

3254

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**



**Histochemická lokalizace GM1 gangliosidu  
B – podjednotkou cholera toxinu při fixaci  
tkání formaldehydem nebo acetonem**

Histochemical localization of GM1 ganglioside using cholera toxin B-subunit  
in formaldehyde or acetone fixed tissues

Diplomová práce

**Biochemie**

**Bc. Tomáš Petr**

Praha, 2008

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy**

**v Praze**

**Katedra biochemie**

**Hepatologická laboratoř Ústavu klinické biochemie**

**a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty UK**

**a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze**

**Histochemická lokalizace GM1 gangliosidu**

**B – podjednotkou cholera toxinu při fixaci tkání**

**formaldehydem nebo acetonem**

**Bc. Tomáš Petr**

**Školitelé**

**Doc. RNDr. František Šmíd, CSc**

**Doc. RNDr. František Novák, CSc**

**Praha, 2008**

# **OBSAH**

Prohlášení.....	6
Poděkování.....	7
Seznam zkratk.....	8
<b>1. Úvod.....</b>	<b>10</b>
1.1 Struktura a názvosloví glykosfingolipidů.....	11
1.2 Biosyntéza a katabolismus glykosfingolipidů.....	15
1.3 Vlastnosti glykosfingolipidů.....	20
1.4 Glykolipidy zpevňují membrány.....	22
1.5 Změny v lokalizaci gangliosidů v cholestatických játrech potkana.....	26
1.6 Glykosfingolipidy zprostředkovávají svými sacharidovými strukturami interakce s exogenními ligandy.....	26
1.7 Glykosfingolipidy jsou markery buněčného povrchu.....	28
1.8 Role glykosfingolipidů při buněčném růstu.....	28
1.9 Glykosfingolipidy jako markery nádorové transformace.....	28
1.10 Úloha glykosfingolipidů v mezibuněčné adhezi.....	29
1.11 Fixace.....	29
1.12 Rozpuštěnost glykosfingolipidů v acetonu.....	29
<b>2. Cíl diplomové práce.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Materiál a metodiky.....</b>	<b>36</b>
3.1. Materiál.....	37
3.2. Chemikálie.....	37
3.3. Přístrojové vybavení.....	37
3.4. Příprava používaných roztoků.....	37
3.5. Porovnání fixace formaldehydem a acetonu.....	38
3.6. Histochemická detekce GM1 gangliosidu.....	38
3.7. Semikvantitativní sledování úniku gangliosidu GM1 po fixaci kryostatových řezů acetonem.....	40
3.8. Analýza obrazu.....	42
3.9. Statistické vyhodnocení.....	42
<b>4. Výsledky.....</b>	<b>43</b>
4.1. Porovnání fixace formaldehydem a acetonem a histochemická detekce gangliosidu GM1.....	44

4.2. Semikvantitativní stanovení úniku gangliosidu GM1 při fixaci kryostových řezů acetone.....	53
5. Diskuse.....	56
6. Závěr.....	60
7. Literatura.....	62
Svolení k zapůjčení.....	66

## **Prohlášení**

**„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Doc. RNDr. Františka Šmída, CSc a Doc. RNDr. Františka Nováka, CSc a všechny použité prameny jsem řádně citoval.“**

**Místo a datum**

*Brno 1.9.2008*

**Podpis**

*Jan Peter*

## **Poděkování**

Chtěl bych touto cestou poděkovat svým školitelům Doc. RNDr. Františku Šmídovi, CSc a Doc. RNDr. Františku Novákovi, CSc za cenné rady, které mi vždy trpělivě a s maximálním úsilím poskytli. Velký dík patří také mé rodině, která mi po celou dobu studia vytvářela klidné zázemí.

# **SEZNAM ZKRATEK**



GSL.....	glykosfingolipidy
Cer.....	ceramid
Gal.....	galaktosa
GalNAc.....	N- acetylgalaktosamin
Glc.....	glukosa
GlcNAc.....	N- acetylglukosamin
NeuNAc.....	kyselina neuraminová
UDP- Gal.....	aktivovaná galaktosa
UDP- Glc.....	aktivovaná glukosa
TLC.....	chromatografie na tenké vrstvě
ER.....	endoplasmatické retikulum
SAT.....	sialyltransferasa
SAP.....	proteinové aktivátory sfingolipidových hydrolas
NAD.....	nikotinamid adenin dinukleotid
GDP.....	guanosin-5- trifosfát
GTP.....	guanosin-5- difosfát
AMP.....	adenosin-5- monofosfát
TAA.....	antigen spojený s nádorovým procesem
C:M:V.....	směs chloroform:methanol:voda
PBS.....	0,9% roztok NaCl ve fosfátovém pufru
BSA.....	hovězí sérový albumin
DAB.....	diaminobenzidin
CHT- B.....	cholera toxin B- podjednotka
AcL2.....	fixace acetonem vychlazeným na teplotu -20°C po dobu 2 minut
AcL15.....	fixace acetonem vychlazeným na teplotu -20°C po dobu 15 minut
AcT2.....	fixace acetonem za pokojové teploty po dobu 2 minut
AcT15.....	fixace acetonem za pokojové teploty po dobu 15 minut
TBA.....	celkové žlučové kyseliny
S- Px- P.....	komplex streptavidinu s polymerním vláknem obsahující peroxidasy
EE.....	17- $\alpha$ - ethinylestradiol
PT.....	pokožová teplota
FITC.....	fluorescenční značka fluorescein-5-izothiokyanát

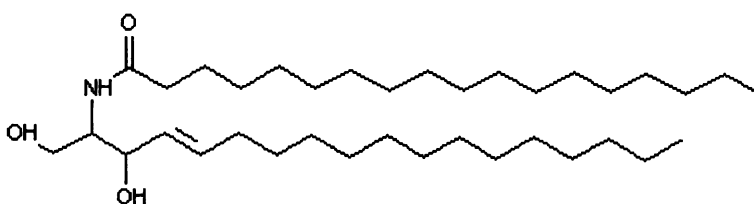
# 1. ÚVOD

## 1.1 Struktura a názvosloví glykosfingolipidů

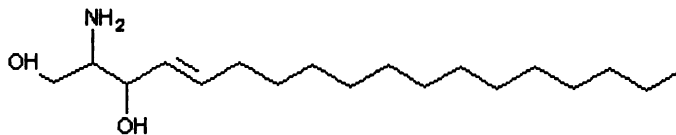
Glykosfingolipidy (GSL), zjednodušeně nazývané též glykolipidy, jsou ze strukturního hlediska komplexní molekuly, které obsahují lipofilní část, zvanou ceramid, a hydrofilní sacharidovou část.

**Ceramid** je skupinový název pro N-acylované sfingoidní base (viz obr. 1a).

**Sfingoidní base (sfingoidy)**- je skupinový název pro víceuhlíkaté alifatické aminoalkoholy a jedná se o název pro sfinganin a jeho homology, stereoisomery, hydroxyderiváty či nenasycené deriváty (viz obr. 1b).



*Obr 1a : ceramid*



*Obr.1b: sfingoidní base*

V lipofilní i hydrofilní části je velká rozmanitost. Variabilita lipofilní části je dána přítomností různých sfingoidních basí a různých acylů mastných kyselin. Tato část je situována do vnější vrstvy plasmatické membrány. Hydrofilní sacharidová část je tvořena mono- až oligo- sacharidem o různém počtu jednotlivých monosacharidových jednotek. Tyto jednotky jsou propojeny různými typy vazeb a sacharidová část je situována na plasmatické membráně vně buňky.

## Glykosfingolipidy (glykosylceramidy) se dělí:

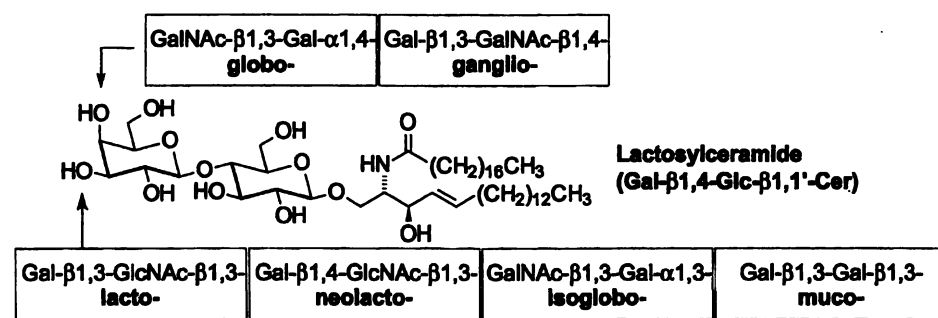
1. Neutrální: mono-, oligo-, polyglykosfingolipidy tvořené neutrálními monosacharidy jako je glukosa, galaktosa, fukosa, N- acetylglukosamin či N-acetylgalaktosamin
2. Kyselé
  - a. Sialoglykosfingolipidy- gangliosidy obsahující skupiny kyseliny sialové
  - b. Sulfoglykosfingolipidy- sulfatidy s estericky vázanou sulfo- skupinu připojenou na oligosacharid
  - c. Fosfoglykosfingolipidy

## Názvosloví glykosfingolipidů

Pro značnou variabilitu sfingoidů a mastných kyselin se v běžném pojmenování lipofilní část GSL označuje souborným názvem ceramid a názvosloví se zaměřuje na popsání hydrofilní sacharidové části. Názvosloví GSL proto vychází z názvosloví sacharidů. Nejjednodušší z nich jsou tvořeny spojením názvu monosacharidové jednotky a ceramid, např. glykosylceramid, galaktosylceramid, fukosylceramid.

Pro základní oligosacharidy bylo vytvořeno názvosloví respektující tyto zásady:

1. Počet monosacharidových jednotek se označuje jako -biosá, -triasá, -tetrasá, -pentasá (nikoliv triosa, tetrosa, pentosa!)
2. Naprostá většina oligosacharidů v GSL je odvozena od laktosylceramidu. Přičemž třetí monosacharidová jednotka udává příslušnost k dané sérii. U laktosérie rozlišuje čtvrtá monosacharidová jednotka lakto a neolaktosérii (viz obr. 2).



*Obr.2: Glykolipidy rozdělené do sérií podle oligosacharidové struktury. Příslušnost většiny glykosfingolipidů je odvozována od laktosylceramidu, přičemž třetí nebo čtvrtá monosacharidová jednotka určuje příslušnost k jednotlivé sérii<sup>1</sup>.*

Zkrácené názvy a\* značení polohy substituentů či větvení ve struktuře oligosacharidu se vytváří u glykosfingolipidů dle doporučení IUPAC - IUBMB/JCBN (viz tab. 1):

1. Strukturální skupina + počet monosacharidů + osylceramid (např. gangliotriaosylceramid, globotetraosylceramid)
2. Římskou číslicí je označována pozice monosacharidové jednotky počítána od ceramidu
3. Arabská číslice v indexu vyjadřuje polohu uhlíkového atomu na monosacharidové jednotce, ke kterému je připojen substituent (IV<sup>2</sup>-  $\alpha$ - fukosyl- IV<sup>3</sup>-  $\alpha$ - galaktosylneolaktotetraosylceramid)

*Tab.1: Struktura, triviální názvy, symboly a zkrácené symboly glykosfingolipidů doporučené dle IUPAC - IUBMB/JCBN<sup>2</sup>.*

Struktura	Triviální název	Symbol (zkr. 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)

Názvosloví gangliosidů dle Svennerholma je velmi oblíbené a užívané pro jeho jednoduchost. Bylo vytvořeno tak, že G značí gangliosid, další písmeno rozčleňuje gangliosidy podle počtu skupin kyseliny sialové v molekule na M- mono-, D- di-, T –tri-, Q -tetra a P-pentasialogangliosidy. Další členění je však už nedůsledné z hlediska popisu chemické struktury, protože bylo vytvořeno podle separace gangliosidů tenkovrstevnou

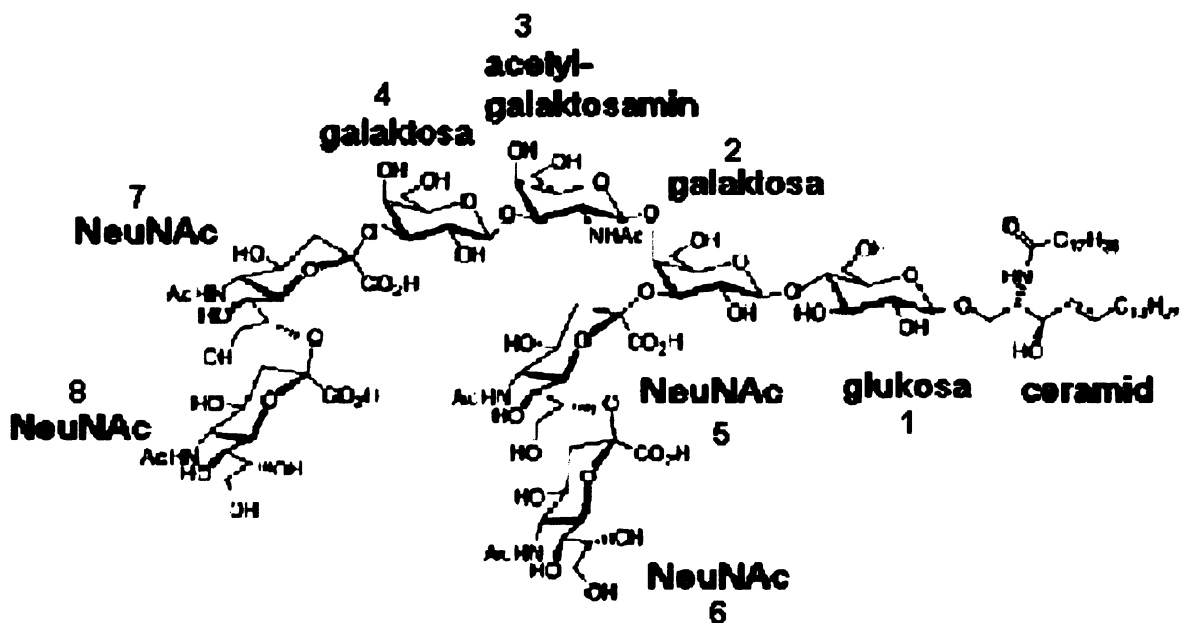
chromatografií (TLC). Označení čísla 1, 2, 3, 4 ve skupině monosialogangliosidů souhlasí s pořadím zón monosialogangliosidů počítaných od startu chromatogramu. Je však v obráceném poměru k počtu monosacharidových jednotek v základním oligosacharidu<sup>3, 4</sup> (viz obr. 3, 4 a tab. 2). Struktura jednotlivých gangliosidů je na obrázku číslo 4.



