nebo nenasycené deriváty. Ceramid je tedy souborné označení pro variabilní skupinu látek, odlišující se jak ve struktuře sfingoidní báze, tak typu acylu mastné kyseliny.



Obr. 1: ceramid



Obr. 2: sfingoidní báze- sfingosin

Sacharidová složka vykazuje také velkou pestrost složení. Jedná se o oligosacharidové struktury sestavené u živočichů nejčastěji z D-glukosy, D-galaktosy, L-fukosy, N-acetyl-D-glukosaminu a N-acetyl-D-galaktosaminu. Monosacharidové jednotky mohou být  $\alpha$ - i  $\beta$ - anomery, jsou vzájemně pospojovány vazbami s různými lokanty a běžně jsou derivatizovány sulfátem či kyselinou sialovou. Kyselina sialová je skupinové označení pro látky odvozené od kyseliny neuraminové (5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero-nonulosová kyselina). V přírodě bylo dosud poznáno několik desítek těchto látek. Jsou to především acetylové či glykolylové deriváty, kdy jsou tyto skupiny vázané na aminoskupinu nebo hydroxyskupinu.

Glykosfingolipidy jsou tedy bohatou skupinou látek vyznačující se strukturní rozmanitostí, která je podkladem pro jejich širokou úlohu v biologických systémech.

Glykosfingolipidy se podle charakteru sacharidové složky dělí na:

- neutrální – obsahují neutrální sacharidy, tj. D-glukosu, D-galaktosu, L-fukosu, N-acetyl-D-glukosamin a N-acetyl-D-galaktosamin
- kyselé – obsahují monosacharidové jednotky derivatizované kyselými skupinami jako jsou:
  - sulfátová skupina  $-SO_3H$  → sulfáty (sulfoglykosfingolipidy)
  - skupina kyseliny sialové → gangliosidy (sialoglykosfingolipidy)
  - fosfátová skupina → fosfoglykosfingolipidy

## 1.2. Názvosloví glykosfingolipidů podle IUPAC-IUB<sup>4,5</sup>

Názvosloví glykosfingolipidů se vzhledem k vysoké heterogenitě lipidové části odvozuje pouze ze sacharidové složky. Lipidová složka se do názvů promítá obecnou koncovkou –ceramid.

Pro názvoslovný systém bylo určeno několik základních pravidel:

- počet monosacharidových jednotek se vyjadřuje koncovkou –diosa, -triaosa, -tetraosa, -pentaosa, atd.
- oligosacharidy se rozdělují do sérií podle struktury a biogenetické příbuznosti
- vazba 1→3 vs. 1→4 se u jinak totožné struktury oligosacharidu vyjadřuje předponou *iso*- při rozlišení vazeb mezi II a III monosacharidem a *neo*- při rozlišení vazeb mezi III a IV monosacharidem
- pro zápis zkrácených názvů GSL byl vytvořen systém symbolů

### Série glykosfingolipidů

Většina glykosfingolipidů je odvozována od laktosylceramidu. Podle třetí či čtvrté monosacharidové jednotky se GSL zařazují do sérií: globo-, ganglio-, muko-, lakto-, neolakto- a gala- (viz. Tab. 1, str. 13).

Tab. 1: Série glykosfingolipidů a jejich strukturní motivy

Série	Strukturní motiv glykosylu
globo-	Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc-
isoglobo-	Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc-
lakto-	Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc-
neolakto-	Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc-
muko-	Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc-
ganglio-	GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc-
gala-	Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal-

Pravidla pro tvorbu zkrácených názvů glykosfingolipidů:

- označení série + počet monosacharidových jednotek + koncovka –osylceramid (př. globotetraosylceramid)
- římskou číslicí se označuje poloha monosacharidu vzhledem k ceramidu
- arabskou číslicí v indexu se označuje poloha atomu uhlíku v monosacharidové jednotce, na kterém je navázán substituent, používá se také pro popis větvení oligosacharidového řetězce
- specifikace anomerních struktur sacharidů ( $\alpha$ -,  $\beta$ -)

Tab. 2: Názvosloví glykosfingolipidů dle IUPAC- IUB<sup>4,5</sup>

Struktura	Triviální název	Symbol (zkrácený symbol)
Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	globotriaosylceramid	GbOsa <sub>3</sub> Cer (Gb <sub>3</sub> Cer)
GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	globotetraosylceramid	GbOsa <sub>4</sub> Cer (Gb <sub>4</sub> Cer)
Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	isoglobotriaosylceramid	iGbOsa <sub>3</sub> Cer (iGb <sub>3</sub> Cer)
GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	isoglobotetraosylceramid	iGbOsa <sub>4</sub> Cer (iGb <sub>4</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	mukotriaosylceramid	McOsa <sub>3</sub> Cer (Mc <sub>3</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	mukotetraosylceramid	McOsa <sub>4</sub> Cer (Mc <sub>4</sub> Cer)
GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	laktotriaosylceramid	LcOsa <sub>3</sub> Cer (Lc <sub>3</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	laktotetraosylceramid	LcOsa <sub>4</sub> Cer (Lc <sub>4</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4) GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	neolaktotetraosylceramid	nLcOsa <sub>4</sub> Cer (nLc <sub>4</sub> Cer)
GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	gangliotriaosylceramid	GgOsa <sub>3</sub> Cer (Gg <sub>3</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	gangliotetraosylceramid	GgOsa <sub>4</sub> Cer (Gg <sub>4</sub> Cer)
Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)GalCer	galabiosylceramid	GaOsa <sub>2</sub> Cer (Ga <sub>2</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)GalCer	galatriaosylceramid	GaOsa <sub>3</sub> Cer (Ga <sub>3</sub> Cer)

Pro značnou jednoduchost se u gangliosidů často používá názvosloví podle Svennerholma<sup>6,7</sup>. Toto názvosloví využívá k označení gangliosidu jeho vlastnosti při dělení na tenkovrstvé chromatografii (TLC). Název se tvoří takto: písmeno G označuje gangliosid, dále je pomocí písmena M (mono-), D (di-), T (tri-), Q (tetra-) nebo P (penta-) vyjádřen počet skupin kyseliny sialové v molekule a číslice na třetí pozici určuje pořadí zóny od startu s daným gangliosidem při dělení na TLC (viz. Tab. 3). Pořadí zón při separaci TLC odpovídá v obráceném sledu počtu monosacharidových jednotek v molekule.

Tab. 3: Názvosloví dle Svennerholma<sup>6,7</sup>

Zkratka dle Svennerholma	Struktura gangliosidu
GM4	Neu5AcGalCer
GM3	Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcCer
GM2	GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GM1a	Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GM1b	Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4Gal $\beta$ 4GlcCer
GD3	Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcCer
GD2	GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GD1a	Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GD1b	Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GT1a	Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GT1b	Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GT1c	Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GQ1b	Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer

### 1.3. Biosyntéza glykosfingolipidů

Biosyntéza je zahájena na cytosolické straně endoplazmatického retikula<sup>8</sup> syntézou ceramidu jako jednoho ze základních stavebních kamenů sfingolipidů. Syntéza ceramidu začíná kondenzací serinu a palmitoyl-CoA katalyzované pyridoxalfosfátem vázaném na serin.<sup>9,10,11</sup> Vzniklý 3-ketosfinganin je NADPH-dependentní reduktasou redukován na sfinganin. Dalším krokem je reakce sfinganinu s acyl-CoA na D-erythro-dihydroceramid a dále na ceramid.

Další kroky biosyntézy jsou již lokalizovány v Golgiho aparátu za účasti membránově vázaných glykosyltransferas. K ceramidu jsou postupně připojovány sacharidové podjednotky z aktivovaných nukleotidových derivátů sacharidů. Pořadí glykosylace a konkrétní konformace vznikajících vazeb je dána specifitou

a kompartmentací zúčastněných enzymů. Společným prekurzorem většiny glykolipidů je glukosylceramid a laktosylceramid. Jejich syntéza probíhá na cytosolické straně Golgiho aparátu, kam jsou lokalizovány příslušné enzymy glukosyltransferasa a galaktosyltransferasa. Přehledně je popsána celá biosyntéza od kondenzace serinu a palmitoyl-CoA až po laktosylceramid v publikaci Sandhoffa a van Echten<sup>12</sup>.

### 1.3.1. Biosyntéza gangliosidů ganglio- série

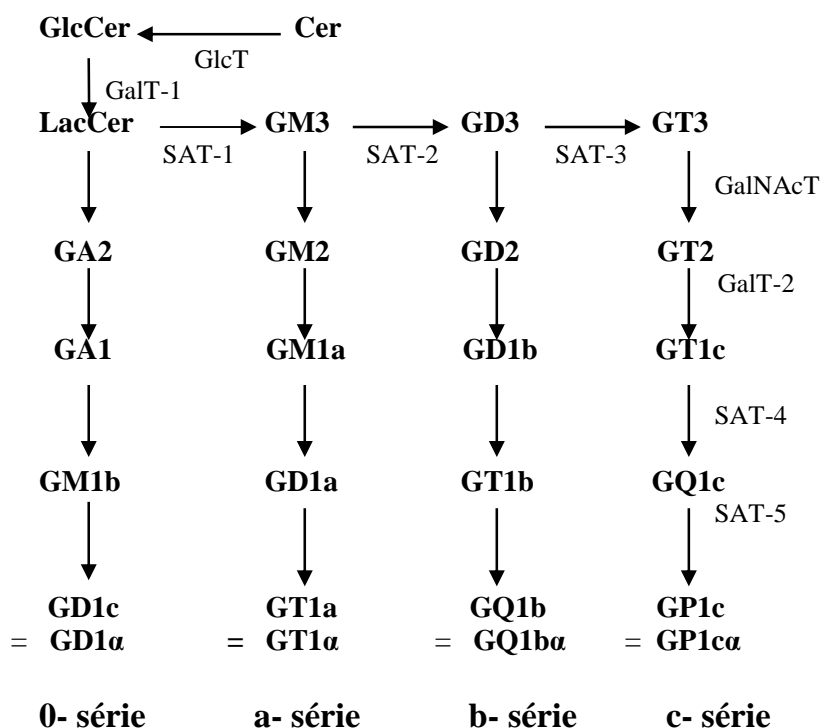
Gangliosidy gangliosérie se nacházejí v mozkové tkáni, kde probíhá i jejich syntéza. Syntéza tří větví gangliosidů gangliosérie probíhá za účasti příslušných sialyltransferas (SAT-1, SAT-2, SAT-3). Enzymy jsou přísně specifické. Každá sialyltransferasa přenáší zbytek kyseliny sialové na příslušný glykosylceramid takto:

SAT-1 na laktosylceramid za vzniku gangliosidu GM3, SAT-2 na GM3 za vzniku GD3 a SAT-3 na GD3 za vzniku GT3<sup>13, 14</sup>. Enzymy jsou svým aktivním místem orientovány do lumen Golgiho aparátu<sup>15</sup>. Sialylace probíhá v *cis*- části, následující glykosylace v *trans*-části. Enzymy katalyzující glykosylaci mají širší specifitu než sialyltransferasy.

N-Acetylgalaktosamintransferasa (GalNAcT) přenáší N-acetylgalaktosamin na laktosylceramid, GM3, GD3 a GT3 za vzniku GA2 (=asialoGM2), GM2, GD2 a GT2, které tvoří 4 větve gangliosidů *α*, *a*, *b*, *c*<sup>16,17</sup>. Také další enzymy sialyltransferasa 4 a 5 mají širokou specifitu. Sialyltransferasa 4 (SAT-4) katalyzuje syntézu GM1b z GA1, GD1a z GM1a a GT1b z GD1b<sup>16</sup>, sialyltransferasa 5 (SAT-5) syntézu GD1c, GT1a, GQ1b a GP1c z GM1b, GD1a, GT1b a GQ1b<sup>17,18</sup> a GD3 na GT3 (viz. Obr.3, str.16)

Protože biosyntéza probíhá v různých odděleních Golgiho aparátu, je třeba vznikající gangliosidy určitým způsobem mezi jednotlivými oddíly transportovat. Předpokládá se, že transport probíhá vesikulární cestou. Konečné produkty biosyntézy jsou z Golgiho aparátu do membrány transportovány rovněž prostřednictvím vesikul<sup>19,20,21</sup>.

U savců a ptáků převažuje větev *a*- a *b*-, zatímco větev *0*- (hojná u žab) a větev *c*- (hojná u ryb) jsou u savců minoritní. Gangliosidy vykazují druhově a tkáňově specifické složení, které je určováno z části genetickými a jinými faktory<sup>22</sup>.



Obr.3: Schéma větví (sérií) biosyntézy gangliosidů. Účinkem specifických sialyltransferas (SAT-1, SAT-2 a SAT-3) vznikají z laktosylceramidu postupně gangliosidy GM3, GD3 a GT3 a z nich dalšími glykosyltransferasami další gangliosidy<sup>16</sup>.

### 1.3.2. Biosyntéza glykosfingolipidů lakto- a neolakto- série

Biosyntéza sfingolipidů lakto- a neolakto- série probíhá především v žláznových epitheliálních buňkách a pravděpodobně i endotheliálních buňkách. Tyto glykosfingolipidy jsou nositeli antigenní specifity krevních skupin ABH, Lewis, I a i. Krevní skupina je charakterizována právě oligosacharidem glykosfingolipidu. Tyto glykolipidy jsou často fukosylovány a sialovány.

### 1.3.3. Regulace biosyntézy

Kompletní regulace biosyntézy sfingolipidů dosud nebyla zcela objasněna. Předpokládá se, že na zastoupení konečných produktů biosyntetických drah, budou mít vliv kinetické parametry jednotlivých transferas, jejich topologické uspořádání a vzájemné prostorové uspořádání enzymů. Svou roli hraje i transkripční regulace transferas a v poslední době byly zjištěny nové skutečnosti o regulaci na úrovni posttranslační modifikace<sup>23,24</sup>.

Starší práce uvažovaly o zpětné kontrole biosyntézy glykolipidů, kdy jsou jednotlivé série inhibovány jejich vyššími produkty. V pokusech in vitro bylo třeba



zjištěno, že N-acetylgalaktosamintransferasa (GalNAcT) syntetizující GM2 v Golgiho aparátu jater potkanů je silně inhibována GD1a, sialyltransferasa syntetizující GD3 (SAT-2) je inhibována GQ1b<sup>25</sup>. Tento jev nebyl dosud pozorován in vivo nebo na pokusech s buněčnými kulturami.

Dále bylo zjištěno, že biosyntéza *a*-, *b*- větve je ovlivněna pH tak, že snížením pH ze 7,4 na 6,2 v kultivačním médiu myších mozečkových buněk dojde reverzibilně k přesunu biosyntézy *a*- větve na biosyntézu *b*- větve<sup>26</sup>. Je to možno vysvětlit různými pH optimy dvou klíčových regulačních glykosyltransferas- GalNAcT a sialyltransferasy 2 (SAT-2).

Jiný experiment ukázal vliv inhibitoru GalNAcT z kuřecího krevního séra, který po přidání ke kultivačnímu médiu buněk embrionální kuřecí retiny ovlivňuje poměr GM3/GD1 a inhibuje diferenciaci<sup>27</sup>.

V poslední dekádě byl učiněn výrazný pokrok ve výzkumu regulace biosyntézy gangliosidů. Bylo zjištěno, že je přísně regulována aktivitami glykosyltransferas. Biosyntéza gangliosidů v paralelních větvích (sériích) vyžaduje jemné sladění subcelulární distribuce a vzájemné souhry glykosyltransferas.

Biosyntéza je kontrolována na úrovni<sup>24</sup>:

- genové transkripce glykosyltransferas
- posttranslační modifikace glykosyltransferas

### **Regulace biosyntézy gangliosidů na transkripční úrovni**

Mechanismus regulující expresi genů různých glykosyltransferas je dosud málo prostudován. Je klíčové charakterizovat struktury promotorů, transkripčních faktorů nebo komplexů transkripčních faktorů zapojených v regulaci biosyntézy na transkripční úrovni. Byly izolovány promotory 6-ti genů glykosyltransferas syntetizujících gangliosidy. Jejich společnou vlastností je, že všechny jsou bez TATA boxu i CCAAT boxu, avšak mají několik Sp1 vazebných míst v blízkosti startovacího místa transkripce. Tyto vlastnosti jsou charakteristické pro „housekeeping geny“. Termín „housekeeping“ označuje permanentní expresi s nízkou regulací<sup>24</sup>.

### **Posttranslační modifikace glykosyltransferas**

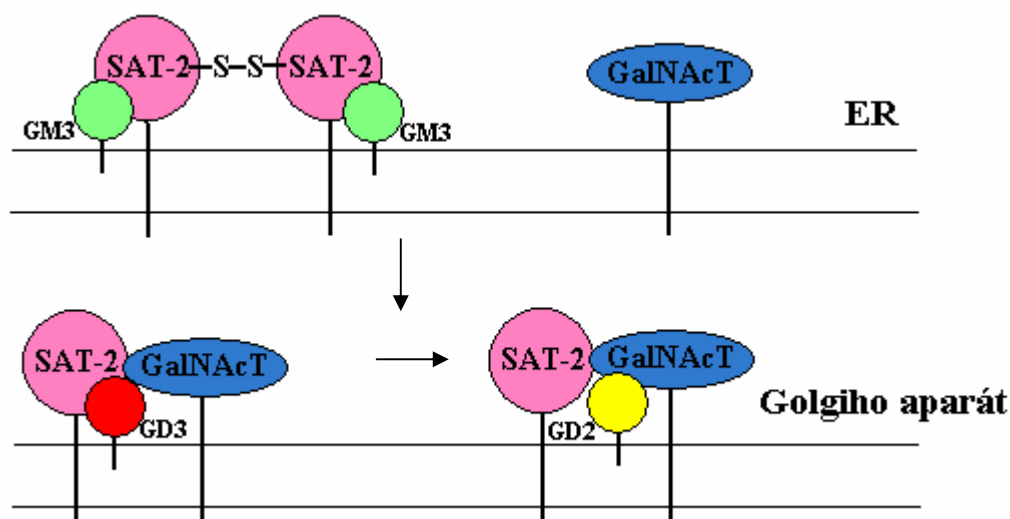
Posttranslační modifikace glykosyltransferas je oblastí výzkumu gangliosidů, ve které byl v poslední době učiněn značný pokrok. Byly navrženy dva možné mechanismy posttranslační kontroly.

**(a) Fosforylace/defosforylace glykosyltransferas** je „rychlý“ regulační mechanismus reagující na okamžité fyziologické potřeby. Přehledným způsobem jej shrnuje publikace

Yu a Biebericha (2001)<sup>23</sup>. Bylo ukázáno, že aktivity několika sialyltransferas jsou „downregulovány“ fosforylací účinkem proteinkinasy C v bezbuněčném i buněčném systému a tento efekt může být zpětně vrácen účinkem membránově vázaných fosfatas. Naproti tomu aktivita N-acetylgalaktosamintransferasy může být „upregulována“ fosforylací účinkem proteinkinasy A. Fosforylace a defosforylace glykosyltransferas může ovlivňovat jejich zapojení do intracelulárních pochodů (jejich aktivaci a deaktivaci, zapojení v procesech buněčné diferenciaci, jejich translokaci).

**(b) N-Glykosylace glykosyltransferas** je důležitým krokem v regulaci jejich aktivit, poločasu života, nitrobuněčného transportu a lokalizaci. Výsledky řady prací shrnuli Yu a spol. (2004) v přehledné práci s následně uvedenými hlavními závěry<sup>24</sup>.

- **Deglykosylace a reglykosylace** glykosyltransferas hraje zřejmě roli v jejich transportu z ER do Golgiho aparátu. Výpadek reglykosylace způsobuje, že glykosyltransferasy nemusí být transportovány do *trans*-Golgi a dále.
- Potvrzuje se **formování komplexů glykosyltransferas**, které ovlivňuje rychlý transport gangliosidu k dalšímu enzymu a tím ovlivňují expresi gangliosidů. Důsledkem toho je, že některé gangliosidy existují krátkou dobu a stávají se minoritními (případ GM2 a GD2 gangliosidů). Formaci enzymových komplexů popsal již Roseman v roce 1970<sup>28</sup> a byla experimentálně dokázána v letech 2000-2002<sup>29,30</sup>. Sialyltransferasa 2 (SAT-2) dimerizuje v endoplasmatickém retikulu prostřednictvím disulfidické vazby, což může stabilizovat tvorbu komplexu s GM3<sup>29,31</sup> a podpořit transport vytvořeného komplexu GM3-SAT-2 do Golgiho aparátu. Heterodimer SAT-2 a GalNAcT konvertuje GM3 na GD3 a usměrní ho do aktivního místa GalNAcT, která katalyzuje přeměnu GD3 na GD2 (viz. Obr. 4, str. 19).
- Pozorování, že přidavek GM3 je potřeba ke stabilizování SAT-2 během in vitro translace naznačuje možnost asistence GM3 jako **lipidního chaperonu** při sbalování proteinu.
- Ukazuje se, že gangliosidy mohou regulovat svojí biosyntézu vazbou ke glykosyltransferasám a asistovat na jejich vyzrání. Můžeme hovořit o **autoregulaci biosyntézy gangliosidů**. Avšak v případě SAT-2 bude tato autoregulace pracovat pouze v přítomnosti GM3 v ER<sup>29,32</sup>.



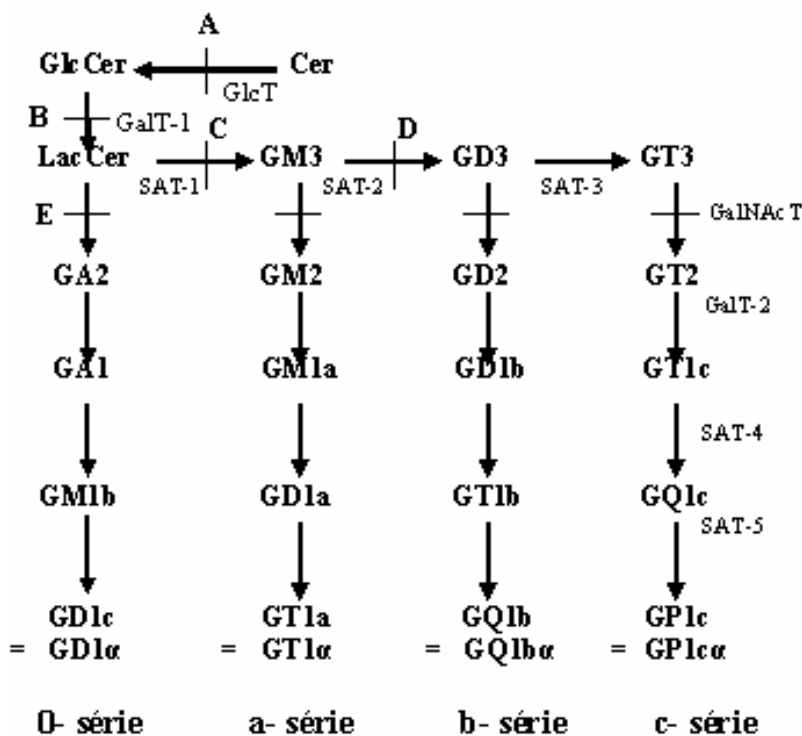
Obr. 4: Regulace biosyntézy gangliosidů pomocí tvorby komplexu SAT-2 a GalNAcT. V ER je SAT-2 dimerizován disulfidickou vazbou, která může stabilizovat tvorbu komplexu s GM3 a podporovat tak transport GM3-SAT-2 komplexu do Golgiho aparátu. V Golgiho aparátu SAT-2 a GalNAcT vytváří heterodimer se vzájemnou enzymovou aktivací. V tomto heterodimeru SAT-2 katalyzuje GM3 na GD3, který potom nasměruje do aktivního místa GalNAcT. GalNAcT katalyzuje GD3 na GD2 a další glykosylace závisí na aktivitě, subcelulární lokalizaci nebo formaci komplexu s dalšími glykosyltransferasami<sup>24</sup>.

#### 1.3.4. Výzkum úlohy gangliosidů pomocí genových mutací

Významný pokrok v porozumnění funkce komplexních gangliosidů v eukaryotických buňkách představuje vyvinutí myši s genetickými defekty v určitých krocích biosyntézy<sup>33,34</sup>. Blokování v časných stádiích biosyntézy A-E je ukázáno na Obr. 5 na str. 20. Genom myši je pozměněn tak, že určité oblasti genů zodpovědných za jednotlivé kroky biosyntetické dráhy jsou poškozeny a nedochází k syntéze příslušných enzymů.

Pokusy s buňkami myši melanomové linie ukázaly, že buňky byly i přes defektní složení glykolipidů životaschopné. Vykazovaly pouze malé změny v buněčné morfologii a buněčném růstu. Na základě tohoto pozorování byl učiněn závěr, že glykolipidy včetně gangliosidů nejsou pro přežití buňky nutné<sup>35</sup>. Pozdější experimenty s geneticky upravenými myšmi však ukázaly, že experimenty in vitro nedokáží dostatečně objasnit funkci metabolitů, které jsou zapojeny do mezibuněčné interakce a jejich využití pro tyto studie je omezené.

Pokusy s geneticky upravenými myši naopak ukázaly důležitou funkci při vývoji mnohobuněčných organismů. Myši s poškozeným genem pro glukosyltransferasu (defekt A) hynou kolem 7.- 8. dne embryonálního vývoje zřejmě v důsledku nárůstu apoptózy v ektodermu. Diferencovala se zde pouze primitivní zárodečná vrstva.



Obr. 5: Schéma větví (sérií) biosyntézy gangliosidů s označením genového poškození pro příslušný enzym. A označuje defekt v *GlcT*, B označuje defekt v *GalT-1*, C označuje defekt v *SAT-1*, D označuje defekt v *SAT-2* a E označuje defekt v *GalNAcT*

Experimenty s defektem glukosyltransferasy byly prováděny i na buněčných kulturách embryonálních kmenových buněk. Mutantní buňky ale narozdíl od „knockout“ myši vykazovaly podobné růstové křivky jako normální buňky, byly tedy schopné diferenciace<sup>37</sup>.

U myši s inaktivovaným genem pro galaktosyltransferasu (defekt B) neprobíhala biosyntéza galaktosylceramidu, sulfatidů a GM4 gangliosidu. Byla zachována schopnost syntézy myelinu s téměř normální strukturou, kdy byl chybějící Gal-Cer nahrazen Glc-Cer s hydroxylovanými mastnými kyselinami. Takovýto myelin ale vykazoval zřetelné poškození funkce a stability doprovázené řadou klinických příznaků jako je generalizovaný

třes, ataxie (porucha koordinace pohybů), porucha vedení vzruchu aj.<sup>38,39</sup>. Byla poškozena i spermatogeneze vzhledem k biosyntéze seminolipidu z monogalaktosylglycerolu.

Myš s poškozením genu pro sulfotransferasu netvoří sulfo-galaktosylceramidy, sulfo-laktosylceramid a seminolipid<sup>40</sup>. Projevují se velmi podobné neurologické příznaky jako u myši s poškozením tvorby galaktosylceramidu.

Byly vytvořeny dva kmeny myši s poškozením tvorby hlavních mozkových gangliosidů. Kmen s poškozením genu pro GalNAcT (defekt E) nebyl schopen syntetizovat GM2, GM1a, GD1a, GT1a, GD2, GD1b, GT1b, GQ1b. Kmen s poškozením genu pro SAT-2 netvořil GD3, GD2, GD1b, GT1b a GQ1b. Oba kmeny vykazují pouze malé poškození mozkových funkcí. Vývoj homozygotní myši s poškozením GalNAcT probíhá téměř normálně bez výraznějšího histologického nálezu v tkáních centrálního nervového systému. Byla zjištěna degenerace axonů a defekty myelinizace v nervovém systému<sup>41</sup>. U myši se projevovaly progresivní poruchy motorických funkcí<sup>42</sup>. Byly nalezeny i defekty mimo nervovou tkáň. Samci byli sterilní s morfologickými a funkčními poruchami varlat<sup>43</sup>. Byla narušena i funkčnost imunitního systému v odpovědi T buněk sleziny na interleukin 2<sup>44</sup>.

Křížením kmene myši s defektem SAT-2 a kmene s defektem beta1-4 GalNAcT (C + E) vznikly myši s dvojitou mutací. Dokázaly exprimovat pouze GM3 jako hlavní gangliosid. Tyto myši projevovaly vysokou citlivost na zvukové podněty s následujícími smrtelnými záchvaty<sup>34</sup>.

Myš s poškozeným genem pro SAT-1 (defekt C) postrádá schopnost biosyntézy GM3 a nebyla zjištěna ani přítomnost žádného dalšího gangliosidu, který se z GM3 následně tvoří. Biosyntéza gangliosidů je představována v tomto případě sérií 0 (GM1b, GD1c (=GD1 $\alpha$ )) v množství, které odpovídá celkovému obsahu gangliosidů u normálních zvířat. Mutované myši mají změněnou homeostázu glukosy, z čehož vyplývá role GM3 jako regulátoru signální cesty zprostředkované insulinem.

Nejnovější model mutovaného kmene jsou myši s dvojitou mutací- na GalNAcT a SAT-1 (defekt E + D). Tyto myši nejsou schopny tvořit žádný glykolipid z ganglio-série. Koncentrace laktosylceramidu je až 100x zvýšena. Navíc sulfo-laktosylceramid má složení sfingoidů a mastných kyselin podobné gangliosidům detekovaným u těchto myši. Po odstavení se u mladých myši vyvíjí těžké neurodegenerativní onemocnění končící smrtí<sup>45</sup>.

Homozygotní kmen myši s poškozeným genem pro SAT-2 neprojevoval pozorovatelnou změnu ve vývoji, nebyla ovlivněna délka života zvířat<sup>34</sup>. Tyto experimenty vyvrátily domněnku o účasti GD3 a *b*-větve gangliosidů na neuronální diferenciaci,

protože u tohoto mutantního kmenu myši dochází k diferenciaci bez přítomnosti gangliosidů *b*-větve.

Z uvedeného textu vidíme, že defekt s poškozením SAT-2 způsobuje velice malé poškození, při kterém zvíře může dobře přežívat. U normálních zdravých savců např. potkanů existují kmeny, které mají aktivovány obě větve biosyntézy *a*- i *b*- a kmeny které mají *b*-větve silně minoritní, což je příklad kmene Wistar použitého v naší studii, který netrpí žádnými zdravotními potížemi.

## 1.4. Chemické vlastnosti gangliosidů

### 1.4.1. Prostorová konformace molekuly gangliosidů

Molekula gangliosidu je stabilizována celou řadou vazebných interakcí, což jí oproti fosfolipidům dává mnohem větší pevnost. Interakce jsou přítomné jak v oligosacharidové, tak v ceramidové složce.

V ceramidu mají stabilizující efekt vodíkové můstky, donorem vodíku je hydroxylová skupina, akceptorem vodíku karbonylamid a kyslík s volnými elektronovými páry. Intramolekulová vodíková vazba mezi NH skupinou sfingoidní báze a kyslíkem glykosidové vazby může udržovat pozici ceramidu vzhledem k oligosacharidové části. Toto usprádnění lze ale narušit vznikem jiných vazebných interakcí gangliosidů s jinými molekulami. Rigiditu molekuly a rovněž planární uspořádání podporuje jednak amidová vazba, tak dvojná vazba s *trans* konfigurací. Amidová vazba určuje paralelní orientaci os obou uhlíkatých řetězců, což zvyšuje možnosti vzájemných hydrofobních interakcí a tak přispívá v pevnosti molekuly. *Trans* dvojná vazba C4-C5 umožňuje kondenzaci ceramidů v těsnějším uspořádání. Další zpevnění poskytují solvatační efekty v C3-C4-C5 části sfingosinu<sup>46</sup> (viz. Obr.1 str. 11 ).

Stabilizujícím prvkem v oligosacharidové části je kyselina sialová udržující vysoce stabilní konformaci tvorbou tří vodíkových vazeb se zbytkem oligosacharidu. Podobnost v konformačním uspořádání složitějších gangliosidů je dána počtem sialylových skupin a sousedními sacharidy.

Prostorové uspořádání molekuly gangliosidu je ovlivněno vazbou kationtů na oligosacharidovou část. Vazebné místo se silně nukleofilním charakterem se nachází v oblasti vnitřní galaktosy díky kyslíkovým atomům sousedního N-acetylgalaktosaminu a kyseliny sialové<sup>47</sup>. V organismech je významná především vazba Ca<sup>2+</sup>, následná změna konformace molekuly má vliv na uspořádání gangliosidů ve shlucích na povrchu membrán.

Ve vodných disperzích v kyselém prostředí tvoří gangliosidy estery. Týká se to především gangliosidů s dvěma sialovými kyselinami v molekule. Esterová vazba vzniká mezi karboxylovou skupinou vnější kyseliny sialové a hydroxylovou skupinou na C-9 vnitřní kyseliny sialové<sup>48,49</sup>. Tvorbou esterové vazby se redukuje negativní náboj sialových kyselin. Estery jsou stabilní v rozmezí pH 2- 7, v mezních hodnotách pH dochází ke štěpení esterové vazby a obnově negativního náboje. Tvorba a rozpad těchto esterů může v přírodě sloužit jako regulátor negativního náboje v mikrosprostředí buněčného povrchu a k expresi nových antigenních struktur<sup>50</sup>.

#### 1.4.2. Amfifilní vlastnosti gangliosidů

Gangliosidy jsou díky přítomnosti hydrofilní sacharidové a hydrofobní ceramidové části látky s amfifilními vlastnostmi, což vede k jejich agregaci ve vodných roztocích<sup>51</sup>.

Ve vodě se orientují hydrofilní částí volně do vody a hydrofobní směrem k jiným hydrofobním částem ostatních molekul gangliosidů. Vytváří tak micely s ceramidovým jádrem obklopeným oligosacharidovými zbytky. Micely se tvoří v roztocích o širokém rozmezí koncentrací gangliosidů, od  $10^{-9}$  do  $10^{-2}$  M. Při vyšších koncentracích  $10^{-2}$  až  $10^{-1}$  vznikají hexagonálně uspořádané cylindrické struktury gangliosidů<sup>52</sup>.

Molekulární hmotnost micel klesá s rostoucím počtem sialylových skupin v molekule a stoupá se zvyšující se nasyceností v ceramidové části a délkou sfingosinových bází<sup>53</sup>.

Dynamika uspořádání molekul gangliosidů do micelárních útvarů je rychlá, zatímco disociace probíhá pomalu. Tvorba micel je ovlivněna vlastnostmi okolního prostředí, dvoumocnými a jednomocnými ionty, jinými lipidy a proteiny.

Gangliosidy narozdíl od fosfolipidů a neutrálních glykosfingolipidů netvoří ve vodných roztocích spontánně dvojvrstevné struktury. Pro jejich vznik je v roztoku nutná přítomnost lipidů, které dvouvrstevné útvary běžně vytvářejí, např. fosfolipidů. V roztoku gangliosidů a fosfatidylcholinu se tvoří dvouvrstevné liposomy, pokud poměr koncentrace gangliosid/fosfatidylcholin nepřekročil přechodovou hodnotu. Nad touto hodnotou vznikají smíšené micely. Např. v roztoku GM1 a vaječného fosfatidylcholinu při pH 7 je tato hodnota 0,2. Přechodová hodnota se snižuje se zvyšujícím se počtem sialylových skupin v molekule gangliosidu nebo s poklesem délky řetězce mastných kyselin ve fosfatidylcholinu<sup>46</sup>. V liposomech jsou gangliosidy lokalizovány do vnější vrstvy fosfolipidové dvojvrstvy s oligosacharidovým zbytkem vystaveným na povrchu, což se velmi podobá uspořádání v plazmatické membráně<sup>54,55</sup>.

## 1.5. Molekulárně-fyziologická úloha glykosfingolipidů v biologických membránách

Glykosfingolipidy se ve vysokých koncentracích nacházejí ve vnější vrstvě plazmatické membrány všech buněk. Jejich složení je specifické pro určitý buněčný typ.

Přítomnost glykosfingolipidů ve vysoké koncentraci na buněčných površích se vysvětluje dvěma důvody:

- glykosfingolipidy zvyšují pevnost struktury plazmatické membrány
- oligosacharidové zbytky glykosfingolipidů zprostředkovávají interakce s exogenními ligandy<sup>56,57</sup>

Gangliosidy se na povrchu plazmatické membrány často shlukují do oblastí zvaných mikrodomény<sup>58</sup>. Model tekuté mozaiky Singerse a Nicolsona<sup>59</sup>, kde jsou proteiny náhodně rozmístěny v homogenní kapalně lipidní dvojvrstvě, byl později nahrazen „deskovým“ modelem<sup>60</sup>. Tato představa ukazuje membránu složenou z uspořádaných a neuspořádaných oblastí, jejichž heterogenita je dána stupněm nenasycenosti mastných kyselin. Poprvé byly klastry glykosfingolipidů (GSL) spatřeny pomocí skenovací elektronové mikroskopie na erytrocytární membráně<sup>61</sup>, později i na dalších typech membrán<sup>62,63</sup> a na liposomech<sup>64</sup>.

Bylo zjištěno, že GSL a glykosylfosfatidylinositolem (GPI)- zakotvené proteiny byly v polarizovaných buňkách přednostně směřovány do apikální membrány. Dalším zajímavým poznatkem bylo zjištění, že membránové biologicky aktivní proteiny jsou asociovány s GSL, které je obklopují<sup>65</sup>.

## 1.6. Žlučový systém

Žlučový systém, který je tvořen žlučovými cestami, slouží k transportu, modifikaci a vylučování žluče do trávicího traktu. Žluč samotná je vytvářena především hepatocyty, cestou své kanalikulární membrány. Jde o aktivní sekreci a koncentraci solí žlučových kyselin a dalších látek jako konjugovaného bilirubinu, cholesterolu, fosfolipidů, proteinů, elektrolytů a vody. Druhým významným faktorem ve vylučování žluči, jsou žlučové cesty samotné. Cholangiocyty, buňky vystylající žlučové cesty, obsahují chloridový kanál (CFTR) a kanál pro bikarbonát. Do žluči secernující chloridový aniont a bikarbonát a významně tak modifikují finální složení žluči.