*Obr.3: Separace jednotlivých gangliosidů na TLC. Delší gangliosidy, tj. gangliosidy s velkým počtem sacharidových jednotek, mají od startu menší vzdálenost.*

*Tab. 2: Struktura gangliosidů a jejich zkratky podle Svennerholma<sup>3,4</sup>*

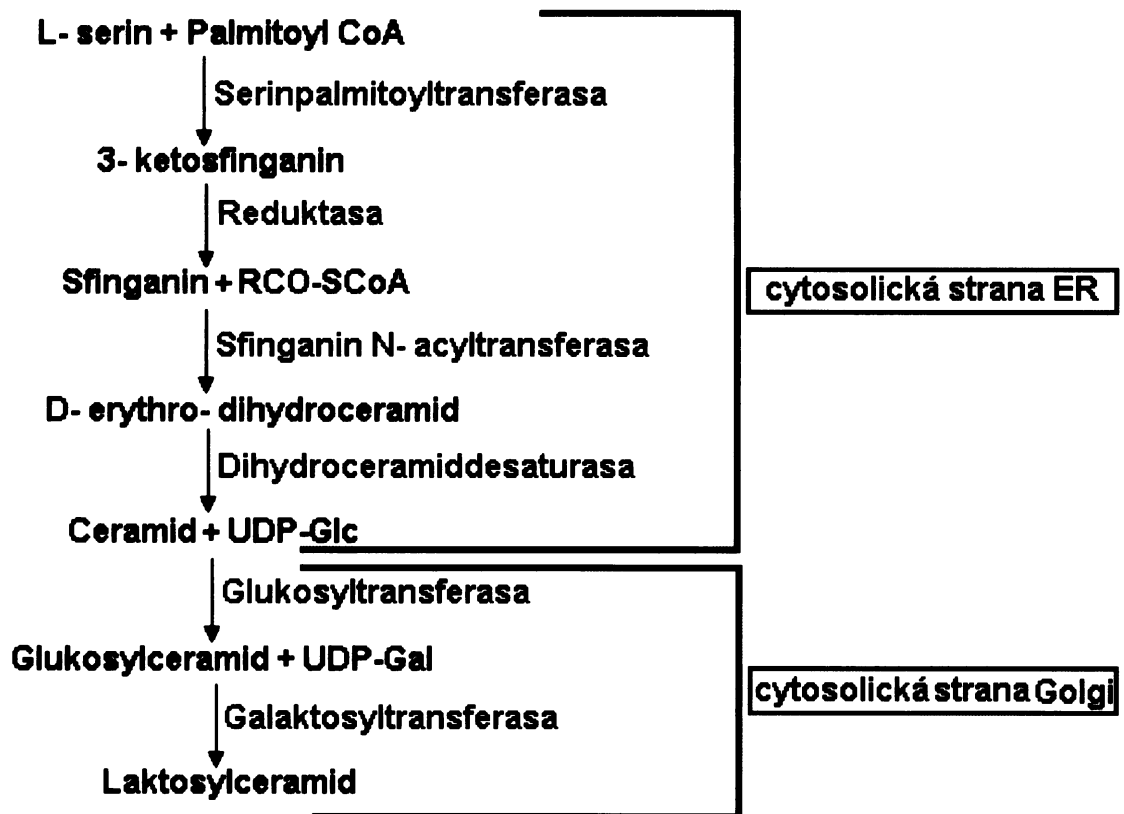
Struktura gangliosidů	Zkratka dle Svennerholma
Neu5AcGalCer	<b>GM4</b>
Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GM3</b>
GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GM2</b>
Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4(Neu5Ac $\alpha$ 3)Gal $\beta$ 4GlcCer	<b>GM1a</b>
Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3GalNAc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



Obr. 4: Schématický vzorec jednotlivých glykosfingolipidů. Gangliosid GM3 se skládá z jednotek 1, 2 a 5, GM2 z 1,2,3,5, GM1 z 1,2,3,4,5, GD3 z 1,2,5,6, GD1a z 1,2,3,4,5,7, GD1b z 1,2,3,4,5,6, GT1b z 1,2,3,4,5,6,7 a GQ1b z jednotek 1,2,3,4,5,6,7,8.

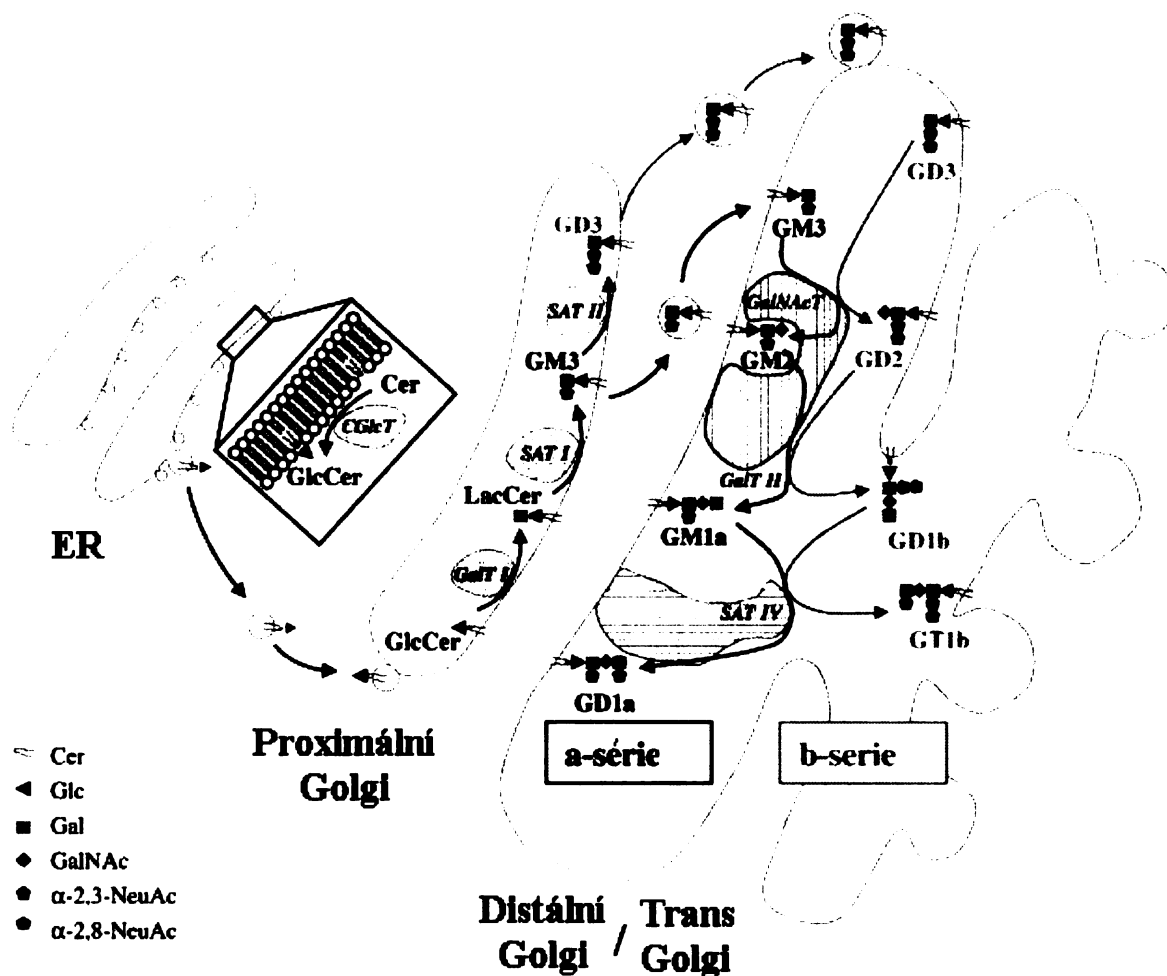
## 1.2 Biosyntéza a katabolismus glykosfingolipidů

Základní složkou biosyntézy glykosfingolipidů je ceramid. Počátek syntézy ceramidu je v kondenzaci serinu a palmitoylkoenzymu A. Tato reakce je katalyzována pyridoxalfosfát dependentní serinpalmitoyltransferasou za vzniku 3- ketosfinganinu<sup>5,6,7</sup>. Tento keton je dále redukován reduktasou na sfinganin<sup>6</sup> a z něho poté vzniká D-erythro-dihydroceramid a ceramid. Biosyntéza samotného ceramidu probíhá na cytosolické straně endoplasmatického retikula<sup>8</sup>, avšak další procesy se odehrávají v prostředí Golgiho aparátu a to účinkem membránově vázaných glykosyltransferas. Glukosyltransferasa a galaktosyltransferasa I jsou přítomné na cytosolické straně Golgiho aparátu, a tak zde může probíhat biosyntéza laktosylceramidu, společného prekurzoru většiny glykolipidů (viz obr. 5). Na ceramid, potažmo laktosylceramid, se postupně váží monosacharidové jednotky. Pořadí těchto jednotek je přesně dané specificitou, kompartmentací či topologií enzymů (viz obr. 6 a 7). Konečné produkty biosyntézy vznikají v lumen Golgiho aparátu a jsou dále transportovány pomocí vesikulů do plasmatické membrány.

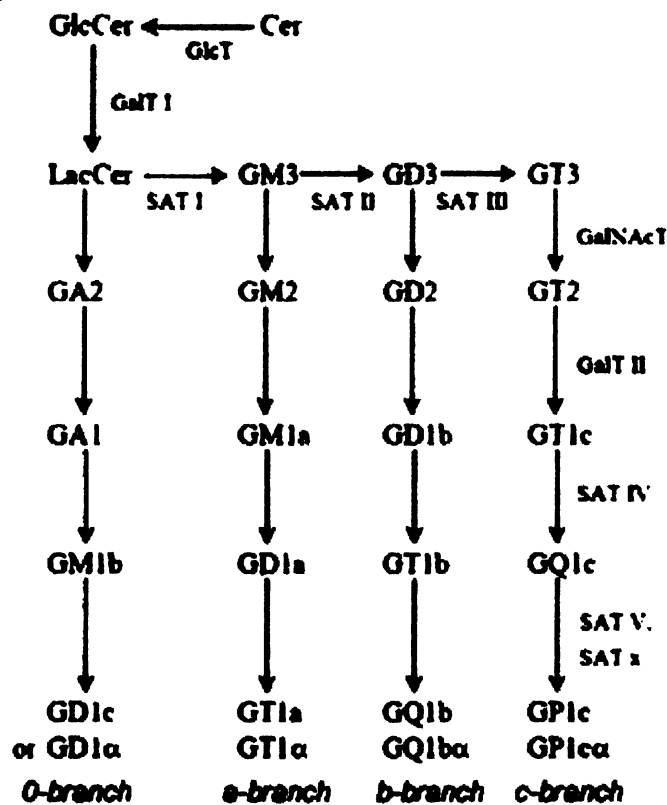


Obr. 5: Schéma biosyntézy laktosylceramidu jakožto prekurzoru většiny glykosfingolipidů. Biosyntéza ceramidu probíhá na cytosolické straně endoplasmatického retikula<sup>8</sup>, avšak další reakce se odehrávají na cytosolické straně Golgiho aparátu. Konečné produkty následně vznikají v lumen Golgiho aparátu.



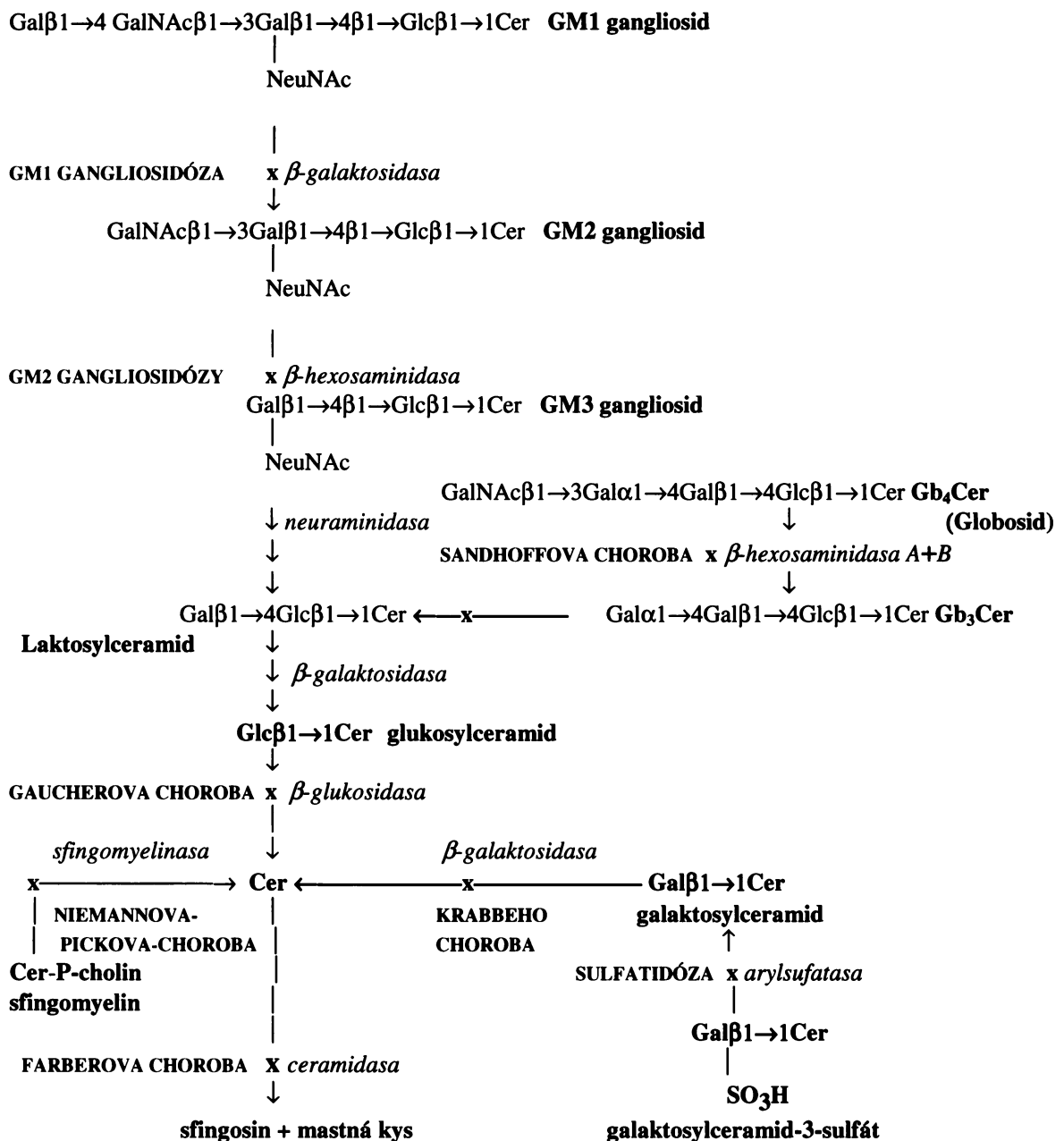


Obr. 6: Znárodnění biosyntézy gangliosidů<sup>9</sup>. Ceramid vzniká na cytosolické straně endoplasmatického retikula, kde probíhá také připojení glukosy. Konečné glykosylační kroky jsou pak mapovány do luminální strany Golgiho aparátu. Prekurzory a- a b- serie gangliosidů, GM3 a GD3, vznikají účinkem specifických sialyltransferas I a II v proximálním Golgiho aparátu. Prekurzory gangliosidů jsou pak transportovány přes vesikuly do distálního Golgiho aparátu, kde jsou aktivovány další glykosyltransferasy<sup>9</sup>.



Obr. 7: Schéma biosyntézy jednotlivých větví gangliosidů. Společným prekurzorem pro všechny 4 větve gangliosidů je ceramid. Počátek biosyntézy tří větví gangliosidů gangliosérie je určen přísnou specifitou sialyltransferasy I (SAT I), sialyltransferasy II (SAT II) a sialyltransferasy III (SAT III), které přináší na laktosylceramid, GM3 a GD3 kyselinu sialovou. Výsledkem jsou gangliosidy GM3, GD3 a GT3<sup>10,11</sup>. Tyto reakce probíhají na luminální straně Golgiho aparátu<sup>12,13</sup>, avšak další glykosylace je katalyzována enzymy s širší specifitou. N-acetylgalaktosamintransferasa I přenáší N-acetylgalaktosamin na laktosylceramid, GM3, GD3 a GT3. O- série se vyskytuje ve zvýšené míře u žab, A a B- série u teplotokrevných živočichů, jako jsou například savci či ptáci a C- série se vyskytuje převážně u ryb.

Degradace glykosfingolipidů se odehrává u živočišných buněk v lysososomech, a to konkrétně tak, že dochází k postupnému působení kyselých exohydrolas. Po degradaci oligosacharidové části GSL je ceramid ceramidasou štěpen na konečné produkty ve formě sfingosinu a mastné kyseliny. Katabolismus běžných glykosfingolipidů z ganglio- a globosérie je s vyznačením enzymů a metabolických blokády u dědičných metabolických chorob uveden na obrázku (viz obr. 8).



Obr. 8: Katabolismus sfingolipidů s vyznačením metabolických poruch odbourávání.  
 x = místo metabolické poruchy

Do lysosomů se dostávají komponenty a fragmenty plasmatické membrány především endocytickou cestou. U tkáňových kultur dochází k obměně plasmatické membrány buněk tak rychle, že internalizace přibližně poloviny plasmatické membrány buněk proběhne asi za hodinu<sup>14</sup>. Tento děj je následován stejně rychlým procesem recyklace a resyntézy membránových komponent z důvodů udržení dynamické integrity

buněčné povrchů. V komplexní obměně cytoplasmatické membrány hraje zásadní úlohu proces zvaný recyklace. Glykolipidy z plasmatické membrány jsou pomocí časných endosomů přepravovány:

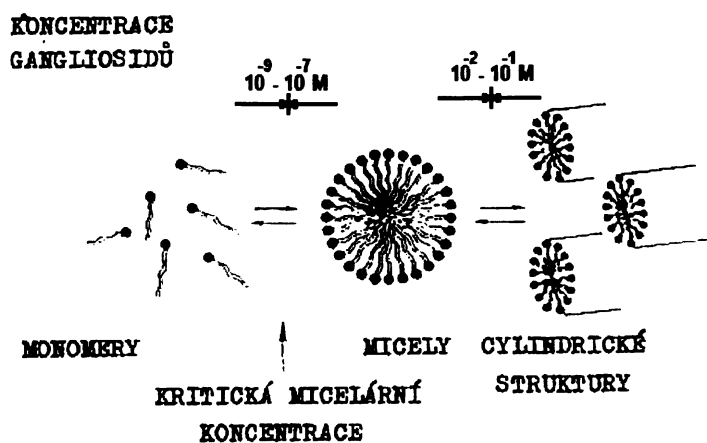
- přímo zpět do plasmatické membrány na jiné místo (retroendocytóza)
- do Golgiho aparátu k "přemodelování" molekuly
- do pozdních endosomů a dále do lysosomů k biodegradaci. Fragmenty částečné, nebo úplné degradace bývají použity znovu k biosyntéze<sup>15</sup>.

U GSL s delším oligosacharidem, tj. obsahujícím více než 4 sacharidové jednotky, je pro odbourávání *in vivo* dostačující přítomnost exohydrolas. Aby mohly být degradovány glykosfingolipidy s kratším oligosacharidem, je zapotřebí vedle enzymů ještě asistence malých glykoproteinových kofaktorů, tzv. sfingolipidních aktivátorových proteinů, saposinů (SAP). Podle dosavadních znalostí je pět z doposud známých SAP kódováno dvěma geny. Jeden gen nese genetickou informaci pro GM2 aktivátor a druhý gen pro SAP- prekursor, proaktivátor, který je pak proteolyticky štěpen na 4 aktivátory označované SAP-A, SAP-B, SAP-C a SAP-D

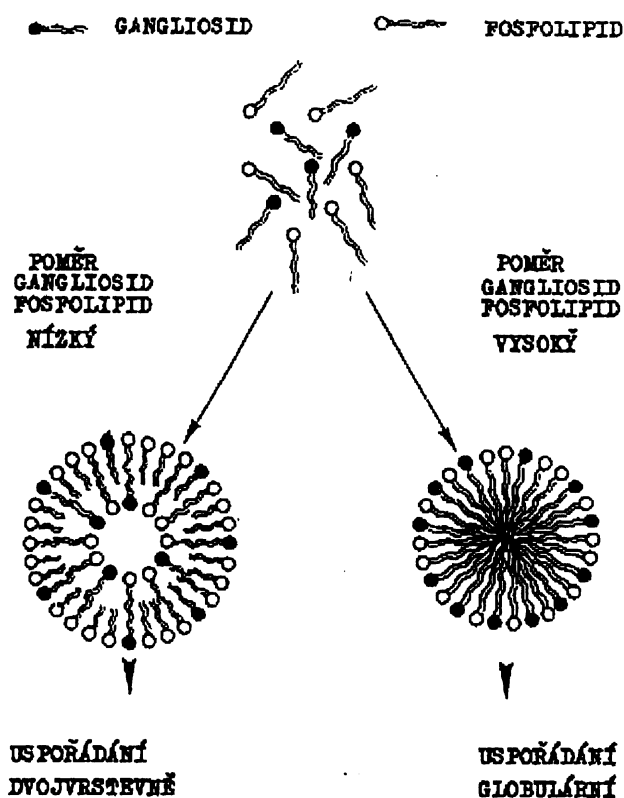
### **1.3. Vlastnosti glykosfingolipidů**

GSL jsou amfifilní molekuly. Tato vlastnost je dána přítomností hydrofilní a hydrofóbní částí v jejich molekule. Ve vodných roztocích nevytváří sami dvojvrstevné struktury jako fosfolipidy, ale agregují do micelárních struktur již při nízkých koncentracích. Micely z gangliosidů vznikají již při koncentracích  $10^{-9} - 10^{-2}$  M (při koncentraci  $10^{-2} - 10^{-1}$  M se tvoří hexagonálně uspořádané cylindrické útvary), viz obr. 9. Těchto vlastností se využívá při separaci od nízkomolekulárních kontaminujících látek a solí (dialýza, gelová filtrace).

Ve směsi s fosfolipidy se tvoří micely, ale při převažující koncentraci fosfolipidů vznikají již dvojvrstevné struktury. GSL se v nich spontánně přeskupují do vnější vrstvy (viz obr. 10). Tato situace nastává v plasmatické membráně buněk, kde jsou skutečně GSL situovány ve vnější vrstvě plasmatické membrány, přičemž jsou oligosacharidem orientovány do vnějšího prostoru<sup>16,17</sup>.



Obr. 9: Ve vodném prostředí se při vysokých koncentracích gangliosidů tvoří makromolekulární micely, avšak při nižších koncentracích vznikají cylindrické struktury. Hydrofóbní ceramidové řetězce jsou orientovány dostředu a hydrofilní oligosacharidové složky směřují vně micel či cylindrických struktur<sup>16</sup>.



Obr. 10: Gangliosidy tvoří spolu s fosfolipidy micely, avšak převáží-li koncentrace fosfolipidů nad gangliosidy, dochází ke vzniku liposomů. V tomto dvojvrstevném uspořádání se gangliosidy spontánně přeskupují do vnější vrstvy<sup>16</sup>.

Glykosfingolipidy jsou ve vysoké koncentraci ve vnější vrstvě plasmatické membrány všech buněk, zatímco v intracelulárních membránách je jejich podíl výrazně menší. Z toho vyplývá skutečnost, že většina základních funkcí gangliosidů souvisí s jejich převládající lokalizací na buněčném povrchu.

Glykosfingolipidy mají několik základních funkcí a vlastností:

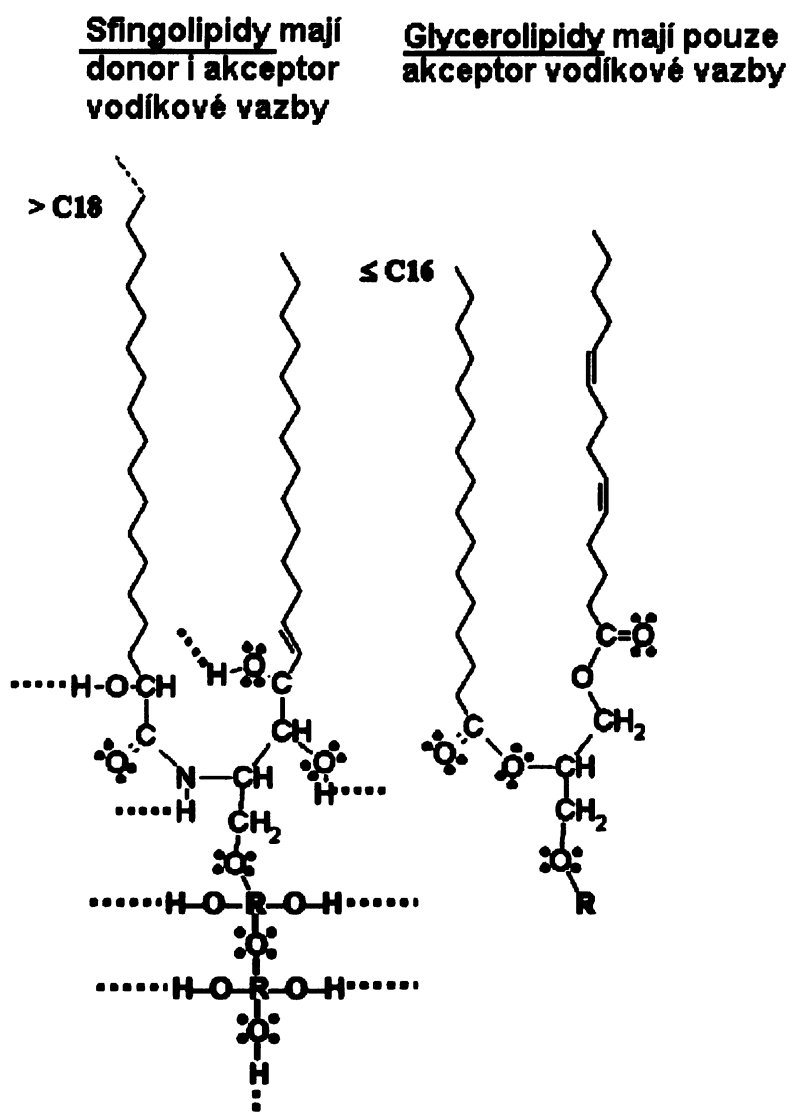
1. podílí se na rigiditě membrány, přičemž mohou vytvářet glykolipid- cholesterolové mikrodomény
2. zprostředkovávají svými sacharidovými strukturami interakce s exogenními ligandy
3. složení glykolipidů je specifické pro určitý buněčný typ
4. jsou markery zralosti buněk. GSL fetálních či nezralých buněk vyžívají a objevují se během histologické diferenciaci.
5. v nádorové tkáni se objevují vlivem odchýlených cest biosyntézy glykosfingolipidů glykolipidní struktury, které představují nádorové markery spojené s nádorovou transformací. Tyto markery jsou využitelné v diagnostice případně v terapii nádorů.
6. mezibuněčná adheze může být zahájena vzájemnou interakcí mezi glykosfingolipidy a většina těchto glykolipidních antigenů je spojena s nádorovým procesem

O jednotlivých význačných bodech je pojednáno dále v následujících kapitolách.

#### **1.4. Glykolipidy zpevňují membrány**

Glykosfingolipidy jsou rigidnější molekuly než fosfolipidy, přičemž přítomnost glykolipidů v membránových lipidech dává membráně větší pevnost. Tato skutečnost je dána tím, že obsahují nasycené mastné kyseliny, mají vyšší bod tání či tvoří interakce s okolními molekulami<sup>18</sup>. Na této rigiditě se podílí jak ceramidová, tak oligosacharidová část molekuly. Ceramidová složka přednostně zaujímá takovou konformaci, která vychází z rigidity planární amidické vazby. Oba uhlíkaté řetězce tak zaujímají paralelní polohu os<sup>19,20,21</sup>. Tato část obsahuje akceptor i donor vodíku, a tudíž dochází k formování stabilních vodíkových vazeb (viz obr. 11). Vodíkové vazby a hydrofóbní interakce dávají ceramidové složce pevnost<sup>16</sup>. Konformace oligosacharidů bývá určena stabilitou kyseliny sialové, jež je dána přítomností tří vodíkových můstků v molekule<sup>22</sup>. Na shlukové

uspořádání gangliosidů na povrchu membrán má vliv vazba vápenatých iontů k těmto glykolipidům<sup>16</sup>.

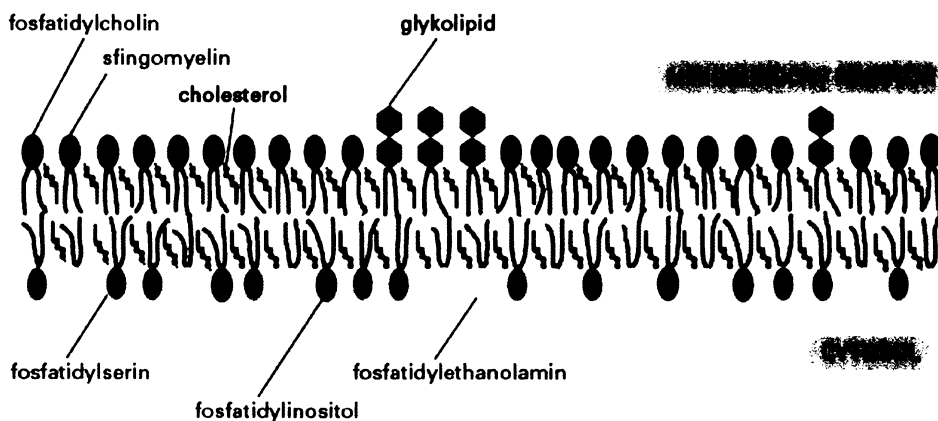


Obr. 11: Glykolipidy jsou oproti fosfolipidům rigidnější molekuly. Jedním z mnoha důvodů je to, že glykosfingolipidy obsahují ve své molekule jak donor, tak akceptor vodíkové vazby, zatímco fosfolipidy obsahují pouze donor vodíkové interakce<sup>23</sup>.

Jednou z nejdůležitějších úloh glykosfingolipidů je jejich role v signalizačních mikrodoménách.

Plasmatická membrána není nahodilý oceán lipidů, ale obsahuje mikrodomény, které zavádějí organizaci v distribuci proteinů v lipidní dvojvrstvě. Buněčné membrány

jsou složeny ze směsi glycerofosfolipidů, glykosfingolipidů, cholesterolu a různých proteinů (viz obr. 12). Sfingolipidy a cholesterol jsou na rozdíl od vnitřních membrán ve vysoké koncentraci v plasmatické membráně a endosomech. Glykosfingolipidy jsou výhradně pouze ve vnější vrstvě lipidní dvojvrstvy, zatímco fosfatidylinositol, fosfatidylethanolamin a fosfatidylserin jsou omezeny na vnitřní vrstvu membrány.



Obr. 12: Plasmatická membrána se skládá z fosfolipidů, glykolipidů, cholesterolu a signálních proteinů. Glykosfingolipidy svými sacharidovými strukturami zprostředkovávají interakce s exogenními ligandy (bakterie, bakteriální toxiny, viry aj.) a nacházejí se výlučně ve vnější vrstvě membrány. Soudí se, že na buněčném povrchu vznikají mikrodomény složené z (glyko)sfingolipidů a cholesterolu plovoucích ve fosfolipid-cholesterolovém prostředí<sup>24</sup>.

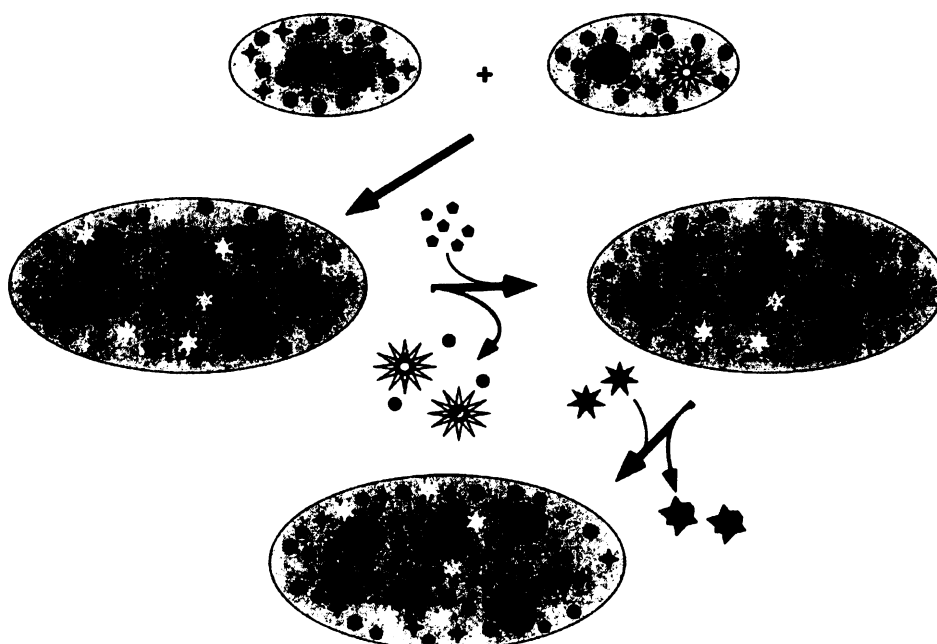
Glykosfingolipidy mají pro vznik rigidnějších mikrodomén unikátní vlastnosti. Konkrétně se jedná o paralelní geometrii sfingosinu a mastné kyseliny v ceramidu, schopnost amidové vazby ceramidu tvořit síť vodíkových vazeb ve vodně-lipidním prostředí plasmatické membrány, schopnost interakce oligosacharidu s vodným prostředím či specifický obsah nasycených alkylových řetězců dávající podnět tvořit domény ve fosfolipidové dvojvrstvě. Cholesterol je situován kolmo k dvojvrstvě, a proto má výrazný vliv na uspořádání této vrstvy. Jelikož sfingolipidy obsahují převážně nasycené acyly, tak se mohou s cholesterolem ochotněji sbalovat<sup>25</sup>.

Ve vnější vrstvě plasmatické membrány vznikají shlukováním glykosfingolipidů a cholesterolu mikrodomény, které bývají někdy nazývány „rafty“. Jedná se o jakési „kry“ v tekutějším prostředí složeném z glycerofosfolipidů a cholesterolu. Takto uspořádané



domény do sebe zahrnují širokou škálu membránových proteinů, přenašečů signálu, zatímco jiné proteiny ze sebe vylučují.