Samotné žlučové cesty začínají jako žlučové kapiláry, jejichž stěna je tvořena pouze klkovitě vybíhající kanalikulární membránou hepatocytů. Tyto kapiláry se vlévají do



žlučových tubulů (Heringovy kanálky nebo též cholangioly s kubickým epitelem) a ty dále ústí do interlobulárních žlučovodů. Jejich splynutím vznikají segmentální a poté lobární žlučovody, aby nakonec vyústily z jater jako levý a pravý jaterní žlučovod. Ty se dále spojují do společného jaterního vývodu a jako ductus choledochus ústí do trávicí trubice, konkrétně do duodena<sup>66</sup>.

## 1.7. Hepatocyt a tvorba žluči

Hepatocyt je funkčně a morfologicky polarizovaná buňka sekrečního epitelu. Svou bazolaterální (sinusoidální) membránou zprostředkovává přes membránové bílkovinné přenašeče absorpci žlučových kyselin, konjugovaného bilirubinu, cholesterolu, fosfolipidů, proteinů, vody a elektrolytů. Dochází k jejich přenosu přes hepatocyt a následnému vyloučení prostřednictvím bílkovinných přenašečů kanalikulární (apikální) membrány do žluči. Celý proces je poháněn činností  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasy}$  v bazolaterální membráně, která udržuje chemický gradient a potenciálový rozdíl mezi hepatocytem a jeho okolím. Buněčný gradient iontů draslíku s sodíku se udržuje výměnou dvou extracelulárních iontů draslíku za tři intracelulární ionty sodíku. Vzniká tím nerovnováha elektrického náboje, kdy je vnitřek buňky oproti okolí záporně nabitý, což přitahuje kladně nabité ionty. Činnost  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasy}$  je ovlivněna membránovou fluiditou.

Na bazolaterální (sinusoidální) membráně se nachází řada transportních proteinů pro absorpci organických iontů. Transportér NTCP přenáší žlučové kyseliny konjugované s taurinem nebo glycinem. Pracuje za současného symportu sodíkových iontů do buňky. Další transportér OATP slouží pro přenos aniontů žlučových kyselin, bromsulftaleinu, bilirubinu a jiných organických aniontů. Není závislý na kotransportu sodíkových iontů. Přenašeč OCT 1 přenáší organické kationty<sup>67</sup>. Mezi další přenašečové proteiny na bazolaterální membráně patří protein vyměňující ion  $\text{Na}^+$  za  $\text{H}^+$  a ion  $\text{Na}^+$  za ion  $\text{HCO}_3^-$ , které udržují intracelulární pH. Jsou přítomné také přenašeče pro sulfát, neesterifikované mastné kyseliny a organické kationty.

Transport žlučových kyselin cytosolem hepatocytu je umožněn především díky proteinu 3- $\alpha$ -hydroxysteroidu-dehydrogenase. Transferasa glutationu-S a proteiny vázané na mastné kyseliny se uplatňují v menší míře. Přenosu žlučových kyselin se pravděpodobně účastní i endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. Dále jsou žlučové kyseliny přenášeny vezikulární dráhou, která přenáší především proteiny tekuté fáze a ligandy, např. IgA a LDL.

Kanalikulární membrána nese transportní proteiny ze skupiny ATP-vázajících kazetových proteinů. Jsou zodpovědné za sekreci látek do žluči proti vysokým koncentračním gradientům. Multispecifický organický aniontový transportér cMOAT označovaný také jako MRP-2 přenáší glukuronid a konjugáty glutationu-S, tj. diglukuronid bilirubinu. Přenos žlučových solí zajišťuje protein BSEP, jehož činnost je částečně závislá na záporném intracelulárním elektrickém potenciálu. Do kanalikulárního transportu jsou zapojeny dva proteiny ze skupiny P-glykoproteinů, jejichž funkce je závislá na ATP<sup>68</sup>. Je to MDR1, který transportuje exogenní hydrofobní organické kationty a MDR3, fosfolipidový translokátor přenášející fosfatidylcholin. Voda a anorganické ionty (Na<sup>+</sup>) do žluči difundují přes těsné spoje díky osmotickému gradientu.

## 1.8. Cholestáza

Cholestáza je onemocnění způsobené nedostatečným odtokem žluči z jaterním buněk do duodena. Porucha odtoku žluči může nastat v jakémkoli místě mezi bazolaterální (sinusoidální) membránou hepatocytu a Vaterovou papilou. Snížením odtoku žluči dochází rovněž k retenci všech látek v krvi, které jsou společně se žlučí hepatocytem vylučovány, tzn. vody a organických aniontů (žlučové kyseliny, bilirubin). V séru je poté zvýšená koncentrace celkových žlučových kyselin a bilirubinu a rovněž zvýšená koncentrace enzymů ALP a GGT. V rámci diagnostiky tohoto onemocnění slouží uvedené jako specifické markery a jsou vyšetřovány v souboru jaterních testů.

Cholestáza se obecně dle místa vzniku poruchy odtoku žluči klasifikuje na extra- a intrahepatální. Toto hrubé rozdělení ale nepopisuje vlastní příčiny, kterých je celá řada.

Extrahepatální (obstrukční) cholestáza vzniká mechanickou překážkou ve žlučových vývodech mimo játra. Nejčastější příčinou extrahepatální cholestázy je konkrement ve společném žlučovodu, dále karcinom pankreatu, benigní striktury žlučovodu a cholangiokarcinom. Obstrukční typ obvykle způsobuje akutní cholestázu.

U intrahepatální cholestázy jsou poruchy nacházeny ve funkci hepatocytu či v drobných intrahepatálních žlučovodech. Příčinou mohou být cholestatické hepatitidy, primární biliární cirhóza nebo primární sklerózující cholangitida. Dále mohou rozvinutí syndromu cholestázy způsobit léky (poléková cholestáza), hormony, sepsis či je podmíněno geneticky. Podstatou jsou poruchy buněčných mechanismů hepatocytu, kdy může být zasažen cytoskelet nebo membrány. Fluidita sinusoidální membrány hepatocytu je snižována estrogény, což je příčinou vzniku těhotenské cholestázy. Experimentálně je používán ethinylestradiol. Funkčnost membránových transportérů je modifikována řadou

pro tělo exogenních látek (např. endotoxin snižuje aktivitu  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasy}$  a pravděpodobně působí i na snížení exprese kanalikulárního multispecifického transportéru cMOAT při pokusném modelu cholestázy sdružené s kolitidou<sup>69</sup>, cyklosporin A inhibuje na ATP závislém přenosu žlučových kyselin přes kanalikulární membránu). Funkce membránových transportérů může být porušena i v důsledku mutace v příslušném genu. Toto vzácně se vyskytující onemocnění je označováno jako progresivní familiární intrahepatální cholestáza (PFIC). Rozeznávají se 3 typy- PFIC typu 1 (Bylerova nemoc) s mutací v genu kódující ATPasu typu P, PFIC typu 2 s mutací BSEP, PFIC typu 3 s mutací v genu pro MDR3 (fosfolipasa). Dalšími vzácně se vyskytující onemocnění jsou benigní rekurentní cholestáza, Hodgkinova choroba a amyloidóza. Intrahepatální cholestáza může být akutní i chronická.

Zadržování toxických látek při cholestáze způsobuje poškození hepatocytu. Nejvíce se na hepatocelulárním poškození podílí hydrofobní žlučové kyseliny, které mají různé účinky. Vyvolávají jednak buněčnou nekrózu a jsou spouštěči apoptózy<sup>70</sup>. Zřejmě oba druhy poškození buňky jsou doprovázeny poruchami funkce mitochondrií. Experimentálně při cholestáze vyvolané podvazy žlučovodů bylo zjištěno porušení aktivity mitochondriálního enzymu respiračního řetězce a  $\beta$ -oxidace<sup>71</sup>.

### **1.9. Gangliosidy u cholestázy indukované ethinylestradiolem**

Výzkum v oblasti vlivu patologických stavů jaterních funkcí na složení gangliosidů v jaterní tkáni dosud postrádá dostatečné množství výsledků, na jejichž základě by se daly učinit komplexnější závěry.

Senn a spol. se počátkem 90.let věnovali výzkumu složení gangliosidů a aktivit enzymů syntetizujících gangliosidy v jaterní tkáni a séru po podvázání žlučovodů u potkanů kmene Wistar<sup>72</sup>. Byl pozorován zřetelný nárůst syntézy gangliosidů *b*- větve, ovšem bez odpovídajícího zvýšení exprese sialyltransferasy syntetizující GD3 (SAT-2). Mechanismus tohoto jevu nebyl v této publikaci jasně vysvětlen.

První studie zabývající se sledováním složení gangliosidů v jaterní tkáni po vyvolání cholestázy podáváním 17- $\alpha$ -ethinylestradiolu (EE) byly uskutečněny Majerem a spol. (2007)<sup>1</sup>. EE-cholestáza se používá jako modelu pro těhotenskou cholestázu. U samic potkanů kmene Wistar byla vyvolána těžká cholestáza subkutánní injekcí EE rozpuštěným v 0,2 ml 1,2- propandiolu (5 mg/kg hmotnosti zvířete) v pravidelném intervalu 24 hodin po dobu 18 dní. Za totožných fyziologických podmínek byla držena

skupina kontrolních zvířat, kterým bylo injikováno pouze 0,2 ml 1,2- propandiolu bez EE a skupina zvířat bez jakékoli medikace.

Vývin cholestázy byl doložen určením biochemických markerů jaterních funkcí u EE medikovaných potkanů v porovnání s kontrolní skupinou potkanů, tj. aktivita jaterní alaninaminotransaminasy (ALT) a aspartátaminotransaminasy (AST), aktivita jaterní alkalické fosfatasy (ALP), hladina bilirubinu a celkových žlučových kyselin (CŽK) v séru, viz. Tab. 4. Statistickou významnost rozdílů hodnot markerů jaterních funkcí mezi sledovanými skupinami ukazuje P- hodnota menší než 0,05, tedy výrazné navýšení hladiny bilirubinu a CŽK v séru u EE medikovaných potkanů, což je dokladem funkčního poškození jater. Morfologicky byla cholestáza pozorována mikroskopem na histologických řezech jako poškození struktury hepatocytů a tvorbou intracelulárních granulí žlučového barviva zejména v periferních oblastech jaterních laloků. U zvířat s cholestázou došlo k výraznému úbytku hmotnosti ( $212 \pm 43$  g) oproti kontrolním zvířatům ( $293 \pm 32$  g), P- hodnota 0,004.

Tab. 4: Markery cholestázy u kontrolních zvířat a zvířat s cholestázou indukovanou 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem (Majer a kol., 2007)<sup>1</sup>

Marker	Kontrolní potkani	EE- potkani	P- hodnota
ALT ( $\mu$ kat/l)	$0,87 \pm 0,14$	$1,16 \pm 0,20$	0,026
AST ( $\mu$ kat/l)	$1,41 \pm 0,28$	$1,85 \pm 0,96$	0,374
ALP ( $\mu$ kat/l)	$2,04 \pm 0,40$	$2,75 \pm 1,50$	0,394
bilirubin ( $\mu$ kat/l)	$2,10 \pm 0,20$	$26,0 \pm 17,0$	0,002
CŽK ( $\mu$ kat/l)	$39 \pm 25$	$589 \pm 186$	0,002

Výsledky ukázaly, že EE-cholestáza způsobuje celkové zvýšení lipidově vázané kyseliny sialové z  $44,1 \pm 15,2$  nmol/g vlhké jaterní tkáně u kontrolních zvířat na  $79,1 \pm 9,0$  nmol/g vlhké jaterní tkáně u EE-medikovaných zvířat, s P- hodnotou menší 0,01. Bylo zjištěno, že toto zvýšení je primárně dáno zvýšením množství gangliosidů *a*- větve a *b*- větve. Velice výrazné je zvýšení syntézy *b*-větve, tj. GD3, GD1b a GT1b, v porovnání s tím je zvýšení *a*- větve méně významné (marker biosyntetické dráhy *a*- větve GD1a je zvýšen zhruba 3x). Celkově se *b*- větev podílí na zvýšení gangliosidů 54x a *a*- větev 1,3x, viz. Tab. 5 str. 29.

Výsledky této studie Majera a kol. (2007) jsou ve shodě s pozorováním Mesarica a Deckera (1990)<sup>73</sup>, kteří studovali vliv pohlavních steroidních hormonů na aktivitu

sialyltransferasy syntetizující GM3 (SAT-1) a GD3 (SAT-2) v kultuře hepatocytů. Progesteron,  $\beta$ - estradiol a testosteron zvyšovaly aktivitu SAT-2, ale nikoli aktivitu SAT-1.

Gangliosidy jsou obecně lokalizovány především v buněčné membráně a Majer a kol. (2007) na základě svých výsledků nabízí vysvětlení, že zvýšení biosyntézy *b*- větve gangliosidů je součástí ochranného systému jaterních buněk proti škodlivým účinkům zvýšené koncentrace žlučových kyselin při cholestáze. Důležitou úlohu *b*-větve gangliosidů zjistili již Kasai a kol. na LEC potkanech (1993)<sup>74</sup> s vyblokoványými geny pro biosyntézu *b*- větve, které vedlo k těžkým jaterním poruchám.

Tab. 5: Změny v zastoupení gangliosidů u kontrolních zvířat a zvířat s cholestázou indukovanou 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem (Majer a kol., 2007)<sup>1</sup>

Biosyntetická větev	Gangliosid	Kontrolní potkani (n=6)(nmol/g)	EE-potkani (n=6)(nmol/g)	P- hodnota
a-	GM3	11,4 $\pm$ 2,2	7,1 $\pm$ 0,6	0,001
	GM1a	7,8 $\pm$ 2,4	10,5 $\pm$ 3,0	0,146
	GD1a	3,6 $\pm$ 1,0	11,8 $\pm$ 3,0	0,001
b-	GD3	0,08 $\pm$ 0,03	2,0 $\pm$ 1,2	0,002
	GD2	0,02 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,34	0,041
	GD1b	0,10 $\pm$ 0,06	5,4 $\pm$ 1,6	0,002
	GT1b	0,06 $\pm$ 0,03	6,4 $\pm$ 2,6	0,002

### 1.10. Histologické změny v lokalizaci gangliosidů u cholestázy indukované ethinylestradiolem a cholestázy indukované podvázáním žlučvodů

Tato diplomová práce souvisí s prací Václava Šmída „Změny v histochemické lokalizaci gangliosidů u experimentální cholestázy“, obhájené na 1. lékařské fakultě UK,<sup>3</sup> která zpracovává histologická pozorování u cholestázy indukované podvazem obdobným způsobem jako již publikovanou studii naší výzkumné skupiny (Jirkovská a kol., 2007)<sup>2</sup>, která sledovala histologické změny v lokalizaci GM1 gangliosidu u cholestázy indukované 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem (EE).

Zmíněné práce upozornily na možnost zpevnování sinusoidální membrány hepatocytů přesunem gangliosidů. Tento přesun je interpretován jako obrana hepatocytů proti detergentnímu působení vysoké koncentrace žlučových kyselin v sinusoidálním řečišti, které by vedlo k poškození plazmatické membrány a k nekróze hepatocytů.

V diplomové práci Václava Šmída byla studována lokalizace GM1 gangliosidu na řezech z jater potkanů s cholestázou vyvolanou podvazem žlučovýchodů a srovnávána s kontrolními zvířaty slepě operovanými. Dalším bodem bylo sledování možného hepatoprotekčního účinku hemoxygenasy 1 (HO-1) na expresi GM1 gangliosidu u kontrolních i cholestatických zvířat. Vliv HO-1 byl sledován po aplikaci inhibitoru HO-1 Sn-mesoporfyrinu a aktivátoru HO-1 heminu. K detekci GM1 gangliosidu byla u obou typů cholestáz využita vazebná afinita GM1 s B-podjednotkou cholera toxinu.

Práce dospěla mj. k následujícím zjištěním:

- a) Byl prokázán zvýšený přesun GM1 pozitivita z cytoplazmy do sinusoidální membrány u skupin BDL a iBDL. Lze tedy usuzovat, že obstrukční cholestáza indukovaná podvazem segmentálních žlučovýchodů potkana vede ke změnám lokalizace GM1 gangliosidu. Podobných výsledků dosáhla Jirkovská a spol.<sup>2</sup>
- b) Byl zjištěn kvalitativní rozdíl v expresi gangliosidu GM1
  - u kontrolních zvířat exprese GM1 plynule lemovala sinusoidální i apikální membrány a občas se vyskytovala i bodová, intracytoplazmatická lokalizace.
  - u zvířat s obstrukční cholestázou byla lokalizace vyznačena plynule v sinusoidálních membránách (obzvláště u skupin BDL a iBDL)

### 1.11. Význam hemoxygenasy v hepatoprotekci

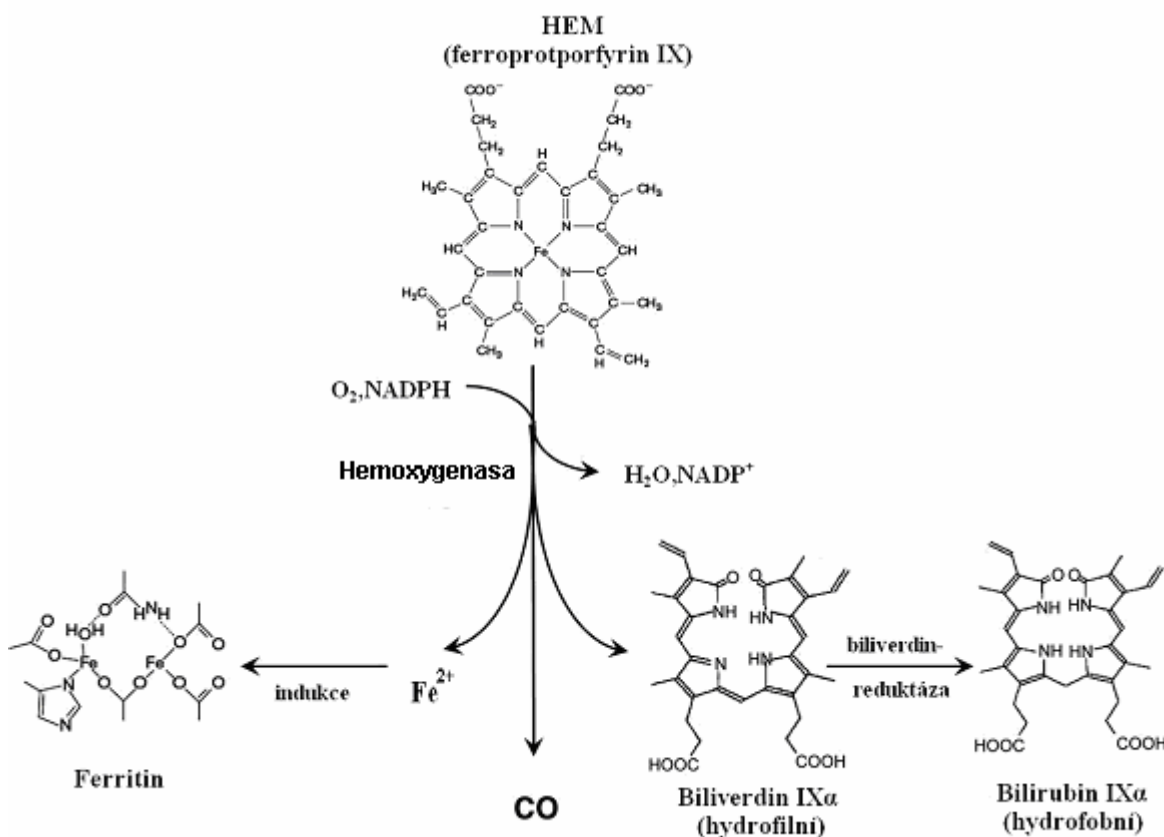
Hemoxygenasa (HO- E.C. 1.14.99.3.) je enzym lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu ve všech typech buněk. Katalyzuje odbourávání hemu na oxid uhelnatý CO, Fe<sup>2+</sup> a biliverdin<sup>75,76,77</sup>. Biliverdin se dále působením biliverdinreduktasy metabolizuje na bilirubin<sup>78</sup> (viz. Obr. 6 str. 31).

HO je plně funkční pouze v komplexu s NADPH-dependentní flavoproteinasou (označovanou také jako cytochrom-P450-reduktasa), společně s biliverdinreduktasou. Tento komplex vzniká na endoplazmatickém retikulu. Působením enzymů za přítomnosti molekuly O<sub>2</sub> je porfyrinový kruh hemu štěpen a oxidován na methinové můstku za vzniku již zmíněných katabolických produktů.

Jsou známy 2 isoenzymy hemoxygenasy- HO-1, HO-2. Aktivita HO-2 je v buňce konstantní, zatímco HO-1 je inducibilní. Experimentálně se pro zvýšení aktivity HO-1 používá hemin, pro snížení aktivity HO-1 Sn-mesoporfyrin.

Produkty katabolizmu hemu již dnes nemohou být chápány pouze jako odpadní látky s toxickými účinky. Bylo totiž zjištěno, že pro organismus vykazují řadu pozitivních efektů. U CO byly zjištěny protizánětlivé, antiapoptotické, antiaterogenní,

antiproliferativní a cytoprotektivní účinky. Tato rozmanitost aktivit zprostředkovaná CO je spojená s klíčovou ochrannou rolí indukce HO-1 v přizpůsobování tkání proti rozdílným formám stresu<sup>79</sup>.



Obr. 6: Katabolická funkce hemoxygenasy<sup>80</sup>

Bilirubin má silné antioxidační účinky<sup>81,82</sup>. V malém množství chrání vitamin A před autooxidací, rovněž chrání kyselinu linolovou a další nenasycené mastné kyseliny před autooxidací<sup>83</sup>. Rovněž působí jako vychytávač singletového kyslíku, reaguje se superoxidovými radikály a je substrátem pro peroxidasy v přítomnosti  $H_2O_2$  a organických hydroperoxidů<sup>81</sup>. Studie Wu a kol.<sup>84</sup> prokázala, že bilirubin vázaný na albumin, tzv. delta-bilirubin, chrání lidské komorové myocyty před poškozením oxyradikály. Dále bylo zjištěno, že biliverdin a bilirubin vázaný na albuminu chrání lidské erythrocyty a potkaní hepatocyty před radikálovým poškozením<sup>85</sup>. Bilirubin má rovněž protizánětlivé účinky a vykazuje řadu dalších efektů- snižuje žilní adhezi leukocytů vyvolanou oxidanty, snižuje aktivaci leukocytů a transendotheliální pohyb monocytů.

Kation  $Fe^{2+}$  může přispívat k ochranné roli HO proti rozdílným formám stresu stimulací vzniku ferritinu. Jedna molekula apoferritinu může navázat až 45 tisíc iontů železa a vykazuje cytoprotektivní účinky ve smyslu ochrany před oxidačními účinky

železa. Kation  $\text{Fe}^{2+}$  se váže na regulační protein ferritinu, který aktivuje zvýšenou expresi ferritinu. Některá pozorování ukázala, že hladina ferritinu je zvýšena při indukci HO-1 a snížena při potlačení exprese HO-1. Nicméně absolutní korelace exprese HO-1 s expresí ferritinu prokázána nebyla. U potkanů vystaveným endotoxickému šoku byla pozorována zvýšená exprese HO-1 nezávisle na hladině ferritinu<sup>86</sup>, naopak u cytotoxicity vyvolané oxidačním stresem byla indukce HO-1 závislá na ferritinu<sup>87</sup>. Dalším mechanismem ochrany buňky před oxidačními vlastnostmi  $\text{Fe}^{2+}$  je zvýšení aktivity ATPasové pumpy společně s expresí ferritinu, ATPasová pumpa zvyšuje odstraňování železa z intracelulárního prostředí<sup>88</sup>.



## **2. Cíl diplomové práce**

Cílem diplomové práce je sledování změn ve složení gangliosidů u cholestázy vyvolané podvazem žlučových cest ve srovnání s výsledky publikovanými u cholestázy indukované ethinylestradiolem.

Dalším cílem je sledovat ovlivnění spektra gangliosidů po aktivaci a inhibici enzymu hemoxygenasy.

Spektrum gangliosidů je dáváno do souvislosti s mírou exprese mRNA klíčové sialyltransferasy syntetizující GD3 (SAT-2).

### **3. Materiál a metodika**

#### **3.1. Materiál**

##### **3.1.1. Biologický materiál**

Játra laboratorních potkanů kmene Wistar, samice

##### **3.1.2. Chemikálie**

Sn-mesoporfyrin (Frontier Scientific, Logan, UT, USA)

Hemin (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Standard GM1 (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Standard GA (připraven v Hepatologické laboratoři ÚKBLD 1.LF UK)

HPTLC Desky (Merck, Darmstadt, Německo, Atr. 5633)

DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia, Uppsala, Švédsko)

Silikagel 60 (Merck, Darmstadt, Německo)

Resorcinol (Merck, Darmstadt, Německo)

Octan amonný (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Chlorid vápenatý (Chemapol, CZ)

Amoniak (Penta, CZ)

Hydroxid sodný (Penta, CZ)

Chloroform (Penta, CZ)

Kyselina octová (Penta, CZ)

Kyselina chlorovodíková (Penta, CZ)

Methanol (Penta, CZ)

Síran mědnatý, pentahydrát (Penta, CZ)

n-Butanol (Penta, CZ)

n-Butylacetát (Penta, CZ)

Kyselina N-acetylneuraminová (Sigma, St. Louis, MO, USA)

TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA)

QIAshredder kit (Qiagen, USA)

Kit pro izolaci mRNA- RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, USA)

Kit pro přepis mRNA na cDNA- High capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA)

### **3.1.3. Přístrojové vybavení**

ABI PRISM 7900 pro qPCR (AME Bioscience AIS)

Analytické váhy (GR 202- EC)

Centrifuga (Beckman GPR)

Denzitometr TLC scanner II ,Camag (Muttentz, Švýcarsko)

Lyofilizátor (Christ alpha 1-4, B. Braun Biotech. International)

Orbitální třepačka (Edmund Bühler, SWIP KM-2)

Předvážky (Kern 572)

Spektrofotometr- Specol 11 (Carl Zeiss- Jena)

Termal Cycler Techno TC512 (Chemos)

Ultrazvukový homogenizátor (Microson XL2000-010)

Vakuová odparka (Ingos RVP 200 A)

Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

Vortex mixer (Thermolyne)

Výrobník ledu Cool SD18L (Gpro)

## **3.2. Metodika**

### **3.2.1. Experiment na zvířatech**

Samice potkanů kmene Wistar (laboratorní potkan- *Rattus norvegicus*) byly chovány za přirozeného denního cyklu a za kontrolované teploty. Zvířata měla volný přístup k vodě a potravě.

Nakládání se zvířaty během celého experimentu splňovalo kritéria pro experimentální práci s laboratorními zvířaty a všechny protokoly byly schváleny Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1.lékařské fakulty UK.

Experimentální cholestáza byla u zvířat vyvolána chirurgickým zásahem, při kterém byly podvázány drobné žlučovody v játrech. Tato metoda vylučuje průnik žluči do břišní dutiny rupturou intrahepatálních žlučovodů a vznik biliární peritonitidy.

Kontrolní zvířata byla podrobena témuž chirurgickému zákroku ovšem bez podvazu žlučovodů, tj. pouze laparotomii.

Inhibice HO-1 byla navozena jednorázovou dávkou 15  $\mu\text{mol/kg}$  Sn-mesoporfyrinu 1.den intraperitoneální injekcí.

Aktivace HO-1 byla navozena dávkou 30  $\mu\text{mol/kg}$  heminu 0. a 3.den intraperitoneálně.

Zvířatům byla provedena laparotomie pod etherovou anestézií 5. nebo 18.den. Odebraná játra byla promyta fyziologickým roztokem s heparinem, zvážena, rozdělena na menší části a zmrazena. Z krevního séra byly provedeny jaterní testy pro posouzení stupně rozvoje cholestázy. Konkrétně byly sledovány tyto markery- celkové žlučové kyseliny (CŽK), celkový bilirubin a ALP jako specifické markery cholestázy a dále ALT a AST, které jsou ukazateli obecného jaterního poškození. Jaterní testy byly provedeny v Centrální biochemické laboratoři ÚKBLD 1.LF UK akreditovanými metodami.

V této diplomové práci jsou převzaty výsledky měření aktivity HO-1 jako pomocný parametr ke sledovanému problému. Vlastní měření aktivity HO-1 prováděla Ing. Kateřina Váňová v rámci řešení své diplomové práce v hepatologické laboratoři ÚKBLD 1. LF UK. Příslušnou metodiku publikovala ve své diplomové práci „Produkty katabolické dráhy hemu ve vztahu k patogenezi cholestázy“, VŠCHT, 2009<sup>89</sup>. Pro měření byla použita modifikovaná metoda pro detekci CO vznikajícího při rozkladu hemu pomocí plynové chromatografie<sup>90</sup>.

Zvířata byla dle provedeného experimentu rozdělena na skupiny, které byly označeny takto:

- čisté podvazy žlučovodů:
  - C- slepá operace, 5 dní
  - BDL- podvaz žlučovodů, 5 dní
  - C<sup>18</sup>- slepá operace, 18 dní
  - BDL<sup>18</sup>- podvaz žlučovodů, 18 dní
- podvazy žlučovodů + aktivace HO-1:
  - aC- slepá operace, hemin, 5 dní
  - aBDL- podvaz žlučovodů, hemin, 5 dní
- podvazy žlučovodů + inhibice HO-1:
  - iC- slepá operace, Sn-mesoporfyrin, 5 dní
  - iBDL-podvaz žlučovodů,Sn-mesoporfyrin,5dní

### **3.2.2. Izolace gangliosidů**

#### **Extrakce glykolipidů z jaterní tkáně**

Vzorek kontrolních jater o hmotnosti 3g v 15 ml methanolu byl nejprve jemně nastříhán a potom homogenizován sonikací. K homogenátu bylo přidáno 15 ml chloroformu a po dobu 30 min při laboratorní teplotě v uzavřené Erlenmayerově baňce probíhala extrakce na orbitální třepačce. Suspenze byla zfiltrována do Erlenmayerovy

baňky. Zbylý filtrační koláč s jaterní tkání byl v nové Erlenmayerově baňce opětovně extrahován ve 49 ml směsi A (viz. Ionexová chromatografie na měničích aniontů) po dobu 30 minut na orbitální třepačce. Suspenze byla zfiltrována a spojené filtráty doplněny na poměr složek směsi A přídatkem 15 ml methanolu a 4 ml destilované vody.

### **Ionexová chromatografie na středně bazickém měničích aniontů**

DEAE Sephadex A-50 byl použit k separaci kyselých lipidů (gangliosidy, sulfatidy, fosfolipidy) od neutrálních lipidů.

Používají se následující eluční směsi:

- A chloroform- methanol- destilovaná voda 30: 60: 8 (v/v/v)
- B chloroform- methanol- 0,8 M vodný octan amonný 30: 60: 8 (v/v/v)
- C 0,2 M octan amonný v methanolu

DEAE Sephadex A-50 byl převeden do acetátového cyklu ve směsi B. Suchý ionex (15 g) byl vsypán do 200 ml eluční směsi B, nechal se usadit a supernatant byl slit. Dále byl ionex ještě 3x promyt 200 ml eluční směsi B, posledním podílem směsi B se ionex ekvilibroval přes noc.

Na kolonku o průměru 1 cm byl nanesen Sephadex v acetátovém cyklu do výšky sloupce 3 cm po usazení a následně byl 3x promyt 20 ml roztoku A pro odstranění volného octanu.

Na kolonku byl opatrně nanesen vzorek a průtok kolonou nastaven na 0,7 ml/min.

Po protečení lipidního extraktu byl sloupec promyt 20 ml roztoku A a následně 5 ml methanolu.

Gangliosidy společně s dalšími kyselými lipidy byly z kolonky vymyty 20 ml roztoku C.

### **Alkalicky katalyzovaná methanolýza a dialýza**

Po chromatografické separaci byly v roztoku vedle gangliosidů přítomny další kyselí lipidy, převážně fosfolipidy. Pro jejich odstranění bylo využito vlastností esterové vazby fosfolipidů, která podléhá hydrolýze v alkalickém prostředí, zatímco gangliosidy jsou díky amidové vazbě stabilní. Gangliosidy vytváří ve vodných roztocích makromolekulární micely, proto byla k dalšímu přečištění od hydrolyzovaných fosfolipidů a ostatních nízkomolekulárních látek využita dialýza. Dialyzační membránou projdou pouze nízkomolekulární látky, zatímco micely gangliosidů jsou zadrženy<sup>91</sup>. K roztoku po

chromatografické separaci se přidaly 2 ml 1 M NaOH v methanolu a temperovalo se při 37 °C 1 hod. Poté byla provedena neutralizace 2 ml 1 M kyseliny octové v methanolu.

Z roztoku byl M odstraněn zahuštěním na vakuové rotační odparce na objem asi 1 ml (60 °C, 60 ot/min). Roztok byl po přidání 6 ml destilované vody dialyzován 2- 4 dny proti destilované vodě.

Vzorek byl následně lyofilizován.

### **Přečištění na koloně silikagelu**

Silikagel 60 (63- 100 µm) byl přečištěn promýváním v centrifugačních zkumavkách 4x 15 objemy směsi CH: M: 2,5M NH<sub>4</sub>OH, 30:60:8 (v/v/v) a poté byl stejným způsobem promyt 4x 15 objemy roztoku A (viz. Ionexová chromatografie na měniči aniontů). Po každém promývání byl silikagel centrifugován (5 min, 3tis ot/min, 10 °C).

Přečištěným suspendovaným silikagelem byla kolona o průměru 1 cm naplněna do výše 2 cm, následně byl sloupec promýván 20 ml směsi CH (redestilovaný): M, 2:1 (v/v), poté 20 ml směsi CH (redestilovaný): M, 95: 5 (v/v).

Lyofilizovaný vzorek byl rozpuštěn v 1 ml směsi CH: M, 1: 1 (v/v), dále byl přidán 1,5 ml chloroformu na konečný poměr CH 4: 1 a vzorek byl nanesen na kolonu. Po eluci sulfatidů 18 ml CH: M, 4: 1 (v/v), byly gangliosidy eluovány 20 ml CH: M, 1: 2 (v/v).

### **Přečištění vzorků**

Vzorky jater iC a iBDL byly po aplikaci Sn-mesoporfyrinu i po uvedených přečišťovacích krocích kontaminovány nečistotami, které se na HPTLC jeví jako hnědé zabarvení, značně zkreslující denzitometrické vyhodnocení. Bylo přistoupeno k dalšímu přečištění vzorku modifikací vytřepávání dle Folcha<sup>92,93</sup> založeném na rozdílné polaritě nečistot (hydrofobní) a gangliosidů (hydrofilní).

Ke vzorkům byl přidán 1 ml směsi CH: M, 2: 1 (v/v) a 200 µl destilované vody a důkladně promícháno na mixéru Wortex. Organická a vodná fáze byly rozděleny centrifugací (2,5tis ot/min, 5 min, 10°C). Horní (vodná) vrstva byla přenesena do nové zkumavky a ke zbylé organické fázi bylo přidáno 0,4 ml směsi M : V, 1: 1 (v/v). Po promíchání na mixéru Wortex se fáze oddělily v centrifuze (2,5tis ot/min, 5 min, 10 °C). Horní (vodná) vrstva byla přenesena k vodné fázi po předchozí centrifugaci. Ke spojeným vodným vrstvám bylo přidáno 1 ml CH a po promíchání na Wortex mixéru a odstředění (2,5tis ot/min, 5 min, 10 °C) byla odebrána horní (vodná) vrstva. Pro další zpracování vzorku je vodný roztok gangliosidů odpařen pod N<sub>2</sub> a rozpuštěn v 80 µl CH:M 1:1, v:v.

### 3.2.3. Fotometrické stanovení celkové kyseliny sialové

Metoda fotometrického stanovení celkové kyseliny sialové<sup>93</sup> je vhodná pouze pro přečištěné gangliosidy, nelze ji provádět ze vzorku celkového lipidního extraktu.

Ředěním zásobního standardního roztoku NeuNAc o koncentraci 0,1 mM (navážka 0,773 mg NeuNAc do 25 ml) byla připravena kalibrační řada s hodnotami 0; 12,5; 25; 50 nM NeuNAc (viz. Tab. 6).

Tab. 6: Kalibrační řada roztoků NeuNAc

Koncentrace NeuNAc/nM	0	12,5	25,0	50,0
Roztoku standardu NeuNAc/ $\mu$ l	0	50	100	200
Resorcinolové činidlo/ $\mu$ l	200	200	200	200
Destilovaná voda/ $\mu$ l	200	150	100	0

Před vlastním stanovením NeuNAc bylo připraveno resorcinolové činidlo o složení 40 ml koncentrované HCl, 5 ml základního roztoku resorcinolu, 0,125 ml 0,1 M  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  a doplněno destilovanou vodou na 50 ml. Základní roztok resorcinolu byl připraven rozpuštěním 2 g resorcinolu ve 100 ml vody a uchováván v hnědé láhvi.

Pro stanovení NeuNAc ve vzorku bylo odebráno 20  $\mu$ l vzorku, přidáno 200  $\mu$ l vody a 200  $\mu$ l resorcinolového činidla. Připravené roztoky byly důkladně promíchány na mixéru Wortex a 15 min zahřívány ve vroucí vodní lázni. Po vyjmutí byly zkumavky ochlazeny a ke všem roztokům přidáno 0,6 ml roztoku butylacetát : butanolu (85:15, v/v). Po protřepání se oddělila vodná a organická fáze. Horní organická fáze byla odebrána pro změření absorbance při  $\lambda = 580 \text{ nm}$ .

### 3.2.4. TLC gangliosidů

Vyvíjecí komora byla vyložena filtračním papírem Whatmann 3 a vyvíjecí směs (CH: M: 0,2%  $\text{CaCl}_2$ - 50: 45: 11, v/v/v) nalita do výšky asi 1 cm.

Vzorky gangliosidů po přečištění na silikagelu byly odpařeny ve vakuové rotační odparce na objem 1- 2 ml, doodpařeny pod  $\text{N}_2$  a rozpuštěny v 80  $\mu$ l CH:M 1:1, v:v. Vzorky byly na TLC desku nanášeny injekční stříkačkou Hamilton v objemu 5  $\mu$ l rovnoměrně v malých kapkách na šířce dráhy 0,5 cm umístěné 1 cm od dolního okraje desky. Jako standard bylo na každou desku naneseno 5  $\mu$ l roztoku standardu GM1 o koncentraci 97,1  $\mu$ M (připraven navážením a rozpuštěním 0,6 g GM1 ve 4 ml V). TLC deska se

nechala vyvíjet, dokud čelo vyvíjecí směsi nedosáhlo 1 cm pod její horní okraj. Poté byla deska důkladně osušena.

K detekci gangliosidů bylo použito resorcinolové činidlo<sup>94</sup>. Příprava činidla je uvedena v kapitole 3.2.3. Fotometrické stanovení celkové kyseliny sialové. Po přestříkání činidlem se deska překryla sklem a sušila v sušárně při 95 °C po dobu 35 min.

### **3.2.5. Denzitometrické vyhodnocení TLC chromatogramu**

Denzitometrické vyhodnocení bylo provedeno denzitometrem Camag při 580 nm v odraženém světle s použitím softwaru CATs3. Kvantifikace byla provedena porovnáním míry denzity gangliosidu se standardem GM1. Standard GM1 o známé koncentraci byl vždy nanesen na každé TLC desce.

### **3.2.6. Stanovení exprese mRNA pro sialyltransferasu syntetizující GD3 (SAT-2)**

#### **Homogenizace jaterní tkáně**

Zmražená jaterní tkáň byla uchovávána v RNA lateru při -80 °C. Homogenizace byla provedena rozdrčením zmrzlé tkáně ve třecí misce v tekutém dusíku. Z jemně nadrcené tkáně bylo pro izolaci mRNA naváženo množství od 10-15 mg a okamžitě zchlazeno v N<sub>2</sub> (l). Zbylý homogenát byl vrácen zpět do RNA lateru a uložen do -80 °C.

#### **Izolace mRNA z jaterní tkáně**

Z jednotlivých vzorků byla izolována mRNA pomocí kitů „RNeasy Plus Mini Kit“ a „QIAshredder“. Bylo postupováno přesně dle návodu výrobce kitu. Izolovaná mRNA byla uchovávána při -80 °C.

#### **Přepis mRNA na cDNA**

Získaná mRNA byla přepsána do cDNA pomocí „High Capacity mRNA-to-cDNA“ kitu. Pro přepis jednoho vzorku mRNA na cDNA bylo do Eppendorfovy zkumavky pipetováno 5 µl RNA vody (tj. bez obsahu RNAs), 2 µl „Master Mix“ (AppliedBiosystems) a 3 µl mRNA. Následovala centrifugace při 3,5tis ot/min. Poté byl proveden vlastní přepis na cDNA v termocykleru. Získaná cDNA byla buď okamžitě zpracována pro real-time PCR analýzu nebo uschována při -30 °C.



### **Kvantifikace mRNA pomocí real-time PCR**

Pomocí real-time PCR byla sledována míra exprese genu SAT-2. Jako endogenní kontrola byl zvolen  $\beta$ -aktin, který vykazuje běžně stabilní expresi a slouží k relativní kvantifikaci exprese cílového genu. Směs pro RT-PCR obsahovala 5  $\mu$ l cDNA (poměr ředění cDNA:voda- 1:4), 0,6  $\mu$ l směsi primerů a fluorescenčně značené sondy, 6  $\mu$ l „TaqMan master mix“ a 0,4  $\mu$ l deionizované vody.

Teplotní program pro jeden cyklus vypadal takto:

- 90- 95 °C po dobu 10 min TaqMan enzymu
- 95- 99 °C po dobu 15 s pro denaturaci DNA
- 60 °C po dobu 1 min pro annealing

Výstupem real-time PCR byly CT hodnoty, pro cílový gen SAT-2 a kontrolní gen  $\beta$ -aktin. CT hodnota (zkratka z anglického „threshold cycle“) uvádí počet cyklů, při kterém fluorescence uvolněné sondy dosáhne prahové hodnoty. Výsledky exprese cílového genu byly vyjádřeny v % exprese kontrolního genu.

#### **3.2.7. Statistická analýza**

Data jsou prezentována jako průměr a směrodatná odchylka (SD). Statistická významnost rozdílů mezi proměnnými byla vyhodnocována t-testem v případě normálního rozdělení hodnot nebo Mann- Whitney testem pokud data nejsou normálně rozložena. Rozdíly byly považovány za statisticky signifikantní, když hodnoty P byly menší než 0,05. Pro vyhodnocení byl použit statistický program NCSS 2007.

## 4. Výsledky

V této práci byly sledovány změny v zastoupení jednotlivých gangliosidů v játrech potkana kmene Wistar u extrahepatální cholestázy vyvolané podvazem žlučovýchodů. Byla srovnávána skupina kontrolních zvířat, na kterých byla provedena slepá operace, se skupinou zvířat s extrahepatální cholestázou.

Dále byl sledován a porovnáván vliv inhibice HO-1 Sn-mesoporfyrinem a vliv aktivace HO-1 heminem na zastoupení jednotlivých gangliosidů v játrech potkana kmene Wistar s experimentální cholestázou. Byly srovnávány kontrolní skupiny s kontrolami s aktivovanou/inhibovanou HO-1 a dále skupiny s podvazem oproti podvazům s aktivovanou/inhibovanou HO-1.

### 4.1. Jaterní testy

Pro zjištění stupně vývoje cholestázy byly stanoveny hodnoty sérových markerů, tzv. jaterní testy: CŽK, bilirubin, ALP, ALT, AST. Specifickými markery cholestázy jsou CŽK, bilirubin a ALP. Ostatní ALT, AST dokumentují obecné poškození jater. Skupiny zvířat byly porovnány pro zjištění statisticky významných rozdílů (Tab. 8-13).

Pro potvrzení úspěšnosti zákroku vedoucího k aktivaci/inhibici HO-1 byla stanovena celková aktivita HO. Výsledky uvádí Tab. 7.

Tab. 7: Hodnoty celkové aktivity HO u sledovaných skupin zvířat, aktivita uváděná v pmol CO/hod/mg tkáně.

Skupina zvířat	Aktivita HO/pmol/hod/mg tkáně
C	327,67±47,5
BDL	199,43±36,5
iC	175,5±63,6
iBDL	59,25±7,05
aC	833,6±176,59
aBDL	640,63±122,86

V Tab. 7 jsou uvedeny průměrné hodnoty celkové aktivity HO ze vzorků jednotlivých skupin zvířat. Potvrzují úspěšný zákrok, jehož cílem bylo vyvolat snížení

anebo zvýšení aktivity HO-1. Po aplikaci Sn-mesoporfyriu vykazuje celková HO výrazné snížení aktivity, po aplikaci heminu vykazuje celková HO výrazné zvýšení aktivity.

Tab. 8: Srovnání hodnot sérových markerů kontrol C a podvazů BDL

Sérový marker	C (n=6)	BDL (n=7)	P-hodnota
CŽK (μmol/l)	17,33±10,05	372,00±142,94	<0,001
Bilirubin (μmol/l)	1,35±0,71	250,3±43,32	<0,001
ALP (μkat/l)	2,00±0,32	4,41±0,32	<0,001
ALT (μkat/l)	0,7 ±0,06	0,91 ± 0,20	0,031
AST (μkat/l)	2,42±0,57	3,27 ±0,47	0,014

V Tab. 8 jsou statisticky vyhodnoceny sérové markery mezi skupinami C (5-denní kontrola) a BDL (5-denní podvaz). Průběh cholestázy byl potvrzen zjištěním statisticky významných rozdílů s P-hodnotami menšími 0,05 u všech sledovaných ukazatelů jaterní cholestázy CŽK, bilirubinu, ALP i markerů jaterního poškození ALT a AST mezi porovnávanými skupinami.

Tab. 9: Srovnání hodnot sérových markerů kontrol C<sup>18</sup> a podvazů BDL<sup>18</sup>

Sérový marker	C <sup>18</sup> (n=6)	BDL <sup>18</sup> (n=11)	P-hodnota
CŽK (μmol/l)	11,83±6,24	304,64±77,32	<0,001
Bilirubin (μmol/l)	2,27±0,90	233,25±32,72	<0,001
ALP (μkat/l)	1,71±0,49	4,59±0,47	<0,001
ALT (μkat/l)	0,81±0,52	0,95±0,26	0,031
AST (μkat/l)	1,96±1,03	6,69±2,55	0,001

V Tab. 9 jsou statisticky vyhodnoceny sérové markery mezi skupinami C<sup>18</sup> (18-denní kontrola) a BDL<sup>18</sup> (18-denní podvaz). Podobně byl průběh cholestázy potvrzen i u 18-denního experimentu P-hodnotami menšími než 0,05 u všech sledovaných sérových markerů.

*Tab. 10: Srovnání hodnot sérových markerů kontrol iC s inhibicí HO-1 a podvazů iBDL s inhibicí HO-1*

Sérový marker	iC (n=6)	iBDL (n=8)	P-hodnota
CŽK (μmol/l)	14,00±13,83	562,75±216,30	0,002
Bilirubin (μmol/l)	2,00±0,30	192,90±78,76	< 0,001
ALP (μkat/l)	1,85±0,31	3,51±0,98	0,002
ALT (μkat/l)	0,65 ±0,06	0,98±0,40	0,071
AST (μkat/l)	1,55±0,21	4,36±1,48	0,001

V Tab. 10 na str. 43 jsou statisticky vyhodnoceny sérové markery mezi skupinami iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) a iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1). U sledovaných markerů cholestázy byly zjištěny P-hodnoty menší než 0,05, což potvrzuje průběh cholestázy. Jaterní poškození potvrzují statisticky významné výsledky pro ALT a AST.

*Tab. 11: Srovnání hodnot sérových markerů kontrol aC s aktivací HO-1 a podvazů aBDL s aktivací HO-1*

Sérový marker	aC (n=5)	aBDL (n=8)	P-hodnota
CŽK (μmol/l)	29,8±21,28	638,38±201,23	0,003
Bilirubin (μmol/l)	3,76±0,97	291,31±40,69	0,003
ALP (μkat/l)	2,08±2,06	4,60±3,70	0,057
ALT (μkat/l)	0,54 ±0,03	1,21±0,39	0,003
AST (μkat/l)	1,53±0,50	6,40±3,90	0,003

V Tab. 11 jsou statisticky vyhodnoceny sérové markery mezi skupinami aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1) a aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1). Průběh cholestázy byl potvrzen zjištěním statisticky významných rozdílů s P-hodnotami menšími 0,05 u markerů cholestázy CŽK a bilirubinu. Jaterní poškození potvrzují statisticky významné výsledky pro ALT a AST.

Tab. 12: Srovnání hodnot sérových markerů u kontrol C a podvazů iC s inhibicí HO-1

Sérový marker	C (n=6)	iC (n=6)	P-hodnota
CŽK (μmol/l)	17,33±10,05	14,00±13,83	0,260
Bilirubin (μmol/l)	1,35±0,71	2,00±0,30	0,066
ALP (μkat/l)	2,00±0,32	1,85±0,31	0,429
ALT (μkat/l)	0,7 ±0,06	0,65 ±0,06	0,185
AST (μkat/l)	2,42±0,57	1,55±0,21	0,006

V Tab. 12 jsou statisticky vyhodnoceny sérové markery mezi skupinami C (5-denní kontrola) a iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1). Kromě AST nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly sérových markerů mezi porovnávanými skupinami a průběh cholestázy nebyl potvrzen.

Tab. 13: Srovnání hodnot sérových markerů u kontrol C a kontrol aC s aktivací HO-1

Sérový marker	C (n=6)	aC (n=5)	P-hodnota
CŽK (μmol/l)	17,33±10,05	29,8±21,28	0,463
Bilirubin (μmol/l)	1,35±0,71	3,76±0,97	0,001
ALP (μkat/l)	2,00±0,32	2,08±2,06	0,100
ALT (μkat/l)	0,7 ±0,06	0,54 ±0,03	0,001
AST (μkat/l)	2,42±0,57	1,53±0,50	0,028

V Tab. 13 jsou statisticky vyhodnoceny sérové markery u skupin C (5-denní kontrola) a aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1). Statisticky významné P-hodnoty menší než 0,05 byly zjištěny u bilirubinu, ALT a AST. Zvýšení koncentrace bilirubinu u skupiny aC potvrzuje aktivaci HO-1 vlivem heminu.

Průběh cholestázy byl potvrzen na základě statistického vyhodnocení jaterních testů u všech skupin zvířat po operativním zákroku s podvazem žlučovýchodů.

#### 4.2. Stanovení celkové lipidně vázané kyseliny sialové

Ve vzorcích izolovaných gangliosidů byla stanovena celková lipidně vázaná kyselina sialová. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 14 na str. 46. V tabulce je pro každou skupinu zvířat uvedena průměrná hodnota NeuNAc a její směrodatná odchylka stanovená z daného počtu vzorků ve skupině. Výsledky jsou uváděny v nmol NeuNAc v 1 g vlhké jaterní tkáni.

Tab. 14: Koncentrace celkové lipidně vázané kyseliny sialové u sledovaných skupin (C, BDL, C<sup>18</sup>, BDL<sup>18</sup>, iC, iBDL, aC, aBDL) uváděná v nmol/g vlhké jaterní tkáně

Skupina	Počet vzorků ve skupině	c(nmol/g) Průměr±SD
C	6	17,33±3,47
BDL	7	26,51±3,90
C <sup>18</sup>	6	17,67±10,51
BDL <sup>18</sup>	11	30,1±17,05
iC	3	29,32±1,57
iBDL	8	51,57±6,20
aC	4	29,58±9,82
aBDL	8	52,04±9,05

Tab. 15: Změny v obsahu celkové kyseliny sialové v uvedených skupinách.

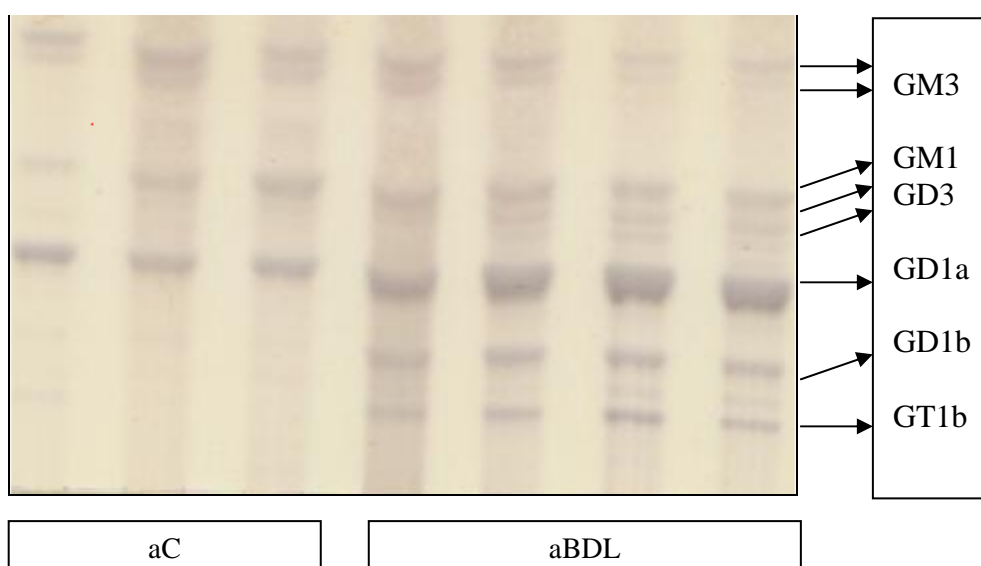
*Posouzení významnosti*

Srovnávané skupiny		P- hodnota
C	BDL	0,001
C <sup>18</sup>	BDL <sup>18</sup>	0,020
iC	iBDL	<0,001
aC	aBDL	0,003
C	iC	0,001
C	aC	0,021
BDL	iBDL	<0,001
BDL	aBDL	<0,001

Rozdíly v obsahu kyseliny sialové mezi skupinami byly statisticky vyhodnoceny (viz. Tab. 15). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou vyjádřeny P hodnotou menší 0,05. Statisticky významné rozdíly v obsahu NeuNAc byly nalezeny mezi skupinami kontrol a podvazů (C x BDL, C<sup>18</sup> x BDL<sup>18</sup>, iC x iBDL, aC x aBDL, C x iC, C x aC), kdy byl sledován nárůst NeuNAc u podvazů oproti kontrolám. Další statisticky významný nárůst obsahu NeuNAc byl zjištěn mezi skupinou 5-denních podvazů a podvazů s aktivovanou/inhibovanou HO-1 (BDL x aBDL, BDL x iBDL).

### 4.3. Vyhodnocení TLC chromatogramů

Obsah jednotlivých gangliosidů ve vzorcích byl zjištěn denzitometrickým proměřením TLC desek po detekci resorcinolovým činidlem. Množství jednotlivých gangliosidů byla přepočítána dle poměru denzitometrických ploch píků vzhledem ke standardu GM1 aplikovanému na každou TLC desku a vyjádřena v množství vázané kyseliny sialové. Vlivem rozdílů mezi TLC deskami způsobenými rozdíly v detekci resorcinolovým činidlem, tj. intenzitou postříku, zahřátím aj., bylo nutné denzitometrické odezvy z jednotlivých TLC desek sjednotit korekčním faktorem vztaženým na stejné množství standardu GM1. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 16-24. Signifikantní změny gangliosidů z chromatografických analýz uvádím přehledně zakreslené ve schématu biosyntézy gangliosidů s vyznačením násobku zvýšení/snížení (Obr. 8-13). Ukázka TLC chromatogramu je uvedena na Obr. 7.

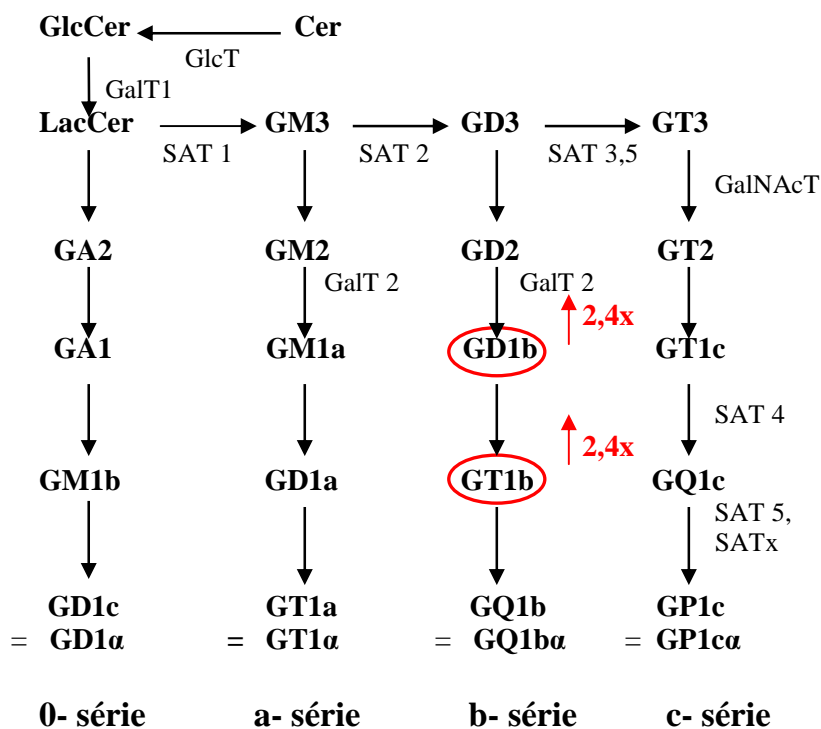


Obr. 7: Ukázka chromatografického dělení. Srovnání gangliosidů skupin aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1) a aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1)- ukázka chromatogramu. Zatímco ve skupině aC převládají gangliosidy a- série, ve skupině aBDL se zřetelně objevují gangliosidy b- série.

Tab. 16: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny C a BDL, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		C (nmol/g)	BDL (nmol/g)	
		n= 4	n= 4	
a-	GM3	2,73±0,95	4,11±2,31	0,206
	GM1a	2,37±2,16	3,07±1,79	0,533
	GD1a	2,47±1,62	5,42±3,13	0,063
b-	GD3	0,79±0,53	1,41±0,83	0,147
	GT1b	0,31±0,28	0,73±0,37	<b>0,046</b>
	GD1b	0,77±0,58	1,83±0,71	<b>0,032</b>

V Tab. 16 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin C (5-denní kontrola) a BDL (5-denní podvaz). Mezi těmito skupinami byl zaznamenán statisticky významný rozdíl u GT1b a GD1b, kdy je sledován jejich nárůst u podvazu (BDL) oproti kontrole (C).



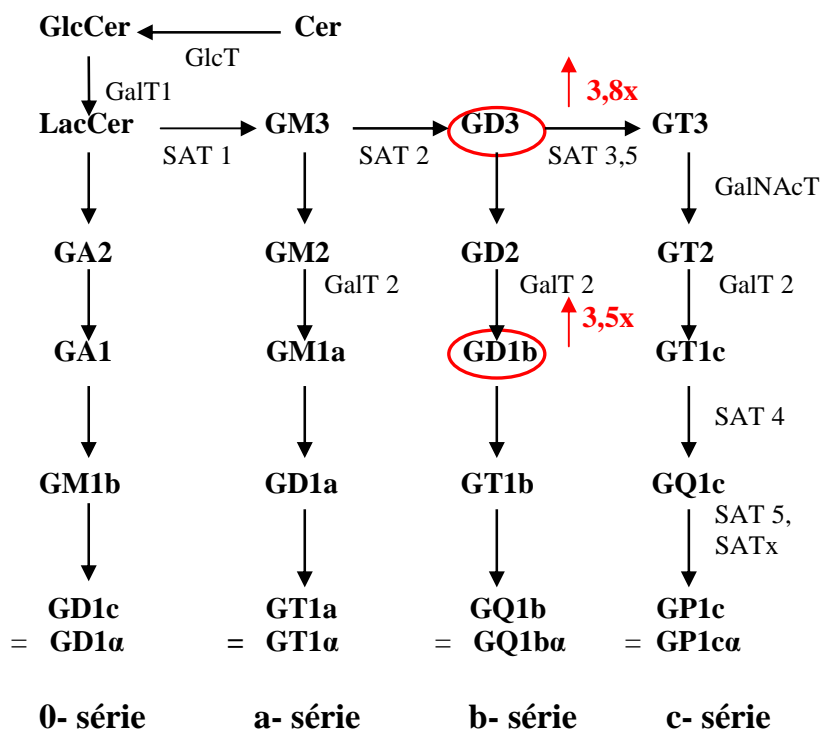
Obr. 8: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu proti slepě operovaným zvířatům, 5-denní, s vyznačením násobku zvýšení koncentrace (skupiny BDL proti C)



Tab. 17: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny C<sup>18</sup> a BDL<sup>18</sup>, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		C <sup>18</sup> (nmol/g)	BDL <sup>18</sup> (nmol/g)	
		n= 4	n= 7	
a-	GM3	2,56±2,01	1,76±0,66	0,340
	GM1a	2,24±1,33	2,95±1,47	0,387
	GD1a	1,73±0,79	3,17±2,58	0,219
b-	GD3	0,47±0,27	1,80±0,52	< <b>0,001</b>
	GT1b	0,35±0,26	0,67±0,47	0,162
	GD1b	0,44±0,16	1,56±1,23	<b>0,046</b>

V Tab. 17 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin C<sup>18</sup> (18-denní kontrola) a BDL<sup>18</sup> (18-denní podvaz). Mezi těmito skupinami byl zjištěn statisticky významný rozdíl u GD3 a GD1b, kdy je sledován jejich nárůst u podvazu (BDL<sup>18</sup>) oproti kontrole (C<sup>18</sup>).

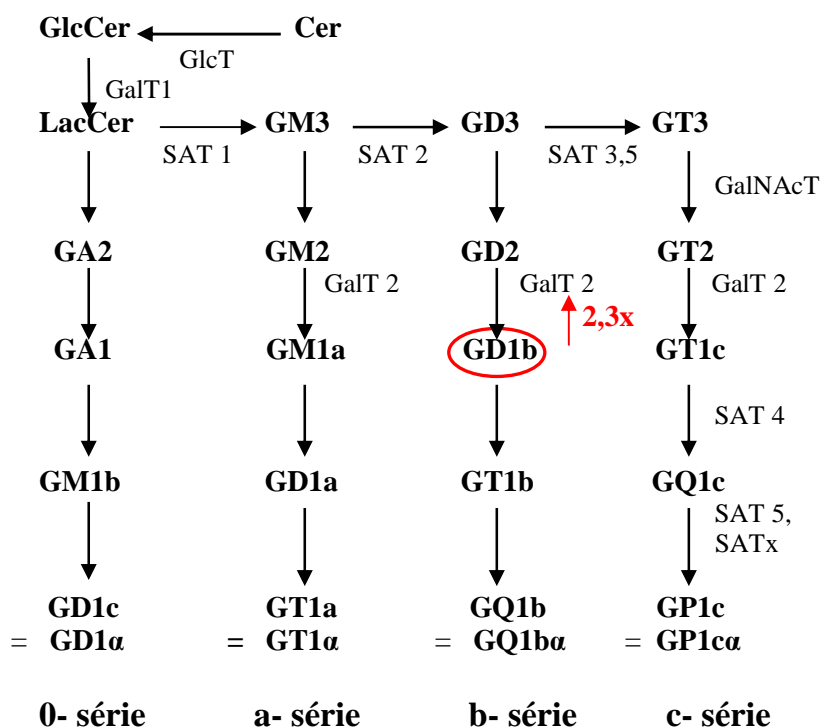


Obr. 9: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu proti slepě operovaným zvířatům, 18-denní, s vyznačením násobku zvýšení koncentrace (skupiny BDL<sup>18</sup> proti C<sup>18</sup>)

Tab. 18: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny iC a iBDL, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		iC (nmol/g)	iBDL (nmol/g)	
		n= 3	n= 7	
a-	GM3	3,36±2,67	1,78±1,39	0,197
	GM1a	1,66±1,37	1,42±1,26	0,751
	GD1a	1,50±1,02	2,65±1,56	0,154
b-	GD3	0,64±0,44	0,76±0,48	0,474
	GT1b	0,17±0,12	0,31±0,17	0,099
	GD1b	0,36±0,29	0,82±0,44	<b>0,048</b>

V Tab. 18 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) a iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1). Mezi těmito skupinami byl zjištěn statisticky významný rozdíl u GD1b, kdy je sledován jeho nárůst u podvazu s inhibicí HO-1 (iBDL) oproti kontrole s inhibicí HO (iC).

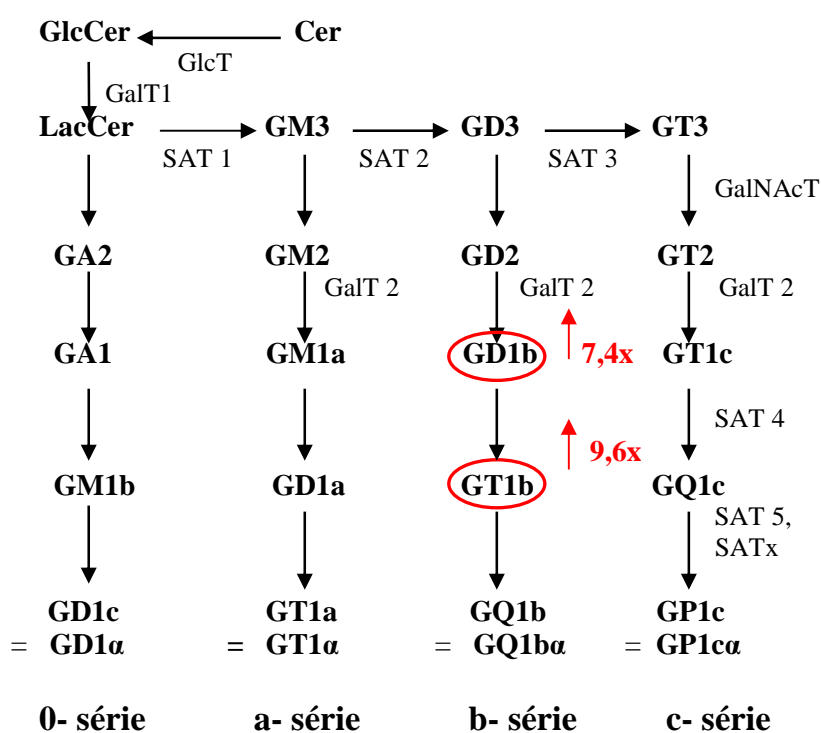


Obr.10: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu s inhibicí HO-1 proti slepě operovaným zvířatům s inhibicí HO-1 s vyznačením násobku zvýšení koncentrace (skupiny iBDL proti iC)

Tab. 19: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny aC a aBDL, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		aC (nmol/g)	aBDL (nmol/g)	
		n= 3	n= 7	
a-	GM3	12,11±7,06	10,01±7,59	0,638
	GM1a	9,47±8,04	7,00±4,83	0,518
	GD1a	4,88±2,71	7,90±4,94	0,167
b-	GD3	0,92±0,67	2,10±1,32	0,190
	GT1b	0,11±0,04	1,06±0,43	< <b>0,001</b>
	GD1b	0,37±0,24	2,75±1,56	<b>0,007</b>

V Tab. 19 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin aC (kontrola s aktivací HO-1) a aBDL (podvaz s aktivací HO-1). Mezi těmito skupinami byly zjištěny statisticky významné rozdíly u GT1b a GD1b, kdy je sledován jejich nárůst u podvazu s aktivací HO-1 (aBDL) oproti kontrole s aktivací HO-1 (aC).



Obr. 11: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu s aktivací HO-1 proti slepě operovaným zvířatům s aktivací HO-1 s vyznačením násobku zvýšení koncentrace (skupiny aBDL proti aC)

Tab. 20: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny C a iC, n- počet zvířat ve skupině

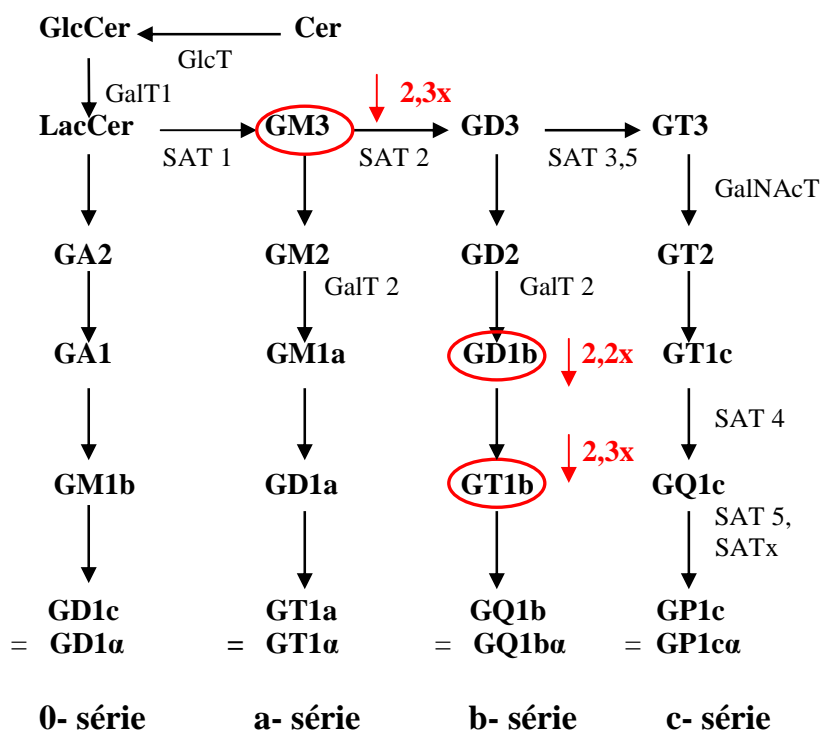
Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		C (nmol/g)	iC (nmol/g)	
		n= 4	n= 3	
a-	GM3	2,73±0,95	3,36±2,67	0,597
	GM1a	2,37±2,16	1,66±1,37	0,514
	GD1a	2,47±1,62	1,50±1,02	0,245
b-	GD3	0,79±0,53	0,64±0,44	0,602
	GT1b	0,31±0,28	0,17±0,12	0,262
	GD1b	0,77±0,58	0,36±0,29	0,297

V Tab. 20 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin C (5-denní kontrola) a iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1). Nebyly zde zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi porovnávanými skupinami.

Tab. 21: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny BDL a iBDL, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		BDL (nmol/g)	iBDL (nmol/g)	
		n= 4	n= 7	
a-	GM3	4,11±2,31	1,78±1,39	<b>0,046</b>
	GM1a	3,07±1,79	1,42±1,26	0,069
	GD1a	5,42±3,13	2,65±1,56	0,109
b-	GD3	1,41±0,83	0,76±0,48	0,124
	GT1b	0,73±0,37	0,31±0,17	<b>0,020</b>
	GD1b	1,83±0,71	0,82±0,44	<b>0,008</b>

V Tab. 21 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin BDL (5-denní podvaz) a iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1). Mezi těmito skupinami byly zjištěny statisticky významné rozdíly u GM3, GT1b a GD1b, kdy je sledováno jejich snížení u skupiny iBDL (podvaz s inhibicí HO-1) oproti BDL (podvaz).

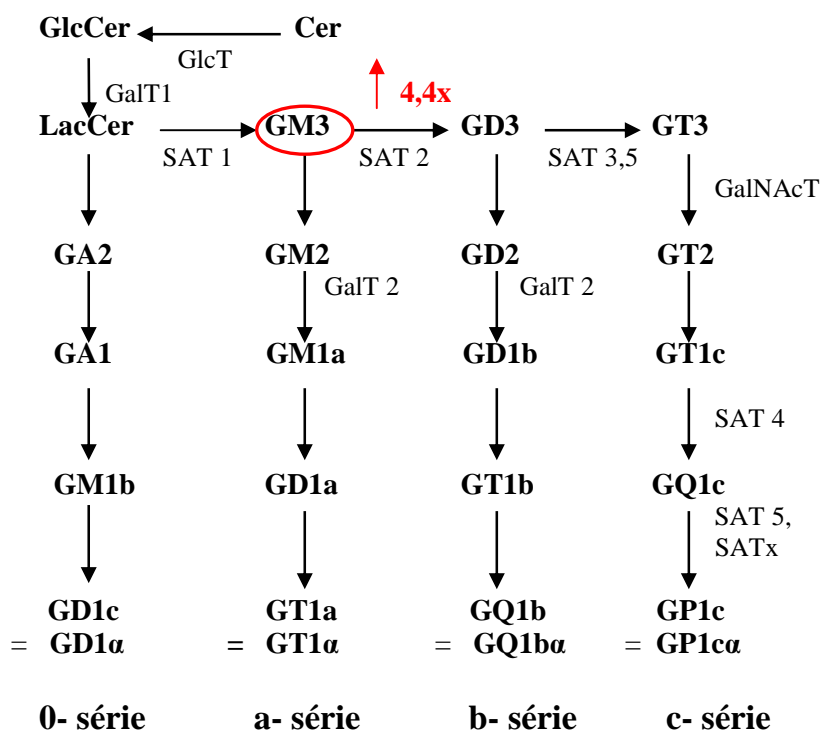


Obr.12: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu s inhibicí HO-1 proti podvazu s vyznačením násobku snížení koncentrace (skupiny iBDL proti BDL)

Tab. 22: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny C a aC, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		C (nmol/g)	aC (nmol/g)	
		n= 4	n= 3	
a-	GM3	2,73±0,95	12,11±7,06	<b>0,010</b>
	GM1a	2,37±2,16	9,47±8,04	0,066
	GD1a	2,47±1,62	4,88±2,71	0,100
b-	GD3	0,79±0,53	0,92±0,67	0,764
	GT1b	0,31±0,28	0,11±0,04	0,081
	GD1b	0,77±0,58	0,37±0,24	0,201

V Tab. 22 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin C (5-denní kontrola) a aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1). Mezi těmito skupinami byly zjištěny statisticky významné rozdíly u GM3, kdy je sledován jeho nárůst u skupiny aC (kontrola s aktivací HO-1) oproti C (kontrola).



Obr.13: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u slepě operovaných s aktivací HO-1 proti slepě operovaným s vyznačením násobku zvýšení koncentrace (skupiny aC proti C)

Tab. 23: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny BDL a aBDL, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		BDL (nmol/g)	aBDL (nmol/g)	
		n= 4	n= 7	
a-	GM3	4,11±2,31	10,01±7,59	0,096
	GM1a	3,07±1,79	7,00±4,83	0,067
	GD1a	5,42±3,13	7,90±4,94	0,482
b-	GD3	1,41±0,83	2,10±1,32	0,268
	GT1b	0,73±0,37	1,06±0,43	0,144
	GD1b	1,83±0,71	2,75±1,56	0,181

V Tab. 23 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin BDL (5-denní podvaz) a aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1). Mezi těmito skupinami nebyly sledovány žádné statisticky významné rozdíly.

Tab. 24: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny C<sup>18</sup> a BDL, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		C <sup>18</sup> (nmol/g)	BDL (nmol/g)	
		n= 4	n= 4	
a-	GM3	2,56±2,01	4,11±2,31	0,244
	GM1a	2,24±1,33	3,07±1,79	0,371
	GD1a	1,73±0,79	5,42±3,13	0,063
b-	GD3	0,47±0,27	1,41±0,83	<b>0,023</b>
	GT1b	0,35±0,26	0,73±0,37	0,060
	GD1b	0,44±0,16	1,83±0,71	<b>0,001</b>

V Tab. 24 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin C<sup>18</sup> (18-denní kontrola) a BDL (5-denní podvaz). Statisticky významné rozdíly byly zjištěny mezi těmito skupinami u GD3 a GD1b, kdy byl sledován jejich nárůst u skupiny BDL (podvaz) oproti C<sup>18</sup> (kontrola).