Mikrodomény mohou být velice heterogenní a velice dynamické. Velikost raftů se uvádí od 10 nm až po 200 nm, kdy se menší mikrodomény mohou spojovat do větších a časově stabilnějších útvarů. Důležitost mikrodomén je v tom, že se mohou signalizační molekuly spojovat do stejného oddílu (jiné se mohou z tohoto kompartmentu vylučovat) a mohou se tak k sobě dostat molekuly, které se mají projevit nějakou signalizační či jinou aktivitou<sup>26</sup> (viz obr. 13), například v procesu signální transdukce, buněčné adheze a migrace, synaptické transmise, organizace cytoskeletu či třídění proteinů během exocytózy a endocytózy.



Obr. 13: Důležitost mikrodomén spočívá v tom, že se různé signalizační molekuly spojují do stejného oddílu – kompartmentu (jiné se mohou vyloučit) a mohou se projevit signalizační nebo jinou aktivitou<sup>26</sup>.

Funkční závažnost mikrodomén pro signální transdukci vychází z představy propojení mikrodomén cholesterolu a sfingolipidů ve vnější vrstvě plasmatické membrány s cholesterolovými doménami ve vnitřní vrstvě<sup>27, 28, 29</sup>.

## **1.5. Změny v lokalizaci gangliosidů v cholestatických játrech**

V souvislosti s výše zmíněnou úlohou glykosfingolipidů při zpevnování plasmatické membrány je zajímavé, jak se GSL přesouvají při intrahepatální cholestáze. Již dlouhou dobu je známo, že glykolipidy chrání buňku proti škodlivým faktorům z okolí tím, že zvyšují rigiditu plasmatické membrány<sup>30</sup>. Již před mnoha lety byl pozorován pokles membránové fluidity v cholestatických hepatocytech<sup>31</sup>. Nedávno bylo prokázáno, že v tomto procesu mohou hrát významnou roli GSL. U cholestázy indukované 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem dochází ke změnám v lokalizaci GM1 gangliosidu, což bylo prokázáno reakcí s CHT- B. Zatímco v normálních játrech potkana byl GM1 lokalizován v sinusoidálních a kanalikulárních membránách hepatocytů, periferní a střední zóně jaterního lalůčku, u cholestatických vzorků byl prokázán GM1 také v centrální zóně jaterního lalůčku. Navíc se densitometrií při velkém zvětšení ukázal rozdíl v expresi GM1 mezi oblastí sinusoidálního povrchu a oblastí přiléhající cytoplasmy, což bylo způsobeno vzestupem sinusoidálního barvení v centrální zóně lalůčku a poklesem barvení v cytoplasmě periferní zóny. Jak ukázaly regresní analýzy, tyto diference korelují s celkovými žlučovými kyselinami v séru. Jelikož obsah GM1 a mRNA odpovídající GM1 synthase zůstal nezměněn, tak zvýšená exprese GM1 v sinusoidální membráně se při limitované biosyntéze jeví jako záležitost redistribuce GM1 gangliosidu v hepatocytu. Tato redistribuce může být odpovědná za ochranu hepatocytu proti škodlivým vlivům žlučových kyselin, které se hromadí při cholestáze.<sup>32</sup>

## **1.6. Glykosfingolipidy zprostředkovávají svými sacharidovými strukturami interakce s exogenními ligandy**

Glykosfingolipidy se na cílových buňkách účastní vazby některých druhů bakterií, virů či toxinů a vystupují tedy jako počáteční receptory bakteriální či virové infekce<sup>33</sup> (viz tab. 3). Tato strukturní specifita může být využita při detekci glykosfingolipidů či při cíleném ničení nádorových buněk nesoucích příslušný gangliosid. Např. *Clostridium perfringens*  $\delta$  toxin selektivně rozpouští buňky nesoucí GM2 gangliosid. Takové buňky jsou např. buňky melanomu, neuroblastomu, gliomu či retinoblastomu<sup>34</sup>. Funkci receptoru obstarává sialyl- oligosacharidový řetězec nikoliv však ceramid.

Tab. 3: Příklady některých gangliosidových receptorů a jim příslušných ligandů, konkrétně bakterií či toxinů<sup>35</sup>

Exogenní ligandy	Receptor
E. coli	GM3
Helicobacter pylori	GM3, sulfatidy
Clostridium perfringens $\delta$ toxin	GM2
Cholera toxin	GM1
E. coli termolabilní	GM1
Tetanus neurotoxin	GT1b
Botulinum neurotoxin	GT1b

Tato diplomová práce převážně pojednává o specifické a nejvíce prostudované vazbě cholera toxinu na GM1 gangliosid.

- **Cholera toxin**

Cholera toxin se skládá ze dvou typů podjednotek:

1. **A podjednotka**

Jedná se o polypeptid složený ze dvou disulfidicky spojených částí, přičemž tato podjednotka má relativní molekulovou hmotnost přibližně 28000 g/mol.

**A1 fragment** obsahuje enzymatickou a toxickou aktivitu, přičemž vstupuje do cytosolu a způsobuje některá onemocnění. Vstupem do cytosolu dochází ve střevě k sekreci chloridů, které vyvolávají poměrně velké průjemové onemocnění. Mechanismus tohoto toxického působení A1 podjednotky je takový, že A1 podjednotka enzymaticky hydrolizuje NAD. Současně dochází k připojení ADP-ribosy z hydrolizovaného NAD na  $\alpha$  podjednotku G proteinu adenylátcyklasy umístěné na vnitřní straně membrány. Toto připojení zablokuje zpětnou vazbu, při které je GTP, vázaný na G protein, hydrolizován na GDP + Pi. Tímto mechanismem dochází k „uzamknutí“ adenylátcyklasy v aktivní formě. Závěrem dochází ke hromadění cyklického AMP. Toto má za následek těžké průjmy a ztráty tekutin způsobené inhibicí absorpce vody či NaCl buňkami střevních klků a stimulací sekrece vody, chloridů a bikarbonátů z buněk střevních krypt.

**A2 fragment** zodpovídá za vazbu k B podjednotce.

## 2. B podjednotka (pentamer)

Tato část cholera toxinu je netoxická a skládá se z 5 oligomerních proteinových částí, přičemž každá má relativní molekulovou hmotnost přibližně 11600 g/mol. Jedná se o pětičlenný kruhový lektin, který se váže k oligosacharidové složce membránového glykolipidního receptoru GM1 gangliosidu. Z tohoto tvrzení tedy vyplývá, že se tato podjednotka může vázat k 5 molekulám gangliosidu GM1.

Vazba cholera toxinu na GM1 gangliosid je velice pevná, rychlá a poměrně specifická. Pevnost této vazby je dána specifickou pentavalentní interakcí 5 částí B podjednotky k 5 molekulám GM1 na buněčném povrchu.

## **1.7. Glykosfingolipidy jsou markery buněčného povrchu**

Složení glykolipidů je specifické pro určitý buněčný typ. GSL jsou zároveň markery zralosti buněk, přičemž GSL fetálních či nezralých buněk vyžívají během histologické diferenciaci a objevují se nové „zralé“ struktury.

## **1.8. Role glykosfingolipidů při buněčném růstu**

Úloha glykosfingolipidů je rovněž v tzv. „kontaktní odpovědi“, kdy se tyto glykolipidy mohou účastnit kontroly buněčného růstu<sup>36,37</sup>. Bylo pozorováno, že těsně před tím, než se rostoucí buněčná populace zmnoží natolik, že se vytvoří souvislá (konfluentní) tkáňová kultura o vysoké koncentraci, dochází k prodloužení oligosacharidového řetězce glykolipidů, které může souviset se zastavením růstu buněk. U nádorově transformovaných buněk tato kontaktní odpověď pozorována nebyla.

## **1.9. Glykosfingolipidy jako markery nádorové transformace**

Bylo zjištěno, že abnormální genová regulace v nádorových buňkách vede k poruchám normálních cest biosyntézy glykosfingolipidů. Následkem toho může docházet ke změnám v sacharidové části molekuly. Na chemickém základě neexistují „nádorově specifické“ struktury, které by se nikdy a nikde nevyskytovaly ani v malé koncentraci v normální tkáni. Z tohoto hlediska se hovoří o antigenech spojených s nádorovým procesem<sup>38</sup> (TTA- tumor associated antigen).

## **1.10. Úloha glykosfingolipidů v mezibuněčné adhesi**

Některé nádorové antigeny (pokud ne všechny) mohou být identifikovány jako adhesní molekuly. Jelikož nádorové buňky mají velkou expresi těchto antigenů, je zde i vyšší pravděpodobnost interakce se sacharidovými strukturami či lektiny cílových buněk. GSL se podílejí na počínající mezibuněčné adhesi vzájemnou interakcí GSL-GSL či GSL-selektin. Tato adheze může pokračovat trvalejšími vazbami, v nichž se již podílejí integriny či imunoglobuliny a může být zapojena např. v těchto mechanismech: uchycení leukocytu na zánětlivé místo nebo uchycení nádorové buňky na endotel, krevní destičky a jiné buňky, což je základem vzniku nádorových metastas<sup>39</sup>.

## **1.11. Fixace**

Úkolem fixace je, aby zůstala co nejvěrněji zachována histologická struktura. Buněčné metabolické procesy po smrti rychle vedou k autolýze a cílem fixace je zastavení tohoto procesu chemickou fixací, nebo jeho zpomalení zmražením, což vede ke stabilizaci či denaturaci proteinů- katabolických enzymů. Vzhledem k přítomnosti autolytických enzymů v buňce je důležitá rychlost fixace. Tento proces často zvyšuje permeabilitu buněčné membrány, čehož se hojně využívá při barvení buněčných struktur. Námí používaná technika spadá do skupiny chemické fixace, kde se nejčastěji využívá formaldehydu, etanolu, methanolu, acetonu, kyseliny octové či kyseliny pikrové.

## **1.12. Rozpustnost glykosfingolipidů v acetonu**

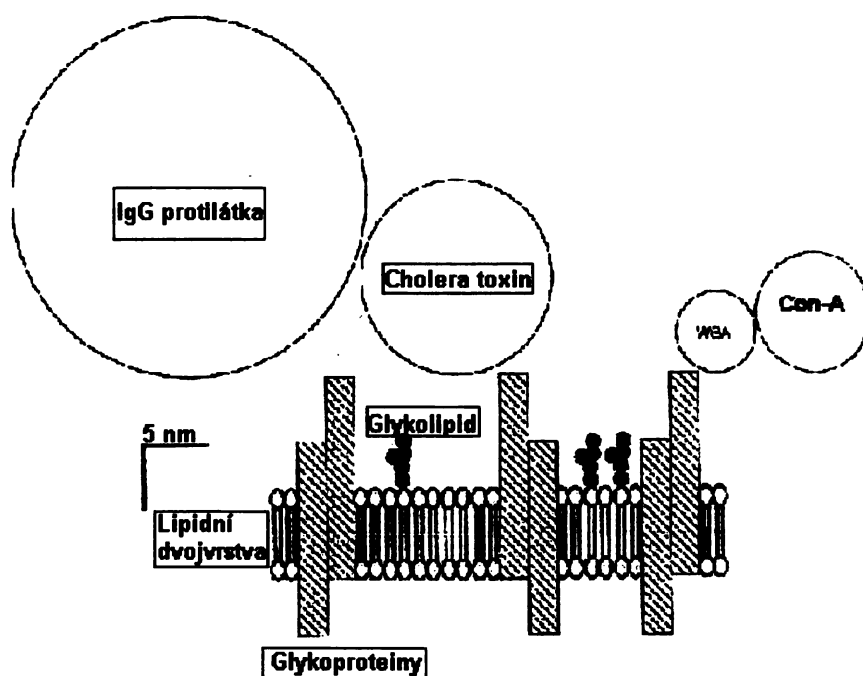
Pro makropreparativní účely byla popsána příprava gangliosidů z acetonového prášku<sup>40</sup>. Tento postup má výhodu v omezení spotřeby rozpouštědel použitých k extrakci tkání. Autorem však nebylo důkladně studováno, jaké jsou ztráty gangliosidů při tomto postupu.

Touto otázkou se zabýval F. Šmíd ve své kandidátské disertační práci<sup>41</sup>, v níž byl zkoumán vliv rozpouštědel na izolaci gangliosidů. Byl zde porovnáván výtěžek gangliosidů z acetonové sušiny z mozkové tkáně s výtěžkem ze stejného množství této tkáně přímo extrahované směsí C:M:V postupem dle Suzukiho<sup>42,43</sup>. Při přípravě acetonového prášku bylo postupováno tak, že malý objem vodného homogenátu byl za stálého míchání rychle vléván do velkého přebytku vychlazeného acetonu. Byla-li konečná koncentrace acetonu

95%, činil výtěžek gangliosidu 70,5%. Při konečné koncentraci acetonu na hodnotu 99% byl výtěžek gangliosidu 80,8% proti přímé extrakci tkáně.

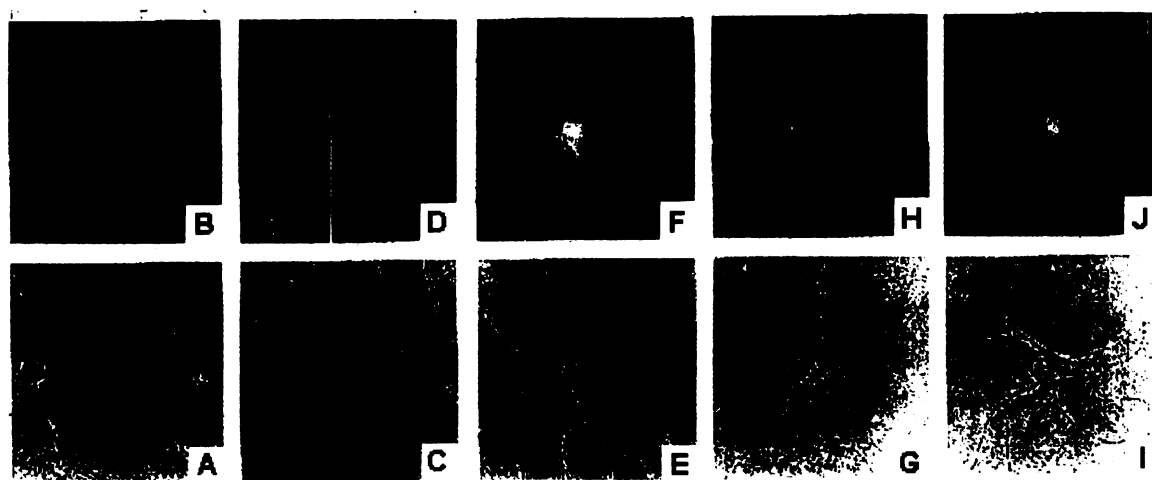
Mnoho vědců studovalo buněčnou lokalizaci užitím anti-gangliosidových protilátek<sup>44</sup> či bakteriálních toxinů. Zjistilo se, že různé fixační techniky tkání vedou k různým výsledkům, a to dokonce při použití stejných protilátek. Gangliosidy jsou nejčastěji fixovány čerstvě připraveným 4% formaldehydem, nebo acetonem.

Detekce různých mozkových gangliosidů byla studována na kryostatových řezech pomocí monoklonálních protilátek třídy IgM Kotanim aj.<sup>45</sup>, kteří si tyto protilátky vyrobili ve vlastní laboratoři, přičemž před samotnou imunodetekcí gangliosidů testovali nefixované, formaldehydem fixované a acetonem fixované řezy. U nefixovaných a formaldehydem fixovaných řezů bylo zřetelné slabší zbarvení. Proto pro další pokusy byla zvolena fixace acetonem při -20°C po dobu 5 minut. Navíc je uváděno, že aceton permeabilizuje buněčné membrány, a tak může „odmaskovat“ glykosfingolipidy, které lze na buněčném povrchu přirovnat k trávnicku mezi keři glykoproteinů. Přístupnost protilátek, cholera toxinu a lektinů ke gangliosidům schematicky znázornil A. Schwarz a A. H. Futerman (viz obr. 14).