Výsledky statistické analýzy vyhodnocující změny mezi porovnávanými skupinami zvířat v obsahu celkové lipidní NeuNAc a v zastoupení sledovaných gangliosidů lze shrnout v následujícím zhodnocení.

Vliv cholestázy vyvolané podvazem žlučovodů způsobuje zvýšení *b*-série gangliosidů a celkové NeuNAc :

- BDL (5-denní podvaz) proti C (5-denní kontrola)- zvýšení gangliosidů *b*-série - GT1b, GD1b a zvýšení celkové NeuNAc
- BDL<sup>18</sup> (18-denní podvaz) proti C<sup>18</sup> (18-denní kontrola)- zvýšení gangliosidů *b*-série- GD1b, GD3 a zvýšení celkové NeuNAc

Podobný trend vlivem cholestázy je patrný i ze srovnání následujících skupin:

- iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1) proti iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) - zvýšení gangliosidů *b*-série GD1b a celkové NeuNAc
- aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1) proti aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1)- zvýšení gangliosidů *b*-série GT1b, GD1b a celkové NeuNAc

Vliv Sn-mesoporfyrinu způsobuje zvýšení celkové NeuNAc, změny v zastoupení gangliosidů jsou méně jednoznačné:

- iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) proti C (5-denní kontrola)- zvýšení celkové NeuNAc, ale nebyla sledována žádná změna v zastoupení gangliosidů
- iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1) proti BDL (5-denní podvaz)- zvýšení celkové NeuNAc a snížení gangliosidů *a*-série GM3, *b*-série GT1b, GD1b

Vliv heminu způsobuje zvýšení gangliosidů *a*-série mezi některými porovnávanými skupinami:

- aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1) proti C (5-denní kontrola)- zvýšení gangliosidů *a*-série GM1, GM3 a zvýšení celkové NeuNAc
- aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1) proti BDL (5-denní podvaz)- beze změny v zastoupení gangliosidů, zvýšení celkové NeuNAc

#### 4.4. Stanovení exprese mRNA pro sialyltransferasu syntetizující GD3 (SAT-2)

Vzhledem k tomu, že u skupin zvířat s vyvolanou cholestázou docházelo ke zvýšení gangliosidů *b*- větve, zjištěné výsledky jsme chtěli ověřit i na molekulárně- biologické úrovni a proto bylo přistoupeno ke stanovení mRNA klíčového enzymu *b*- větve, SAT-2.

Tab. 25: *Expresa mRNA pro sialyltransferasu syntetizující GD3 (SAT-2) u jednotlivých skupin zvířat vyjádřená v % vůči expresi mRNA pro β-aktin (endogenní kontrola)*

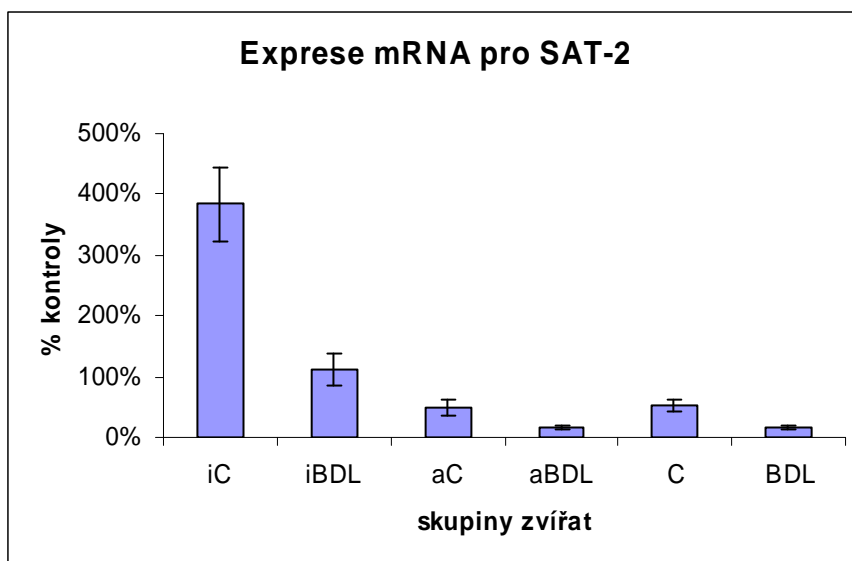
Skupina zvířat	Expresa SAT-2 / % kontroly průměr±SD
C	52,9±20,0
BDL	17,5±6,9
aC	48,2±26,2
aBDL	15,3±6,8
iC	383,8±123,1
iBDL	111,7±54,3

- Z výsledků (Tab. 25) je patrné, že dochází ke snížení exprese mRNA pro cílový enzym SAT-2 u skupin zvířat s podvazy oproti příslušné kontrolní skupině zvířat:
  - C (5-denní kontrola) x BDL (5-denní podvaz)
  - aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1) x aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1)
  - iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) x iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1)



- Dalším zjištěním je, že skupiny zvířat s aplikovaným Sn-mesoporfyrinem iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) a iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1) vykazují několikanásobný nárůst exprese mRNA pro SAT-2 oproti kontrolním skupinám C (5-denní kontrola) a BDL (5-denní podvaz).

Data z Tab. 26 jsou přehledně znázorněna v grafu 1.



*Graf 1: Výsledky stanovení mRNA odpovídající SAT-2 u sledovaných skupin.*

*Zatímco vlivem cholestázy (kontrolní C srovnávána s podvazem **BDL**, kontrolní + aktivovanou HO-1 **aC** srovnávána s podvazem + aktivovanou HO-1 **aBDL**) dochází k poklesu exprese mRNA, u skupin s inhibovanou HO-1 (kontrola **iC**, podvaz **iBDL**) dochází ke zřetelnému nárůstu mRNA pro SAT-2.*

## 5. Diskuse

Při posuzování změn ve složení gangliosidů je nejprve nutno zmínit, že jsou popsány druhově a tkáňově specifické rozdíly ve složení, které je určováno z části genetickými faktory<sup>95</sup>. Může být ovlivňováno hormony<sup>96</sup>, chemikáliemi nebo maligní transformací buněk. Toto složení může procházet změnami, které jsou ovlivňovány změnami v aktivitách glykosyltransferas, účastnících se v biosyntéze<sup>97</sup>. V myších játrech byly pozorovány změny v expresi gangliosidů v závislosti na věku<sup>98</sup>.

Detailní vyšetření jednotlivých variací ve složení gangliosidů, které provedl Schütz-Henninger a spol.<sup>22</sup>, zjistilo odchylky ve složení gangliosidů v játrech potkana kmene Wistar. Zde byly zvýšeny gangliosidy *b*- série (GD3, GD1b, GT1b), což korelovalo s aktivitou sialyltransferasy syntetizující GD3 (SAT-2). Tyto změny vykazovaly odchylky mezi mladými a staršími zvířaty i rozdíly mezi samci a samicemi.

Vzhledem k uvedeným zjištěním je třeba poznamenat, že jak v publikaci Majera a spol.<sup>1</sup>, tak v práci prováděné mnou, byly použity samice potkanů kmene Wistar. V daném experimentu vždy stejného stáří (12 týdnů), u nichž byla dle Majera zjištěna zvýšená míra exprese gangliosidů *b*- série až po vyvolání cholestázy indukované 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem.

Zatímco Majer a spol. (2007)<sup>1</sup> sledovali změny gangliosidů po vyvolání intrahepatální cholestázy 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem, v mé diplomové práci byly sledovány změny v gangliosidech po vyvolání obstrukční extrahepatální cholestázy, při níž se uzávěr žlučovodů experimentálně napodobuje jejich podvazem.

Po metodické stránce jsem použila postupy analogické jako v práci Majera a spol.. V izolaci gangliosidů jsem použila důkladnější postup přečištění gangliosidů zejména použitím afinitní chromatografie na koloně DEAE Sephadexu a finální purifikací na koloně silikagelu, což vedlo k většímu zaostření zón v následující chromatografii na tenké vrstvě. Postupy vlastního chromatografického dělení i denzitometrie a rovněž fotometrické stanovení celkové lipidní kyseliny sialové bylo identické jako v práci Majera a spol. Proto lze výsledky v mé práci a práci Majera a spol. vzájemně porovnat (viz. dále).

Vyhodnocování detekovaných zón dělení na tenké vrstvě může poskytovat, ve srovnání s metodami při nichž je gangliosid v roztoku např. při fotometrii, méně přesné výsledky. Chromatografie na tenké vrstvě s následnou denzitometrií je však stále nejrozšířenější metodou při analýze gangliosidů a má i přes semikvantitativní výstupy řadu výhod. Modernější postupy, jako je např. HPLC dělení na kolonci aminosilikagelu

(LichrosorbNH<sub>2</sub>, Merck Darmstadt)<sup>99</sup>, umožňují sice dělení nederivatizovaných gangliosidů v komplikované směsi gradientů, je však při ní těžké odlišit gangliosidy od případné negangliosidové příměsi poskytující při 215 nm rovněž odezvu. Proto metoda neposkytuje zvláštní výhody bez napojení na systém MS/MS. Toto zařízení nebylo však k dispozici.

Pro denzitometrické měření jsem vycházela z práce Šmída a Reinišové (1973)<sup>100</sup>, podle níž poskytovalo vyhodnocení barevných zón gangliosidů po resorcinolové detekci srovnatelné výsledky s fotometrickou metodou publikovanou Suzukim (1965)<sup>101</sup>, při níž byly jednotlivé zóny gangliosidů vyškrabány a gangliosidy eluovány a provedena s nimi resorcinolová reakce ve zkumavce. V práci Šmída a Reinišové bylo zjištěno, že stejné množství mono-, di-, trisialogangliosidů dává denzitometrickým měřením ploch píků odezvu v poměru 1:2:3 a fotometrickým měřením lineární kalibraci do 0,4 μmol gangliosidu (tj. přibližně do 6 nmol lipidně vázané kyseliny sialové). Lineární kalibraci pro 0,1-6 nmol lipidně vázané kyseliny sialové u různých gangliosidů zjistili také Chigorno a kol. (1982)<sup>102</sup> za použití alternativní metody detekce kyseliny sialové s Ehrlichovým činidlem (*p*-dimethylaminobenzaldehydem-HCl). Z toho vyplývá, že pomocí denzitometrie je možno vyjadřovat získané hodnoty jako procentuelní zastoupení kyseliny sialové a v případě kalibračního standardu i jako absolutní hodnoty kyseliny sialové v nmolech. Chigorno a spol. zjistili, že lze použít jediného standardu GM1 gangliosidu. V této práci jsem použila k výpočtu rovněž standard monosialogangliosidu GM1 o známé koncentraci aplikovaný na každou desku v nmolech vázané kyseliny sialové. Vliv rozdílů detekce mezi TLC deskami způsobený odlišnostmi v postřiku resorcinolovým činidlem, tj. intenzitou postřiku, zahřátím aj., byly sjednoceny korekčním faktorem vztaženým denzitometrickou odezvu stejného množství standardu GM1 na jednotlivých TLC deskách.

#### **Tato práce dospěla k následujícím zjištěním ohledně vlivu cholestázy:**

Vzorky s cholestázou vykazují oproti kontrolním vzorkům nárůst gangliosidů *b*-větve (GT1b, GD1b, případně GD3), čemuž odpovídá i prokázaný nárůstem celkové lipidně vázané kyseliny sialové (celkové gangliosidy). Toto zjištění je platné pro srovnání skupin C proti BDL, C<sup>18</sup> x BDL<sup>18</sup>), iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) x iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1) a aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1) x aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1). Na základě těchto výsledků lze říci, že cholestáza vyvolaná podvazem žlučovodů způsobuje nárůst gangliosidů *b*-větve a celkové NeuNAc, které však jsou výrazně nižší než u EE-cholestázy (Majer a spol., 2007)<sup>1</sup>. Toto lze vysvětlit dvěma faktory.

U EE-cholestázy vysoké koncentrace žlučových kyselin atakují membránu hepatocytů ze sinusoidální strany, zatímco u cholestázy vyvolané podvazem působí nahromaděné CŽK ze strany sinusoidální i kanalikulární. Druhým faktorem je vliv estrogenů. U těhotenské cholestázy byla zjištěna snížená fluidita membrán (Smith and Gordon, 1988)<sup>103</sup>, která může být způsobena právě vyšší koncentrací gangliosidů v membráně. To by mohlo souviset i se známým faktem, že při těhotenské cholestáze většinou nevzniká žádné periportální poškození hepatocytu, které je typickým jevem u obstrukční cholestázy.

### **Vliv inhibice a aktivace hemoxygenasy:**

U vzorků s aplikovaným heminem (5-denní kontrola aC) oproti kontrolním vzorkům (C 5-denní) dochází ke zvýšení gangliosidu *a*-větve. U srovnání aC proti C bylo rovněž zaznamenáno statisticky významné navýšení celkové NeuNAc. U srovnání skupin aBDL proti BDL byl potvrzen pouze nárůst celkové NeuNAc. Z výsledků můžeme usuzovat, že HO-1 aktivovaná heminem vyvolává nárůst gangliosidů *a*-větve a celkové NeuNAc. Na vysvětlení toho jevu se zaměří další výzkum v laboratoři školitele.

Kontrolní vzorky s HO-1 inhibovanou Sn-mesoporfyrinem (iC) oproti kontrolním vzorkům (C) nevykazují změny ve složení gangliosidů, byl pouze zjištěn nárůst celkové NeuNAc u iC oproti C. Pokud srovnáváme vzorky s cholestázou v kombinaci s Sn-mesoporfyrinem inhibovanou HO-1 (iBDL) proti vzorkům s cholestázou (BDL), je zde významné snížení gangliosidů- u iBDL proti BDL snížení gangliosidů *a*- i *b*-větve.

Srovnání zvýšení gangliosidů *b*- větve s mírou exprese mRNA, klíčového enzymu pro syntézu GD3, sialyltransferasy 2 (SAT-2), nepřineslo očekávané výsledky, protože při zvýšených gangliosidech *b*-větve odpovídající mRNA nebyla zvýšena, byl zde naopak zjištěn pokles exprese SAT-2. Zvýšení biosyntézy gangliosidů *b*-série probíhá zřejmě jiným způsobem než zvýšením exprese mRNA pro SAT-2. K podobným výsledkům nezvýšené mRNA pro GalT-2 a SAT-2, dospěl i Majer a spol. u EE cholestázy<sup>1</sup> a Šmíd pro GalT-2 u cholestázy indukované podvazem<sup>3</sup>. Senn a spol. (1991)<sup>72</sup> se však zmiňují o určité dosažené korelaci mezi stanovením aktivity glykosyltransferas a výsledky analýzy gangliosidů. Je tedy ještě v našem výzkumu potřebné sledovat aktivity glykosyltransferas. Stanovení aktivit glykosyltransferas se vymykalo možností řešení v rámci mé diplomové práce, proto bude zahrnuto v dalším výzkumu Hepatologické laboratoře.

Výsledky chromatografické analýzy v této, Majerově práci<sup>1</sup> a histologických studií Jirkovské a spol.<sup>2</sup> a Šmída<sup>3</sup> může přinést vysvětlení v tom, že zvýšení množství gangliosidů

v plazmatické membráně při cholestáze je důležité pro její zpevnění proti detergenčním účinkům CŽK.

## 6. Souhrn

Práce se zabývala výzkumem vlivu experimentální cholestázy vyvolané podvazem žlučovodů laboratorních potkanů kmene Wistar na změnu ve složení jaterních gangliosidů.

Výsledkem je zjištění, že obstrukční cholestáza způsobuje zvýšení celkové kyseliny sialové (celkových gangliosidů) a gangliosidů *b*- větve (GD1b, GT1b, případně GD3). Tyto výsledky korelují se závěry studie cholestázy indukované 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem Majera a spol.<sup>1</sup>.

Modulace HO-1 se projevila zvýšením celkové NeuNAc. Zajímavým zjištěním byl pokles gangliosidů *a*- , *b*- větve po inhibici HO-1 u cholestatických potkanů (iBDL vs. BDL).

U skupin s inhibovanou HO-1 (kontrola iC, podvaz iBDL) dochází ke zřetelnému nárůstu mRNA pro SAT-2, klíčového enzymu v biosyntéze gangliosidů *b*- série. Vlivem cholestázy a aktivací HO-1 dochází k poklesu mRNA pro SAT-2.

Rozdíly v koncentracích gangliosidů a expresích mRNA je možné vysvětlit vlivem posttranslační modifikace. Stanovení aktivit příslušných glykosyltransferas bude jedním z dalších cílů výzkumné skupiny Hepatologické laboratoře 1. LF UK.

Výsledky této studie potvrzují, že zvýšení množství gangliosidů v plazmatické membráně při cholestáze je důležité pro její zpevnění proti detergenčním účinkům žlučových kyselin.

## 7. Seznam použité literatury

---

- 1 Majer, F., Trnka, L., Vítek, L., Jirkovská, M., Mareček, Z., Šmíd, F., *Biomed. Chromatogr.*, 21, 446-450 (2007)
- 2 Jirkovská, M., Majer, F., Šmídová, J., Strítěský, J., Shaik, G. M., Dráber, P., Vítek, L., Mareček, Z., Šmíd, F., *Glycoconj. J.*, 24, 231-241 (2007)
- 3 Šmíd, V.: Změny v histochemické lokalizaci gangliosidů u experimentální cholestázy. Diplomová práce 1. LF UK, Praha (2010)
- 4 IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, The nomenclature of Lipids. *Recommendations Lipids*, 12, 455-468 (1977)
- 5 Bláha, K., Košťář, J., Michalec, Č., Ranný, M., *Chem. Listy*, 81, 715-748 (1987)
- 6 Svennerholm, L., *Neurochem.*, 10, 613-623 (1963)
- 7 Svennerholm, L., *Progr. Brain Res.*, 101, XI-XIV (1994)
- 8 Mandon, E., Ehses, I., Rother, J., van Echten, G., Sandhoff, K., *J. Biol. Chem.*, 267, 11144-11148 (1992)
- 9 Braun, E. P., Schnell, E. E., *J. Biol. Chem.*, 243, 3577-3583 (1968)
- 10 Stoffel W., Le Kim, D., Stich G., Hoppe Seyler's *Z. Physiol. Chem.*, 349, 664-670 (1968)
- 11 Mandon, E. C., van Echten, G., Birk, R., Schmidt, R. R., Sandhoff, K., *Eur. J. Biochem.*, 198, 667-674 (1991)
- 12 Sandhoff, K., van Echten, G., *Progr. Brain Res.*, 101, 17-29 (1994)
- 13 Carey, D. J., Hirschberg, C. W., *J. Biol. Chem.*, 256, 989-993 (1981)
- 14 Trinchiera, M., Fabbri, M., Ghidoni, R., *J. Biol. Chem.*, 266, 20907-20912 (1991)
- 15 Schwarzmann, G., Sandhoff, K., *Biochemistry*, 29, 10865-10871 (1990)
- 16 Pohlenz, G., Klein, D., Schwarzmann, G., Schmitz, D., Sandhoff, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 7044-7048 (1988)
- 17 Iber, H., Zacharias, C., Sandhoff, K., *Glycobiology*, 2, 137-142 (1992)
- 18 Iber, H., Sandhoff, K., *FEBS Lett.*, 254, 124-128 (1989)
- 19 Tettamanti G., Riboni L., *Adv. Lipid Res.*, 25, 235-267 (1993)
- 20 Sandhoff, K., van Echten, G., *Progr. Brain Res.*, 101, 17-29 (1994)
- 21 Tettamanti G., Riboni L., *Progr. Brain Res.*, 101, 77-100 (1994)
- 22 Schütz-Henninger, R., Ullmer, E., Prinz, C., Decker, K., *Eur. J. Biochem.*, 185, 327-330 (1989)

- 
- 23 Yu, R. K., Bieberich, E., *Mol. Cell. Endocrinol.*, 177, 19-24 (2001)
- 24 Yu, R. K., Bieberich, E., Xia, T., Zeng, G., *J. Lipid Res.*, 45, 783-793 (2004)
- 25 Yusuf H. K. M., Schwarzmann, G., Pohlenz, G., Sandhoff, K., *Hoppe Seyler's Z. Physiol.*, 368, 455-462 (1987)
- 26 Iber, H., van Echten, G., Klien, R. A., Sandhoff, K., *Eur. J. Cell Biol.*, 52, 236-240 (1990)
- 27 Qiroga, S., Panzetta, P., Capputo, R., *J. Neurosci. Res.*, 30, 414-420 (1991)
- 28 Roseman, S., *Chem. Phys. Lipids*, 5, 270-297 (1970)
- 29 Bieberich, E. S., MacKinnon, S., Silva, J., Li, D. D., Tencomnao, T., Irwin, D., Kapitonov, D., Yu, R. K., *Biochemistry*, 41, 11479-11487 (2002)
- 30 Bieberich, E., Tencomnao, T., Kapitonov, D., Yu, R. K., *J. Neurochem.*, 74, 2359-2364 (2000)
- 31 Martina, J. A., Daniotti, J. L., Maccioni, H. J., *J. Biol. Chem.*, 273, 3725-3731 (1998)
- 32 Stern, C. A., Braverman, T. R., Tiemeyer, M., *Glycobiology*, 10, 365-374 (2000)
- 33 Farukawa, K., Takamiya, K., Okada, M., Inoue, M., Fukumoto, S., *Biochim. Biophys. Acta*, 1525, 1-12 (2001)
- 34 Proia, R. L., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 358, 879-883 (2003)
- 35 Ichikawa, S., Nakajo, N., Sakiyama, H., Hirabayashi, Y., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 2703-2707 (1994)
- 36 Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreud, U., Sandhoff, K., Proia, R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 9142-9147 (1999)
- 37 Kolter, T., Proia, R. L., Sandhoff K., *Traffic*, 1, 803-804 (2000)
- 38 Bosio, A., Binczek, E., Stoffel, W., *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 93, 13280-13285 (1996)
- 39 Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Popko, B., *Cell.*, 86, 209-219 (1996)
- 40 Honke, K., Hirahara, Y., Dupree, S., Suzuki, K., Popko, B., Fukushima, K., Fukushima, J., Nagasawa, T., Yoshida, N., Wada, Y., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 4227-4232 (2002)
- 41 Sheikh, K. A., Sun, J., Liu, Y., Kawai, H., Crawford, T. O., Proia, R. L., Griffin, J. W., Schnaar, R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 7532-7537 (1999)



- 
- 42 Chiavegatto, S., Sun, J., Nelson, R. J., Schnaar, R. L., *Exp. Neurol.*, 166, 227-234 (2000)
- 43 Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Zhao, J., Fukumoto, S., Yamashiro, S., Okada, M., Haraguchi, M., Shin, M., Kishikawa, M., Shiku, H., Aizawa, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 12147-12152 (1998)
- 44 Zhao, J., Furukawa, K., Fukumoto, S., Okada, M., Furugen, R., Miyazaki, H., Takamiya, K., Aizawa, S., Shiku, H., Matsuyama, T., *J. Biol. Chem.*, 274, 13744-13747 (1999)
- 45 Yamashita, T., Wu, Y. P., Sandhoff, R., Werth, N., Mizukami, H., Ellis, J. M., Dupree, J. L., Geyer, R., Sandhoff, K., Proia, R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 2725-2730 (2005)
- 46 Tettamanti, G., Masserini, M., Giulliani, A., Pagani, A., *Ann. Inst. Super. Sanita.*, 24, 23-32 (1988)
- 47 Koerner, T. A. W., Prestegard, J. H., Demou, P. C., Yu, R. K., *Biochemistry*, 22, 2676-2684 (1983)
- 48 Acquotti, D., Fronza, G., Riboni, L., Sonnino, S., Tettamanti, G., *Glycoconjugate J.*, 4, 119-127 (1987)
- 49 Levery, S. B., Roberts, C. E., Salyan, M. E. K., Bouchon, B., Hakomori, S., *Biomed. Environ. Mass Spectrosc.*, 19, 311-318 (1990)
- 50 Riboni, S., et al., *J. Biol. Chem.*, 261, 8514-8519 (1986)
- 51 Tettamanti, G., Preti, A., Cestaro, B., Masserini, M., Sonino, S., Ghidoni, G., *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 128, 321-343 (1980)
- 52 Curatolo, W., Small, D. W., Shipley, G., *Biochim. Biophys. Acta*, 468, 11-20 (1977)
- 53 Catu, L., Corti, M., Sonnino, S., Tettamanti, G., *Chem. Phys. Lipids*, 41, 315- 328 (1976)
- 54 Felgner, P. L., Freire, E., Barenholz, Y., Thompson, T. E., *Biochemistry*, 20, 2168-2172 (1981)
- 55 Masserini, M., Freire, E., *Biochemistry*, 26, 237-242 (1987)
- 56 Hakomori, S.: *Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis*, v knize *Handbook of Lipid Research, Vol. 3 Sphingolipid Biochemistry*, J. N. Kanfer and S. Hakomori (eds) Plenum, New York, 327-379 (1983)

- 
- 57 Karlsson, K. A., *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 309-350 (1989)
- 58 Myers, M., Wortman, C., Freire, E., *Biochemistry*, 23, 1442-1448 (1984)
- 59 Singer, S. J., Nicolson, *Science*, 185, 720-731 (1972)
- 60 Jain, M. K., White, H. B., *Adv. Lipid Res.*, 15, 1-60 (1977)
- 61 Tillack, T.W., Allietta, M., Moran, R. E., Young, W. W. J., *Biochim. Biophys. Acta*, 733, 15-24 (1983)
- 62 Sorice M., Parolini I., Sansolini T., Garofalo T., Dolo V., Sargiacomo M., Tai T., Peschle C., Torrisi M. R., Pavan A., *J. Lipid. Res.* 38, 969-980 (1997)
- 63 Rahmann H, Rösner H, Körtje K-H, Beitinger H., Seybold V., *Prog. Brain. Res.*, 101, 127-145 (1994)
- 64 Rock P., Allietta M., Young W. W. Jr, Thompson T. E., Tillack T. W., *Biochemistry*, 30, 19-25 (1991)
- 65 Simons, K., Ikonen, E., *Nature*, 387, 569-572 (1997)
- 66 Nečas, E., Šulc, K., Vokurka, M.: *Patologická fyziologie orgánových systémů*, Karolinum, Praha (2005)
- 67 Trauner, M., Meier, P. J., Boyer, J. L., *J. Hepatol.*, 31, 165-178 (1999)
- 68 Jansen, P. L. M., Müller, M., *Can. J. Gastroenterol.*, 14, 233-238 (2000)
- 69 Kawaguchi, T., Sakisaka, S., Mitsuyama, K., *Hepatology*, 31, 1285-1295 (2000)
- 70 Rodrigues, C. M. P., Steer, C. J., *J. Hepatol.*, 32, 135-141 (2000)
- 71 Krähenbuhl, L., Schäfer, M., Krähenbuhl, S., *J. Hepatol.*, 28, 1000-1007 (1998)
- 72 Senn, H. J., Geiser, T., Fitzke, E., Baumgartner, U., Scholmerich, J., Gerok, W., *J. Hepatol.*, 13, 152-160 (1991)
- 73 Mesaric, M., Decker, K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171, 1188-1191 (1990)
- 74 Kasai, N., Kamimura, A., Miyoshi, I., Ariga, T., *J. Biochem.*, 113, 251- 257 (1993)
- 75 Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 61, 748-755 (1968)
- 76 Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R., *J. Biol. Chem.*, 244, 6388-6394 (1969)
- 77 Yoshida, T., Kikuchi, G. J., *Biol. Chem.*, 253, 4230-4236 (1978)
- 78 Tenhunen, R., Ross, M. E., Marver, H. S., Schmid, R., *Biochemistry*, 9, 298-303 (1970)
- 79 Motterlini, R., Mann, B. E., Foresti, R., *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, 14, 1305-1318 (2005)

- 
- 80 Wu, L., Wang, R., *Pharmacol. Rev.*, 57, 585-630 (2005)
- 81 Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glaker, A. N., Ames, B. N., *Science*, 235, 1043-1047 (1987)
- 82 Vítek, L., Schwertner, H. A., *Adv. Clin. Chem.*, 43, 1-57 (2007)
- 83 Bliuger, A. F., Dudnik, L. B., Maiore Ala, Mieza, I. E., *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 99, 166-168 (1985)
- 84 Wu, T. W., Wu, J., Li, R. K., Mickle, D., Carey, D., *Biochem. Cell. Biol.*, 69, 683-688 (1991)
- 85 Wu, T. W., Carey, D., Wu, J., Sugiyama, H., *Biochem. Cell. Biol.*, 69, 828-834 (1991)
- 86 Otterbein, L., Chin, B. Y., Otterbein, S. L., Lowe, V. C., Fessler, H. E., Choi, A. M., *Am. J. Physiol.*, 272, 268-275 (1997)
- 87 Jeney, V., Balla, J., Yachie, A., Varga, Z., Vercellotti, G. M., Eaton, J. W., Balla, G., *Blood.*, 100, 879-887 (2002)
- 88 Ferris, C. D., Jaffrey, S. R., Sawa, A., Takahashi, M., Brady, S., Barrow, R. K., Tysoe, S. A., Wolosker, H., Baranano, D. E., Dore, S., Poss, K. D., Snyder, S. H., *Nat. Cell. Biol.*, 1, 152-157 (1999)
- 89 Váňová, K.: Produkty katabolické dráhy hemu ve vztahu k patogenezi cholestázy, Diplomová práce VŠCHT, Praha (2009)
- 90 Kaplan, M., Vreman, H. J., Hammerman, C., Stevenson, D. K., *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.*, 81, F56-60 (1999)
- 91 Leeden, R. W., Yu, R. K., Eng, L. F., *J. Neurochem.*, 21, 829-839 (1973)
- 92 Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H., *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509 (1957)
- 93 Suzuki, K., *J. Neurochem.*, 12, 629-638 (1965)
- 94 Svennerholm, L., *Biochim. Biophys. Acta*, 24, 604-611 (1957)
- 95 Nakamura, K., Hashimoto, Y., Yamakawa, T., Suzuki, A., *J. Biochem.*, 103, 201-208 (1988)
- 96 Dahiya, R., Dudeja, P. K., Brasitus, T. A., *Biochim. Biophys. Acta*, 962, 390-395 (1988)
- 97 Hakomori, S., *Chem. Phys. Lipids*, 42, 209-233 (1986)
- 98 Nakamura, Y., Hashimoto, Y., Yamakawa, T., Suzuki, A., *J. Biochem.*, 103, 396-398 (1988)
- 99 Gazzotti, G., Sonnino, S., Ghidoni, R., *J. Chromatogr.*, 348, 371-378 (1985)

- 
- 100 Šmíd, F., Reinišová, J., *J. Chromatogr.*, 86, 200- 2004 (1973)
- 101 Suzuki, K., *Life Sci.*, 3, 1227- 1233 (1964)
- 102 Chigorno, V., Sonnino, S., Ghidoni, R., Tettamanti, G., *Neurochem. Int.*, 4, 397-404 (1982)
- 103 Smith, D. J., Gordon, E. R., *J. Lab. Clin. Med.*, 112, 679-685 (1988)

---

**„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.“**

<b>Jméno a příjmení (s adresou)</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Studijní program: Biochemie**

**Studijní obor: Biochemie**



**Ing. Barbora Hynková**

**Gangliosidy v játrech u cholestázy indukované  
podvázáním žlučovodu**

**Liver gangliosides in cholestasis induced by bile duct  
ligation**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí diplomové práce:

Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.

Školitel:

Doc. RNDr. František Šmíd, CSc.

**Praha, 2011**

## **Prohlášení:**

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

V Praze, dne 6.5.2011

Podpis:

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr Františku Šmídovi, CSc. za jeho odborné vedení a pomoc při zpracování této práce. Děkuji vedoucímu mé diplomové práce Prof. RNDr Gustavu Entlicherovi, CSc. za jeho cenné rady a připomínky. Dále děkuji Mgr. Tomáši Petrovi a MUDr. Václavu Šmídovi za pomoc při přípravě experimentů. Dík patří celému kolektivu Hepatologické laboratoře ÚKBLD 1.LF UK za vytvoření přátelské atmosféry. Děkuji PharmDr. Daliboru Černému z Farmakologického ústavu 1.LF UK za rady v oblasti molekulární biologie. Svě rodině děkuji za podporu během mého studia.

Práce byla vypracována s podporou grantů: IGAMZ NR/9366-3 a GAUK 251207.



## Abstrakt

Gangliosidy patří mezi sfingolipidy obsahující kyselinu sialovou. Nachází se na buněčném povrchu všech typů živočišných buněk. Zde plní funkci receptorových molekul, dále se účastní mezibuněčných interakcí a díky své rigidní struktuře zpevňují buněčnou membránu a chrání tak buňku před škodlivými okolními vlivy.

Tato diplomová práce studuje vliv experimentální cholestázy na složení gangliosidů jaterní tkáně. Cholestáza byla vyvolána podvazem žlučvodů u potkanů kmene Wistar. V játrech zvířat s cholestázou ve srovnání s kontrolami byl zjištěn signifikantní nárůst celkové lipidní kyseliny sialové a gangliosidů *b*-série (GD1b, GT1b event. GD3). Tyto výsledky zjištěné u obstrukční cholestázy odpovídají výsledkům které publikoval Majer a spol. *Biomed. Chromatogr.*, 21, 446-450 (2007) u cholestázy vyvolané 17- $\alpha$ -ethinyloestradiolem, ale nárůst gangliosidů *b*-série je v naší studii mírnější.

Dále tato práce zkoumala vliv modulační aktivity hemoxygenasy 1 (HO-1) při cholestáze vyvolané podvazem žlučvodů (hemin jako aktivátor HO-1, Sn-mesoporfyrin jako inhibitor HO-1) na složení gangliosidů. U skupin zvířat s podávaným Sn-mesoporfyrinem bylo zjištěno zvýšení celkové kyseliny sialové, zatímco u některých gangliosidů *a*- i *b*- větve byl zjištěn pokles. U skupin zvířat s heminem aktivovanou HO-1 byla zvýšená celková lipidně vázaná kyselina sialová beze změn ve složení gangliosidů.

Exprese mRNA pro sialyltransferasu syntetizující GD3 (SAT-2) jako klíčového enzymu v biosyntéze gangliosidů *b*-série výrazně vzrostla u zvířat s podávaným Sn-mesoporfyrinem.

## Abstract

Gangliosides are sialic acid-containing glycosphingolipids located on the cell surface of all animal cell types. They play a role as receptor molecules, share in cell-to-cell interaction and protect the cell against harmful environmental factors by increasing of rigidity of cell surface.

This diploma thesis studies an influence of experimental cholestasis on hepatic ganglioside composition. Cholestasis was induced by bile duct ligation in Wistar rats. A significant increase of total lipid bound sialic acid and *b*-series gangliosides (GD1b, GT1b, event. GD3) was found in cholestatic liver when compared with controls. These results found in obstructive cholestasis correspond with the results Majer et al. Biomed. Chromatogr., 21, 446-450 (2007), described in 17 $\alpha$ -ethinylestradiol induced cholestasis, but the increase of *b*-series gangliosides was milder in our study.

As a second point, an effect of modulated heme-oxygenase 1 (HO-1) activity was investigated in cholestatis induced bile duct ligation (HO-1 activator- hemine, HO-1 inhibitor- Sn-mesoporphyrin). An increase of a total lipid sialic acid was found in Sn-mesoporphyrin treated animals, but a decrease of some *a*- and *b*- series gangliosides was observed. In group with activated HO-1 total sialic acid increased, but the composition of gangliosides was not changed.

Expression of mRNA of key enzyme in biosynthesis *b*-series gangliosides, GD3 synthase significantly increased in Sn-mesoporphyrin treated animals.