Obr. 14: Znázornění přístupnosti glykolipidů protilátkám<sup>52</sup>

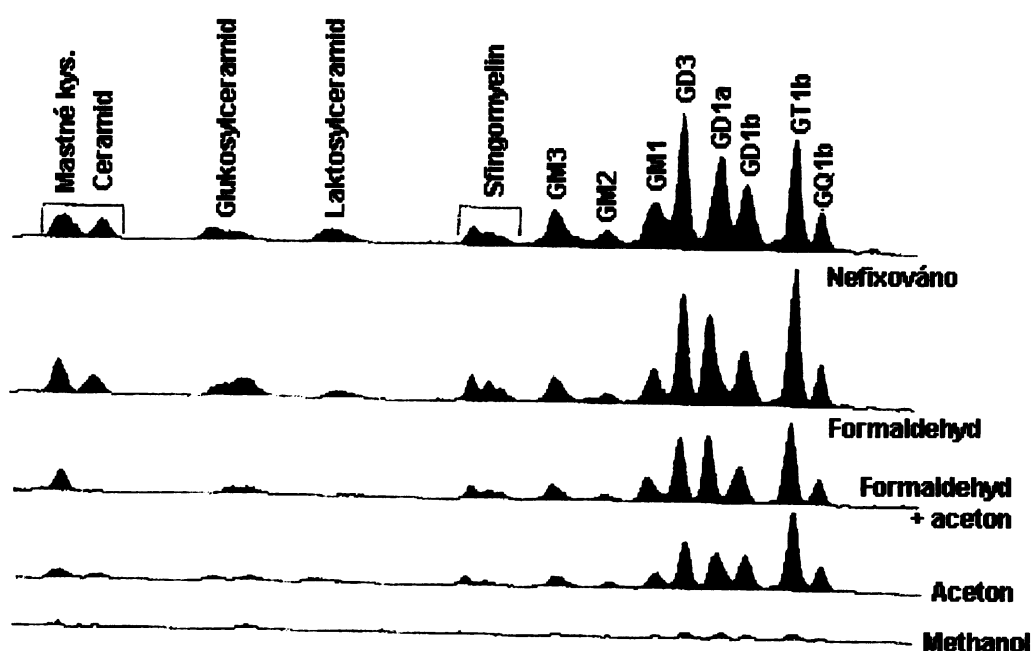
Více detailů týkajících se vlivu různých fixačních technik na přítomnost gangliosidů ve tkáních již publikovali A. Schwarz, A. H. Futerman<sup>44,46</sup>. Konkrétně se jedná o fixaci (A) formaldehydem po inkubaci s protilátkami („post-fixace“), (B) formaldehydem před inkubací s protilátkami („pre-fixace“), (C) formaldehydem a následně fixaci acetonem, (D) samotným acetonem a (E) methanolem. Fixační efekt byl popisován na monoklonálních protilátkách třídy A<sub>2</sub>B<sub>5</sub>, které se váží na různé gangliosidy hipokampálních neuronů. Imunostanovení neuronů po fixaci formaldehydem a následně acetonem ukazuje oproti pre- a post- fixaci značné projasnění buněčných těl axonů a dendritů nervových buněk (viz obr.15).



*Obr. 15: Efekt fixačních metod při vazbě monoklonálních protilátek třídy A<sub>2</sub>B<sub>5</sub> ke kulturám hipokampálních neuronů, které byly staré 7 dnů. Neurony byly fixovány formaldehydem po inkubaci protilátkou (A, B), formaldehydem před inkubací protilátkou (C, D), formaldehydem a acetonem před inkubací protilátkou (E, F), samotným acetonem před inkubací protilátkou (G, H) či methanolem před inkubací protilátkou (I, J). Obrázky A, C, E, G a I jsou mikrofotografie zachycující fázový kontrast, zatímco obrázky B, D, F, H a J ukazují fluorescenční mikrofotografie<sup>46</sup>.*

Ve své publikaci studovali únik gangliosidů při použití různých fixačních roztoků. Nejprve byly sfingolipidy a gangliosidy v neuronech metabolicky označeny [4,5- <sup>3</sup>H]-dihydrosfinganinem a po řádném oprání přebytku [4,5- <sup>3</sup>H]-dihydrosfinganinu byly fixovány fixačními roztoky: formaldehydem před a po imunoreakci, formaldehydem a následně acetonem, samotným acetonem a methanolem. Při této studii bylo pozorováno,

že po působení metanolu [ $^3\text{H}$ ]-GSL téměř vymizely. Při fixaci acetonem klesla hladina buněčně asociovaných [ $^3\text{H}$ ]-gangliosidů ve srovnání s nefixovanými kontrolními buňkami o 56% (obr. 16). Působením formaldehydu a následně acetonu byla hladina [ $^3\text{H}$ ]-gangliosidů snížena o 46%, což je však v kontrastu s jejich vlastním histochemickým pozorováním (viz obrázek 15I a 15J), kde dochází po fixaci formaldehydem a následně acetonem k projasnění těl neuronů a zesílení imunodetekce. Tento pozorovaný jev je autory interpretován jako odmaskování GSL. Při fixaci samotným formaldehydem dochází k poklesu hladiny [ $^3\text{H}$ ]- gangliosidů pouze o 10% (viz. obr.16)



Obr. 16: TLC analýza buněčných [ $^3\text{H}$ ] sfingolipidů a [ $^3\text{H}$ ] gangliosidů po různých fixačních technikách<sup>46</sup>.

Podle studií publikovaných skupinou profesora **Lingwooda** byly odlišné sacharidové epitopy, rozpoznávající glykosfingolipidový globotriaosylceramid ( $\text{Gb}_3\text{Cer}$ ), studovány pomocí verotoxinu a monoklonálních protilátek na lidských ledvinových řezech<sup>47</sup>. Při těchto experimentech bylo pozorováno, že vazba verotoxinu na  $\text{Gb}_3\text{Cer}$  může být částečně blokována cholesterolem. Pro odstranění cholesterolu, který může bránit této vazbě či vazbě cholera toxinu na  $\text{GM1}$  gangliosid<sup>53</sup>, se využívá acetonu nebo metyl- $\beta$ -cyklodextrinů. Podle autorů glykolipidy a membránové fosfolipidy jsou velice málo, pokud vůbec, rozpustné ve vychlazeném acetonu.



K podobným závěrům ohledně lepší přístupnosti protilátek po acetonové fixaci před vlastním imunobarvením dospěla skupina kolem **S. Kusunokiho**. Glykolipidy byly u nervové tkáně po odstranění cholesterolu acetonem více přístupné protilátkám. Konkrétně fixace acetonem u mozkových řezů napomohla přístupnosti fukosyl-GM1 k příslušným protilátkám<sup>48</sup>.

Jelikož závěry prací A. Schwarze, A. H. Futermana<sup>46</sup> a C. Lingwooda<sup>47</sup> jsou v rozporu, pokusil jsem se v následující srovnávací studii o posouzení vlivu fixace acetonem na ztráty gangliosidů v suchých kryostatových histologických řezech z jater potkana.

## **2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Cílem této diplomové práce je zjistit, zda při histochemickém průkazu gangliosidu GM1 na kryostatových řezech dochází při fixaci acetonem oproti fixaci formaldehydem k úniku gangliosidů. Důvodem studia této problematiky je to, že se literární údaje v tomto bodě výrazně rozcházejí. Cílem je i posouzení za jakých podmínek lze tento případný únik minimalizovat.

### **3. MATERIÁL A METODIKA**

### **3.1. Materiál**

Játra ze samic potkanů kmene Wistar

### **3.2. Chemikálie**

Paraformaldehyd- Sigma- Aldrich S38509- 127

Avidin- Fluka 11368

Biotin- Sigma B4501

CHT- B- Sigma C9972

Albumin- Sigma A9085

Streptavidin- peroxidasa polymer - Sigma S2438

DAB tetrahydrochlorid tablets- Sigma D5905

### **3.3. Přístrojové vybavení**

Ultrazvukový homogenizátor- firma Microson XL2000- 010

Centrifuga- firma Beckman GPR

Analytické váhy- GR 202- EC

Předvážky- Kern 572

Třepačka- Edmund Bühler SWIP KM- 2

Mikroskop- Diaplan, Olympus BH- 2

PH metr- TetraCon 325

Magnetická míchačka- Variomag MONO

Densitometr- Camag TLC scanner

Vortex- Genie 2

Fotoaparát- Canon A620

### **3.4. Příprava používaných roztoků**

#### **4% formaldehyd (100 ml)**

4% formaldehyd je nutné připravit podle následujícího postupu vždy čerstvý. 4g paraformaldehydu byly rozpuštěny v 80 ml vody a tato suspenze byla zahřívána za stálého míchání k bodu varu. K tomuto roztoku byl přikapáván 1M NaOH až do úplného rozpuštění paraformaldehydu. Dále bylo přidáno 20 ml 10x PBS a takto vzniklý roztok byl přefiltrován.

### Bezvodý aceton

K 1 litru komerčně dostupného acetonu bylo přidáno 100 – 150 g bezvodého  $\text{CaCl}_2$  a suspenze se nechala několik dní stát v uzavřené nádobě. Poté byla kapalina dekantována a predestilována pod zpětným chladičem. Díky napojené trubici obsahující  $\text{CaCl}_2$  docházelo k odstranění vzdušné vlhkosti. Vzniklý roztok byl uložen v těsně uzavřené baňce.

### 3.5. Porovnání fixace formaldehydem a acetonem

Nativní kryostatové řezy z potkaních jater o tloušťce 6  $\mu\text{m}$  byly 5 minut fixovány čerstvě připraveným 4% formaldehydem, jak uvádí M. Kotani<sup>45</sup>, a suchým acetonem. Vliv fixace bezvodým acetonem na extrakci gangliosidu GM1 z řezů byl testován při době fixace 2 a 15 minut a při fixačních teplotách  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  a  $+25\text{ }^\circ\text{C}$ .

Pro posouzení vlivu vody v acetonu na extrahovatelnost gangliosidu GM1 ze suchých kryostatových řezů byla srovnávána běžně používaná fixace 4% formaldehydem po dobu 5 minut s fixací suchým acetonem a směsí aceton:voda v poměru 9:1 v/v (obojí za podmínek  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  a po dobu 15 minut), viz obr. 22.

### 3.6. Histochemická detekce GM1 gangliosidu

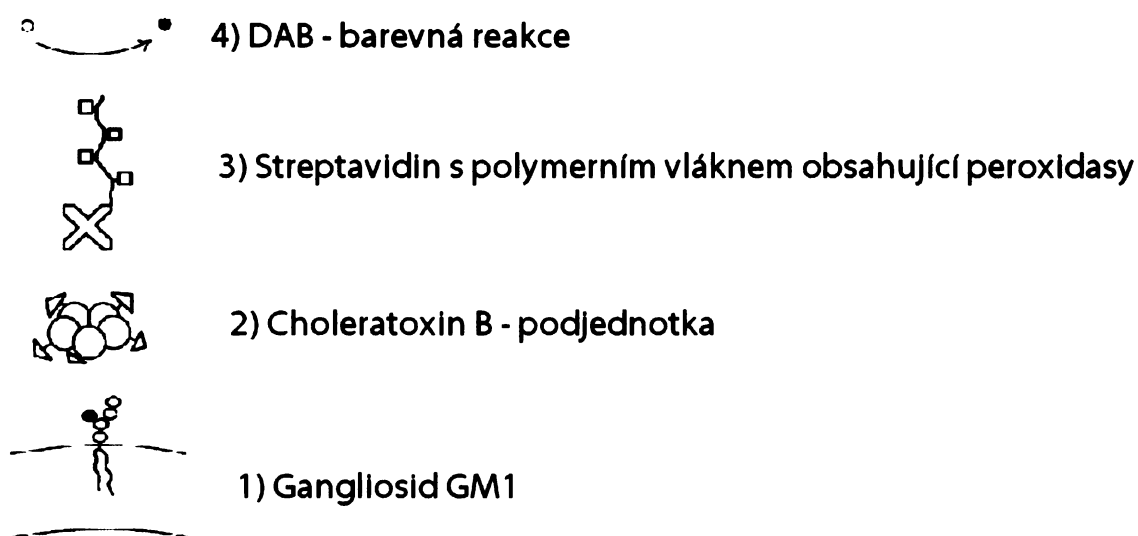
Histochemická detekce GM1 gangliosidu byla prováděna na suchých kryostatových řezech z potkaních jater o tloušťce 6  $\mu\text{m}$ . Řezy fixované acetonem při teplotě  $+25\text{ }^\circ\text{C}$  byly sušeny za laboratorních podmínek, zatímco řezy fixované acetonem vychlazeným na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  byly po fixaci rychle přeneseny do exsikátoru, kde byly sušeny. Sušení bylo použito z důvodu, aby nedocházelo ke kondenzaci vody ze vzdušné vlhkosti na vychlazeném mikroskopickém skle. Řezy fixované formaldehydem byly po důkladném usušení za laboratorních podmínek přeneseny do PBS.

Pro posouzení rozdílů v histologickém barvení různě fixovaných řezů byla zvolena modifikace již dříve vyvinutého a publikovaného postupu<sup>32</sup>. Postup je založen na citlivé a poměrně specifické reakci gangliosidu GM1 s cholera toxinem B- podjednotkou. Na tuto podjednotku cholera toxinu značenou biotinem se navázal komplex streptavidinu s polymerním vláknem obsahujícím peroxidasy. Tímto způsobem se docílilo optimálního zesílení konečné reakce peroxidasy s DAB. Dříve optimalizovaný a publikovaný postup<sup>32</sup> inkubace cholera toxinem B podjednotkou (List Laboratories) v ředění 1:250 při pokojové teplotě a hodinové inkubaci, byl modifikován tak, že z důvodu úspory cholera toxinu bylo

vyzkoušeno ředění 1:500, 1:1000 a 1:2000 s 16,5 hodinovou inkubací v lednici při teplotě kolem 8°C (Sigma). Detekce, která výsledkem odpovídala dříve optimalizovaným podmínkám v ředění 1:250 při pokojové teplotě po dobu jedné hodiny u ChT-B (List Laboratories), byla docílena u ChT- B podjednotky (Sigma) při ředění 1:500. Vlastní posuzování ohledně fixačního vlivu bylo prováděno za použití cholera toxinu B-podjednotky od firmy Sigma.

Vlastní histochemická detekce GM1 se tedy skládala z následujících kroků: endogenní peroxidasová aktivita byla blokována 15 minut 1% peroxidem vodíku v PBS s rozpuštěným 0,1% azidem sodným. Endogenní biotin byl blokován 0,1% avidinem 10 minut, pak 3x opláchnut v PBS po dobu 5 minut a zbytkový avidin byl 10 minut blokován 0,01% biotinem rozpuštěným v PBS. Poté se řezy opět 3x propraly v PBS. Nеспецифické vazebné interakce byly 15 minut blokovány 3% BSA v PBS. Celý tento proces probíhal za stálého třepání na orbitální třepačce při otáčkách 100 cyklů za minutu. Cholera toxin B-podjednotka, která je značená biotinem, byla rozpuštěna v 3% BSA v PBS o koncentraci 1:500. Inkubace probíhala stabilně po dobu 16,5 hodin při teplotě 8 °C. Po promytí v PBS následovala, za stálého třepání, 60 minutová inkubace komplexem streptavidin peroxidasa polymer (Sigma) v PBS v ředění 1:400. Konečná barevná reakce byla završena histochemickým stanovením peroxidasové aktivity pomocí tablet diaminobenzidinu tetrahydrochloridu (Sigma). Tato reakce probíhala ve tmě po dobu 20 minut při laboratorní teplotě (schéma postupu je na obr. 17).

Výsledky mikroskopického pozorování byly fotografovány za konstantních expozičních podmínek.



Obr. 17: Hlavní kroky postupu imunodetekce GM1 gangliosidu. Na GM1 gangliosid se váže cholera toxin B- podjednotka, která je značená biotinem. Na ní se naváže ultrasensitivní streptavidin s polymerním vláknem obsahující peroxidasy. Vlastní barevná reakce je završena pomocí DAB.