„ (In Czech)“

## Obsah

Seznam zkratk	8
1. Úvod- Současný stav řešené problematiky	10
1.1. Glykosfingolipidy	11
1.2. Názvosloví glykosfingolipidů podle IUPAC- IUB	12
1.3. Biosyntéza glykosfingolipidů	14
1.3.1. Biosyntéza gangliosidů ganglio- série	15
1.3.2. Biosyntéza glykosfingolipidů lakto- a neolakto- série	16
1.3.3. Regulace biosyntézy	16
1.3.4. Výzkum úlohy gangliosidů pomocí genových mutací	19
1.4. Chemické vlastnosti gangliosidů	22
1.4.1. Prostorová konformace molekuly gangliosidů	22
1.4.2. Amfifilní vlastnosti gangliosidů	23
1.5. Molekulárně- fyziologická úloha glykosfingolipidů v biologických membránách	24
1.6. Žlučový systém	24
1.7. Hepatocyt a tvorba žluči	25
1.8. Cholestáza	26
1.9. Gangliosidy u cholestázy indukované ethinylestradiolem	27
1.10. Histologické změny v lokalizaci gangliosidů u cholestázy indukované ethinyl- estradiolem a cholestázy indukované podvázáním žlučových	29
1.11. Význam hemoxygenasy v hepatoprotekci	30
2. Cíl diplomové práce	33
3. Materiál a metodika	34
3.1. Materiál	34
3.1.1. Biologický materiál	34
3.1.2. Chemikálie	34
3.1.3. Přístrojové vybavení	35
3.2. Metodika	35
3.2.1. Experiment na zvířatech	35
3.2.2. Izolace gangliosidů	36
3.2.3. Fotometrické stanovení celkové kyseliny sialové	39
3.2.4. TLC gangliosidů	39
3.2.5. Denzitometrické vyhodnocení TLC chromatogramu	40

3.2.6. Stanovení exprese mRNA pro sialyltransferasu syntetizující GD3 (SAT-2)	40
3.2.7. Statistická analýza	41
4. Výsledky	42
4.1. Jaterní testy	42
4.2. Stanovení celkové lipidně vázané kyseliny sialové	45
4.3. Vyhodnocení TLC chromatogramů	47
4.4. Stanovení exprese mRNA pro sialyltransferasu syntetizující GD3 (SAT-2)	56
5. Diskuse	58
6. Souhrn	62
7. Seznam použité literatury	63

## Seznam zkratek

ALP	alkalická fosfatasa
ALT	alaninaminotransferasa
AST	aspartátaminotransferasa
BSEP	bile- salt export pump
CŽK	celkové žlučové kyseliny
cMOAT	canalicular multispecific organic-anion transporter, kanalikulární multispecifický transportér organických iontů
EE	17- $\alpha$ -ethinylestradiol
EE-cholestáza	cholestáza indukovaná 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem
GalT	galaktosyltransferasa
GalNAcT	N-acetylgalaktosamintransferasa
GlcT	glukosyltransferasa
GGT	$\gamma$ - glutamyltranspeptidasa
GSL	glykosfingolipid
HO-1	hemoxygenasa 1
HO-2	hemoxygenasa 2
HPTLC	tenkovrstvá chromatografie s vysokým rozlišením
CH	chloroform
M	methanol
MDR1	multidrug resistance P glycoprotein 1
MDR3	multidrug resistance P glycoprotein 3
MRP-2	multidrug resistance associated protein
NeuNAc	kyselina N-acetylneuraminová
NTCP	Na/Taurocholate cotransporting polypeptide- na sodíku závislý taurocholátový kotransportní protein
OATP	organic anion-transporting polypeptide, organický aniontový transportér
OCT1	organic cation transporter, organický kationtový transportér
PFIC	syndrom progresivní familiární intrahepatální cholestázy
RNA later	uchovávací medium pro RNA
SAT-1	sialyltransferasa 1 syntetizující GM3
SAT-2	sialyltransferasa 2 syntetizující GD3
SAT-3	sialyltransferasa 3 syntetizující GT3
V	voda (destilovaná)

### **Zkratky pro skupiny zvířat v experimentu**

aBDL skupina zvířat s podvazem žlučovéhoodu (**Bile Duct Ligation**) a HO-1 aktivovanou heminem, 5-denní

aC kontrolní skupina (**Controls**) zvířat slepě operovaných<sup>a</sup> s HO-1 aktivovanou heminem, 5-denní

BDL skupina zvířat s podvazem žlučovéhoodu (**Bile Duct Ligation**) 5-denní

iBDL skupina zvířat s podvazem žlučovéhoodu (**Bile Duct Ligation**) 5-denní, a HO-1 inhibovanou Sn-mesoporfyrinem,

C kontrolní skupina (**Controls**) zvířat slepě operovaných

iC kontrolní skupina (**Controls**) zvířat slepě operovaných s HO-1 inhibovanou Sn-mesoporfyrinem, 5-denní

BDL<sup>18</sup> skupina zvířat s podvazem žlučovéhoodu, 18-denní

C<sup>18</sup> kontrolní skupina zvířat slepě operovaných, 18-denní

---

<sup>a</sup> pojem slepě operovaných – viz kap 3.2.1

## 1. Úvod- Současný stav řešené problematiky

Diplomová práce „Gangliosidy v játrech u cholestázy indukované podvázáním žlučovodu“ je pokračováním výzkumu řešeného v Hepatologické laboratoři Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty UK (Grant IGAMZ NR/9366-3 a GAUK 251207). Diplomová práce navazuje na předchozí publikaci laboratoře, zejména na práci popisující dramatický vzestup některých gangliosidů v játrech potkana u estrogeny indukované cholestázy<sup>1</sup>. Jedním z možných výkladů byl vliv estrogenů na tyto gangliosidy.

Tato diplomová práce sleduje s použitím stejných metod složení gangliosidů u cholestázy indukované podvazem žlučovodů. Porovnání obou typů cholestáz má přispět k posouzení, do jaké míry je vzestup těchto gangliosidů způsoben vlivem estrogenů či vlivy genetickými, případně jinými. Poněvadž vzestup gangliosidů je zřejmě způsoben aktivací určitých glykosyltransferas, je v úvodu připojeno podrobné pojednání o biosyntéze gangliosidů a její regulaci.

Chromatografické analýzy byly dávány do souvislosti s histochemickým sledováním změn v lokalizaci gangliosidu GM1 u cholestázy indukované estrogeny a toto sledování upozornilo na kumulaci GM1 gangliosidu do sinusoidální membrány v případě, že je jaterní buňka při cholestáze ohrožena detergentním působením vysokých koncentrací žlučových kyselin v krvi<sup>2</sup>. A právě gangliosidům je připisována schopnost zpevnování membrány vzhledem k jejich rigidnější struktuře ve srovnání s fosfolipidy a u cholestázy byl vzestup rigidity membrány popsán. Proto je podrobně pojednáváno o chemických vlastnostech gangliosidů a o jejich fyziologické úloze při zpevnování vnější vrstvy plazmatické membrány.

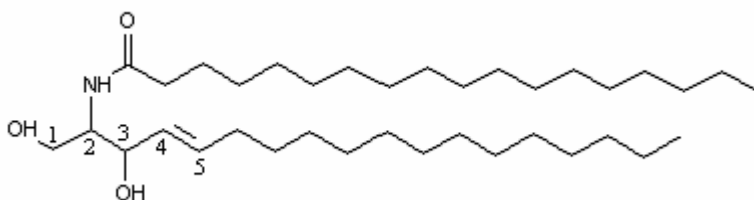
Podobně jsou v této diplomové práci u cholestázy indukované podvazem chromatografické analýzy spolu se stanovením mRNA příslušných glykosyltransferas dávány do souvislosti s histologickými nálezy, popisovanými v diplomové práci Václava Šmída, obhájené na 1.LF UK<sup>3</sup>.

Kromě sledování vlivu cholestázy na složení gangliosidů je zkoumán ještě vliv hepatoprotekčního enzymu hemoxygenasy.

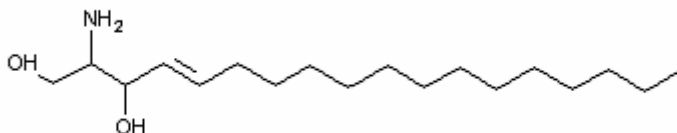
## 1.1. Glykosfingolipidy

Glykosfingolipidy jsou komplexní sloučeniny patřící do skupiny glykolipidů. Obsahují hydrofilní sacharidovou a hydrofobní lipidovou složku.

Lipidová část se nazývá ceramid. Ceramidy jsou N-acylované sfingoidní báze (viz. Obr. 1). Sfingoidní báze (long chain bases- LCB) neboli sfingoidy (viz. Obr. 2) jsou víceuhlíkaté alifatické aminoalkoholy odvozené od sfinganinu (D-erythro-2-amino-1,3-oktadekandiol). Bývají to jeho homology, stereoizomery, hydroxyderiváty nebo nenasycené deriváty. Ceramid je tedy souborné označení pro variabilní skupinu látek, odlišující se jak ve struktuře sfingoidní báze, tak typu acylu mastné kyseliny.



Obr. 1: ceramid



Obr. 2: sfingoidní báze- sfingosin

Sacharidová složka vykazuje také velkou pestrost složení. Jedná se o oligosacharidové struktury sestavené u živočichů nejčastěji z D-glukosy, D-galaktosy, L-fukosy, N-acetyl-D-glukosaminu a N-acetyl-D-galaktosaminu. Monosacharidové jednotky mohou být  $\alpha$ - i  $\beta$ - anomery, jsou vzájemně pospojovány vazbami s různými lokanty a běžně jsou derivatizovány sulfátem či kyselinou sialovou. Kyselina sialová je skupinové označení pro látky odvozené od kyseliny neuraminové (5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero-nonulosová kyselina). V přírodě bylo dosud poznáno několik desítek těchto látek. Jsou to především acetylové či glykolylové deriváty, kdy jsou tyto skupiny vázané na aminoskupinu nebo hydroxyskupinu.



Glykosfingolipidy jsou tedy bohatou skupinou látek vyznačující se strukturní rozmanitostí, která je podkladem pro jejich širokou úlohu v biologických systémech.

Glykosfingolipidy se podle charakteru sacharidové složky dělí na:

- neutrální – obsahují neutrální sacharidy, tj. D-glukosu, D-galaktosu, L-fukosu, N-acetyl-D-glukosamin a N-acetyl-D-galaktosamin
- kyselé – obsahují monosacharidové jednotky derivatizované kyselými skupinami jako jsou:
  - sulfátová skupina  $-SO_3H$  → sulfáty (sulfoglykosfingolipidy)
  - skupina kyseliny sialové → gangliosidy (sialoglykosfingolipidy)
  - fosfátová skupina → fosfoglykosfingolipidy

## 1.2. Názvosloví glykosfingolipidů podle IUPAC-IUB<sup>4,5</sup>

Názvosloví glykosfingolipidů se vzhledem k vysoké heterogenitě lipidové části odvozuje pouze ze sacharidové složky. Lipidová složka se do názvů promítá obecnou koncovkou –ceramid.

Pro názvoslovný systém bylo určeno několik základních pravidel:

- počet monosacharidových jednotek se vyjadřuje koncovkou –diosa, -triaosa, -tetraosa, -pentaosa, atd.
- oligosacharidy se rozdělují do sérií podle struktury a biogenetické příbuznosti
- vazba 1→3 vs. 1→4 se u jinak totožné struktury oligosacharidu vyjadřuje předponou *iso*- při rozlišení vazeb mezi II a III monosacharidem a *neo*- při rozlišení vazeb mezi III a IV monosacharidem
- pro zápis zkrácených názvů GSL byl vytvořen systém symbolů

### Série glykosfingolipidů

Většina glykosfingolipidů je odvozována od laktosylceramidu. Podle třetí či čtvrté monosacharidové jednotky se GSL zařazují do sérií: globo-, ganglio-, muko-, lakto-, neolakto- a gala- (viz. Tab. 1, str. 13).

Tab. 1: Série glykosfingolipidů a jejich strukturní motivy

Série	Strukturní motiv glykosylu
globo-	Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc-
isoglobo-	Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc-
lakto-	Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc-
neolakto-	Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc-
muko-	Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc-
ganglio-	GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc-
gala-	Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal-

Pravidla pro tvorbu zkrácených názvů glykosfingolipidů:

- označení série + počet monosacharidových jednotek + koncovka –osylceramid (př. globotetraosylceramid)
- římskou číslicí se označuje poloha monosacharidu vzhledem k ceramidu
- arabskou číslicí v indexu se označuje poloha atomu uhlíku v monosacharidové jednotce, na kterém je navázán substituent, používá se také pro popis větvení oligosacharidového řetězce
- specifikace anomerních struktur sacharidů ( $\alpha$ -,  $\beta$ -)

Tab. 2: Názvosloví glykosfingolipidů dle IUPAC- IUB<sup>4,5</sup>

Struktura	Triviální název	Symbol (zkrácený symbol)
Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	globotriaosylceramid	GbOsa <sub>3</sub> Cer (Gb <sub>3</sub> Cer)
GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	globotetraosylceramid	GbOsa <sub>4</sub> Cer (Gb <sub>4</sub> Cer)
Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	isoglobotriaosylceramid	iGbOsa <sub>3</sub> Cer (iGb <sub>3</sub> Cer)
GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	isoglobotetraosylceramid	iGbOsa <sub>4</sub> Cer (iGb <sub>4</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	mukotriaosylceramid	McOsa <sub>3</sub> Cer (Mc <sub>3</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	mukotetraosylceramid	McOsa <sub>4</sub> Cer (Mc <sub>4</sub> Cer)
GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	laktotriaosylceramid	LcOsa <sub>3</sub> Cer (Lc <sub>3</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	laktotetraosylceramid	LcOsa <sub>4</sub> Cer (Lc <sub>4</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4) GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	neolaktotetraosylceramid	nLcOsa <sub>4</sub> Cer (nLc <sub>4</sub> Cer)
GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	gangliotriaosylceramid	GgOsa <sub>3</sub> Cer (Gg <sub>3</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3) GalNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcCer	gangliotetraosylceramid	GgOsa <sub>4</sub> Cer (Gg <sub>4</sub> Cer)
Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)GalCer	galabiosylceramid	GaOsa <sub>2</sub> Cer (Ga <sub>2</sub> Cer)
Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)GalCer	galatriaosylceramid	GaOsa <sub>3</sub> Cer (Ga <sub>3</sub> Cer)

Pro značnou jednoduchost se u gangliosidů často používá názvosloví podle Svennerholma<sup>6,7</sup>. Toto názvosloví využívá k označení gangliosidu jeho vlastnosti při dělení na tenkovrstvé chromatografii (TLC). Název se tvoří takto: písmeno G označuje gangliosid, dále je pomocí písmena M (mono-), D (di-), T (tri-), Q (tetra-) nebo P (penta-) vyjádřen počet skupin kyseliny sialové v molekule a číslice na třetí pozici určuje pořadí zóny od startu s daným gangliosidem při dělení na TLC (viz. Tab. 3). Pořadí zón při separaci TLC odpovídá v obráceném sledu počtu monosacharidových jednotek v molekule.

Tab. 3: Názvosloví dle Svennerholma<sup>6,7</sup>

Zkratka dle Svennerholma	Struktura gangliosidu
GM4	Neu5AcGalCer
GM3	Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcCer
GM2	GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GM1a	Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GM1b	Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4Gal $\beta$ 4GlcCer
GD3	Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcCer
GD2	GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GD1a	Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GD1b	Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GT1a	Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GT1b	Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GT1c	Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer
GQ1b	Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 8Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer

### 1.3. Biosyntéza glykosfingolipidů

Biosyntéza je zahájena na cytosolické straně endoplazmatického retikula<sup>8</sup> syntézou ceramidu jako jednoho ze základních stavebních kamenů sfingolipidů. Syntéza ceramidu začíná kondenzací serinu a palmitoyl-CoA katalyzované pyridoxalfosfátem vázaném na serin.<sup>9,10,11</sup> Vzniklý 3-ketosfinganin je NADPH-dependentní reduktasou redukován na sfinganin. Dalším krokem je reakce sfinganinu s acyl-CoA na D-erythro-dihydroceramid a dále na ceramid.

Další kroky biosyntézy jsou již lokalizovány v Golgiho aparátu za účasti membránově vázaných glykosyltransferas. K ceramidu jsou postupně připojovány sacharidové podjednotky z aktivovaných nukleotidových derivátů sacharidů. Pořadí glykosylace a konkrétní konformace vznikajících vazeb je dána specifitou

a kompartmentací zúčastněných enzymů. Společným prekurzorem většiny glykolipidů je glukosylceramid a laktosylceramid. Jejich syntéza probíhá na cytosolické straně Golgiho aparátu, kam jsou lokalizovány příslušné enzymy glukosyltransferasa a galaktosyltransferasa. Přehledně je popsána celá biosyntéza od kondenzace serinu a palmitoyl-CoA až po laktosylceramid v publikaci Sandhoffa a van Echten<sup>12</sup>.

### 1.3.1. Biosyntéza gangliosidů ganglio- série

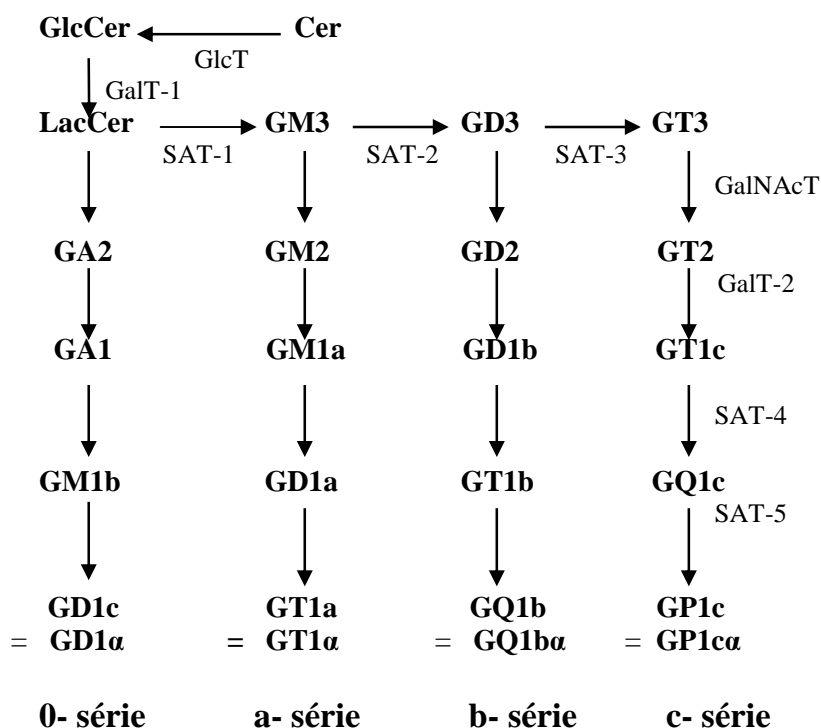
Gangliosidy gangliosérie se nacházejí v mozkové tkáni, kde probíhá i jejich syntéza. Syntéza tří větví gangliosidů gangliosérie probíhá za účasti příslušných sialyltransferas (SAT-1, SAT-2, SAT-3). Enzymy jsou přísně specifické. Každá sialyltransferasa přenáší zbytek kyseliny sialové na příslušný glykosylceramid takto:

SAT-1 na laktosylceramid za vzniku gangliosidu GM3, SAT-2 na GM3 za vzniku GD3 a SAT-3 na GD3 za vzniku GT3<sup>13, 14</sup>. Enzymy jsou svým aktivním místem orientovány do lumen Golgiho aparátu<sup>15</sup>. Sialylace probíhá v *cis*- části, následující glykosylace v *trans*-části. Enzymy katalyzující glykosylaci mají širší specifitu než sialyltransferasy.

N-Acetylgalaktosamintransferasa (GalNAcT) přenáší N-acetylgalaktosamin na laktosylceramid, GM3, GD3 a GT3 za vzniku GA2 (=asialoGM2), GM2, GD2 a GT2, které tvoří 4 větve gangliosidů *α*, *a*, *b*, *c*<sup>16,17</sup>. Také další enzymy sialyltransferasa 4 a 5 mají širokou specifitu. Sialyltransferasa 4 (SAT-4) katalyzuje syntézu GM1b z GA1, GD1a z GM1a a GT1b z GD1b<sup>16</sup>, sialyltransferasa 5 (SAT-5) syntézu GD1c, GT1a, GQ1b a GP1c z GM1b, GD1a, GT1b a GQ1b<sup>17, 18</sup> a GD3 na GT3 (viz. Obr.3, str.16)

Protože biosyntéza probíhá v různých odděleních Golgiho aparátu, je třeba vznikající gangliosidy určitým způsobem mezi jednotlivými oddíly transportovat. Předpokládá se, že transport probíhá vesikulární cestou. Konečné produkty biosyntézy jsou z Golgiho aparátu do membrány transportovány rovněž prostřednictvím vesikul<sup>19,20,21</sup>.

U savců a ptáků převažuje větev *a*- a *b*-, zatímco větev *0*- (hojná u žab) a větev *c*- (hojná u ryb) jsou u savců minoritní. Gangliosidy vykazují druhově a tkáňově specifické složení, které je určováno z části genetickými a jinými faktory<sup>22</sup>.



Obr.3: Schéma větví (sérií) biosyntézy gangliosidů. Účinkem specifických sialyltransferas (SAT-1, SAT-2 a SAT-3) vznikají z laktosylceramidu postupně gangliosidy GM3, GD3 a GT3 a z nich dalšími glykosyltransferasami další gangliosidy<sup>16</sup>.

### 1.3.2. Biosyntéza glykosfingolipidů lakto- a neolakto- série

Biosyntéza sfingolipidů lakto- a neolakto- série probíhá především v žláznových epitheliálních buňkách a pravděpodobně i endotheliálních buňkách. Tyto glykosfingolipidy jsou nositeli antigenní specifity krevních skupin ABH, Lewis, I a i. Krevní skupina je charakterizována právě oligosacharidem glykosfingolipidu. Tyto glykolipidy jsou často fukosylovány a sialovány.

### 1.3.3. Regulace biosyntézy

Kompletní regulace biosyntézy sfingolipidů dosud nebyla zcela objasněna. Předpokládá se, že na zastoupení konečných produktů biosyntetických drah, budou mít vliv kinetické parametry jednotlivých transferas, jejich topologické uspořádání a vzájemné prostorové uspořádání enzymů. Svou roli hraje i transkripční regulace transferas a v poslední době byly zjištěny nové skutečnosti o regulaci na úrovni posttranslační modifikace<sup>23,24</sup>.

Starší práce uvažovaly o zpětné kontrole biosyntézy glykolipidů, kdy jsou jednotlivé série inhibovány jejich vyššími produkty. V pokusech in vitro bylo třeba

zjištěno, že N-acetylgalaktosamintransferasa (GalNAcT) syntetizující GM2 v Golgiho aparátu jater potkanů je silně inhibována GD1a, sialyltransferasa syntetizující GD3 (SAT-2) je inhibována GQ1b<sup>25</sup>. Tento jev nebyl dosud pozorován *in vivo* nebo na pokusech s buněčnými kulturami.

Dále bylo zjištěno, že biosyntéza *a*-, *b*- větve je ovlivněna pH tak, že snížením pH ze 7,4 na 6,2 v kultivačním médiu myších mozečkových buněk dojde reverzibilně k přesunu biosyntézy *a*- větve na biosyntézu *b*- větve<sup>26</sup>. Je to možno vysvětlit různými pH optimy dvou klíčových regulačních glykosyltransferas- GalNAcT a sialyltransferasy 2 (SAT-2).

Jiný experiment ukázal vliv inhibitoru GalNAcT z kuřecího krevního séra, který po přidání ke kultivačnímu médiu buněk embrionální kuřecí retiny ovlivňuje poměr GM3/GD1 a inhibuje diferenciaci<sup>27</sup>.

V poslední dekádě byl učiněn výrazný pokrok ve výzkumu regulace biosyntézy gangliosidů. Bylo zjištěno, že je přísně regulována aktivitami glykosyltransferas. Biosyntéza gangliosidů v paralelních větvích (sériích) vyžaduje jemné sladění subcelulární distribuce a vzájemné souhry glykosyltransferas.

Biosyntéza je kontrolována na úrovni<sup>24</sup>:

- genové transkripce glykosyltransferas
- posttranslační modifikace glykosyltransferas

### **Regulace biosyntézy gangliosidů na transkripční úrovni**

Mechanismus regulující expresi genů různých glykosyltransferas je dosud málo prostudován. Je klíčové charakterizovat struktury promotorů, transkripčních faktorů nebo komplexů transkripčních faktorů zapojených v regulaci biosyntézy na transkripční úrovni. Byly izolovány promotory 6-ti genů glykosyltransferas syntetizujících gangliosidy. Jejich společnou vlastností je, že všechny jsou bez TATA boxu i CCAAT boxu, avšak mají několik Sp1 vazebných míst v blízkosti startovacího místa transkripce. Tyto vlastnosti jsou charakteristické pro „housekeeping geny“. Termín „housekeeping“ označuje permanentní expresi s nízkou regulací<sup>24</sup>.

### **Posttranslační modifikace glykosyltransferas**

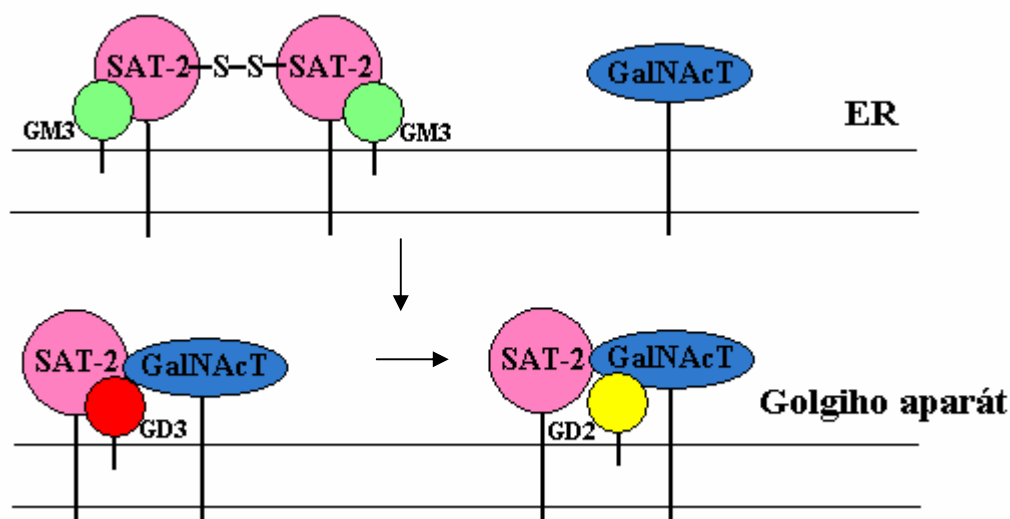
Posttranslační modifikace glykosyltransferas je oblastí výzkumu gangliosidů, ve které byl v poslední době učiněn značný pokrok. Byly navrženy dva možné mechanismy posttranslační kontroly.

**(a) Fosforylace/defosforylace glykosyltransferas** je „rychlý“ regulační mechanismus reagující na okamžité fyziologické potřeby. Přehledným způsobem jej shrnuje publikace

Yu a Biebericha (2001)<sup>23</sup>. Bylo ukázáno, že aktivity několika sialyltransferas jsou „downregulovány“ fosforylací účinkem proteinkinasy C v bezbuněčném i buněčném systému a tento efekt může být zpětně vrácen účinkem membránově vázaných fosfatas. Naproti tomu aktivita N-acetylgalaktosamintransferasy může být „upregulována“ fosforylací účinkem proteinkinasy A. Fosforylace a defosforylace glykosyltransferas může ovlivňovat jejich zapojení do intracelulárních pochodů (jejich aktivaci a deaktivaci, zapojení v procesech buněčné diferenciaci, jejich translokaci).

**(b) N-Glykosylace glykosyltransferas** je důležitým krokem v regulaci jejich aktivit, poločasu života, nitrobuněčného transportu a lokalizaci. Výsledky řady prací shrnuli Yu a spol. (2004) v přehledné práci s následně uvedenými hlavními závěry<sup>24</sup>.

- **Deglykosylace a reglykosylace** glykosyltransferas hraje zřejmě roli v jejich transportu z ER do Golgiho aparátu. Výpadek reglykosylace způsobuje, že glykosyltransferasy nemusí být transportovány do *trans*-Golgi a dále.
- Potvrzuje se **formování komplexů glykosyltransferas**, které ovlivňuje rychlý transport gangliosidu k dalšímu enzymu a tím ovlivňují expresi gangliosidů. Důsledkem toho je, že některé gangliosidy existují krátkou dobu a stávají se minoritními (případ GM2 a GD2 gangliosidů). Formaci enzymových komplexů popsal již Roseman v roce 1970<sup>28</sup> a byla experimentálně dokázána v letech 2000-2002<sup>29,30</sup>. Sialyltransferasa 2 (SAT-2) dimerizuje v endoplasmatickém retikulu prostřednictvím disulfidické vazby, což může stabilizovat tvorbu komplexu s GM3<sup>29,31</sup> a podpořit transport vytvořeného komplexu GM3-SAT-2 do Golgiho aparátu. Heterodimer SAT-2 a GalNAcT konvertuje GM3 na GD3 a usměrní ho do aktivního místa GalNAcT, která katalyzuje přeměnu GD3 na GD2 (viz. Obr. 4, str. 19).
- Pozorování, že přidavek GM3 je potřeba ke stabilizování SAT-2 během in vitro translace naznačuje možnost asistence GM3 jako **lipidního chaperonu** při sbalování proteinu.
- Ukazuje se, že gangliosidy mohou regulovat svojí biosyntézu vazbou ke glykosyltransferasám a asistovat na jejich vyzrání. Můžeme hovořit o **autoregulaci biosyntézy gangliosidů**. Avšak v případě SAT-2 bude tato autoregulace pracovat pouze v přítomnosti GM3 v ER<sup>29,32</sup>.



Obr. 4: Regulace biosyntézy gangliosidů pomocí tvorby komplexu SAT-2 a GalNAcT. V ER je SAT-2 dimerizován disulfidickou vazbou, která může stabilizovat tvorbu komplexu s GM3 a podporovat tak transport GM3-SAT-2 komplexu do Golgiho aparátu. V Golgiho aparátu SAT-2 a GalNAcT vytváří heterodimer se vzájemnou enzymovou aktivací. V tomto heterodimeru SAT-2 katalyzuje GM3 na GD3, který potom nasměruje do aktivního místa GalNAcT. GalNAcT katalyzuje GD3 na GD2 a další glykosylace závisí na aktivitě, subcelulární lokalizaci nebo formaci komplexu s dalšími glykosyltransferasami<sup>24</sup>.

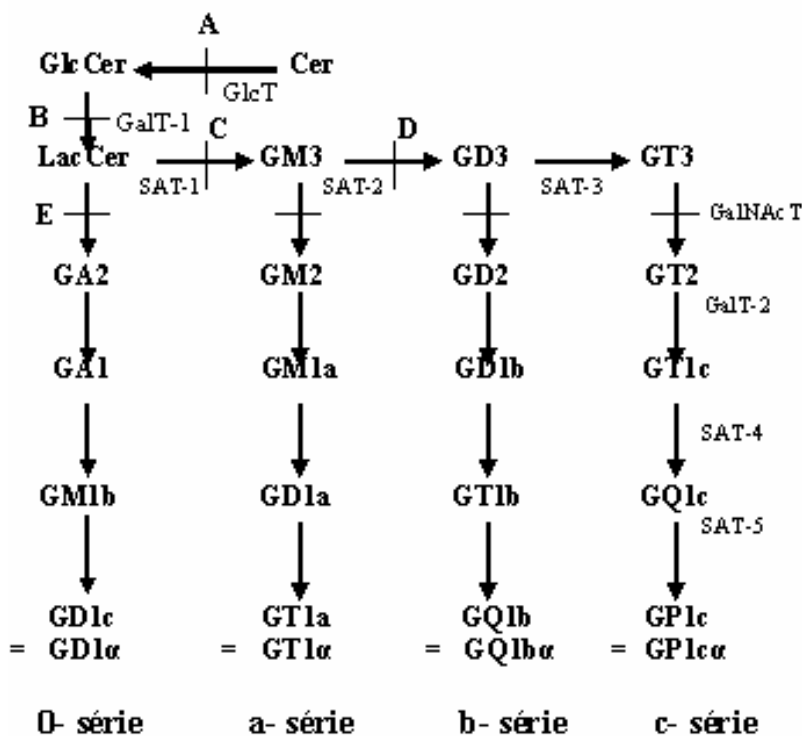
#### 1.3.4. Výzkum úlohy gangliosidů pomocí genových mutací

Významný pokrok v porozumnění funkce komplexních gangliosidů v eukaryotických buňkách představuje vyvinutí myši s genetickými defekty v určitých krocích biosyntézy<sup>33,34</sup>. Blokování v časných stádiích biosyntézy A-E je ukázáno na Obr. 5 na str. 20. Genom myši je pozměněn tak, že určité oblasti genů zodpovědných za jednotlivé kroky biosyntetické dráhy jsou poškozeny a nedochází k syntéze příslušných enzymů.

Pokusy s buňkami myši melanomové linie ukázaly, že buňky byly i přes defektní složení glykolipidů životaschopné. Vykazovaly pouze malé změny v buněčné morfologii a buněčném růstu. Na základě tohoto pozorování byl učiněn závěr, že glykolipidy včetně gangliosidů nejsou pro přežití buňky nutné<sup>35</sup>. Pozdější experimenty s geneticky upravenými myšmi však ukázaly, že experimenty in vitro nedokáží dostatečně objasnit funkci metabolitů, které jsou zapojeny do mezibuněčné interakce a jejich využití pro tyto studie je omezené.



Pokusy s geneticky upravenými myši naopak ukázaly důležitou funkci při vývoji mnohobuněčných organismů. Myši s poškozeným genem pro glukosyltransferasu (defekt A) hynou kolem 7.- 8. dne embryonálního vývoje zřejmě v důsledku nárůstu apoptózy v ektodermu. Diferencovala se zde pouze primitivní zárodečná vrstva.



Obr. 5: Schéma větví (sérií) biosyntézy gangliosidů s označením genového poškození pro příslušný enzym. A označuje defekt v *GlcT*, B označuje defekt v *GalT-1*, C označuje defekt v *SAT-1*, D označuje defekt v *SAT-2* a E označuje defekt v *GalNAcT*

Experimenty s defektem glukosyltransferasy byly prováděny i na buněčných kulturách embryonálních kmenových buněk. Mutantní buňky ale narozdíl od „knockout“ myši vykazovaly podobné růstové křivky jako normální buňky, byly tedy schopné diferenciace<sup>37</sup>.

U myši s inaktivovaným genem pro galaktosyltransferasu (defekt B) neprobíhala biosyntéza galaktosylceramidu, sulfatidů a GM4 gangliosidu. Byla zachována schopnost syntézy myelinu s téměř normální strukturou, kdy byl chybějící Gal-Cer nahrazen Glc-Cer s hydroxylovanými mastnými kyselinami. Takovýto myelin ale vykazoval zřetelné poškození funkce a stability doprovázené řadou klinických příznaků jako je generalizovaný

třes, ataxie (porucha koordinace pohybů), porucha vedení vzruchu aj.<sup>38,39</sup>. Byla poškozena i spermatogeneze vzhledem k biosyntéze seminolipidu z monogalaktosylglycerolu.

Myš s poškozením genu pro sulfotransferasu netvoří sulfo-galaktosylceramidy, sulfo-laktosylceramid a seminolipid<sup>40</sup>. Projevují se velmi podobné neurologické příznaky jako u myši s poškozením tvorby galaktosylceramidu.

Byly vytvořeny dva kmeny myši s poškozením tvorby hlavních mozkových gangliosidů. Kmen s poškozením genu pro GalNAcT (defekt E) nebyl schopen syntetizovat GM2, GM1a, GD1a, GT1a, GD2, GD1b, GT1b, GQ1b. Kmen s poškozením genu pro SAT-2 netvořil GD3, GD2, GD1b, GT1b a GQ1b. Oba kmeny vykazují pouze malé poškození mozkových funkcí. Vývoj homozygotní myši s poškozením GalNAcT probíhá téměř normálně bez výraznějšího histologického nálezu v tkáních centrálního nervového systému. Byla zjištěna degenerace axonů a defekty myelinizace v nervovém systému<sup>41</sup>. U myši se projevovaly progresivní poruchy motorických funkcí<sup>42</sup>. Byly nalezeny i defekty mimo nervovou tkáň. Samci byli sterilní s morfologickými a funkčními poruchami varlat<sup>43</sup>. Byla narušena i funkčnost imunitního systému v odpovědi T buněk sleziny na interleukin 2<sup>44</sup>.

Křížením kmene myši s defektem SAT-2 a kmene s defektem beta1-4 GalNAcT (C + E) vznikly myši s dvojitou mutací. Dokázaly exprimovat pouze GM3 jako hlavní gangliosid. Tyto myši projevovaly vysokou citlivost na zvukové podněty s následujícími smrtelnými záchvaty<sup>34</sup>.

Myš s poškozeným genem pro SAT-1 (defekt C) postrádá schopnost biosyntézy GM3 a nebyla zjištěna ani přítomnost žádného dalšího gangliosidu, který se z GM3 následně tvoří. Biosyntéza gangliosidů je představována v tomto případě sérií 0 (GM1b, GD1c (=GD1 $\alpha$ )) v množství, které odpovídá celkovému obsahu gangliosidů u normálních zvířat. Mutované myši mají změněnou homeostázu glukosy, z čehož vyplývá role GM3 jako regulátoru signalizační cesty zprostředkované insulinem.

Nejnovější model mutovaného kmene jsou myši s dvojitou mutací- na GalNAcT a SAT-1 (defekt E + D). Tyto myši nejsou schopny tvořit žádný glykolipid z ganglio-série. Koncentrace laktosylceramidu je až 100x zvýšena. Navíc sulfo-laktosylceramid má složení sfingoidů a mastných kyselin podobné gangliosidům detekovaným u těchto myši. Po odstavení se u mladých myši vyvíjí těžké neurodegenerativní onemocnění končící smrtí<sup>45</sup>.

Homozygotní kmen myši s poškozeným genem pro SAT-2 neprojevoval pozorovatelnou změnu ve vývoji, nebyla ovlivněna délka života zvířat<sup>34</sup>. Tyto experimenty vyvrátily domněnku o účasti GD3 a *b*-větve gangliosidů na neuronální diferenciaci,

protože u tohoto mutantního kmenu myši dochází k diferenciaci bez přítomnosti gangliosidů *b*-větve.

Z uvedeného textu vidíme, že defekt s poškozením SAT-2 způsobuje velice malé poškození, při kterém zvíře může dobře přežívat. U normálních zdravých savců např. potkanů existují kmeny, které mají aktivovány obě větve biosyntézy *a*- i *b*- a kmeny které mají *b*-větve silně minoritní, což je příklad kmene Wistar použitého v naší studii, který netrpí žádnými zdravotními potížemi.

## 1.4. Chemické vlastnosti gangliosidů

### 1.4.1. Prostorová konformace molekuly gangliosidů

Molekula gangliosidu je stabilizována celou řadou vazebných interakcí, což jí oproti fosfolipidům dává mnohem větší pevnost. Interakce jsou přítomné jak v oligosacharidové, tak v ceramidové složce.

V ceramidu mají stabilizující efekt vodíkové můstky, donorem vodíku je hydroxylová skupina, akceptorem vodíku karbonylamid a kyslík s volnými elektronovými páry. Intramolekulová vodíková vazba mezi NH skupinou sfingoidní báze a kyslíkem glykosidové vazby může udržovat pozici ceramidu vzhledem k oligosacharidové části. Toto usprádnění lze ale narušit vznikem jiných vazebných interakcí gangliosidů s jinými molekulami. Rigiditu molekuly a rovněž planární uspořádání podporuje jednak amidová vazba, tak dvojná vazba s *trans* konfigurací. Amidová vazba určuje paralelní orientaci os obou uhlíkatých řetězců, což zvyšuje možnosti vzájemných hydrofobních interakcí a tak přispívá v pevnosti molekuly. *Trans* dvojná vazba C4-C5 umožňuje kondenzaci ceramidů v těsnějším uspořádání. Další zpevnění poskytují solvatační efekty v C3-C4-C5 části sfingosinu<sup>46</sup> (viz. Obr.1 str. 11 ).