### **3.7. Semikvantitativní sledování úniku gangliosidu GM1 po fixaci kryostatových řezů acetonem**

12 kryostatových řezů ze stejného jaterního vzorku potkana o stejné velikosti a tloušťce 6  $\mu\text{m}$  bylo nakrájeno na mikroskopická podložní skla, kde jedno sklo s 12 řezy představovalo jeden vzorek. Řezy na sklech byly následně extrahovány:

- 4 skla byla extrahována 10 minut směsí chloroform:methanol:voda (C:M:V) v poměru 10:10:1 v/v/v za míchání na orbitální třepačce při pokojové teplotě. Tímto způsobem byl stanoven 100% výtěžek gangliosidu GM1.
- 6 skel bylo 15 minut extrahováno bezvodým acetonem při teplotě +25 °C
- 6 skel bylo po předešlé extrakci bezvodým acetonem 10 minut extrahováno směsí C:M:V v poměru 10:10:1 v/v/v
- u dalších 3 skel byla provedena 15 minutová extrakce bezvodým acetonem, vychlazeným na teplotu -20 °C



- 3 skla byla po předešlé extrakci vychlazeným acetonem 10 minut extrahována směsí C:M:V o poměru 10:10:1 v/v/v
- 3 skla byla 15 minut extrahována 90% acetonem vychlazeným na teplotu – 20 °C
- 3 skla byla po předešlé extrakci vychlazeným 90% acetonem extrahována po dobu 10 minut směsí C:M:V v poměru 10:10:1 v/v/v

Všechny extrakty byly odpařeny do sucha v proudu dusíku za mírného zahřívání na teplotu 45°C, a následně rozpuštěny v malém objemu směsi chloroform:methanol o poměru 1:1 v/v. Vzorky byly nanесeny na HPTLC alufolie silikagelu (Merck). Vrstvy byly poté vyvíjeny ve směsi chloroform:methanol:0,2% CaCl<sub>2</sub> o poměru 55:45:10 v/v/v a po vyvinutí byl chromatogram usušen. Poté byla TLC folie rozstřížena, přičemž kontrolní proužek folie byl detekován orcinolovým činidlem a bylo provedeno stanovení pohyblivosti standardu GM1 gangliosidu. Podle výsledku se provedlo zmenšení formátu TLC folie pro následné imunobarvení na nezbytně nutný rozměr z důvodu úspory protilátek. Dále byla vrstva silikagelu impregnována 0,1% polyisobutylmetakrylátem v cyklohexanu po dobu 75 sekund a okraje vrstvy byly zpevněny 1% polyisobutylmetakrylátem. Potom byla provedena detekce GM1 gangliosidu následujícím způsobem. Chromatogram byl ponořen na 15 minut do blokovacího pufru, který byl tvořen 1% BSA v PBS. Dále byl přenesen do roztoku cholera toxinu B- podjednotky v blokovacím pufru na dobu 30 minut při pokojové teplotě. Následně byl chromatogram 5x po 5 minutách prán v lázních s PBS. Pak přišel na řadu opět blokovací pufr po dobu 15 minut, a poté byl na biotin navázán komplex Streptavidin- polymer- peroxidasa po dobu 60 minut. Nenavázaný komplex byl intenzivně oplachován v 6 lázních PBS. Reakcí peroxidasy s roztokem 1- chlornaftol:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v citrátovém pufru o pH= 7,5 vznikl modrý barevný produkt znázorňující GM1 gangliosid. Celý proces imunodetekce se prováděl za míchání na orbitální třepačce (100 cyklů za minutu). Z densitometrického proměření TLC fólie bylo rozpočítáno procentuální zastoupení GM1 v acetonových extraktech a po nich následujících C:M:V extraktech.

### **3.8. Analýza obrazu**

Při hodnocení jednotlivých preparátů byl používán densitometrický program Cue 2 analýzy obrazu firmy Olympus. Byla proměřována průměrná optická densita barvení GM1 na jednotku plochy přes celý preparát. Pracováno bylo při malém zvětšení 40x, a proto jsme mohli proměřit jednotlivé úseky celého řezu. Z měření tak byly vyloučeny pouze trhliny a velké cévy.

### **3.9. Statistické vyhodnocení**

Data jsou prezentována jako medián v rozsahu 25 - 75%. Statistická významnost rozdílů mezi proměnnými byla hodnocena Mann-Whitney Rank Sum testem. Ten se používá v případě, že data nebyla rozložena normálně. Rozdíly byly považovány za statisticky významné pokud  $P \leq 0,05$ . Všechny výpočty byly dělány s použitím softwaru SigmaStat (Jandel Scientific, USA).

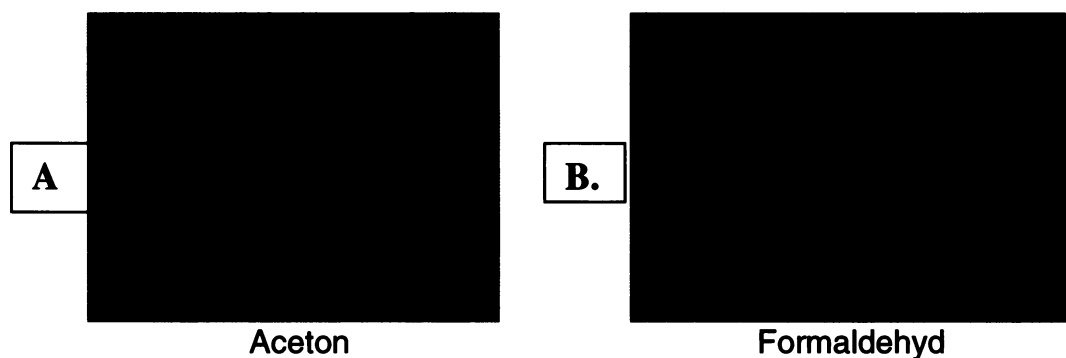
Vztah mezi koncentrací žlučových kyselin v séru a přítomností GM1 gangliosidu byl hodnocen lineárně regresní analýzou.

## **4. VÝSLEDKY**

## **4.1. Porovnání fixace 4% formaldehydem a acetonem a histochemická detekce gangliosidu GM1**

Z důvodů objasnění již zmíněné protichůdnosti publikací Schwarze a Futermana<sup>46</sup> a Charka<sup>47</sup> v otázce úniku gangliosidů při fixaci histologických řezů acetonem, bylo nejprve rozhodnuto provést pokus extrahovatelnosti gangliosidu GM1 ze suchých stejně silných kryostatových řezů ze stejného vzorku potkana.

Pro začátek bylo zvoleno porovnání fixace čerstvě připraveným 4% formaldehydem po dobu 5 minut a fixace acetonem, jenž byl vychlazen na teplotu  $-20^{\circ}\text{C}$  po dobu 2 a 15 minut. Ve výsledku se neukázal žádný pozorovatelný rozdíl v intenzitě zbarvení a lokalizaci GM1 gangliosidu mezi fixací 4% formaldehydem a acetonem vychlazeným na teplotu  $-20^{\circ}\text{C}$  v desetkrát opakovaných experimentech. Z obou vzorků byly pořízeny fotografie ze stejného místa v paralelních řezech za konstantních podmínek, tj. intenzita světla v mikroskopu, clona, expoziční doba či nastavení bílého pozadí (viz obr. 18).



*Obr.18 : Detekce GM1 gangliosidu v kontrolním jaterním vzorku potkana po fixaci:*

*(A) acetonem po dobu 15 minut a při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$*

*(B) běžně používaným a čerstvě připraveným 4% formaldehydem při pokojové teplotě po dobu 5 minut*

*Fotografie byly pořízeny při zvětšení mikroskopu 250x.*

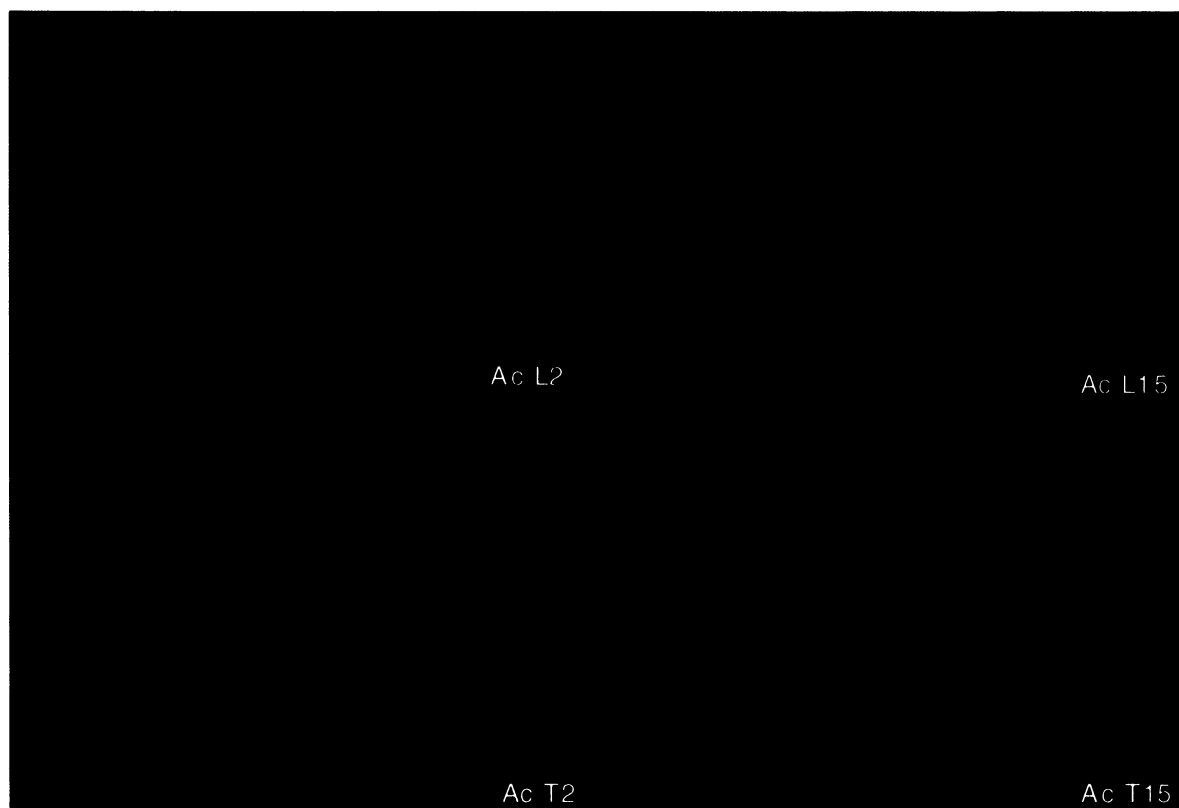
Dále byl vyzkoušen vliv rozdílné teploty acetonu  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $+25^{\circ}\text{C}$  při době fixace 2 a 15 minut. Fixace za těchto podmínek byla srovnávána s fixací čerstvě připraveným 4% formaldehydem po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Použity byly stejně silné suché kryostatové řezy. Detekce gangliosidu GM1 byla provedena opět pomocí velice specifické

reakce GM1 s cholera toxinem B- podjednotkou. Na první dojem se jeví, že formaldehydové fixace se nejvíce podobá fixace vychlazeným acetonem, přičemž z dvou rozdílných fixačních časů se nejvíce přibližovala doba fixace 15 minut. Co se týče intenzity zbarvení, nebyl pozorován žádný výrazný rozdíl. Z obou vzorků byly jako v předešlém případě pořízeny fotografie za konstantních podmínek ze stejného místa, které zmíněné tvrzení dokumentují (viz obr. 19).

**A.**



**B.**



*Obr. 19: Efekt různých fixačních technik.*

*A) běžně používaná fixace 4% formaldehydem (For)*

*B) fixace acetonem za různých podmínek: -20°C a 2 min (AcL2), -20°C a 15 minut (AcL15), +25°C a 2 minuty (AcT2), +25°C a 15 minut (AcT15)*

*Fotografie byly pořízeny při zvětšení mikroskopu 500x.*

Porovnání obsahu GM1 gangliosidu v kontrolních jaterních řezech potkanů kmene Wistar, jež byly fixovány formaldehydem a acetonem, bylo provedeno následovně. Hodnoty z densitometrického vyhodnocení analýzy obrazu u jednotlivých případů byly přepočítány tak, že hodnota ve formaldehydu byla vyjádřena jako 100%. V případě acetonu bylo zjištěno, že u 11 sledovaných preparátů docházelo k mírnému navýšení hodnot, v 5 případech jsou hodnoty formaldehydu a acetonu stejné a v 7 případech dochází u acetonu ke snížení (viz tab. 4).

*Tab. 4: Změny v detekci GM1 gangliosidu při fixaci acetonem oproti fixaci formaldehydem v histologických preparátech z kontrolních zvířat 1-23. Hodnoty optické density barvení GM1 z každého zvířete po fixaci acetonem jsou vztahovány k hodnotě po fixaci formaldehydem (= 100%.)*

	<b>TBA</b> [ $\mu\text{mol/l}$ ]	<b>Aceton</b> [%]
<b>1.</b>	27	112
<b>2.</b>	53	104
<b>3.</b>	6	104
<b>4.</b>	40	119
<b>5.</b>	91	120
<b>6.</b>	60	119
<b>7.</b>	76	122
<b>8.</b>	30	112
<b>9.</b>	19	105
<b>10.</b>	19	127
<b>11.</b>	18	116
<b>12.</b>	30	100
<b>13.</b>	14	100
<b>14.</b>	27	100
<b>15.</b>	13	100
<b>16.</b>	10	100
<b>17.</b>	16	88

<b>18.</b>	70	96
<b>19.</b>	13	95
<b>20.</b>	25	95
<b>21.</b>	33	95
<b>22.</b>	11	91
<b>23.</b>	7	86

**Výsledky Mann-Whitney Rank Sum testu:**

<b>Typ fixace</b>	<b>Počet vzorků</b>	<b>Median</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
Formaldehyd	23	100,0	100,0	100,0
Aceton	23	100,0	95,3	115,0

**P= 0,3**

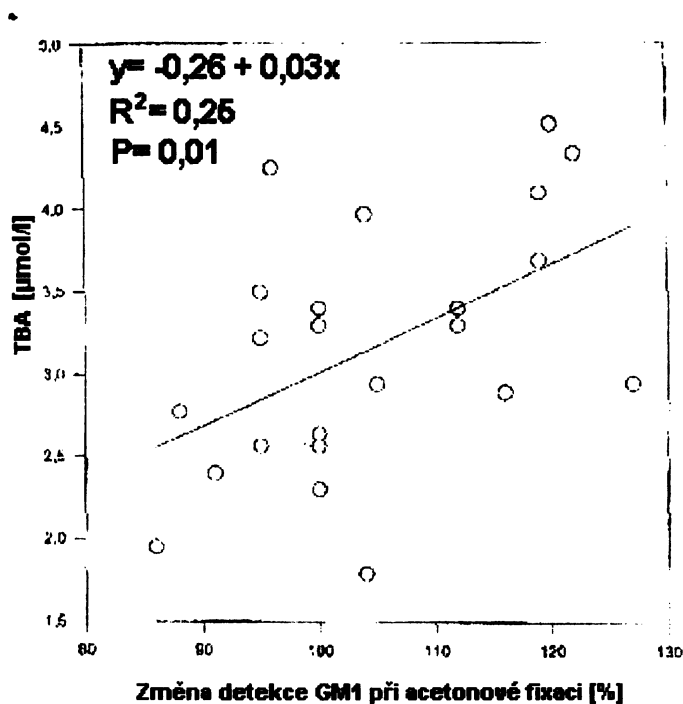
Protože naměřené hodnoty nebyly normálně rozloženy, byl stanoven medián u kontrolní skupiny na hodnotu 100. Naměřené výsledky změny density barvení GM1 po acetonové fixaci oproti fixaci 4% formaldehydem byly nevýznamné (P= 0,3).

**Sledování vlivu koncentrace TBA na densitu barvení GM1**

Jelikož bylo publikováno, že nárůst koncentrace celkových žlučových kyselin (TBA) v krvi může vést k zvýšeným přesunům gangliosidů v rámci jaterního lalůčku i z cytoplasmatické lokalizace do sinusoidální membrány, což bylo zjištěno u intrahepatální cholestázy vyvolané ethinylestardiolem<sup>32</sup>, bylo sledováno i to, zda nastane nějaký vztah mezi TBA a densitou barvení GM1 gangliosidu.

U 23 kontrolních vzorků ukázala regresní analýza lineární závislost s významností P= 0,01 (viz obr. 20).





Obr. 20: Závislost žlučových kyselin na densitě barvení GM1 gangliosidu u kontrolních potkaních vzorků po acetonové fixaci vykazuje po regresní analýze lineární průběh. TBA jsou prezentovány po logaritmické transformaci.