Stabilizujícím prvkem v oligosacharidové části je kyselina sialová udržující vysoce stabilní konformaci tvorbou tří vodíkových vazeb se zbytkem oligosacharidu. Podobnost v konformačním uspořádání složitějších gangliosidů je dána počtem sialylových skupin a sousedními sacharidy.

Prostorové uspořádání molekuly gangliosidu je ovlivněno vazbou kationtů na oligosacharidovou část. Vazebné místo se silně nukleofilním charakterem se nachází v oblasti vnitřní galaktosy díky kyslíkovým atomům sousedního N-acetylgalaktosaminu a kyseliny sialové<sup>47</sup>. V organismech je významná především vazba Ca<sup>2+</sup>, následná změna konformace molekuly má vliv na uspořádání gangliosidů ve shlucích na povrchu membrán.

Ve vodných disperzích v kyselém prostředí tvoří gangliosidy estery. Týká se to především gangliosidů s dvěma sialovými kyselinami v molekule. Esterová vazba vzniká mezi karboxylovou skupinou vnější kyseliny sialové a hydroxylovou skupinou na C-9 vnitřní kyseliny sialové<sup>48,49</sup>. Tvorbou esterové vazby se redukuje negativní náboj sialových kyselin. Estery jsou stabilní v rozmezí pH 2- 7, v mezních hodnotách pH dochází ke štěpení esterové vazby a obnově negativního náboje. Tvorba a rozpad těchto esterů může v přírodě sloužit jako regulátor negativního náboje v mikrosprostředí buněčného povrchu a k expresi nových antigenních struktur<sup>50</sup>.

#### 1.4.2. Amfifilní vlastnosti gangliosidů

Gangliosidy jsou díky přítomnosti hydrofilní sacharidové a hydrofobní ceramidové části látky s amfifilními vlastnostmi, což vede k jejich agregaci ve vodných roztocích<sup>51</sup>.

Ve vodě se orientují hydrofilní částí volně do vody a hydrofobní směrem k jiným hydrofobním částem ostatních molekul gangliosidů. Vytváří tak micely s ceramidovým jádrem obklopeným oligosacharidovými zbytky. Micely se tvoří v roztocích o širokém rozmezí koncentrací gangliosidů, od  $10^{-9}$  do  $10^{-2}$  M. Při vyšších koncentracích  $10^{-2}$  až  $10^{-1}$  vznikají hexagonálně uspořádané cylindrické struktury gangliosidů<sup>52</sup>.

Molekulární hmotnost micel klesá s rostoucím počtem sialylových skupin v molekule a stoupá se zvyšující se nasyceností v ceramidové části a délkou sfingosinových bází<sup>53</sup>.

Dynamika uspořádání molekul gangliosidů do micelárních útvarů je rychlá, zatímco disociace probíhá pomalu. Tvorba micel je ovlivněna vlastnostmi okolního prostředí, dvoumocnými a jednomocnými ionty, jinými lipidy a proteiny.

Gangliosidy narozdíl od fosfolipidů a neutrálních glykosfingolipidů netvoří ve vodných roztocích spontánně dvojvrstevné struktury. Pro jejich vznik je v roztoku nutná přítomnost lipidů, které dvouvrstevné útvary běžně vytvářejí, např. fosfolipidů. V roztoku gangliosidů a fosfatidylcholinu se tvoří dvouvrstevné liposomy, pokud poměr koncentrace gangliosid/fosfatidylcholin nepřekročil přechodovou hodnotu. Nad touto hodnotou vznikají smíšené micely. Např. v roztoku GM1 a vaječného fosfatidylcholinu při pH 7 je tato hodnota 0,2. Přechodová hodnota se snižuje se zvyšujícím se počtem sialylových skupin v molekule gangliosidu nebo s poklesem délky řetězce mastných kyselin ve fosfatidylcholinu<sup>46</sup>. V liposomech jsou gangliosidy lokalizovány do vnější vrstvy fosfolipidové dvojvrstvy s oligosacharidovým zbytkem vystaveným na povrchu, což se velmi podobá uspořádání v plazmatické membráně<sup>54,55</sup>.

## 1.5. Molekulárně-fyziologická úloha glykosfingolipidů v biologických membránách

Glykosfingolipidy se ve vysokých koncentracích nacházejí ve vnější vrstvě plazmatické membrány všech buněk. Jejich složení je specifické pro určitý buněčný typ.

Přítomnost glykosfingolipidů ve vysoké koncentraci na buněčných površích se vysvětluje dvěma důvody:

- glykosfingolipidy zvyšují pevnost struktury plazmatické membrány
- oligosacharidové zbytky glykosfingolipidů zprostředkovávají interakce s exogenními ligandy<sup>56,57</sup>

Gangliosidy se na povrchu plazmatické membrány často shlukují do oblastí zvaných mikrodomény<sup>58</sup>. Model tekuté mozaiky Singerse a Nicolsona<sup>59</sup>, kde jsou proteiny náhodně rozmístěny v homogenní kapalné lipidní dvojvrstvě, byl později nahrazen „deskovým“ modelem<sup>60</sup>. Tato představa ukazuje membránu složenou z uspořádaných a neuspořádaných oblastí, jejichž heterogenita je dána stupněm nenasycenosti mastných kyselin. Poprvé byly klastry glykosfingolipidů (GSL) spatřeny pomocí skenovací elektronové mikroskopie na erytrocytární membráně<sup>61</sup>, později i na dalších typech membrán<sup>62,63</sup> a na liposomech<sup>64</sup>.

Bylo zjištěno, že GSL a glykosylfosfatidylinositolem (GPI)- zakotvené proteiny byly v polarizovaných buňkách přednostně směřovány do apikální membrány. Dalším zajímavým poznatkem bylo zjištění, že membránové biologicky aktivní proteiny jsou asociovány s GSL, které je obklopují<sup>65</sup>.

## 1.6. Žlučový systém

Žlučový systém, který je tvořen žlučovými cestami, slouží k transportu, modifikaci a vylučování žluče do trávicího traktu. Žluč samotná je vytvářena především hepatocyty, cestou své kanalikulární membrány. Jde o aktivní sekreci a koncentraci solí žlučových kyselin a dalších látek jako konjugovaného bilirubinu, cholesterolu, fosfolipidů, proteinů, elektrolytů a vody. Druhým významným faktorem ve vylučování žluči, jsou žlučové cesty samotné. Cholangiocyty, buňky vystylající žlučové cesty, obsahují chloridový kanál (CFTR) a kanál pro bikarbonát. Do žluči secernující chloridový aniont a bikarbonát a významně tak modifikují finální složení žluči.

Samotné žlučové cesty začínají jako žlučové kapiláry, jejichž stěna je tvořena pouze klkovitě vybíhající kanalikulární membránou hepatocytů. Tyto kapiláry se vlévají do

žlučových tubulů (Heringovy kanálky nebo též cholangioly s kubickým epitelem) a ty dále ústí do interlobulárních žlučovodů. Jejich splynutím vznikají segmentální a poté lobární žlučovody, aby nakonec vyústily z jater jako levý a pravý jaterní žlučovod. Ty se dále spojují do společného jaterního vývodu a jako ductus choledochus ústí do trávicí trubice, konkrétně do duodena<sup>66</sup>.

## 1.7. Hepatocyt a tvorba žluči

Hepatocyt je funkčně a morfologicky polarizovaná buňka sekrečního epitelu. Svou bazolaterální (sinusoidální) membránou zprostředkovává přes membránové bílkovinné přenašeče absorpci žlučových kyselin, konjugovaného bilirubinu, cholesterolu, fosfolipidů, proteinů, vody a elektrolytů. Dochází k jejich přenosu přes hepatocyt a následnému vyloučení prostřednictvím bílkovinných přenašečů kanalikulární (apikální) membrány do žluči. Celý proces je poháněn činností  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasy}$  v bazolaterální membráně, která udržuje chemický gradient a potenciálový rozdíl mezi hepatocytem a jeho okolím. Buněčný gradient iontů draslíku s sodíku se udržuje výměnou dvou extracelulárních iontů draslíku za tři intracelulární ionty sodíku. Vzniká tím nerovnováha elektrického náboje, kdy je vnitřek buňky oproti okolí záporně nabitý, což přitahuje kladně nabité ionty. Činnost  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasy}$  je ovlivněna membránovou fluiditou.

Na bazolaterální (sinusoidální) membráně se nachází řada transportních proteinů pro absorpci organických iontů. Transportér NTCP přenáší žlučové kyseliny konjugované s taurinem nebo glycinem. Pracuje za současného symportu sodíkových iontů do buňky. Další transportér OATP slouží pro přenos aniontů žlučových kyselin, bromsulftaleinu, bilirubinu a jiných organických aniontů. Není závislý na kotransportu sodíkových iontů. Přenašeč OCT 1 přenáší organické kationty<sup>67</sup>. Mezi další přenašečové proteiny na bazolaterální membráně patří protein vyměňující ion  $\text{Na}^+$  za  $\text{H}^+$  a ion  $\text{Na}^+$  za ion  $\text{HCO}_3^-$ , které udržují intracelulární pH. Jsou přítomné také přenašeče pro sulfát, neesterifikované mastné kyseliny a organické kationty.

Transport žlučových kyselin cytosolem hepatocytu je umožněn především díky proteinu 3- $\alpha$ -hydroxysteroidu-dehydrogenase. Transferasa glutationu-S a proteiny vázané na mastné kyseliny se uplatňují v menší míře. Přenosu žlučových kyselin se pravděpodobně účastní i endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. Dále jsou žlučové kyseliny přenášeny vezikulární dráhou, která přenáší především proteiny tekuté fáze a ligandy, např. IgA a LDL.

Kanalikulární membrána nese transportní proteiny ze skupiny ATP-vázajících kazetových proteinů. Jsou zodpovědné za sekreci látek do žluči proti vysokým koncentračním gradientům. Multispecifický organický aniontový transportér cMOAT označovaný také jako MRP-2 přenáší glukuronid a konjugáty glutationu-S, tj. diglukuronid bilirubinu. Přenos žlučových solí zajišťuje protein BSEP, jehož činnost je částečně závislá na záporném intracelulárním elektrickém potenciálu. Do kanalikulárního transportu jsou zapojeny dva proteiny ze skupiny P-glykoproteinů, jejichž funkce je závislá na ATP<sup>68</sup>. Je to MDR1, který transportuje exogenní hydrofobní organické kationty a MDR3, fosfolipidový translokátor přenášející fosfatidylcholin. Voda a anorganické ionty (Na<sup>+</sup>) do žluči difundují přes těsné spoje díky osmotickému gradientu.

## 1.8. Cholestáza

Cholestáza je onemocnění způsobené nedostatečným odtokem žluči z jaterním buněk do duodena. Porucha odtoku žluči může nastat v jakémkoli místě mezi bazolaterální (sinusoidální) membránou hepatocytu a Vaterovou papilou. Snížením odtoku žluči dochází rovněž k retenci všech látek v krvi, které jsou společně se žlučí hepatocytem vylučovány, tzn. vody a organických aniontů (žlučové kyseliny, bilirubin). V séru je poté zvýšená koncentrace celkových žlučových kyselin a bilirubinu a rovněž zvýšená koncentrace enzymů ALP a GGT. V rámci diagnostiky tohoto onemocnění slouží uvedené jako specifické markery a jsou vyšetřovány v souboru jaterních testů.

Cholestáza se obecně dle místa vzniku poruchy odtoku žluči klasifikuje na extra- a intrahepatální. Toto hrubé rozdělení ale nepopisuje vlastní příčiny, kterých je celá řada.

Extrahepatální (obstrukční) cholestáza vzniká mechanickou překážkou ve žlučových vývodech mimo játra. Nejčastější příčinou extrahepatální cholestázy je konkrement ve společném žlučovodu, dále karcinom pankreatu, benigní striktury žlučovodu a cholangiokarcinom. Obstrukční typ obvykle způsobuje akutní cholestázu.

U intrahepatální cholestázy jsou poruchy nacházeny ve funkci hepatocytu či v drobných intrahepatálních žlučovodech. Příčinou mohou být cholestatické hepatitidy, primární biliární cirhóza nebo primární sklerózující cholangitida. Dále mohou rozvinutí syndromu cholestázy způsobit léky (poléková cholestáza), hormony, sepsis či je podmíněno geneticky. Podstatou jsou poruchy buněčných mechanismů hepatocytu, kdy může být zasažen cytoskelet nebo membrány. Fluidita sinusoidální membrány hepatocytu je snižována estrogény, což je příčinou vzniku těhotenské cholestázy. Experimentálně je používán ethinylestradiol. Funkčnost membránových transportérů je modifikována řadou

pro tělo exogenních látek (např. endotoxin snižuje aktivitu  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasy}$  a pravděpodobně působí i na snížení exprese kanalikulárního multispecifického transportéru cMOAT při pokusném modelu cholestázy sdružené s kolitidou<sup>69</sup>, cyklosporin A inhibuje na ATP závislém přenosu žlučových kyselin přes kanalikulární membránu). Funkce membránových transportérů může být porušena i v důsledku mutace v příslušném genu. Toto vzácně se vyskytující onemocnění je označováno jako progresivní familiární intrahepatální cholestáza (PFIC). Rozeznávají se 3 typy- PFIC typu 1 (Bylerova nemoc) s mutací v genu kódující ATPasu typu P, PFIC typu 2 s mutací BSEP, PFIC typu 3 s mutací v genu pro MDR3 (fosfolipasa). Dalšími vzácně se vyskytující onemocnění jsou benigní rekurentní cholestáza, Hodgkinova choroba a amyloidóza. Intrahepatální cholestáza může být akutní i chronická.

Zadržování toxických látek při cholestáze způsobuje poškození hepatocytu. Nejvíce se na hepatocelulárním poškození podílí hydrofobní žlučové kyseliny, které mají různé účinky. Vyvolávají jednak buněčnou nekrózu a jsou spouštěči apoptózy<sup>70</sup>. Zřejmě oba druhy poškození buňky jsou doprovázeny poruchami funkce mitochondrií. Experimentálně při cholestáze vyvolané podvazy žlučovodů bylo zjištěno porušení aktivity mitochondriálního enzymu respiračního řetězce a  $\beta$ -oxidace<sup>71</sup>.

### **1.9. Gangliosidy u cholestázy indukované ethinylestradiolem**

Výzkum v oblasti vlivu patologických stavů jaterních funkcí na složení gangliosidů v jaterní tkáni dosud postrádá dostatečné množství výsledků, na jejichž základě by se daly učinit komplexnější závěry.

Senn a spol. se počátkem 90.let věnovali výzkumu složení gangliosidů a aktivit enzymů syntetizujících gangliosidy v jaterní tkáni a séru po podvázání žlučovodů u potkanů kmene Wistar<sup>72</sup>. Byl pozorován zřetelný nárůst syntézy gangliosidů *b*- větve, ovšem bez odpovídajícího zvýšení exprese sialyltransferasy syntetizující GD3 (SAT-2). Mechanismus tohoto jevu nebyl v této publikaci jasně vysvětlen.

První studie zabývající se sledováním složení gangliosidů v jaterní tkáni po vyvolání cholestázy podáváním 17- $\alpha$ -ethinylestradiolu (EE) byly uskutečněny Majerem a spol. (2007)<sup>1</sup>. EE-cholestáza se používá jako modelu pro těhotenskou cholestázu. U samic potkanů kmene Wistar byla vyvolána těžká cholestáza subkutánní injekcí EE rozpuštěným v 0,2 ml 1,2- propandiolu (5 mg/kg hmotnosti zvířete) v pravidelném intervalu 24 hodin po dobu 18 dní. Za totožných fyziologických podmínek byla držena



skupina kontrolních zvířat, kterým bylo injikováno pouze 0,2 ml 1,2- propandiolu bez EE a skupina zvířat bez jakékoli medikace.

Vývin cholestázy byl doložen určením biochemických markerů jaterních funkcí u EE medikovaných potkanů v porovnání s kontrolní skupinou potkanů, tj. aktivita jaterní alaninaminotransaminasy (ALT) a aspartátaminotransaminasy (AST), aktivita jaterní alkalické fosfatasy (ALP), hladina bilirubinu a celkových žlučových kyselin (CŽK) v séru, viz. Tab. 4. Statistickou významnost rozdílů hodnot markerů jaterních funkcí mezi sledovanými skupinami ukazuje P- hodnota menší než 0,05, tedy výrazné navýšení hladiny bilirubinu a CŽK v séru u EE medikovaných potkanů, což je dokladem funkčního poškození jater. Morfologicky byla cholestáza pozorována mikroskopem na histologických řezech jako poškození struktury hepatocytů a tvorbou intracelulárních granulí žlučového barviva zejména v periferních oblastech jaterních laloků. U zvířat s cholestázou došlo k výraznému úbytku hmotnosti ( $212 \pm 43$  g) oproti kontrolním zvířatům ( $293 \pm 32$  g), P- hodnota 0,004.

Tab. 4: Markery cholestázy u kontrolních zvířat a zvířat s cholestázou indukovanou 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem (Majer a kol., 2007)<sup>1</sup>

Marker	Kontrolní potkani	EE- potkani	P- hodnota
ALT ( $\mu$ kat/l)	$0,87 \pm 0,14$	$1,16 \pm 0,20$	0,026
AST ( $\mu$ kat/l)	$1,41 \pm 0,28$	$1,85 \pm 0,96$	0,374
ALP ( $\mu$ kat/l)	$2,04 \pm 0,40$	$2,75 \pm 1,50$	0,394
bilirubin ( $\mu$ kat/l)	$2,10 \pm 0,20$	$26,0 \pm 17,0$	0,002
CŽK ( $\mu$ kat/l)	$39 \pm 25$	$589 \pm 186$	0,002

Výsledky ukázaly, že EE-cholestáza způsobuje celkové zvýšení lipidově vázané kyseliny sialové z  $44,1 \pm 15,2$  nmol/g vlhké jaterní tkáně u kontrolních zvířat na  $79,1 \pm 9,0$  nmol/g vlhké jaterní tkáně u EE-medikovaných zvířat, s P- hodnotou menší 0,01. Bylo zjištěno, že toto zvýšení je primárně dáno zvýšením množství gangliosidů *a*- větve a *b*- větve. Velice výrazné je zvýšení syntézy *b*-větve, tj. GD3, GD1b a GT1b, v porovnání s tím je zvýšení *a*- větve méně významné (marker biosyntetické dráhy *a*- větve GD1a je zvýšen zhruba 3x). Celkově se *b*- větev podílí na zvýšení gangliosidů 54x a *a*- větev 1,3x. , viz. Tab. 5 str. 29.

Výsledky této studie Majera a kol. (2007) jsou ve shodě s pozorováním Mesarica a Deckera (1990)<sup>73</sup>, kteří studovali vliv pohlavních steroidních hormonů na aktivitu

sialyltransferasy syntetizující GM3 (SAT-1) a GD3 (SAT-2) v kultuře hepatocytů. Progesteron,  $\beta$ - estradiol a testosteron zvyšovaly aktivitu SAT-2, ale nikoli aktivitu SAT-1.

Gangliosidy jsou obecně lokalizovány především v buněčné membráně a Majer a kol. (2007) na základě svých výsledků nabízí vysvětlení, že zvýšení biosyntézy *b*- větve gangliosidů je součástí ochranného systému jaterních buněk proti škodlivým účinkům zvýšené koncentrace žlučových kyselin při cholestáze. Důležitou úlohu *b*-větve gangliosidů zjistili již Kasai a kol. na LEC potkanech (1993)<sup>74</sup> s vyblokoványými geny pro biosyntézu *b*- větve, které vedlo k těžkým jaterním poruchám.

Tab. 5: Změny v zastoupení gangliosidů u kontrolních zvířat a zvířat s cholestázou indukovanou 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem (Majer a kol., 2007)<sup>1</sup>

Biosyntetická větev	Gangliosid	Kontrolní potkani (n=6)(nmol/g)	EE-potkani (n=6)(nmol/g)	P- hodnota
a-	GM3	11,4 $\pm$ 2,2	7,1 $\pm$ 0,6	0,001
	GM1a	7,8 $\pm$ 2,4	10,5 $\pm$ 3,0	0,146
	GD1a	3,6 $\pm$ 1,0	11,8 $\pm$ 3,0	0,001
b-	GD3	0,08 $\pm$ 0,03	2,0 $\pm$ 1,2	0,002
	GD2	0,02 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,34	0,041
	GD1b	0,10 $\pm$ 0,06	5,4 $\pm$ 1,6	0,002
	GT1b	0,06 $\pm$ 0,03	6,4 $\pm$ 2,6	0,002

### 1.10. Histologické změny v lokalizaci gangliosidů u cholestázy indukované ethinylestradiolem a cholestázy indukované podvázáním žlučvodů

Tato diplomová práce souvisí s prací Václava Šmída „Změny v histochemické lokalizaci gangliosidů u experimentální cholestázy“, obhájené na 1. lékařské fakultě UK,<sup>3</sup> která zpracovává histologická pozorování u cholestázy indukované podvazem obdobným způsobem jako již publikovanou studii naší výzkumné skupiny (Jirkovská a kol., 2007)<sup>2</sup>, která sledovala histologické změny v lokalizaci GM1 gangliosidu u cholestázy indukované 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem (EE).

Zmíněné práce upozornily na možnost zpevnování sinusoidální membrány hepatocytů přesunem gangliosidů. Tento přesun je interpretován jako obrana hepatocytů proti detergentnímu působení vysoké koncentrace žlučových kyselin v sinusoidálním řečišti, které by vedlo k poškození plazmatické membrány a k nekróze hepatocytů.

V diplomové práci Václava Šmída byla studována lokalizace GM1 gangliosidu na řezech z jater potkanů s cholestázou vyvolanou podvazem žlučvodů a srovnávána s kontrolními zvířaty slepě operovanými. Dalším bodem bylo sledování možného hepatoprotekčního účinku hemoxygenasy 1 (HO-1) na expresi GM1 gangliosidu u kontrolních i cholestatických zvířat. Vliv HO-1 byl sledován po aplikaci inhibitoru HO-1 Sn-mesoporfyrinu a aktivátoru HO-1 heminu. K detekci GM1 gangliosidu byla u obou typů cholestáz využita vazebná afinita GM1 s B-podjednotkou cholera toxinu.

Práce dospěla mj. k následujícím zjištěním:

- a) Byl prokázán zvýšený přesun GM1 pozitivita z cytoplazmy do sinusoidální membrány u skupin BDL a iBDL. Lze tedy usuzovat, že obstrukční cholestáza indukovaná podvazem segmentálních žlučvodů potkana vede ke změnám lokalizace GM1 gangliosidu. Podobných výsledků dosáhla Jirkovská a spol.<sup>2</sup>
- b) Byl zjištěn kvalitativní rozdíl v expresi gangliosidu GM1
  - u kontrolních zvířat exprese GM1 plynule lemovala sinusoidální i apikální membrány a občas se vyskytovala i bodová, intracytoplazmatická lokalizace.
  - u zvířat s obstrukční cholestázou byla lokalizace vyznačena plynule v sinusoidálních membránách (obzvláště u skupin BDL a iBDL)

### 1.11. Význam hemoxygenasy v hepatoprotekci

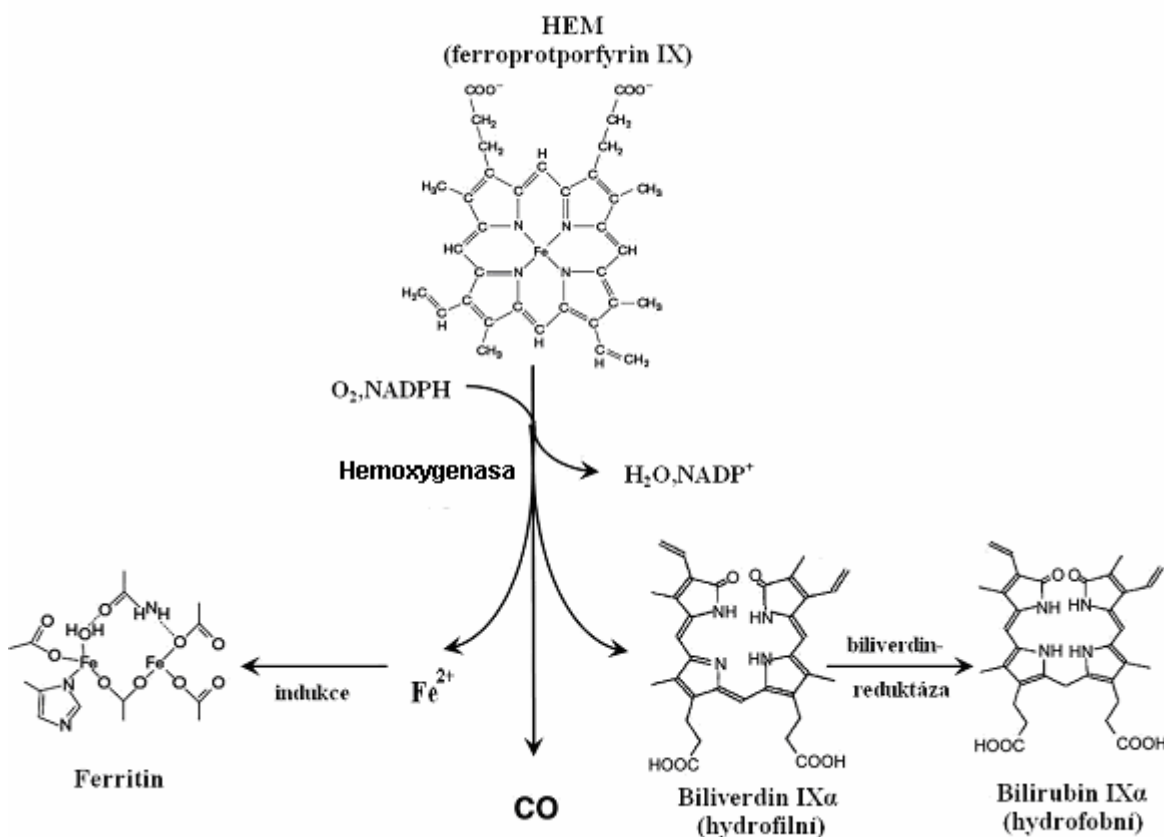
Hemoxygenasa (HO- E.C. 1.14.99.3.) je enzym lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu ve všech typech buněk. Katalyzuje odbourávání hemu na oxid uhelnatý CO, Fe<sup>2+</sup> a biliverdin<sup>75,76,77</sup>. Biliverdin se dále působením biliverdinreduktasy metabolizuje na bilirubin<sup>78</sup> (viz. Obr. 6 str. 31).

HO je plně funkční pouze v komplexu s NADPH-dependentní flavoproteinasou (označovanou také jako cytochrom-P450-reduktasa), společně s biliverdinreduktasou. Tento komplex vzniká na endoplazmatickém retikulu. Působením enzymů za přítomnosti molekuly O<sub>2</sub> je porfyrinový kruh hemu štěpen a oxidován na methinové můstku za vzniku již zmíněných katabolických produktů.

Jsou známy 2 isoenzymy hemoxygenasy- HO-1, HO-2. Aktivita HO-2 je v buňce konstantní, zatímco HO-1 je inducibilní. Experimentálně se pro zvýšení aktivity HO-1 používá hemin, pro snížení aktivity HO-1 Sn-mesoporfyrin.

Produkty katabolizmu hemu již dnes nemohou být chápány pouze jako odpadní látky s toxickými účinky. Bylo totiž zjištěno, že pro organismus vykazují řadu pozitivních efektů. U CO byly zjištěny protizánětlivé, antiapoptotické, antiaterogenní,

antiproliferativní a cytoprotektivní účinky. Tato rozmanitost aktivit zprostředkovaná CO je spojená s klíčovou ochrannou rolí indukce HO-1 v přizpůsobování tkání proti rozdílným formám stresu<sup>79</sup>.



Obr. 6: Katabolická funkce hemoxygenasy<sup>80</sup>

Bilirubin má silné antioxidační účinky<sup>81,82</sup>. V malém množství chrání vitamin A před autooxidací, rovněž chrání kyselinu linolovou a další nenasycené mastné kyseliny před autooxidací<sup>83</sup>. Rovněž působí jako vychytávač singletového kyslíku, reaguje se superoxidovými radikály a je substrátem pro peroxidasy v přítomnosti  $H_2O_2$  a organických hydroperoxidů<sup>81</sup>. Studie Wu a kol.<sup>84</sup> prokázala, že bilirubin vázaný na albumin, tzv. delta-bilirubin, chrání lidské komorové myocyty před poškozením oxyradikály. Dále bylo zjištěno, že biliverdin a bilirubin vázaný na albuminu chrání lidské erythrocyty a potkaní hepatocyty před radikálovým poškozením<sup>85</sup>. Bilirubin má rovněž protizánětlivé účinky a vykazuje řadu dalších efektů- snižuje žilní adhezi leukocytů vyvolanou oxidanty, snižuje aktivaci leukocytů a transendotheliální pohyb monocytů.

Kation  $Fe^{2+}$  může přispívat k ochranné roli HO proti rozdílným formám stresu stimulací vzniku ferritinu. Jedna molekula apoferritinu může navázat až 45 tisíc iontů železa a vykazuje cytoprotektivní účinky ve smyslu ochrany před oxidačními účinky

železa. Kation  $\text{Fe}^{2+}$  se váže na regulační protein ferritinu, který aktivuje zvýšenou expresi ferritinu. Některá pozorování ukázala, že hladina ferritinu je zvýšena při indukci HO-1 a snížena při potlačení exprese HO-1. Nicméně absolutní korelace exprese HO-1 s expresí ferritinu prokázána nebyla. U potkanů vystaveným endotoxickému šoku byla pozorována zvýšená exprese HO-1 nezávisle na hladině ferritinu<sup>86</sup>, naopak u cytotoxicity vyvolané oxidačním stresem byla indukce HO-1 závislá na ferritinu<sup>87</sup>. Dalším mechanismem ochrany buňky před oxidačními vlastnostmi  $\text{Fe}^{2+}$  je zvýšení aktivity ATPasové pumpy společně s expresí ferritinu, ATPasová pumpa zvyšuje odstraňování železa z intracelulárního prostředí<sup>88</sup>.

## **2. Cíl diplomové práce**

Cílem diplomové práce je sledování změn ve složení gangliosidů u cholestázy vyvolané podvazem žlučových cest ve srovnání s výsledky publikovanými u cholestázy indukované ethinylestradiolem.

Dalším cílem je sledovat ovlivnění spektra gangliosidů po aktivaci a inhibici enzymu hemoxygenasy.

Spektrum gangliosidů je dáváno do souvislosti s mírou exprese mRNA klíčové sialyltransferasy syntetizující GD3 (SAT-2).

### **3. Materiál a metodika**

#### **3.1. Materiál**

##### **3.1.1. Biologický materiál**

Játra laboratorních potkanů kmene Wistar, samice

##### **3.1.2. Chemikálie**

Sn-mesoporfyrin (Frontier Scientific, Logan, UT, USA)

Hemin (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Standard GM1 (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Standard GA (připraven v Hepatologické laboratoři ÚKBLD 1.LF UK)

HPTLC Desky (Merck, Darmstadt, Německo, Atr. 5633)

DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia, Uppsala, Švédsko)

Silikagel 60 (Merck, Darmstadt, Německo)

Resorcinol (Merck, Darmstadt, Německo)

Octan amonný (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Chlorid vápenatý (Chemapol, CZ)

Amoniak (Penta, CZ)

Hydroxid sodný (Penta, CZ)

Chloroform (Penta, CZ)

Kyselina octová (Penta, CZ)

Kyselina chlorovodíková (Penta, CZ)

Methanol (Penta, CZ)

Síran mědnatý, pentahydrát (Penta, CZ)

n-Butanol (Penta, CZ)

n-Butylacetát (Penta, CZ)

Kyselina N-acetylneuraminová (Sigma, St. Louis, MO, USA)

TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA)

QIAshredder kit (Qiagen, USA)

Kit pro izolaci mRNA- RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, USA)

Kit pro přepis mRNA na cDNA- High capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA)

### **3.1.3. Přístrojové vybavení**

ABI PRISM 7900 pro qPCR (AME Bioscience AIS)

Analytické váhy (GR 202- EC)

Centrifuga (Beckman GPR)

Denzitometr TLC scanner II ,Camag (Muttentz, Švýcarsko)

Lyofilizátor (Christ alpha 1-4, B. Braun Biotech. International)

Orbitální třepačka (Edmund Bühler, SWIP KM-2)

Předvážky (Kern 572)

Spektrofotometr- Specol 11 (Carl Zeiss- Jena)

Termal Cycler Techno TC512 (Chemos)

Ultrazvukový homogenizátor (Microson XL2000-010)

Vakuová odparka (Ingos RVP 200 A)

Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

Vortex mixer (Thermolyne)

Výrobník ledu Cool SD18L (Gpro)

## **3.2. Metodika**

### **3.2.1. Experiment na zvířatech**

Samice potkanů kmene Wistar (laboratorní potkan- *Rattus norvegicus*) byly chovány za přirozeného denního cyklu a za kontrolované teploty. Zvířata měla volný přístup k vodě a potravě.

Nakládání se zvířaty během celého experimentu splňovalo kritéria pro experimentální práci s laboratorními zvířaty a všechny protokoly byly schváleny Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1.lékařské fakulty UK.

Experimentální cholestáza byla u zvířat vyvolána chirurgickým zásahem, při kterém byly podvázány drobné žlučovody v játrech. Tato metoda vylučuje průnik žluči do břišní dutiny rupturou intrahepatálních žlučovodů a vznik biliární peritonitidy.

Kontrolní zvířata byla podrobena témuž chirurgickému zákroku ovšem bez podvazu žlučovodů, tj. pouze laparotomii.

Inhibice HO-1 byla navozena jednorázovou dávkou 15  $\mu\text{mol/kg}$  Sn-mesoporfyrinu 1.den intraperitoneální injekcí.

Aktivace HO-1 byla navozena dávkou 30  $\mu\text{mol/kg}$  heminu 0. a 3.den intraperitoneálně.



Zvířatům byla provedena laparotomie pod etherovou anestézií 5. nebo 18.den. Odebraná játra byla promyta fyziologickým roztokem s heparinem, zvážena, rozdělena na menší části a zmrazena. Z krevního séra byly provedeny jaterní testy pro posouzení stupně rozvoje cholestázy. Konkrétně byly sledovány tyto markery- celkové žlučové kyseliny (CŽK), celkový bilirubin a ALP jako specifické markery cholestázy a dále ALT a AST, které jsou ukazateli obecného jaterního poškození. Jaterní testy byly provedeny v Centrální biochemické laboratoři ÚKBLD 1.LF UK akreditovanými metodami.

V této diplomové práci jsou převzaty výsledky měření aktivity HO-1 jako pomocný parametr ke sledovanému problému. Vlastní měření aktivity HO-1 prováděla Ing. Kateřina Váňová v rámci řešení své diplomové práce v hepatologické laboratoři ÚKBLD 1. LF UK. Příslušnou metodiku publikovala ve své diplomové práci „Produkty katabolické dráhy hemu ve vztahu k patogenezi cholestázy“, VŠCHT, 2009<sup>89</sup>. Pro měření byla použita modifikovaná metoda pro detekci CO vznikajícího při rozkladu hemu pomocí plynové chromatografie<sup>90</sup>.

Zvířata byla dle provedeného experimentu rozdělena na skupiny, které byly označeny takto:

- čisté podvazy žlučovodů:
  - C- slepá operace, 5 dní
  - BDL- podvaz žlučovodů, 5 dní
  - C<sup>18</sup>- slepá operace, 18 dní
  - BDL<sup>18</sup>- podvaz žlučovodů, 18 dní
- podvazy žlučovodů + aktivace HO-1:
  - aC- slepá operace, hemin, 5 dní
  - aBDL- podvaz žlučovodů, hemin, 5 dní
- podvazy žlučovodů + inhibice HO-1:
  - iC- slepá operace, Sn-mesoporfyrin, 5 dní
  - iBDL-podvaz žlučovodů,Sn-mesoporfyrin,5dní

### **3.2.2. Izolace gangliosidů**

#### **Extrakce glykolipidů z jaterní tkáně**

Vzorek kontrolních jater o hmotnosti 3g v 15 ml methanolu byl nejprve jemně nastříhán a potom homogenizován sonikací. K homogenátu bylo přidáno 15 ml chloroformu a po dobu 30 min při laboratorní teplotě v uzavřené Erlenmayerově baňce probíhala extrakce na orbitální třepačce. Suspenze byla zfiltrována do Erlenmayerovy

baňky. Zbylý filtrační koláč s jaterní tkání byl v nové Erlenmayerově baňce opětovně extrahován ve 49 ml směsi A (viz. Ionexová chromatografie na měniči aniontů) po dobu 30 minut na orbitální třepačce. Suspenze byla zfiltrována a spojené filtráty doplněny na poměr složek směsi A přídatkem 15 ml methanolu a 4 ml destilované vody.

### **Ionexová chromatografie na středně bazickém měniči aniontů**

DEAE Sephadex A-50 byl použit k separaci kyselých lipidů (gangliosidy, sulfatidy, fosfolipidy) od neutrálních lipidů.

Používají se následující eluční směsi:

- A chloroform- methanol- destilovaná voda 30: 60: 8 (v/v/v)
- B chloroform- methanol- 0,8 M vodný octan amonný 30: 60: 8 (v/v/v)
- C 0,2 M octan amonný v methanolu

DEAE Sephadex A-50 byl převeden do acetátového cyklu ve směsi B. Suchý ionex (15 g) byl vsypán do 200 ml eluční směsi B, nechal se usadit a supernatant byl slit. Dále byl ionex ještě 3x promyt 200 ml eluční směsi B, posledním podílem směsi B se ionex ekvilibroval přes noc.

Na kolonku o průměru 1 cm byl nanesen Sephadex v acetátovém cyklu do výšky sloupce 3 cm po usazení a následně byl 3x promyt 20 ml roztoku A pro odstranění volného octanu.

Na kolonku byl opatrně nanesen vzorek a průtok kolonou nastaven na 0,7 ml/min.

Po protečení lipidního extraktu byl sloupec promyt 20 ml roztoku A a následně 5 ml methanolu.

Gangliosidy společně s dalšími kyselými lipidy byly z kolonky vymyty 20 ml roztoku C.

### **Alkalicky katalyzovaná methanolýza a dialýza**

Po chromatografické separaci byly v roztoku vedle gangliosidů přítomny další kyselé lipidy, převážně fosfolipidy. Pro jejich odstranění bylo využito vlastností esterové vazby fosfolipidů, která podléhá hydrolýze v alkalickém prostředí, zatímco gangliosidy jsou díky amidové vazbě stabilní. Gangliosidy vytváří ve vodných roztocích makromolekulární micely, proto byla k dalšímu přečištění od hydrolyzovaných fosfolipidů a ostatních nízkomolekulárních látek využita dialýza. Dialyzační membránou projdou pouze nízkomolekulární látky, zatímco micely gangliosidů jsou zadrženy<sup>91</sup>. K roztoku po

chromatografické separaci se přidaly 2 ml 1 M NaOH v methanolu a temperovalo se při 37 °C 1 hod. Poté byla provedena neutralizace 2 ml 1 M kyseliny octové v methanolu.

Z roztoku byl M odstraněn zahuštěním na vakuové rotační odparce na objem asi 1 ml (60 °C, 60 ot/min). Roztok byl po přidání 6 ml destilované vody dialyzován 2- 4 dny proti destilované vodě.

Vzorek byl následně lyofilizován.

### **Přečištění na koloně silikagelu**

Silikagel 60 (63- 100 µm) byl přečištěn promýváním v centrifugačních zkumavkách 4x 15 objemy směsi CH: M: 2,5M NH<sub>4</sub>OH, 30:60:8 (v/v/v) a poté byl stejným způsobem promyt 4x 15 objemy roztoku A (viz. Ionexová chromatografie na měniči aniontů). Po každém promývání byl silikagel centrifugován (5 min, 3tis ot/min, 10 °C).

Přečištěným suspendovaným silikagelem byla kolona o průměru 1 cm naplněna do výše 2 cm, následně byl sloupec promýván 20 ml směsi CH (redestilovaný): M, 2:1 (v/v), poté 20 ml směsi CH (redestilovaný): M, 95: 5 (v/v).

Lyofilizovaný vzorek byl rozpuštěn v 1 ml směsi CH: M, 1: 1 (v/v), dále byl přidán 1,5 ml chloroformu na konečný poměr CH 4: 1 a vzorek byl nanesen na kolonu. Po eluci sulfatidů 18 ml CH: M, 4: 1 (v/v), byly gangliosidy eluovány 20 ml CH: M, 1: 2 (v/v).

### **Přečištění vzorků**

Vzorky jater iC a iBDL byly po aplikaci Sn-mesoporphyrinu i po uvedených přečišťovacích krocích kontaminovány nečistotami, které se na HPTLC jeví jako hnědé zabarvení, značně zkreslující denzitometrické vyhodnocení. Bylo přistoupeno k dalšímu přečištění vzorku modifikací vytřepávání dle Folcha<sup>92,93</sup> založeném na rozdílné polaritě nečistot (hydrofobní) a gangliosidů (hydrofilní).

Ke vzorkům byl přidán 1 ml směsi CH: M, 2: 1 (v/v) a 200 µl destilované vody a důkladně promícháno na mixéru Wortex. Organická a vodná fáze byly rozděleny centrifugací (2,5tis ot/min, 5 min, 10°C). Horní (vodná) vrstva byla přenesena do nové zkumavky a ke zbylé organické fázi bylo přidáno 0,4 ml směsi M : V, 1: 1 (v/v). Po promíchání na mixéru Wortex se fáze oddělily v centrifuze (2,5tis ot/min, 5 min, 10 °C). Horní (vodná) vrstva byla přenesena k vodné fázi po předchozí centrifugaci. Ke spojeným vodným vrstvám bylo přidáno 1 ml CH a po promíchání na Wortex mixéru a odstředění (2,5tis ot/min, 5 min, 10 °C) byla odebrána horní (vodná) vrstva. Pro další zpracování vzorku je vodný roztok gangliosidů odpařen pod N<sub>2</sub> a rozpuštěn v 80 µl CH:M 1:1, v:v.

### 3.2.3. Fotometrické stanovení celkové kyseliny sialové

Metoda fotometrického stanovení celkové kyseliny sialové<sup>93</sup> je vhodná pouze pro přečištěné gangliosidy, nelze ji provádět ze vzorku celkového lipidního extraktu.

Ředěním zásobního standardního roztoku NeuNAc o koncentraci 0,1 mM (navážka 0,773 mg NeuNAc do 25 ml) byla připravena kalibrační řada s hodnotami 0; 12,5; 25; 50 nM NeuNAc (viz. Tab. 6).

Tab. 6: Kalibrační řada roztoků NeuNAc

Koncentrace NeuNAc/nM	0	12,5	25,0	50,0
Roztoku standardu NeuNAc/ $\mu$ l	0	50	100	200
Resorcinolové činidlo/ $\mu$ l	200	200	200	200
Destilovaná voda/ $\mu$ l	200	150	100	0

Před vlastním stanovením NeuNAc bylo připraveno resorcinolové činidlo o složení 40 ml koncentrované HCl, 5 ml základního roztoku resorcinolu, 0,125 ml 0,1 M  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  a doplněno destilovanou vodou na 50 ml. Základní roztok resorcinolu byl připraven rozpuštěním 2 g resorcinolu ve 100 ml vody a uchováván v hnědé láhvi.

Pro stanovení NeuNAc ve vzorku bylo odebráno 20  $\mu$ l vzorku, přidáno 200  $\mu$ l vody a 200  $\mu$ l resorcinolového činidla. Připravené roztoky byly důkladně promíchány na mixéru Wortex a 15 min zahřívány ve vroucí vodní lázni. Po vyjmutí byly zkumavky ochlazeny a ke všem roztokům přidáno 0,6 ml roztoku butylacetát : butanolu (85:15, v/v). Po protřepání se oddělila vodná a organická fáze. Horní organická fáze byla odebrána pro změření absorbance při  $\lambda = 580 \text{ nm}$ .

### 3.2.4. TLC gangliosidů

Vyvíjecí komora byla vyložena filtračním papírem Whatmann 3 a vyvíjecí směs (CH: M: 0,2%  $\text{CaCl}_2$ - 50: 45: 11, v/v/v) nalita do výšky asi 1 cm.

Vzorky gangliosidů po přečištění na silikagelu byly odpařeny ve vakuové rotační odparce na objem 1- 2 ml, doodpařeny pod  $\text{N}_2$  a rozpuštěny v 80  $\mu$ l CH:M 1:1, v:v. Vzorky byly na TLC desku nanášeny injekční stříkačkou Hamilton v objemu 5  $\mu$ l rovnoměrně v malých kapkách na šířce dráhy 0,5 cm umístěné 1 cm od dolního okraje desky. Jako standard bylo na každou desku naneseno 5  $\mu$ l roztoku standardu GM1 o koncentraci 97,1  $\mu$ M (připraven navážením a rozpuštěním 0,6 g GM1 ve 4 ml V). TLC deska se

nechala vyvíjet, dokud čelo vyvíjecí směsi nedosáhlo 1 cm pod její horní okraj. Poté byla deska důkladně osušena.

K detekci gangliosidů bylo použito resorcinolové činidlo<sup>94</sup>. Příprava činidla je uvedena v kapitole 3.2.3. Fotometrické stanovení celkové kyseliny sialové. Po přestříkání činidlem se deska překryla sklem a sušila v sušárně při 95 °C po dobu 35 min.

### **3.2.5. Denzitometrické vyhodnocení TLC chromatogramu**

Denzitometrické vyhodnocení bylo provedeno denzitometrem Camag při 580 nm v odraženém světle s použitím softwaru CATs3. Kvantifikace byla provedena porovnáním míry denzity gangliosidu se standardem GM1. Standard GM1 o známé koncentraci byl vždy nanesen na každé TLC desce.

### **3.2.6. Stanovení exprese mRNA pro sialyltransferasu syntetizující GD3 (SAT-2)**

#### **Homogenizace jaterní tkáně**

Zmražená jaterní tkáň byla uchovávána v RNA lateru při -80 °C. Homogenizace byla provedena rozdrčením zmrzlé tkáně ve třecí misce v tekutém dusíku. Z jemně nadrcené tkáně bylo pro izolaci mRNA naváženo množství od 10-15 mg a okamžitě zchlazeno v N<sub>2</sub> (l). Zbylý homogenát byl vrácen zpět do RNA lateru a uložen do -80 °C.

#### **Izolace mRNA z jaterní tkáně**

Z jednotlivých vzorků byla izolována mRNA pomocí kitů „RNeasy Plus Mini Kit“ a „QIAshredder“. Bylo postupováno přesně dle návodu výrobce kitu. Izolovaná mRNA byla uchovávána při -80 °C.

#### **Přepis mRNA na cDNA**

Získaná mRNA byla přepsána do cDNA pomocí „High Capacity mRNA-to-cDNA“ kitu. Pro přepis jednoho vzorku mRNA na cDNA bylo do Eppendorfovy zkumavky pipetováno 5 µl RNA vody (tj. bez obsahu RNAs), 2 µl „Master Mix“ (AppliedBiosystems) a 3 µl mRNA. Následovala centrifugace při 3,5tis ot/min. Poté byl proveden vlastní přepis na cDNA v termocykleru. Získaná cDNA byla buď okamžitě zpracována pro real-time PCR analýzu nebo uschována při -30 °C.

### **Kvantifikace mRNA pomocí real-time PCR**

Pomocí real-time PCR byla sledována míra exprese genu SAT-2. Jako endogenní kontrola byl zvolen  $\beta$ -aktin, který vykazuje běžně stabilní expresi a slouží k relativní kvantifikaci exprese cílového genu. Směs pro RT-PCR obsahovala 5  $\mu$ l cDNA (poměr ředění cDNA:voda- 1:4), 0,6  $\mu$ l směsi primerů a fluorescenčně značené sondy, 6  $\mu$ l „TaqMan master mix“ a 0,4  $\mu$ l deionizované vody.

Teplotní program pro jeden cyklus vypadal takto:

- 90- 95 °C po dobu 10 min TaqMan enzymu
- 95- 99 °C po dobu 15 s pro denaturaci DNA
- 60 °C po dobu 1 min pro annealing

Výstupem real-time PCR byly CT hodnoty, pro cílový gen SAT-2 a kontrolní gen  $\beta$ -aktin. CT hodnota (zkratka z anglického „threshold cycle“) uvádí počet cyklů, při kterém fluorescence uvolněné sondy dosáhne prahové hodnoty. Výsledky exprese cílového genu byly vyjádřeny v % exprese kontrolního genu.

#### **3.2.7. Statistická analýza**

Data jsou prezentována jako průměr a směrodatná odchylka (SD). Statistická významnost rozdílů mezi proměnnými byla vyhodnocována t-testem v případě normálního rozdělení hodnot nebo Mann- Whitney testem pokud data nejsou normálně rozložena. Rozdíly byly považovány za statisticky signifikantní, když hodnoty P byly menší než 0,05. Pro vyhodnocení byl použit statistický program NCSS 2007.

## 4. Výsledky

V této práci byly sledovány změny v zastoupení jednotlivých gangliosidů v játrech potkana kmene Wistar u extrahepatální cholestázy vyvolané podvazem žlučovýchodů. Byla srovnávána skupina kontrolních zvířat, na kterých byla provedena slepá operace, se skupinou zvířat s extrahepatální cholestázou.

Dále byl sledován a porovnáván vliv inhibice HO-1 Sn-mesoporfyrinem a vliv aktivace HO-1 heminem na zastoupení jednotlivých gangliosidů v játrech potkana kmene Wistar s experimentální cholestázou. Byly srovnávány kontrolní skupiny s kontrolami s aktivovanou/inhibovanou HO-1 a dále skupiny s podvazem oproti podvazům s aktivovanou/inhibovanou HO-1.

### 4.1. Jaterní testy

Pro zjištění stupně vývoje cholestázy byly stanoveny hodnoty sérových markerů, tzv. jaterní testy: CŽK, bilirubin, ALP, ALT, AST. Specifickými markery cholestázy jsou CŽK, bilirubin a ALP. Ostatní ALT, AST dokumentují obecné poškození jater. Skupiny zvířat byly porovnány pro zjištění statisticky významných rozdílů (Tab. 8-13).

Pro potvrzení úspěšnosti zákroku vedoucího k aktivaci/inhibici HO-1 byla stanovena celková aktivita HO. Výsledky uvádí Tab. 7.

Tab. 7: Hodnoty celkové aktivity HO u sledovaných skupin zvířat, aktivita uváděná v pmol CO/hod/mg tkáně.

Skupina zvířat	Aktivita HO/pmol/hod/mg tkáně
C	327,67±47,5
BDL	199,43±36,5
iC	175,5±63,6
iBDL	59,25±7,05
aC	833,6±176,59
aBDL	640,63±122,86

V Tab. 7 jsou uvedeny průměrné hodnoty celkové aktivity HO ze vzorků jednotlivých skupin zvířat. Potvrzují úspěšný zákrok, jehož cílem bylo vyvolat snížení

anebo zvýšení aktivity HO-1. Po aplikaci Sn-mesoporfyriu vykazuje celková HO výrazné snížení aktivity, po aplikaci heminu vykazuje celková HO výrazné zvýšení aktivity.

Tab. 8: Srovnání hodnot sérových markerů kontrol C a podvazů BDL

Sérový marker	C (n=6)	BDL (n=7)	P-hodnota
CŽK (μmol/l)	17,33±10,05	372,00±142,94	<0,001
Bilirubin (μmol/l)	1,35±0,71	250,3±43,32	<0,001
ALP (μkat/l)	2,00±0,32	4,41±0,32	<0,001
ALT (μkat/l)	0,7 ±0,06	0,91 ± 0,20	0,031
AST (μkat/l)	2,42±0,57	3,27 ±0,47	0,014

V Tab. 8 jsou statisticky vyhodnoceny sérové markery mezi skupinami C (5-denní kontrola) a BDL (5-denní podvaz). Průběh cholestázy byl potvrzen zjištěním statisticky významných rozdílů s P-hodnotami menšími 0,05 u všech sledovaných ukazatelů jaterní cholestázy CŽK, bilirubinu, ALP i markerů jaterního poškození ALT a AST mezi porovnávanými skupinami.

Tab. 9: Srovnání hodnot sérových markerů kontrol C<sup>18</sup> a podvazů BDL<sup>18</sup>

Sérový marker	C <sup>18</sup> (n=6)	BDL <sup>18</sup> (n=11)	P-hodnota
CŽK (μmol/l)	11,83±6,24	304,64±77,32	<0,001
Bilirubin (μmol/l)	2,27±0,90	233,25±32,72	<0,001
ALP (μkat/l)	1,71±0,49	4,59±0,47	<0,001
ALT (μkat/l)	0,81±0,52	0,95±0,26	0,031
AST (μkat/l)	1,96±1,03	6,69±2,55	0,001

V Tab. 9 jsou statisticky vyhodnoceny sérové markery mezi skupinami C<sup>18</sup> (18-denní kontrola) a BDL<sup>18</sup> (18-denní podvaz). Podobně byl průběh cholestázy potvrzen i u 18-denního experimentu P-hodnotami menšími než 0,05 u všech sledovaných sérových markerů.



*Tab. 10: Srovnání hodnot sérových markerů kontrol iC s inhibicí HO-1 a podvazů iBDL s inhibicí HO-1*

Sérový marker	iC (n=6)	iBDL (n=8)	P-hodnota
CŽK (μmol/l)	14,00±13,83	562,75±216,30	0,002
Bilirubin (μmol/l)	2,00±0,30	192,90±78,76	< 0,001
ALP (μkat/l)	1,85±0,31	3,51±0,98	0,002
ALT (μkat/l)	0,65 ±0,06	0,98±0,40	0,071
AST (μkat/l)	1,55±0,21	4,36±1,48	0,001

V Tab. 10 na str. 43 jsou statisticky vyhodnoceny sérové markery mezi skupinami iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) a iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1). U sledovaných markerů cholestázy byly zjištěny P-hodnoty menší než 0,05, což potvrzuje průběh cholestázy. Jaterní poškození potvrzují statisticky významné výsledky pro ALT a AST.

*Tab. 11: Srovnání hodnot sérových markerů kontrol aC s aktivací HO-1 a podvazů aBDL s aktivací HO-1*

Sérový marker	aC (n=5)	aBDL (n=8)	P-hodnota
CŽK (μmol/l)	29,8±21,28	638,38±201,23	0,003
Bilirubin (μmol/l)	3,76±0,97	291,31±40,69	0,003
ALP (μkat/l)	2,08±2,06	4,60±3,70	0,057
ALT (μkat/l)	0,54 ±0,03	1,21±0,39	0,003
AST (μkat/l)	1,53±0,50	6,40±3,90	0,003

V Tab. 11 jsou statisticky vyhodnoceny sérové markery mezi skupinami aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1) a aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1). Průběh cholestázy byl potvrzen zjištěním statisticky významných rozdílů s P-hodnotami menšími 0,05 u markerů cholestázy CŽK a bilirubinu. Jaterní poškození potvrzují statisticky významné výsledky pro ALT a AST.

Tab. 12: Srovnání hodnot sérových markerů u kontrol C a podvazů iC s inhibicí HO-1

Sérový marker	C (n=6)	iC (n=6)	P-hodnota
CŽK (μmol/l)	17,33±10,05	14,00±13,83	0,260
Bilirubin (μmol/l)	1,35±0,71	2,00±0,30	0,066
ALP (μkat/l)	2,00±0,32	1,85±0,31	0,429
ALT (μkat/l)	0,7 ±0,06	0,65 ±0,06	0,185
AST (μkat/l)	2,42±0,57	1,55±0,21	0,006

V Tab. 12 jsou statisticky vyhodnoceny sérové markery mezi skupinami C (5-denní kontrola) a iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1). Kromě AST nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly sérových markerů mezi porovnávanými skupinami a průběh cholestázy nebyl potvrzen.

Tab. 13: Srovnání hodnot sérových markerů u kontrol C a kontrol aC s aktivací HO-1

Sérový marker	C (n=6)	aC (n=5)	P-hodnota
CŽK (μmol/l)	17,33±10,05	29,8±21,28	0,463
Bilirubin (μmol/l)	1,35±0,71	3,76±0,97	0,001
ALP (μkat/l)	2,00±0,32	2,08±2,06	0,100
ALT (μkat/l)	0,7 ±0,06	0,54 ±0,03	0,001
AST (μkat/l)	2,42±0,57	1,53±0,50	0,028

V Tab. 13 jsou statisticky vyhodnoceny sérové markery u skupin C (5-denní kontrola) a aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1). Statisticky významné P-hodnoty menší než 0,05 byly zjištěny u bilirubinu, ALT a AST. Zvýšení koncentrace bilirubinu u skupiny aC potvrzuje aktivaci HO-1 vlivem heminu.

Průběh cholestázy byl potvrzen na základě statistického vyhodnocení jaterních testů u všech skupin zvířat po operativním zákroku s podvazem žlučovýchodů.

#### 4.2. Stanovení celkové lipidně vázané kyseliny sialové

Ve vzorcích izolovaných gangliosidů byla stanovena celková lipidně vázaná kyselina sialová. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 14 na str. 46. V tabulce je pro každou skupinu zvířat uvedena průměrná hodnota NeuNAc a její směrodatná odchylka stanovená z daného počtu vzorků ve skupině. Výsledky jsou uváděny v nmol NeuNAc v 1 g vlhké jaterní tkáni.

Tab. 14: Koncentrace celkové lipidně vázané kyseliny sialové u sledovaných skupin (C, BDL, C<sup>18</sup>, BDL<sup>18</sup>, iC, iBDL, aC, aBDL) uváděná v nmol/g vlhké jaterní tkáně

Skupina	Počet vzorků ve skupině	c(nmol/g) Průměr±SD
C	6	17,33±3,47
BDL	7	26,51±3,90
C <sup>18</sup>	6	17,67±10,51
BDL <sup>18</sup>	11	30,1±17,05
iC	3	29,32±1,57
iBDL	8	51,57±6,20
aC	4	29,58±9,82
aBDL	8	52,04±9,05

Tab. 15: Změny v obsahu celkové kyseliny sialové v uvedených skupinách.

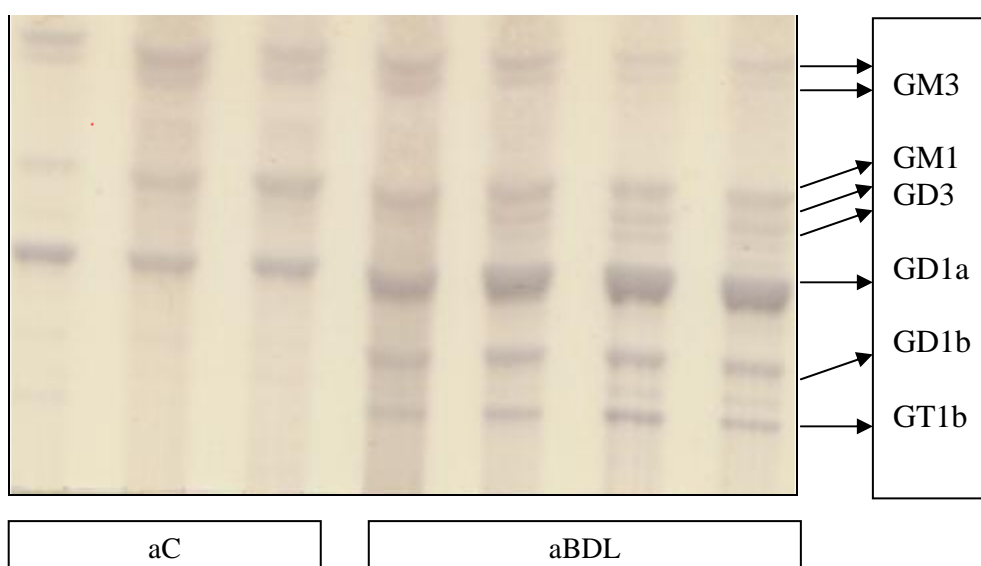
*Posouzení významnosti*

Srovnávané skupiny		P- hodnota
C	BDL	0,001
C <sup>18</sup>	BDL <sup>18</sup>	0,020
iC	iBDL	<0,001
aC	aBDL	0,003
C	iC	0,001
C	aC	0,021
BDL	iBDL	<0,001
BDL	aBDL	<0,001

Rozdíly v obsahu kyseliny sialové mezi skupinami byly statisticky vyhodnoceny (viz. Tab. 15). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou vyjádřeny P hodnotou menší 0,05. Statisticky významné rozdíly v obsahu NeuNAc byly nalezeny mezi skupinami kontrol a podvazů (C x BDL, C<sup>18</sup> x BDL<sup>18</sup>, iC x iBDL, aC x aBDL, C x iC, C x aC), kdy byl sledován nárůst NeuNAc u podvazů oproti kontrolám. Další statisticky významný nárůst obsahu NeuNAc byl zjištěn mezi skupinou 5-denních podvazů a podvazů s aktivovanou/inhibovanou HO-1 (BDL x aBDL, BDL x iBDL).

### 4.3. Vyhodnocení TLC chromatogramů

Obsah jednotlivých gangliosidů ve vzorcích byl zjištěn denzitometrickým proměřením TLC desek po detekci resorcinolovým činidlem. Množství jednotlivých gangliosidů byla přepočítána dle poměru denzitometrických ploch píků vzhledem ke standardu GM1 aplikovanému na každou TLC desku a vyjádřena v množství vázané kyseliny sialové. Vlivem rozdílů mezi TLC deskami způsobenými rozdíly v detekci resorcinolovým činidlem, tj. intenzitou postříku, zahřátím aj., bylo nutné denzitometrické odezvy z jednotlivých TLC desek sjednotit korekčním faktorem vztaženým na stejné množství standardu GM1. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 16-24. Signifikantní změny gangliosidů z chromatografických analýz uvádím přehledně zakreslené ve schématu biosyntézy gangliosidů s vyznačením násobku zvýšení/snížení (Obr. 8-13). Ukázka TLC chromatogramu je uvedena na Obr. 7.

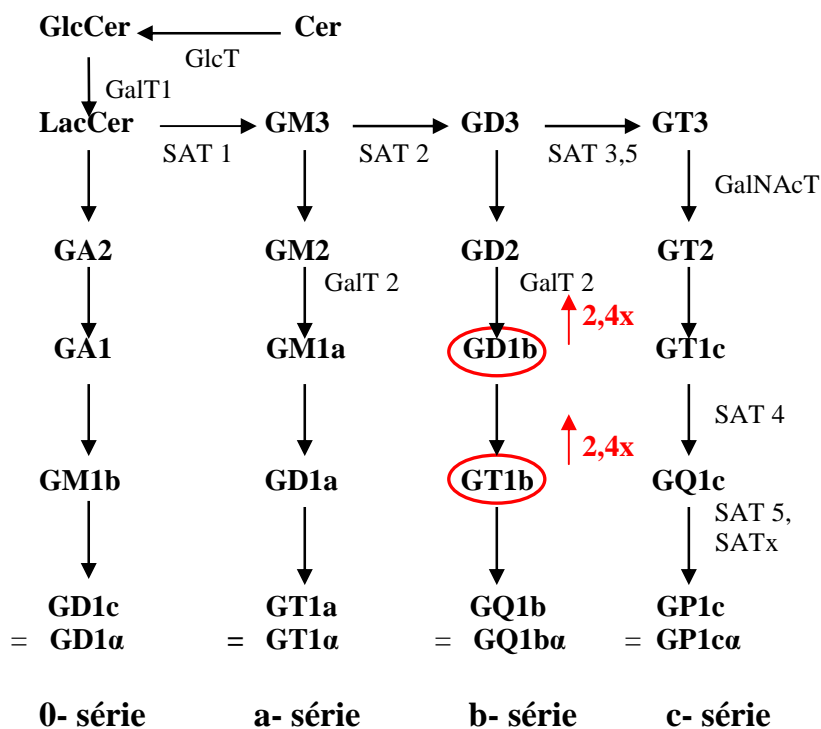


Obr. 7: Ukázka chromatografického dělení. Srovnání gangliosidů skupin aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1) a aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1)- ukázka chromatogramu. Zatímco ve skupině aC převládají gangliosidy a- série, ve skupině aBDL se zřetelně objevují gangliosidy b- série.

Tab. 16: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny C a BDL, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		C (nmol/g)	BDL (nmol/g)	
		n= 4	n= 4	
a-	GM3	2,73±0,95	4,11±2,31	0,206
	GM1a	2,37±2,16	3,07±1,79	0,533
	GD1a	2,47±1,62	5,42±3,13	0,063
b-	GD3	0,79±0,53	1,41±0,83	0,147
	GT1b	0,31±0,28	0,73±0,37	<b>0,046</b>
	GD1b	0,77±0,58	1,83±0,71	<b>0,032</b>

V Tab. 16 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin C (5-denní kontrola) a BDL (5-denní podvaz). Mezi těmito skupinami byl zaznamenán statisticky významný rozdíl u GT1b a GD1b, kdy je sledován jejich nárůst u podvazu (BDL) oproti kontrole (C).

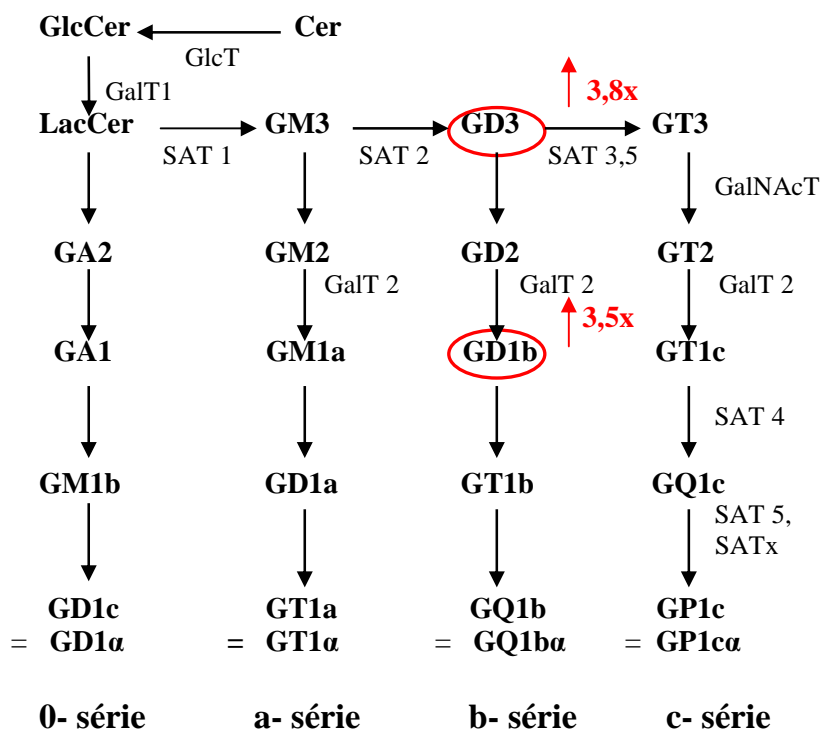


Obr. 8: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu proti slepě operovaným zvířatům, 5-denní, s vyznačením násobku zvýšení koncentrace (skupiny BDL proti C)

Tab. 17: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny C<sup>18</sup> a BDL<sup>18</sup>, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		C <sup>18</sup> (nmol/g)	BDL <sup>18</sup> (nmol/g)	
		n= 4	n= 7	
a-	GM3	2,56±2,01	1,76±0,66	0,340
	GM1a	2,24±1,33	2,95±1,47	0,387
	GD1a	1,73±0,79	3,17±2,58	0,219
b-	GD3	0,47±0,27	1,80±0,52	< <b>0,001</b>
	GT1b	0,35±0,26	0,67±0,47	0,162
	GD1b	0,44±0,16	1,56±1,23	<b>0,046</b>

V Tab. 17 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin C<sup>18</sup> (18-denní kontrola) a BDL<sup>18</sup> (18-denní podvaz). Mezi těmito skupinami byl zjištěn statisticky významný rozdíl u GD3 a GD1b, kdy je sledován jejich nárůst u podvazu (BDL<sup>18</sup>) oproti kontrole (C<sup>18</sup>).

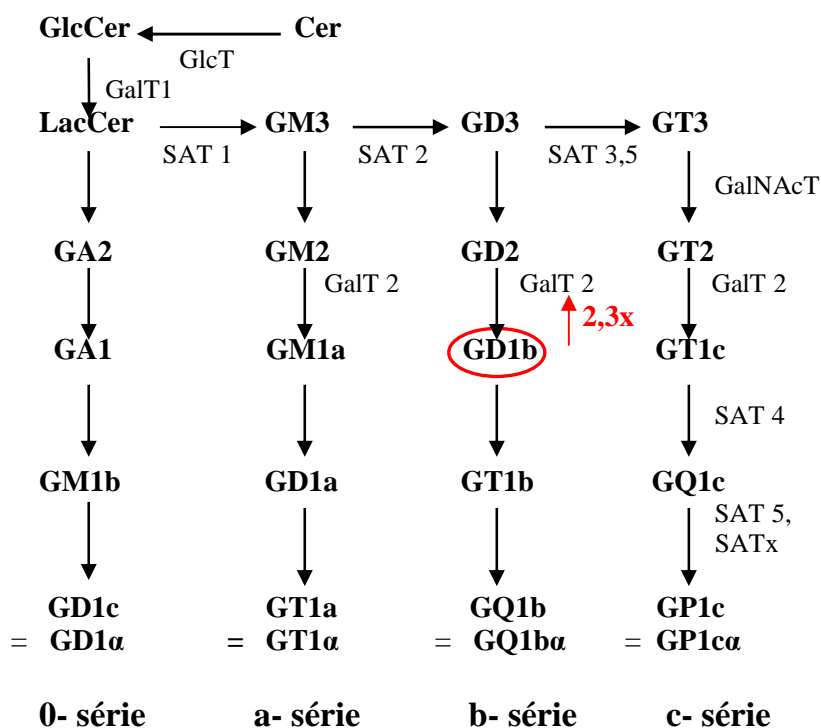


Obr. 9: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu proti slepě operovaným zvířatům, 18-denní, s vyznačením násobku zvýšení koncentrace (skupiny BDL<sup>18</sup> proti C<sup>18</sup>)

Tab. 18: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny iC a iBDL, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		iC (nmol/g)	iBDL (nmol/g)	
		n= 3	n= 7	
a-	GM3	3,36±2,67	1,78±1,39	0,197
	GM1a	1,66±1,37	1,42±1,26	0,751
	GD1a	1,50±1,02	2,65±1,56	0,154
b-	GD3	0,64±0,44	0,76±0,48	0,474
	GT1b	0,17±0,12	0,31±0,17	0,099
	GD1b	0,36±0,29	0,82±0,44	<b>0,048</b>

V Tab. 18 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) a iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1). Mezi těmito skupinami byl zjištěn statisticky významný rozdíl u GD1b, kdy je sledován jeho nárůst u podvazu s inhibicí HO-1 (iBDL) oproti kontrole s inhibicí HO (iC).

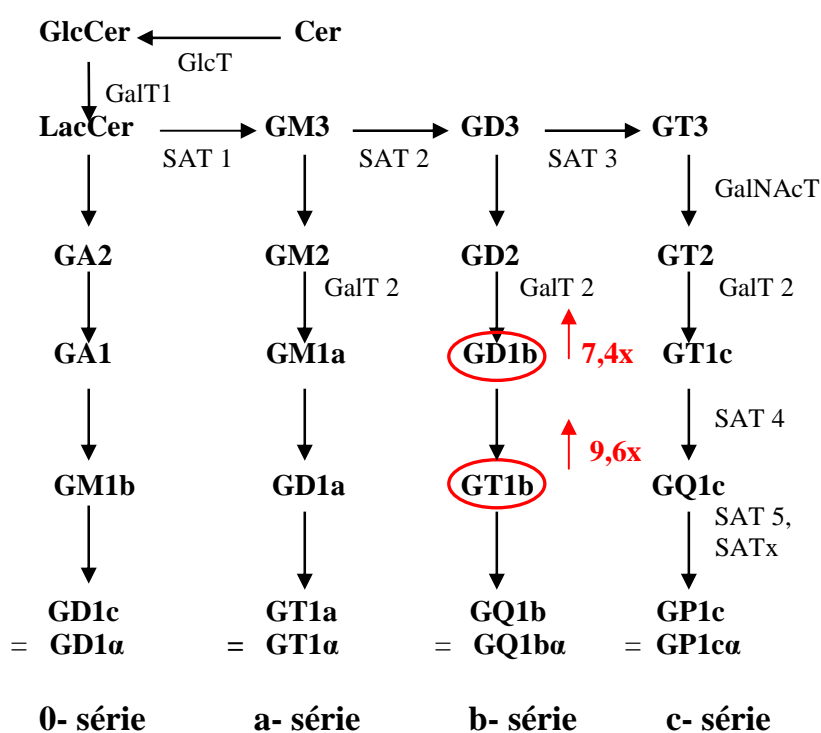


Obr.10: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu s inhibicí HO-1 proti slepě operovaným zvířatům s inhibicí HO-1 s vyznačením násobku zvýšení koncentrace (skupiny iBDL proti iC)

Tab. 19: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny aC a aBDL, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		aC (nmol/g)	aBDL (nmol/g)	
		n= 3	n= 7	
a-	GM3	12,11±7,06	10,01±7,59	0,638
	GM1a	9,47±8,04	7,00±4,83	0,518
	GD1a	4,88±2,71	7,90±4,94	0,167
b-	GD3	0,92±0,67	2,10±1,32	0,190
	GT1b	0,11±0,04	1,06±0,43	< <b>0,001</b>
	GD1b	0,37±0,24	2,75±1,56	<b>0,007</b>

V Tab. 19 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin aC (kontrola s aktivací HO-1) a aBDL (podvaz s aktivací HO-1). Mezi těmito skupinami byly zjištěny statisticky významné rozdíly u GT1b a GD1b, kdy je sledován jejich nárůst u podvazu s aktivací HO-1 (aBDL) oproti kontrole s aktivací HO-1 (aC).



Obr. 11: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu s aktivací HO-1 proti slepě operovaným zvířatům s aktivací HO-1 s vyznačením násobku zvýšení koncentrace (skupiny aBDL proti aC)



Tab. 20: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny C a iC, n- počet zvířat ve skupině

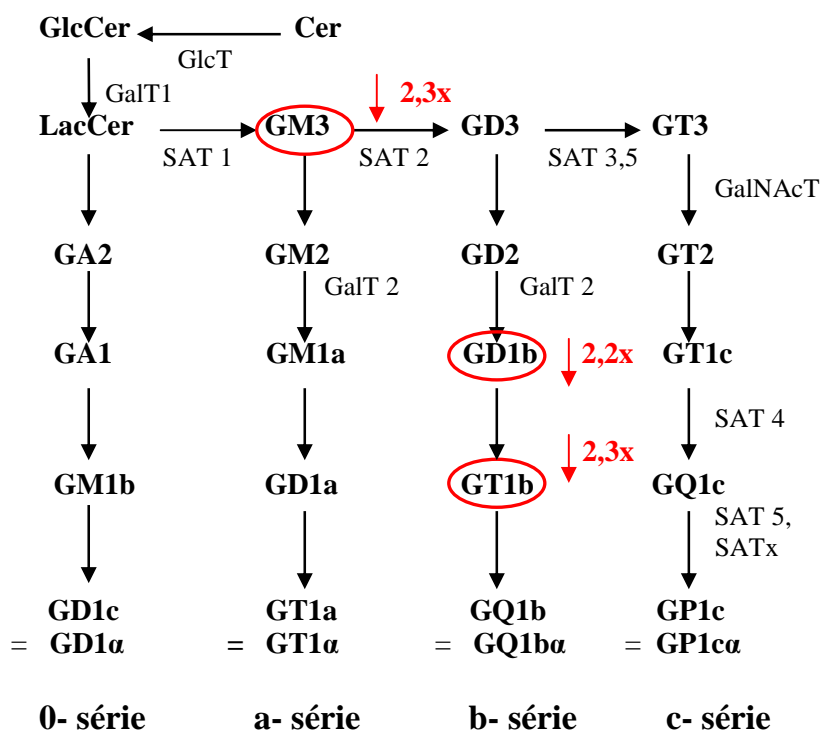
Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		C (nmol/g)	iC (nmol/g)	
		n= 4	n= 3	
a-	GM3	2,73±0,95	3,36±2,67	0,597
	GM1a	2,37±2,16	1,66±1,37	0,514
	GD1a	2,47±1,62	1,50±1,02	0,245
b-	GD3	0,79±0,53	0,64±0,44	0,602
	GT1b	0,31±0,28	0,17±0,12	0,262
	GD1b	0,77±0,58	0,36±0,29	0,297

V Tab. 20 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin C (5-denní kontrola) a iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1). Nebyly zde zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi porovnávanými skupinami.