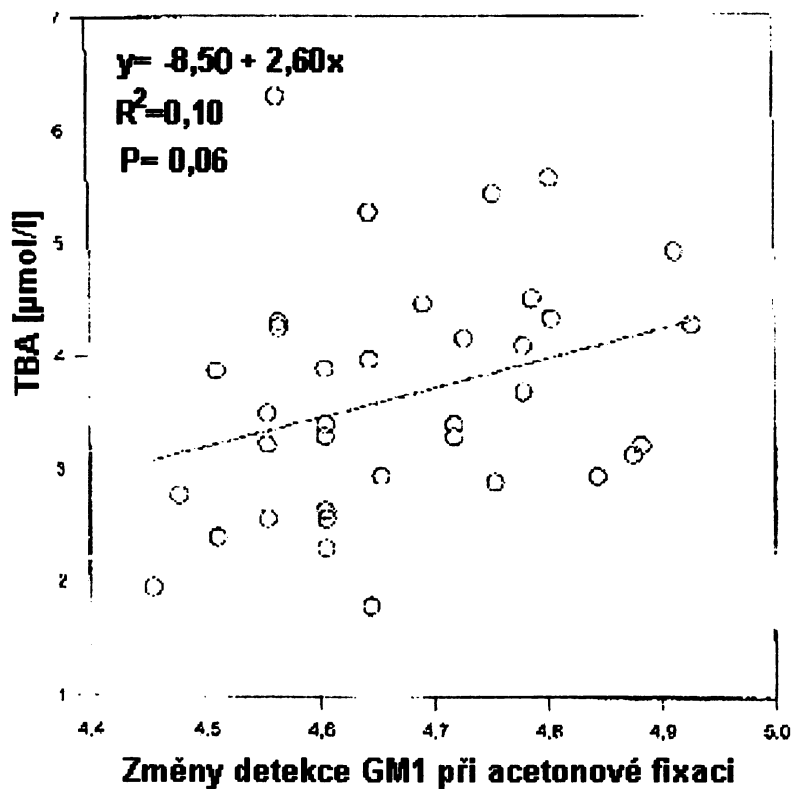
Aby bylo zjištěno více poznatků o vztahu mezi TBA a densitou barvení GM1, byl soubor vzorků rozšířen o jaterní řezy z případů cholestázy indukované EE (5 mg/kg váhy zvířete po dobu 5 a 18 dnů). U těchto případů došlo k výraznému nárůstu TBA v séru zvířat. Hodnoty z analýzy obrazu u cholestatických vzorků jsou v tab. 5.

Tab. 5: Změny v detekci GM1 gangliosidu při fixaci acetonem oproti fixaci formaldehydem (= 100%) u cholestatických vzorků s cholestázou indukovanou EE 5 dní (\*) a 18 dní (\*\*).

	TBA [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Aceton [%]
24.*	25	132
25.*	23	131
26.*	87	109
27.*	64	113
28.*	72	138

<b>29.**</b>	195	104
<b>30.**</b>	137	136
<b>31.**</b>	263	122
<b>32.**</b>	229	116
<b>33.*</b>	49	100
<b>34.*</b>	48	91
<b>35.*</b>	74	96
<b>36.**</b>	543	96

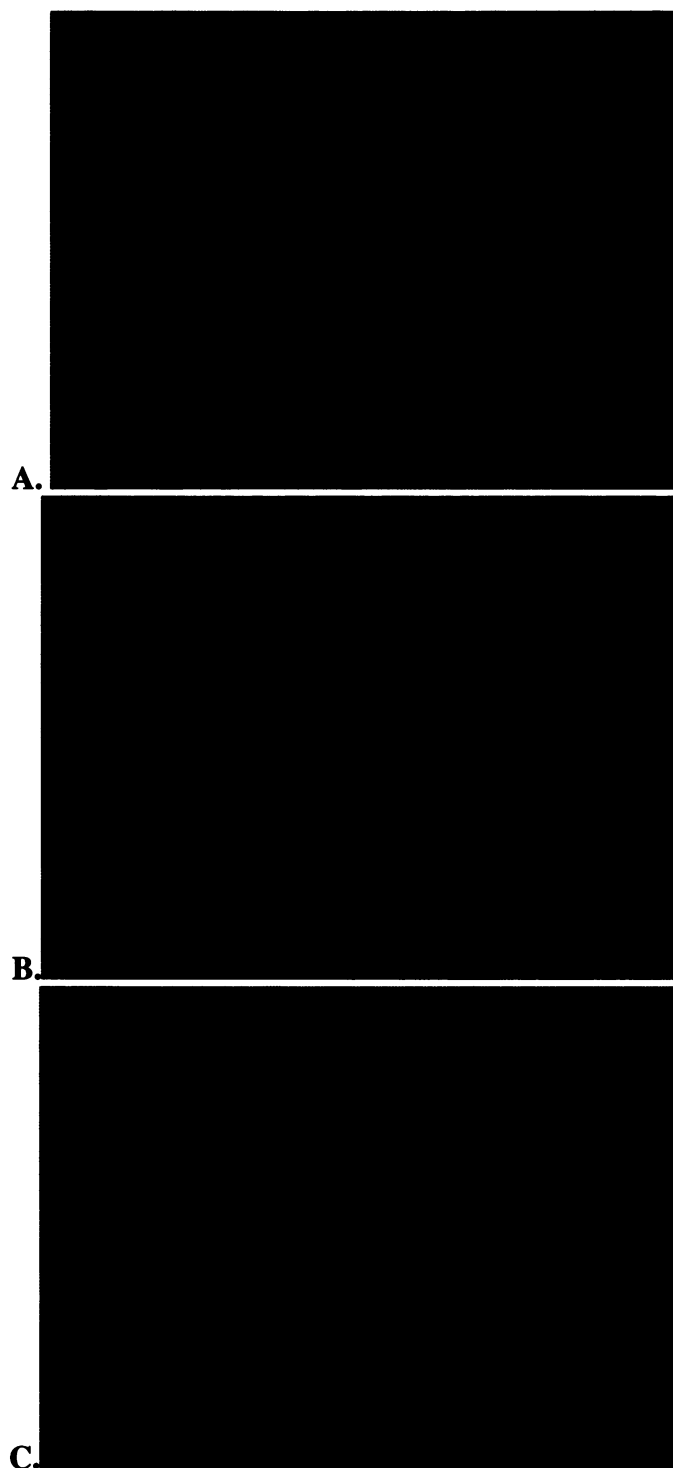
Lineárně regresní analýza vztahu mezi TBA a densitou GM1 po acetonové fixaci u všech vzorků (1 – 36) dosáhla hraniční významnosti ( $P=0,06$ ), viz obr. 21.



Obr. 21: Závislost žlučových kyselin na změně množství GM1 gangliosidu u kontrolních a cholestatických potkaních vzorků po acetonové fixaci. Data jsou na obrázku po logaritmické transformaci.

Rozšíření počtu případů o vzorky z cholestatických jater nevedlo k přesvědčivému důkazu, že existuje spolehlivá závislost mezi TBA a densitou v barvení GM1.

Dále byl studován vliv přídavku vody do acetonu. Kryostatové řezy byly fixovány 90% acetonem po dobu 15 minut. Z obrázku číslo 22 je patrné, že při porovnávání výsledků imunodetekce po formaldehydové fixaci a fixaci bezvodým acetonem dochází pouze k jemným rozdílům v mikrostruktuře a nedochází k difuzi do okolí. Zatímco při porovnání fixace formaldehydem a 90% acetonem dochází k masivnějšímu uvolňování a rozmývání původní lokalizace gangliosidu GM1.



*Obr. 22: Detekce gangliosidu GM1 B- podjednotkou cholera toxinu na řezu z jater potkana po fixaci:*

*(A) formaldehydem za pokojové teploty po dobu 5 minut*

*(B) bezvodým ledovým acetonem po dobu 15 minut*

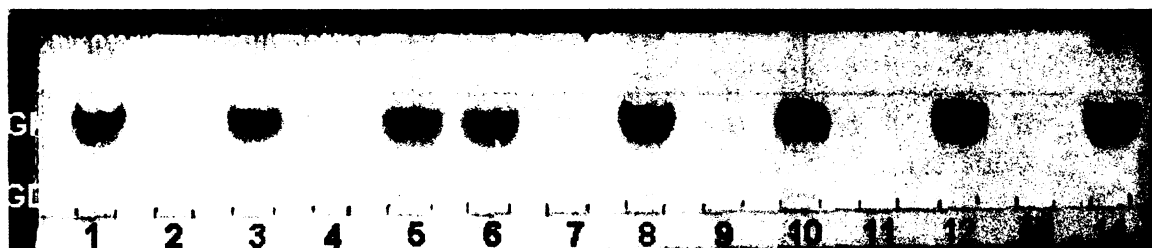
*(C) 90% ledovým acetonem po dobu 15 minut*

*Fotografie byly pořízeny při zvětšení mikroskopu 780x.*

## **4.2. Semikvantitativní sledování úniku gangliosidu GM1 při fixaci kryostatových řezů acetonem**

Za účelem objektivního posouzení extrakce gangliosidu GM1 při fixaci kryostatových řezů acetonem byla provedena extrakce acetonem ze skel s 12 paralelními jaterními řezy potkana a dodatečná extrakce směsí C:M:V. Extrakty byly po zakoncentrování nanесeny na HPTLC folie, na kterých byla provedena detekce GM1 pomocí CHT- B a S- Px- P. Modré zóny znázorňující produkt GM1 vznikly reakcí peroxidasy s 1- chlornaftolem. Kromě dominantních pozitivních zón, znázorňující GM1 gangliosid, se v některých drahách na chromatogramu v blízkosti startu ještě objevuje minoritní zóna znázorňující GD1b gangliosid. Tento gangliosid B série reaguje s CHT- B asi 20x slaběji. Jednotlivé modré zóny GM1 gangliosidu na chromatogramu byly fotograficky dokumentovány (viz obr. 23 a obr. 24) a dále densitometricky proměřeny (viz tab. 6 a 7).

Obrázek chromatogramu č. 23 ukazuje extrahovatelnost gangliosidu GM1 acetonem vychlazeným na teplotu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a acetonem při pokojové teplotě. Z obrázku je patrné, že únik GM1 do acetonu je velmi malý, takže zóna GM1 na drahách 2, 4, 7, 9, 11 a 13 není patrná i při velmi citlivé detekci s ChT-B. Většina GM1 se extrahuje až při dodatečné extrakci směsí C:M:V (dráhy 3, 5, 8, 10, 12 a 14). Tyto zóny GM1 se blíží svojí velikostí a densitou přímé extrakci GM1 směsí C:M:V (dráhy 1 a 6).



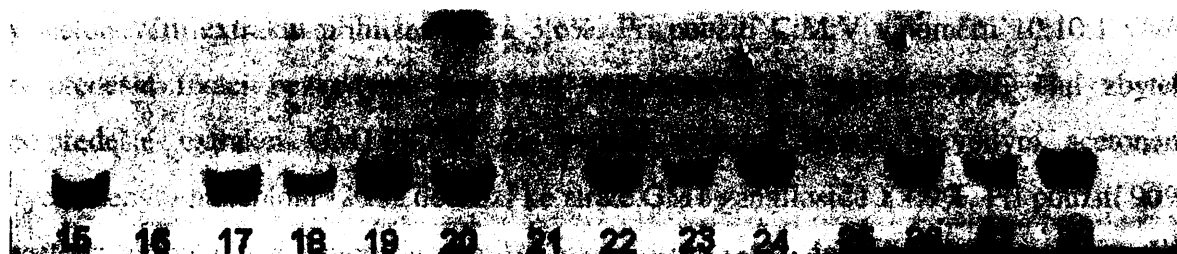
*Obr. 23: Chromatogram extrahovatelnosti gangliosidu GM1 acetonem vychlazeným na teplotu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a acetonem při pokojové teplotě. Jednotlivé dráhy obsahují vzorky: 1 a 6 získané přímou extrakcí C:M:V v poměru 10:10:1 v/v/v při pokojové teplotě a době extrakce 10 min., vzorky 2, 7 a 11 jsou získané extrakcí ledovým suchým acetonem vychlazeným na teplotu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 minut, vzorky 3, 8 a 12 tvoří C:M:V extrakty*

po předešlé extrakci ledovým suchým acetonem; dráhy 4, 9, 13 odpovídají extraktům ze suchého acetonu při pokojové teplotě a době extrakce 15 minut, dráhy 5, 10, 14 náleží C:M:V extraktům získaným po předešlé extrakci suchým acetonem při pokojové teplotě.

Jelikož je densitometrie metoda pouze semikvantitativní, je vyhodnocení výsledků z nepatrných a velkých zón zatíženo samozřejmě chybou. Ve výsledcích byl zjištěn únik gangliosidu GM1 do acetonu dopočítáním z rozdílu celkového C:M:V extraktu a z C:M:V extraktu po předešlé extrakci acetonem. Při výpočtu úniku ze slabých téměř neviditelných zón v acetonových extraktech by byla do tohoto měření zanesena velká chyba. Výsledky densitometrie chromatogramu jsou v tab. 6.

Tab. 6: Výsledky obsahu GM1 gangliosidu v jednotlivých extraktech po různých typech fixace a densitometrickém proměření chromatogramu na obrázku 23.

Typ fixace (extrakce)	Extrakce gangliosidů [%]	Počet experimentů (n)
C:M:V	100,0	n= 2
Bezvodý ledový aceton	1,9	n= 3
C:M:V extrakce po extrakci suchým ledovým acetonem	98,1 ± 12,9	n= 3
Bezvodý aceton při PT	3,8	n= 3
C:M:V extrakce po extrakci suchým acetonem při PT	96,2 ± 10,0	n= 3



Obr. 24: Chromatogram při dalším experimentu extrahovatelnosti gangliosidu GM1 směsí C:M:V, suchým acetonem při pokojové teplotě a zavodněným 90% acetonem při pokojové

teplotě. Jednotlivé dráhy obsahují vzorky: 15 a 20 získané přímou extrakcí C:M:V o poměru 10:10:1 v/v/v a době extrakce 10 minut; vzorky 16, 21 a 25 odpovídají extraktům ze suchého acetonu při pokojové teplotě a době fixace 15 minut, dráhy 17, 22 a 26 demonstrují C:M:V extrakty získané po extrakci suchým acetonem při pokojové teplotě. Pozice 18, 23 a 27 přísluší extrahovaným vzorkům 90% acetonem při pokojové teplotě po dobu 15 minut a dráhy 19, 24, 28 odpovídají C:M:V extraktům po předešlé extrakci 90% acetonu při pokojové teplotě.

Tab. 7: Výsledky obsahu GM1 gangliosidu v jednotlivých extraktech po různých typech fixace a densitometrickém proměření chromatogramu na obrázku 24.

Typ fixace (extrakce)	Extrakce gangliosidů [%]	Počet experimentů (n)
C:M:V	100,0	n= 2
<b>Bezvodý aceton při PT</b>	<b>3,6</b>	<b>n= 3</b>
C:M:V extrakce po extrakci suchým acetonem při PT	96,4 ± 4,6	n= 3
<b>90% aceton při PT</b>	<b>30,5 ± 4,8</b>	<b>n= 3</b>
C:M:V extrakce po extrakci 90% acetonem při PT	69,5 ± 6,7	n= 3

*Pokojová teplota (PT) v době experimentu byla v laboratoři změřena jako 25°C*

Z naměřených hodnot je patrné, že při použití C:M:V v poměru 10:10:1 v/v/v po předešlé fixaci bezvodým acetonem při PT se GM1 extrahuje z 96,2% a 96,4%. Z toho vyplývá, že při fixaci bezvodým acetonem při pokojové teplotě je ztráta GM1 gangliosidu v acetonovém extraktu přibližně 3,8 a 3,6%. Při použití C:M:V v poměru 10:10:1 v/v/v po předešlé fixaci bezvodýma acetonem vychlazeným na teplotu -20°C činí zbytek po předešlé extrakci GM1 98,1%. Za využití samotné fixace bezvodým acetonem vychlazeným na teplotu -20°C dochází ke ztrátě GM1 gangliosidu z 1,9%. Při použití 90% acetonu za pokojové teploty je extrakce gangliosidu GM1 dokonce 30,5% a po použití C:M:V v poměru 10:10:1 v/v/v po předešlé extrakci 90% acetonem za pokojové teploty je zbytek po extrakci GM1 gangliosidu 69,5%.

## **5. Diskuse**



V posledních letech roste zájem o sledování GSL na buněčné a subcelulární úrovni a nabývají na významu mikroskopická a ultramikroskopická pozorování. Například při sledování glykolipidních mikrodomén „raftů“ jsou mikroskopické metody úspěšnější, než izolace detergent resistantních domén ultracentrifugací, protože sám zásah detergentů mění fyziologickou situaci na povrchu buňky<sup>26</sup>.

Při histochemickém průkazu gangliosidů bývá používána acetonová fixace na kryostatových řezech. Na základě srovnání nefixovaných, formaldehydem a acetonem fixovaných řezů bylo konstatováno, že po fixaci acetonem vychlazeným na  $-20^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 minut je barvení gangliosidů intenzivnější, než po formaldehydu nebo na řezech nefixovaných<sup>45</sup> a tkáňová morfolgie je dobře zachována. Další práce užívají podmínky fixace acetonem stejné jako Kotani, avšak bez dalšího bližšího rozboru použitelnosti<sup>49, 50</sup> nebo pouze s prostým konstatováním, že došlo k zlepšení permeabilizace, jak popsal ve své studii S. Kusunoki<sup>51</sup>. Podobně se zmiňují D. Chark aj.<sup>47</sup> z laboratoře profesora Lingwooda o rozpustnosti glykosfingolipidů u řezů z lidské ledvinové tkáně. V této studii se v diskusi uvádí, že ačkoliv jsou glykolipidy a membránové fosfolipidy v ledovém acetonu slabě rozpustné, pokud vůbec, měla by být imunolokalizace GSL po acetonové fixaci interpretována se značnou opatrností. I malá rozpustnost může být dostačující pro difuzi glykosfingolipidů.