Tab. 21: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny BDL a iBDL, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		BDL (nmol/g)	iBDL (nmol/g)	
		n= 4	n= 7	
a-	GM3	4,11±2,31	1,78±1,39	<b>0,046</b>
	GM1a	3,07±1,79	1,42±1,26	0,069
	GD1a	5,42±3,13	2,65±1,56	0,109
b-	GD3	1,41±0,83	0,76±0,48	0,124
	GT1b	0,73±0,37	0,31±0,17	<b>0,020</b>
	GD1b	1,83±0,71	0,82±0,44	<b>0,008</b>

V Tab. 21 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin BDL (5-denní podvaz) a iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1). Mezi těmito skupinami byly zjištěny statisticky významné rozdíly u GM3, GT1b a GD1b, kdy je sledováno jejich snížení u skupiny iBDL (podvaz s inhibicí HO-1) oproti BDL (podvaz).

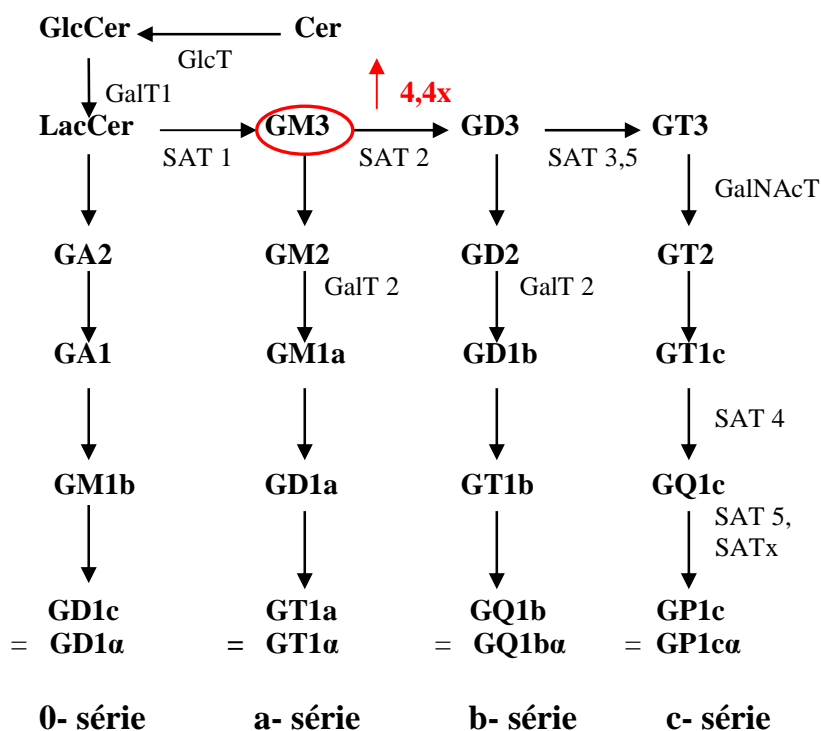


Obr.12: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu s inhibicí HO-1 proti podvazu s vyznačením násobku snížení koncentrace (skupiny iBDL proti BDL)

Tab. 22: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny C a aC, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		C (nmol/g)	aC (nmol/g)	
		n= 4	n= 3	
a-	GM3	2,73±0,95	12,11±7,06	<b>0,010</b>
	GM1a	2,37±2,16	9,47±8,04	0,066
	GD1a	2,47±1,62	4,88±2,71	0,100
b-	GD3	0,79±0,53	0,92±0,67	0,764
	GT1b	0,31±0,28	0,11±0,04	0,081
	GD1b	0,77±0,58	0,37±0,24	0,201

V Tab. 22 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin C (5-denní kontrola) a aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1). Mezi těmito skupinami byly zjištěny statisticky významné rozdíly u GM3, kdy je sledován jeho nárůst u skupiny aC (kontrola s aktivací HO-1) oproti C (kontrola).



Obr.13: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u slepě operovaných s aktivací HO-1 proti slepě operovaným s vyznačením násobku zvýšení koncentrace (skupiny aC proti C)

Tab. 23: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny BDL a aBDL, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		BDL (nmol/g)	aBDL (nmol/g)	
		n= 4	n= 7	
a-	GM3	4,11±2,31	10,01±7,59	0,096
	GM1a	3,07±1,79	7,00±4,83	0,067
	GD1a	5,42±3,13	7,90±4,94	0,482
b-	GD3	1,41±0,83	2,10±1,32	0,268
	GT1b	0,73±0,37	1,06±0,43	0,144
	GD1b	1,83±0,71	2,75±1,56	0,181

V Tab. 23 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin BDL (5-denní podvaz) a aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1). Mezi těmito skupinami nebyly sledovány žádné statisticky významné rozdíly.

Tab. 24: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny C<sup>18</sup> a BDL, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		C <sup>18</sup> (nmol/g)	BDL (nmol/g)	
		n= 4	n= 4	
a-	GM3	2,56±2,01	4,11±2,31	0,244
	GM1a	2,24±1,33	3,07±1,79	0,371
	GD1a	1,73±0,79	5,42±3,13	0,063
b-	GD3	0,47±0,27	1,41±0,83	<b>0,023</b>
	GT1b	0,35±0,26	0,73±0,37	0,060
	GD1b	0,44±0,16	1,83±0,71	<b>0,001</b>

V Tab. 24 jsou uvedena množství sledovaných gangliosidů v nmol na g vlhké jaterní tkáně u skupin C<sup>18</sup> (18-denní kontrola) a BDL (5-denní podvaz). Statisticky významné rozdíly byly zjištěny mezi těmito skupinami u GD3 a GD1b, kdy byl sledován jejich nárůst u skupiny BDL (podvaz) oproti C<sup>18</sup> (kontrola).

Výsledky statistické analýzy vyhodnocující změny mezi porovnávanými skupinami zvířat v obsahu celkové lipidní NeuNAc a v zastoupení sledovaných gangliosidů lze shrnout v následujícím zhodnocení.

Vliv cholestázy vyvolané podvazem žlučovodů způsobuje zvýšení *b*-série gangliosidů a celkové NeuNAc :

- BDL (5-denní podvaz) proti C (5-denní kontrola)- zvýšení gangliosidů *b*-série - GT1b, GD1b a zvýšení celkové NeuNAc
- BDL<sup>18</sup> (18-denní podvaz) proti C<sup>18</sup> (18-denní kontrola)- zvýšení gangliosidů *b*-série- GD1b, GD3 a zvýšení celkové NeuNAc

Podobný trend vlivem cholestázy je patrný i ze srovnání následujících skupin:

- iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1) proti iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) - zvýšení gangliosidů *b*-série GD1b a celkové NeuNAc
- aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1) proti aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1)- zvýšení gangliosidů *b*-série GT1b, GD1b a celkové NeuNAc

Vliv Sn-mesoporfyrinu způsobuje zvýšení celkové NeuNAc, změny v zastoupení gangliosidů jsou méně jednoznačné:

- iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) proti C (5-denní kontrola)- zvýšení celkové NeuNAc, ale nebyla sledována žádná změna v zastoupení gangliosidů
- iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1) proti BDL (5-denní podvaz)- zvýšení celkové NeuNAc a snížení gangliosidů *a*-série GM3, *b*-série GT1b, GD1b

Vliv heminu způsobuje zvýšení gangliosidů *a*-série mezi některými porovnávanými skupinami:

- aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1) proti C (5-denní kontrola)- zvýšení gangliosidů *a*-série GM1, GM3 a zvýšení celkové NeuNAc
- aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1) proti BDL (5-denní podvaz)- beze změny v zastoupení gangliosidů, zvýšení celkové NeuNAc

#### 4.4. Stanovení exprese mRNA pro sialyltransferasu syntetizující GD3 (SAT-2)

Vzhledem k tomu, že u skupin zvířat s vyvolanou cholestázou docházelo ke zvýšení gangliosidů *b*- větve, zjištěné výsledky jsme chtěli ověřit i na molekulárně- biologické úrovni a proto bylo přistoupeno ke stanovení mRNA klíčového enzymu *b*- větve, SAT-2.

Tab. 25: *Expresa mRNA pro sialyltransferasu syntetizující GD3 (SAT-2) u jednotlivých skupin zvířat vyjádřená v % vůči expresi mRNA pro  $\beta$ -aktin (endogenní kontrola)*

Skupina zvířat	Expresa SAT-2 / % kontroly průměr $\pm$ SD
C	52,9 $\pm$ 20,0
BDL	17,5 $\pm$ 6,9
aC	48,2 $\pm$ 26,2
aBDL	15,3 $\pm$ 6,8
iC	383,8 $\pm$ 123,1
iBDL	111,7 $\pm$ 54,3

- Z výsledků (Tab. 25) je patrné, že dochází ke snížení exprese mRNA pro cílový enzym SAT-2 u skupin zvířat s podvazy oproti příslušné kontrolní skupině zvířat:

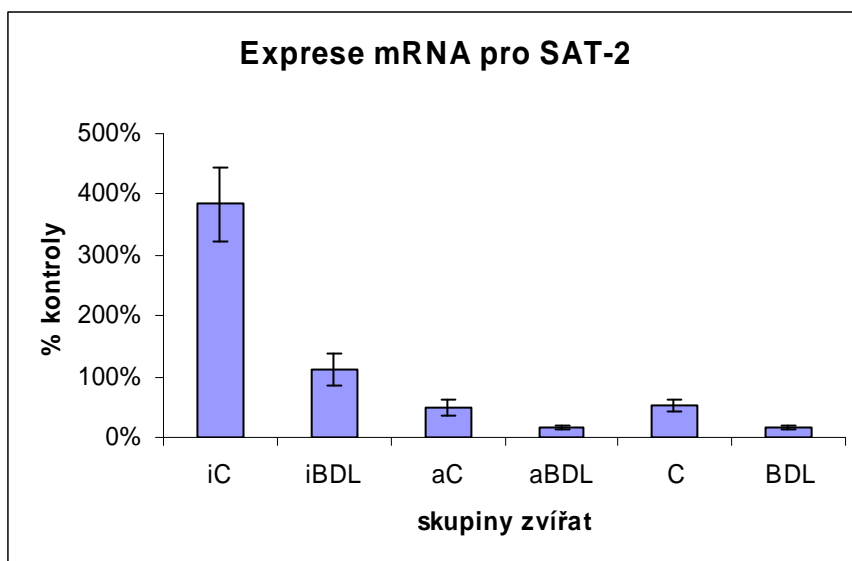
C (5-denní kontrola) x BDL (5-denní podvaz)

aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1) x aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1)

iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) x iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1)

- Dalším zjištěním je, že skupiny zvířat s aplikovaným Sn-mesoporfyrinem iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) a iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1) vykazují několikanásobný nárůst exprese mRNA pro SAT-2 oproti kontrolním skupinám C (5-denní kontrola) a BDL (5-denní podvaz).

Data z Tab. 26 jsou přehledně znázorněna v grafu 1.



*Graf 1: Výsledky stanovení mRNA odpovídající SAT-2 u sledovaných skupin.*

*Zatímco vlivem cholestázy (kontrolní C srovnávána s podvazem **BDL**, kontrolní + aktivovanou HO-1 **aC** srovnávána s podvazem + aktivovanou HO-1 **aBDL**) dochází k poklesu exprese mRNA, u skupin s inhibovanou HO-1 (kontrola **iC**, podvaz **iBDL**) dochází ke zřetelnému nárůstu mRNA pro SAT-2.*

## 5. Diskuse

Při posuzování změn ve složení gangliosidů je nejprve nutno zmínit, že jsou popsány druhově a tkáňově specifické rozdíly ve složení, které je určováno z části genetickými faktory<sup>95</sup>. Může být ovlivňováno hormony<sup>96</sup>, chemikáliemi nebo maligní transformací buněk. Toto složení může procházet změnami, které jsou ovlivňovány změnami v aktivitách glykosyltransferas, účastnících se v biosyntéze<sup>97</sup>. V myších játrech byly pozorovány změny v expresi gangliosidů v závislosti na věku<sup>98</sup>.

Detailní vyšetření jednotlivých variací ve složení gangliosidů, které provedl Schütz-Henninger a spol.<sup>22</sup>, zjistilo odchylky ve složení gangliosidů v játrech potkana kmene Wistar. Zde byly zvýšeny gangliosidy *b*- série (GD3, GD1b, GT1b), což korelovalo s aktivitou sialyltransferasy syntetizující GD3 (SAT-2). Tyto změny vykazovaly odchylky mezi mladými a staršími zvířaty i rozdíly mezi samci a samicemi.

Vzhledem k uvedeným zjištěním je třeba poznamenat, že jak v publikaci Majera a spol.<sup>1</sup>, tak v práci prováděné mnou, byly použity samice potkanů kmene Wistar. V daném experimentu vždy stejného stáří (12 týdnů), u nichž byla dle Majera zjištěna zvýšená míra exprese gangliosidů *b*- série až po vyvolání cholestázy indukované 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem.

Zatímco Majer a spol. (2007)<sup>1</sup> sledovali změny gangliosidů po vyvolání intrahepatální cholestázy 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem, v mé diplomové práci byly sledovány změny v gangliosidech po vyvolání obstrukční extrahepatální cholestázy, při níž se uzávěr žlučovodů experimentálně napodobuje jejich podvazem.

Po metodické stránce jsem použila postupy analogické jako v práci Majera a spol.. V izolaci gangliosidů jsem použila důkladnější postup přečištění gangliosidů zejména použitím afinitní chromatografie na koloně DEAE Sephadexu a finální purifikací na koloně silikagelu, což vedlo k většímu zaostření zón v následující chromatografii na tenké vrstvě. Postupy vlastního chromatografického dělení i denzitometrie a rovněž fotometrické stanovení celkové lipidní kyseliny sialové bylo identické jako v práci Majera a spol. Proto lze výsledky v mé práci a práci Majera a spol. vzájemně porovnat (viz. dále).

Vyhodnocování detekovaných zón dělení na tenké vrstvě může poskytovat, ve srovnání s metodami při nichž je gangliosid v roztoku např. při fotometrii, méně přesné výsledky. Chromatografie na tenké vrstvě s následnou denzitometrií je však stále nejrozšířenější metodou při analýze gangliosidů a má i přes semikvantitativní výstupy řadu výhod. Modernější postupy, jako je např. HPLC dělení na koloně aminosilikagelu

(LichrosorbNH<sub>2</sub>, Merck Darmstadt)<sup>99</sup>, umožňují sice dělení nederivatizovaných gangliosidů v komplikované směsi gradientů, je však při ní těžké odlišit gangliosidy od případné negangliosidové příměsi poskytující při 215 nm rovněž odezvu. Proto metoda neposkytuje zvláštní výhody bez napojení na systém MS/MS. Toto zařízení nebylo však k dispozici.

Pro denzitometrické měření jsem vycházela z práce Šmída a Reinišové (1973)<sup>100</sup>, podle níž poskytovalo vyhodnocení barevných zón gangliosidů po resorcinolové detekci srovnatelné výsledky s fotometrickou metodou publikovanou Suzukim (1965)<sup>101</sup>, při níž byly jednotlivé zóny gangliosidů vyškrabány a gangliosidy eluovány a provedena s nimi resorcinolová reakce ve zkumavce. V práci Šmída a Reinišové bylo zjištěno, že stejné množství mono-, di-, trisialogangliosidů dává denzitometrickým měřením ploch pík odezvu v poměru 1:2:3 a fotometrickým měřením lineární kalibraci do 0,4 μmol gangliosidu (tj. přibližně do 6 nmol lipidně vázané kyseliny sialové). Lineární kalibraci pro 0,1-6 nmol lipidně vázané kyseliny sialové u různých gangliosidů zjistili také Chigorno a kol. (1982)<sup>102</sup> za použití alternativní metody detekce kyseliny sialové s Ehrlichovým činidlem (*p*-dimethylaminobenzaldehydem-HCl). Z toho vyplývá, že pomocí denzitometrie je možno vyjadřovat získané hodnoty jako procentuelní zastoupení kyseliny sialové a v případě kalibračního standardu i jako absolutní hodnoty kyseliny sialové v nmolech. Chigorno a spol. zjistili, že lze použít jediného standardu GM1 gangliosidu. V této práci jsem použila k výpočtu rovněž standard monosialogangliosidu GM1 o známé koncentraci aplikovaný na každou desku v nmolech vázané kyseliny sialové. Vliv rozdílů detekce mezi TLC deskami způsobený odlišnostmi v postřiku resorcinolovým činidlem, tj. intenzitou postřiku, zahřátím aj., byly sjednoceny korekčním faktorem vztaženým denzitometrickou odezvu stejného množství standardu GM1 na jednotlivých TLC deskách.

#### **Tato práce dospěla k následujícím zjištěním ohledně vlivu cholestázy:**

Vzorky s cholestázou vykazují oproti kontrolním vzorkům nárůst gangliosidů *b*-větve (GT1b, GD1b, případně GD3), čemuž odpovídá i prokázaný nárůstem celkové lipidně vázané kyseliny sialové (celkové gangliosidy). Toto zjištění je platné pro srovnání skupin C proti BDL, C<sup>18</sup> x BDL<sup>18</sup>), iC (5-denní kontrola s inhibicí HO-1) x iBDL (5-denní podvaz s inhibicí HO-1) a aC (5-denní kontrola s aktivací HO-1) x aBDL (5-denní podvaz s aktivací HO-1). Na základě těchto výsledků lze říci, že cholestáza vyvolaná podvazem žlučovodů způsobuje nárůst gangliosidů *b*-větve a celkové NeuNAc, které však jsou výrazně nižší než u EE-cholestázy (Majer a spol., 2007)<sup>1</sup>. Toto lze vysvětlit dvěma faktory.



U EE-cholestázy vysoké koncentrace žlučových kyselin atakují membránu hepatocytů ze sinusoidální strany, zatímco u cholestázy vyvolané podvazem působí nahromaděné CŽK ze strany sinusoidální i kanalikulární. Druhým faktorem je vliv estrogenů. U těhotenské cholestázy byla zjištěna snížená fluidita membrán (Smith and Gordon, 1988)<sup>103</sup>, která může být způsobena právě vyšší koncentrací gangliosidů v membráně. To by mohlo souviset i se známým faktem, že při těhotenské cholestáze většinou nevzniká žádné periportální poškození hepatocytu, které je typickým jevem u obstrukční cholestázy.

#### **Vliv inhibice a aktivace hemoxygenasy:**

U vzorků s aplikovaným heminem (5-denní kontrola aC) oproti kontrolním vzorkům (C 5-denní) dochází ke zvýšení gangliosidu *a*-větve. U srovnání aC proti C bylo rovněž zaznamenáno statisticky významné navýšení celkové NeuNAc. U srovnání skupin aBDL proti BDL byl potvrzen pouze nárůst celkové NeuNAc. Z výsledků můžeme usuzovat, že HO-1 aktivovaná heminem vyvolává nárůst gangliosidů *a*-větve a celkové NeuNAc. Na vysvětlení toho jevu se zaměří další výzkum v laboratoři školitele.

Kontrolní vzorky s HO-1 inhibovanou Sn-mesoporfyrinem (iC) oproti kontrolním vzorkům (C) nevykazují změny ve složení gangliosidů, byl pouze zjištěn nárůst celkové NeuNAc u iC oproti C. Pokud srovnáváme vzorky s cholestázou v kombinaci s Sn-mesoporfyrinem inhibovanou HO-1 (iBDL) proti vzorkům s cholestázou (BDL), je zde významné snížení gangliosidů- u iBDL proti BDL snížení gangliosidů *a*- i *b*-větve.

Srovnání zvýšení gangliosidů *b*- větve s mírou exprese mRNA, klíčového enzymu pro syntézu GD3, sialyltransferasy 2 (SAT-2), nepřineslo očekávané výsledky, protože při zvýšených gangliosidech *b*-větve odpovídající mRNA nebyla zvýšena, byl zde naopak zjištěn pokles exprese SAT-2. Zvýšení biosyntézy gangliosidů *b*-série probíhá zřejmě jiným způsobem než zvýšením exprese mRNA pro SAT-2. K podobným výsledkům nezvýšené mRNA pro GalT-2 a SAT-2, dospěl i Majer a spol. u EE cholestázy<sup>1</sup> a Šmíd pro GalT-2 u cholestázy indukované podvazem<sup>3</sup>. Senn a spol. (1991)<sup>72</sup> se však zmiňují o určité dosažené korelaci mezi stanovením aktivity glykosyltransferas a výsledky analýzy gangliosidů. Je tedy ještě v našem výzkumu potřebné sledovat aktivity glykosyltransferas. Stanovení aktivit glykosyltransferas se vymykalo možností řešení v rámci mé diplomové práce, proto bude zahrnuto v dalším výzkumu Hepatologické laboratoře.

Výsledky chromatografické analýzy v této, Majerově práci<sup>1</sup> a histologických studií Jirkovské a spol.<sup>2</sup> a Šmída<sup>3</sup> může přinést vysvětlení v tom, že zvýšení množství gangliosidů

v plazmatické membráně při cholestáze je důležité pro její zpevnění proti detergenčním účinkům CŽK.

## 6. Souhrn

Práce se zabývala výzkumem vlivu experimentální cholestázy vyvolané podvazem žlučovodů laboratorních potkanů kmene Wistar na změnu ve složení jaterních gangliosidů.

Výsledkem je zjištění, že obstrukční cholestáza způsobuje zvýšení celkové kyseliny sialové (celkových gangliosidů) a gangliosidů *b*- větve (GD1b, GT1b, případně GD3). Tyto výsledky korelují se závěry studie cholestázy indukované 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem Majera a spol.<sup>1</sup>.

Modulace HO-1 se projevila zvýšením celkové NeuNAc. Zajímavým zjištěním byl pokles gangliosidů *a*- , *b*- větve po inhibici HO-1 u cholestatických potkanů (iBDL vs. BDL).

U skupin s inhibovanou HO-1 (kontrola iC, podvaz iBDL) dochází ke zřetelnému nárůstu mRNA pro SAT-2, klíčového enzymu v biosyntéze gangliosidů *b*- série. Vlivem cholestázy a aktivací HO-1 dochází k poklesu mRNA pro SAT-2.

Rozdíly v koncentracích gangliosidů a expresích mRNA je možné vysvětlit vlivem posttranslační modifikace. Stanovení aktivit příslušných glykosyltransferas bude jedním z dalších cílů výzkumné skupiny Hepatologické laboratoře 1. LF UK.

Výsledky této studie potvrzují, že zvýšení množství gangliosidů v plazmatické membráně při cholestáze je důležité pro její zpevnění proti detergenčním účinkům žlučových kyselin.

## 7. Seznam použité literatury

---

- 1 Majer, F., Trnka, L., Vítek, L., Jirkovská, M., Mareček, Z., Šmíd, F., *Biomed. Chromatogr.*, 21, 446-450 (2007)
- 2 Jirkovská, M., Majer, F., Šmídová, J., Strítěský, J., Shaik, G. M., Dráber, P., Vítek, L., Mareček, Z., Šmíd, F., *Glycoconj. J.*, 24, 231-241 (2007)
- 3 Šmíd, V.: Změny v histochemické lokalizaci gangliosidů u experimentální cholestázy. Diplomová práce 1. LF UK, Praha (2010)
- 4 IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, The nomenclature of Lipids. *Recommendations Lipids*, 12, 455-468 (1977)
- 5 Bláha, K., Košťář, J., Michalec, Č., Ranný, M., *Chem. Listy*, 81, 715-748 (1987)
- 6 Svennerholm, L., *Neurochem.*, 10, 613-623 (1963)
- 7 Svennerholm, L., *Progr. Brain Res.*, 101, XI-XIV (1994)
- 8 Mandon, E., Ehses, I., Rother, J., van Echten, G., Sandhoff, K., *J. Biol. Chem.*, 267, 11144-11148 (1992)
- 9 Braun, E. P., Schnell, E. E., *J. Biol. Chem.*, 243, 3577-3583 (1968)
- 10 Stoffel W., Le Kim, D., Stich G., Hoppe Seyler's *Z. Physiol. Chem.*, 349, 664-670 (1968)
- 11 Mandon, E. C., van Echten, G., Birk, R., Schmidt, R. R., Sandhoff, K., *Eur. J. Biochem.*, 198, 667-674 (1991)
- 12 Sandhoff, K., van Echten, G., *Progr. Brain Res.*, 101, 17-29 (1994)
- 13 Carey, D. J., Hirschberg, C. W., *J. Biol. Chem.*, 256, 989-993 (1981)
- 14 Trinchiera, M., Fabbri, M., Ghidoni, R., *J. Biol. Chem.*, 266, 20907-20912 (1991)
- 15 Schwarzmann, G., Sandhoff, K., *Biochemistry*, 29, 10865-10871 (1990)
- 16 Pohlenz, G., Klein, D., Schwarzmann, G., Schmitz, D., Sandhoff, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 7044-7048 (1988)
- 17 Iber, H., Zacharias, C., Sandhoff, K., *Glycobiology*, 2, 137-142 (1992)
- 18 Iber, H., Sandhoff, K., *FEBS Lett.*, 254, 124-128 (1989)
- 19 Tettamanti G., Riboni L., *Adv. Lipid Res.*, 25, 235-267 (1993)
- 20 Sandhoff, K., van Echten, G., *Progr. Brain Res.*, 101, 17-29 (1994)
- 21 Tettamanti G., Riboni L., *Progr. Brain Res.*, 101, 77-100 (1994)
- 22 Schütz-Henninger, R., Ullmer, E., Prinz, C., Decker, K., *Eur. J. Biochem.*, 185, 327-330 (1989)

- 
- 23 Yu, R. K., Bieberich, E., *Mol. Cell. Endocrinol.*, 177, 19-24 (2001)
- 24 Yu, R. K., Bieberich, E., Xia, T., Zeng, G., *J. Lipid Res.*, 45, 783-793 (2004)
- 25 Yusuf H. K. M., Schwarzmann, G., Pohlenz, G., Sandhoff, K., *Hoppe Seyler's Z. Physiol.*, 368, 455-462 (1987)
- 26 Iber, H., van Echten, G., Klien, R. A., Sandhoff, K., *Eur. J. Cell Biol.*, 52, 236-240 (1990)
- 27 Qiroga, S., Panzetta, P., Capputo, R., *J. Neurosci. Res.*, 30, 414-420 (1991)
- 28 Roseman, S., *Chem. Phys. Lipids*, 5, 270-297 (1970)
- 29 Bieberich, E. S., MacKinnon, S., Silva, J., Li, D. D., Tencomnao, T., Irwin, D., Kapitonov, D., Yu, R. K., *Biochemistry*, 41, 11479-11487 (2002)
- 30 Bieberich, E., Tencomnao, T., Kapitonov, D., Yu, R. K., *J. Neurochem.*, 74, 2359-2364 (2000)
- 31 Martina, J. A., Daniotti, J. L., Maccioni, H. J., *J. Biol. Chem.*, 273, 3725-3731 (1998)
- 32 Stern, C. A., Braverman, T. R., Tiemeyer, M., *Glycobiology*, 10, 365-374 (2000)
- 33 Farukawa, K., Takamiya, K., Okada, M., Inoue, M., Fukumoto, S., *Biochim. Biophys. Acta*, 1525, 1-12 (2001)
- 34 Proia, R. L., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 358, 879-883 (2003)
- 35 Ichikawa, S., Nakajo, N., Sakiyama, H., Hirabayashi, Y., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 2703-2707 (1994)
- 36 Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreud, U., Sandhoff, K., Proia, R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 9142-9147 (1999)
- 37 Kolter, T., Proia, R. L., Sandhoff K., *Traffic*, 1, 803-804 (2000)
- 38 Bosio, A., Binczek, E., Stoffel, W., *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 93, 13280-13285 (1996)
- 39 Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Popko, B., *Cell.*, 86, 209-219 (1996)
- 40 Honke, K., Hirahara, Y., Dupree, S., Suzuki, K., Popko, B., Fukushima, K., Fukushima, J., Nagasawa, T., Yoshida, N., Wada, Y., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 4227-4232 (2002)
- 41 Sheikh, K. A., Sun, J., Liu, Y., Kawai, H., Crawford, T. O., Proia, R. L., Griffin, J. W., Schnaar, R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 7532-7537 (1999)

- 
- 42 Chiavegatto, S., Sun, J., Nelson, R. J., Schnaar, R. L., *Exp. Neurol.*, 166, 227-234 (2000)
- 43 Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Zhao, J., Fukumoto, S., Yamashiro, S., Okada, M., Haraguchi, M., Shin, M., Kishikawa, M., Shiku, H., Aizawa, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 12147-12152 (1998)
- 44 Zhao, J., Furukawa, K., Fukumoto, S., Okada, M., Furugen, R., Miyazaki, H., Takamiya, K., Aizawa, S., Shiku, H., Matsuyama, T., *J. Biol. Chem.*, 274, 13744-13747 (1999)
- 45 Yamashita, T., Wu, Y. P., Sandhoff, R., Werth, N., Mizukami, H., Ellis, J. M., Dupree, J. L., Geyer, R., Sandhoff, K., Proia, R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 2725-2730 (2005)
- 46 Tettamanti, G., Masserini, M., Giulliani, A., Pagani, A., *Ann. Inst. Super. Sanita.*, 24, 23-32 (1988)
- 47 Koerner, T. A. W., Prestegard, J. H., Demou, P. C., Yu, R. K., *Biochemistry*, 22, 2676-2684 (1983)
- 48 Acquotti, D., Fronza, G., Riboni, L., Sonnino, S., Tettamanti, G., *Glycoconjugate J.*, 4, 119-127 (1987)
- 49 Levery, S. B., Roberts, C. E., Salyan, M. E. K., Bouchon, B., Hakomori, S., *Biomed. Environ. Mass Spectrosc.*, 19, 311-318 (1990)
- 50 Riboni, S., et al., *J. Biol. Chem.*, 261, 8514-8519 (1986)
- 51 Tettamanti, G., Preti, A., Cestaro, B., Masserini, M., Sonino, S., Ghidoni, G., *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 128, 321-343 (1980)
- 52 Curatolo, W., Small, D. W., Shipley, G., *Biochim. Biophys. Acta*, 468, 11-20 (1977)
- 53 Catu, L., Corti, M., Sonnino, S., Tettamanti, G., *Chem. Phys. Lipids*, 41, 315- 328 (1976)
- 54 Felgner, P. L., Freire, E., Barenholz, Y., Thompson, T. E., *Biochemistry*, 20, 2168-2172 (1981)
- 55 Masserini, M., Freire, E., *Biochemistry*, 26, 237-242 (1987)
- 56 Hakomori, S.: *Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis*, v knize *Handbook of Lipid Research, Vol. 3 Sphingolipid Biochemistry*, J. N. Kanfer and S. Hakomori (eds) Plenum, New York, 327-379 (1983)

- 
- 57 Karlsson, K. A., *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 309-350 (1989)
- 58 Myers, M., Wortman, C., Freire, E., *Biochemistry*, 23, 1442-1448 (1984)
- 59 Singer, S. J., Nicolson, *Science*, 185, 720-731 (1972)
- 60 Jain, M. K., White, H. B., *Adv. Lipid Res.*, 15, 1-60 (1977)
- 61 Tillack, T.W., Allietta, M., Moran, R. E., Young, W. W. J., *Biochim. Biophys. Acta*, 733, 15-24 (1983)
- 62 Sorice M., Parolini I., Sansolini T., Garofalo T., Dolo V., Sargiacomo M., Tai T., Peschle C., Torrisi M. R., Pavan A., *J. Lipid. Res.* 38, 969-980 (1997)
- 63 Rahmann H, Rösner H, Körtje K-H, Beitinger H., Seybold V., *Prog. Brain. Res.*, 101, 127-145 (1994)
- 64 Rock P., Allietta M., Young W. W. Jr, Thompson T. E., Tillack T. W., *Biochemistry*, 30, 19-25 (1991)
- 65 Simons, K., Ikonen, E., *Nature*, 387, 569-572 (1997)
- 66 Nečas, E., Šulc, K., Vokurka, M.: *Patologická fyziologie orgánových systémů*, Karolinum, Praha (2005)
- 67 Trauner, M., Meier, P. J., Boyer, J. L., *J. Hepatol.*, 31, 165-178 (1999)
- 68 Jansen, P. L. M., Müller, M., *Can. J. Gastroenterol.*, 14, 233-238 (2000)
- 69 Kawaguchi, T., Sakisaka, S., Mitsuyama, K., *Hepatology*, 31, 1285-1295 (2000)
- 70 Rodrigues, C. M. P., Steer, C. J., *J. Hepatol.*, 32, 135-141 (2000)
- 71 Krähenbuhl, L., Schäfer, M., Krähenbuhl, S., *J. Hepatol.*, 28, 1000-1007 (1998)
- 72 Senn, H. J., Geiser, T., Fitzke, E., Baumgartner, U., Scholmerich, J., Gerok, W., *J.Hepatol.*, 13, 152-160 (1991)
- 73 Mesaric, M., Decker, K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171, 1188-1191 (1990)
- 74 Kasai, N., Kamimura, A., Miyoshi, I., Ariga, T., *J. Biochem.*, 113, 251- 257 (1993)
- 75 Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 61, 748-755 (1968)
- 76 Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R., *J. Biol. Chem.*, 244, 6388-6394 (1969)
- 77 Yoshida, T., Kikuchi, G. J., *Biol. Chem.*, 253, 4230-4236 (1978)
- 78 Tenhunen, R., Ross, M. E., Marver, H. S., Schmid, R., *Biochemistry*, 9, 298-303 (1970)
- 79 Motterlini, R., Mann, B. E., Foresti, R., *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, 14, 1305-1318 (2005)

- 
- 80 Wu, L., Wang, R., *Pharmacol. Rev.*, 57, 585-630 (2005)
- 81 Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glaker, A. N., Ames, B. N., *Science*, 235, 1043-1047 (1987)
- 82 Vítek, L., Schwertner, H. A., *Adv. Clin. Chem.*, 43, 1-57 (2007)
- 83 Bliuger, A. F., Dudnik, L. B., Maiore Ala, Mieze, I. E., *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 99, 166-168 (1985)
- 84 Wu, T. W., Wu, J., Li, R. K., Mickle, D., Carey, D., *Biochem. Cell. Biol.*, 69, 683-688 (1991)
- 85 Wu, T. W., Carey, D., Wu, J., Sugiyama, H., *Biochem. Cell. Biol.*, 69, 828-834 (1991)
- 86 Otterbein, L., Chin, B. Y., Otterbein, S. L., Lowe, V. C., Fessler, H. E., Choi, A. M., *Am. J. Physiol.*, 272, 268-275 (1997)
- 87 Jeney, V., Balla, J., Yachie, A., Varga, Z., Vercellotti, G. M., Eaton, J. W., Balla, G., *Blood.*, 100, 879-887 (2002)
- 88 Ferris, C. D., Jaffrey, S. R., Sawa, A., Takahashi, M., Brady, S., Barrow, R. K., Tysoe, S. A., Wolosker, H., Baranano, D. E., Dore, S., Poss, K. D., Snyder, S. H., *Nat. Cell. Biol.*, 1, 152-157 (1999)
- 89 Váňová, K.: Produkty katabolické dráhy hemu ve vztahu k patogenezi cholestázy, Diplomová práce VŠCHT, Praha (2009)
- 90 Kaplan, M., Vreman, H. J., Hammerman, C., Stevenson, D. K., *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.*, 81, F56-60 (1999)
- 91 Leeden, R. W., Yu, R. K., Eng, L. F., *J. Neurochem.*, 21, 829-839 (1973)
- 92 Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H., *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509 (1957)
- 93 Suzuki, K., *J. Neurochem.*, 12, 629-638 (1965)
- 94 Svennerholm, L., *Biochim. Biophys. Acta*, 24, 604-611 (1957)
- 95 Nakamura, K., Hashimoto, Y., Yamakawa, T., Suzuki, A., *J. Biochem.*, 103, 201-208 (1988)
- 96 Dahiya, R., Dudeja, P. K., Brasitus, T. A., *Biochim. Biophys. Acta*, 962, 390-395 (1988)
- 97 Hakomori, S., *Chem. Phys. Lipids*, 42, 209-233 (1986)
- 98 Nakamura, Y., Hashimoto, Y., Yamakawa, T., Suzuki, A., *J. Biochem.*, 103, 396-398 (1988)
- 99 Gazzotti, G., Sonnino, S., Ghidoni, R., *J. Chromatogr.*, 348, 371-378 (1985)



- 
- 100 Šmíd, F., Reinišová, J., J. Chromatogr., 86, 200- 2004 (1973)
- 101 Suzuki, K., Life Sci., 3, 1227- 1233 (1964)
- 102 Chigorno, V., Sonnino, S., Ghidoni, R., Tettamanti, G., Neurochem. Int., 4, 397-404 (1982)
- 103 Smith, D. J., Gordon, E. R., J. Lab. Clin. Med., 112, 679-685 (1988)

---

**„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.“**

<b>Jméno a příjmení (s adresou)</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>