K odlišným závěrům dospěli A. Schwarz a A. H. Futerman, kteří ve své přehledné práci<sup>44</sup> konstatují, že různé fixační metody mohou vyústit v odlišné výsledky při vlastní detekci gangliosidů. Později v metodické práci<sup>46</sup> označili metabolicky GSL v buněčné kultuře neuronů [ $4,5\text{-}^3\text{H}$  dihydrosfinganinem]. Po oprání buněk fixovali fixačními roztoky formaldehydu, formaldehydu a acetonu, acetonu či methanolu. Zjistili, že po fixaci acetonem byly [ $^3\text{H}$ ]-gangliosidy redukovány o 56% ve srovnání s kontrolními vzorky. Po formaldehydové a následně acetonové fixaci byly redukovány o 46% a fixace samotným formaldehydem redukovala hladinu takovýchto gangliosidů pouze o 10%. (viz obr 16). S touto analytickou prací poněkud kontrastují výsledky imunohistochemické detekce, při níž zřetelně nejvýraznější detekce gangliosidů byla po fixaci formaldehydem a následně acetonem, nikoliv po fixaci formaldehydové (viz obr. 15) v kapitole 1.12.

Podle předkládaných výsledků demonstrovaných na obrázcích 18 a 19 a podle statistického vyhodnocení analýzy obrazu lze konstatovat, že nebyla zjištěna významná změna v barvení GM1 gangliosidu při fixaci bezvodým acetonem a 4% formaldehydem

u kontrolních řezů potkana. Ve sledovaných histologických preparátech je v některých případech mírně výraznější barvení GM1 po fixaci acetonem. V jiných případech je výsledek stejný a v dalších případech je výraznější barvení GM1 po fixaci formaldehydem. Statistické vyhodnocení ukázalo, že výsledný rozdíl je nevýznamný.

K diskusi ještě zbývá otázka přístupnosti protilátek či bakteriálních ligandů ke glykosfingolipidům. Ty mohou být na buněčném povrchu skryty a maskovány proteiny či sacharidovými částmi glykoproteinů. A. Schwarz a A. H. Futerman ve své publikaci<sup>52</sup> zmiňovali, že lepší přístupnost protilátek ke glykosfingolipidům je připisováno permeabilizaci buněk acetonem. Rozpor v jejich práci nastává v tom, že po fixaci formaldehydem a následně acetonem se ztrácí podle biochemické analýzy 46% gangliosidů, ale přitom imunohistochemická reakce v neuronech je silnější, než po fixaci formaldehydové. To je možné vysvětlit buď permeabilizací buněk právě acetonem, nebo odstraněním cholesterolu. Chark<sup>47</sup> uvádí, že vazba verotoxinu 1B značeného FITC ke glykolipidu globotriaosylceramidu (Gb<sub>3</sub>Cer) se stává zřetelnou až po fixaci acetonem, nebo působením metyl- $\beta$ -cyklodextrinu, které mohou extrahovat cholesterol a steroidy. Profesor Lingwood<sup>53</sup> k této problematice připomíná, že cholesterol může bránit vazbě nejen verotoxinu ke Gb<sub>3</sub>Cer, ale i cholera toxinu ke GM1.

Zároveň se nepotvrdilo, že by v jaterních řezech hrál cholesterol významnou roli v potlačení detekce GM1 ve formaldehydem fixovaných řezech. Výsledky plynové chromatografie u náhodně vybraných kontrolních a cholestatických vzorků jater neukázaly výrazný rozdíl v analytických hodnotách cholesterolu. Ani histochemická detekce GM1 nevykazovala výrazné rozdíly. Z toho usuzuji, že odstranění cholesterolu u jaterní tkáně není naléhavě nutné, jak je to popisováno ve většině doposud publikovaných prací. Tyto práce však byly dělány na mozkové tkáni<sup>45,52</sup>, mozkových buňkách<sup>46</sup> nebo řezech z ledvin<sup>47</sup>, takže je možné, že ve tkáních zkoumaných těmito autory mohl být obsah cholesterolu vyšší, a tím jeho úloha v potlačení imunodetekce významnější.

Chromatografická analýza s následným densitometrickým vyhodnocením po detekci na TLC ukázala, že ztráty gangliosidu GM1 po acetonové fixaci jsou kolem 4%. Vysvětlení rozdílů našich výsledků od výsledků Schwarze a Futermana<sup>46</sup>, kde uvádí po acetonové fixaci ztrátu 56%, mohou být v tom, že v našich experimentech byl použit bezvodý aceton při fixaci suchých kryostatových řezů, kdežto oni fixovali buněčnou kulturu neuronů. Uvnitř neuronů se nachází voda a v takovémto vodném nitrobuněčném prostředí muselo nutně docházet k postupnému nárůstu koncentrace acetonu od nulové

do vysoké koncentrace, a tudíž docházelo k úniku gangliosidů do acetonu s vodou. Tuto možnost potvrzují i předkládané výsledky, podle nichž 10% vody v acetonu extrahovalo gangliosid GM1 ze 30,5%. Navíc zmínění autoři pravděpodobně nepoužili bezvodý aceton, alespoň to neuvádějí. Vysvětlení je ovšem hlavně ve vodném obsahu buněčných kultur ve srovnání se suchými kryostatovými řezy.

V souhlase s tím jsou i výsledky F. Šmída<sup>41</sup>, který uvádí ztráty při přípravě gangliosidů z acetonové sušiny. Při vlévání vodného homogenátu do 95% acetonu je ztráta asi 30% a asi 20% při 99% koncentraci acetonu.

Při fixaci acetonem na histologických řezech je dodržení bezvodosti acetonu a suchých řezů nejdůležitější podmínkou. Dokonce při použití vychlazeného acetonu je nutné rychle přendat řezy na chladných sklech do exikátoru, aby se zabránilo rozmytí gangliosidů vlivem vysrážení vzdušné vlhkosti. Jako méně důležité se jeví použití různých teplot acetonu a délky fixace. Při použití ledového acetonu může fixace trvat i 15 minut, avšak při použití teplého acetonu dochází k mírnému zvýraznění reakce a zároveň k lehké difuzi barevného produktu.

Difuze GM1 gangliosidu z buněčných membrán do okolí je v optickém mikroskopu stěží pozorovatelná, pokud je použit při fixaci suchých kryostatových řezů bezvodý aceton. Při 10% obsahu vody v acetonu ovšem difuze gangliosidu patrná je.

## **6. Závěr**

Histochemický průkaz GM1 gangliosidu na základě reakce B- podjednotky cholera toxinu neukázal na jaterních řezech z potkana statisticky významné rozdíly v densitě barvení GM1 po fixaci acetonem a 4% formaldehydem. Analýza obrazu ukázala mírné kolísání hodnot denzity na obě strany a možnou mírnou permeabilizaci.

Na rozdíl od výsledků popisovaných na mozkové tkáni, kde extrakce acetonem může vést k rozpouštění cholesterolu, a tím k zviditelnění či zaostrění reakčního produktu, výsledky na jaterních řezech neukázaly zřetelný rozdíl v densitě zbarvení GM1 gangliosidu.

Mikroskopická pozorování jsme se snažili dokázat i analyticky pomocí extrakce kryostatových jaterních řezů potkana acetonem za různých podmínek, následnou tenkovrstevnou chromatografií, imunobarvením a densitometrií. Semikvantitativním sledováním úniku GM1 gangliosidu do acetonu jsme zjistili, že hraje velkou roli vodnatost používaného acetonu. Při použití bezvodého acetonu při teplotě +25°C a době fixace 15 minut dochází k extrakci gangliosidů maximálně kolem 4 %. K významným rozdílům ve výsledcích dochází při použití 90% acetonu, kde se ztrácí přibližně 30,5% gangliosidu GM1. Z toho vyplývá, že nejdůležitější podmínkou pro minimální extrahovatelnost gangliosidů je použití bezvodého acetonu a suchých kryostatových řezů. Doba a teplota fixace nehrají tak důležitou roli.

Navíc se nám podařilo nalézt vysvětlení rozdílů mezi našimi výsledky a výsledky A. Schwarze a A. H. Futermana <sup>46</sup>, které jsou v tom, že v našich experimentech bylo použito suchých kryostatových řezů a suchého acetonu. Při jejich experimentech byly použity buňky obsahující vodu a při stoupající koncentraci acetonu od nuly muselo docházet k extrakci gangliosidů zavodněným acetonem.

## **7. Literatura**

- 
- <sup>1</sup> Kolter, T., Proia R. L., Sandhoff, K., *J. Biol. Chem.*, 277, 25859 - 25862 (2002)
  - <sup>2</sup> Bláha, K., Košťář, J., Michalec, Č., Ranný, M., *Chem. listy* 81, 715 - 748 (1987)
  - <sup>3</sup> Svennerholm, L., *J. Neurochem.*, 10, 613 - 623 (1963)
  - <sup>4</sup> Holmgren, J., Svennerholm, L., Elving, H., Fredman, P., Shannegard, O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1947 (1980)
  - <sup>5</sup> Braun, P., E., Schnell, E., E., *J. Biol. Chem.*, 243, 3577 – 3583 (1968)
  - <sup>6</sup> Stoffel, W., Le Kim, D., Stich, G., *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 349, 664 – 670 (1968)
  - <sup>7</sup> Mandon, E., C., van Echten, G., Birk., R., Schmidt, R. R., Sandhoff, K., *Eur. J. Biochem.*, 198, 667 – 674 (1991)
  - <sup>8</sup> Mandon, E., C., Ehses, I., Rother, J., van Echten, G., Sandhoff, K., *J. Biol. Chem.*, 267, 11144 – 11148 (1992)
  - <sup>9</sup> van Echten, G., Herget, T., *Biochim. Biophys. Acta*, 12, 1978-94 (2006)
  - <sup>10</sup> Basu, M., De, T., Das, K. K., Kyje, J. W., Chon, H. C., Schaeper, R. J., Basu, S., *Methods Enzymol.*, 138, 575 – 607 (1987)
  - <sup>11</sup> Schwarzmann, G., Sandhoff, K., *Biochemistry*, 29, 10865 – 10871 (1990)
  - <sup>12</sup> Carey, D. J., Hirschberg, C. W., *J. Biol. Chem.*, 256, 989 – 993 (1981)
  - <sup>13</sup> Trinchiera, M., Fabbri, M., Ghidoni, R., *J. Biol. Chem.*, 226, 20907 – 20912 (1991)
  - <sup>14</sup> Steinman, R.M. Mellman, I.S., Muller, W.A., and Cohn, Z.A., *Cell Biol.*, 96 (1983)1-27
  - <sup>15</sup> Pagano, R.E., *Curr. Opinion Cell Biol.*, 2, 652-663(1990)
  - <sup>16</sup> Tettamanti, G., Masserini, M., Giuliani, A., Pagani A., *Ann. Inst. Super. Sanita*, 24, 23 - 32 (1988)
  - <sup>17</sup> Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V., Prinetti, A., *Glycobiology*, 17, 1R – 13R, (2006)
  - <sup>18</sup> Kuikka, M., Ramstedt, B., Ohvo – Rekilä, H., Tuuf, J., Slotte, J. P., *Biophys. J.*, 80, 2327–2337 (2001)
  - <sup>19</sup> Pascher, J., *Biochim. Biophys. Acta*, 455, 433 – 451 (1976)
  - <sup>20</sup> Harris, P. L., Thorton, E. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 6738 – 6745 (1978)
  - <sup>21</sup> Hakomori, S., *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 733 – 764 (1981)
  - <sup>22</sup> Czarnietzki, M. F., Thorton, E. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 8273 – 8278 (1977)
  - <sup>23</sup> Hakomori, S., *Ann. Brazil. Acad. Sci.*, 76, 553 – 572 (2004)

- 
- <sup>24</sup> Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: *Základy buněčné biologie, Úvod do molekulární biologie buňky*, Espero Publishing, Ústí nad Labem, str. 355 (1998)
- <sup>25</sup> Ohvo-Rekilä H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte J.P., *Prog. Lipid. Res.*, 41, 66 – 97 (2002)
- <sup>26</sup> Pike, L., *Biochem. J.*, 378, 281 - 292 (2004)
- <sup>27</sup> Simons, K., Ikonen, E., *Nature*, 387, 569 - 572 (1997)
- <sup>28</sup> Brown, D. A., London, E., *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 14, 111 - 136 (1998)
- <sup>29</sup> Simons, K., Toomre, D., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 1, 31 - 39 (2000)
- <sup>30</sup> van Meer, G., Lisman, Q., *J. Biol. Chem.*, 277, 25855-25858 (2002)
- <sup>31</sup> Balistreri, W. F., Leslie, M. H., Cooper, R. A., *Pediatrics*, 67, 461 – 466 (1981)
- <sup>32</sup> Jirkovská, M., Majer, F., Šmídová, J., Stříteský, J., Shaik, G. M., Dráber, P., Vítek, L., Mareček, Z., Šmíd, F., *Glycoconj. J*, 24, 231 – 241 (2007)
- <sup>33</sup> Karlsson, K. A., *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 309 – 350 (1989)
- <sup>34</sup> Jolivet- Reynaud, C., Estrade J., West, L. A., Alouf, J. E., Chedid, L., *Anticancer Drugs*, 4, 65 (1993)
- <sup>35</sup> Schengrund, C., *Biochem. Pharmacol.*, 65, 699 – 707 (2003)
- <sup>36</sup> Hakomori, S., *Ann. Rev. Biochem*, 50, 733 (1981)
- <sup>37</sup> Hakomori, S., Kannagi, R., *J. Natl. Cancer. Inst.*, 71, 231 (1983)
- <sup>38</sup> Hakomori, S.: Tumor associated carbohydrate markers, In *Serological cancer markers*, Sell, S. (ed), The Human Press, Tootwa NJ, USA, str. 207 – 232 (1992)
- <sup>39</sup> Hakomori, S., *Brain Res.*, 101, 241 – 249 (1994)
- <sup>40</sup> Kanfer, J. N., *Methods Enzymol.*, 14, 660 – 664, (1969)
- <sup>41</sup> Šmíd, F.: Gangliosidy – izolace, separace, využití: Kandidátská disertační práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 71 – 74 (1991)
- <sup>42</sup> Suzuki, K., *J. Neurochem.*, 12, 629 – 638 (1965)
- <sup>43</sup> Suzuki, K., *Life Sci.*, 3, 1227 – 1233 (1964)
- <sup>44</sup> Schwarz, A., Futerman, A. H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1286, 247 - 267 (1996)
- <sup>45</sup> Kotani, M., Kawashima, I., Ozawa, H., Terashima, T., Tai, T., *Glycobiology*, 3, 137 – 146 (1993)
- <sup>46</sup> Schwarz, A., Futerman, A. H., *J. Histochem. Cytochem.* 45, 611-618 (1997)



- 
- <sup>47</sup> Chark, D., Nutikka, A., Trusevych, N., Kuzmina, J., Lingwood, C., *Eur. J. Biochem.*, 271, 405-417 (2004)
- <sup>48</sup> Kusunoki, S., Chiba, A., Shimizu, T., Kanazawa, I., *Biochim. Biophys. Acta*, 1214, 27 – 31 (1994)
- <sup>49</sup> Furuya, S., Irie, F., Hashikawa, T., Nakazawa, K., Kozakai, A., Hasegawa, A., Sudo, K., Hirabayashi, Y., *J. Biol. Chem.*, 269, 32418 – 32425 (1994)
- <sup>50</sup> Furuya S., Hashikawa T., Irie F., Hasegawa A., Nakao T and Hirabayashi, Y., *Neurosci. Res.*, 22, 411-421 (1995)
- <sup>51</sup> Kusunoki S., *Brain Res.*, 623, 83 – 88 (1993)
- <sup>52</sup> Schwarz, A., Futerman, A. H., *Methods Enzymol.*, 312, 179 – 187 (2000)
- <sup>53</sup> Lingwood, C., Mahfoud, R., *Satellite Meeting of XVIII International Symposium on Glycoconjugates, Siena, Italy* (2005)
- <sup>52</sup> Kotani, M., Kawashima, I., Ozawa, H., Ogura, K., Ishizuka, I., Terashima, T., Tai, T., *Glycobiology*, 4, 855 – 865 (1994)

---

**„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>