UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Gangliosidy v játrech u cholestázy indukované podvázáním žlučovodu

Liver gangliosides in cholestasis induced by bile duct ligation

Diplomová práce

Ing. Barbora Hynková

Praha, 2010

Práce byla vypracována v Hepatologické laboratoři Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty UK za podpory grantu IGAMZ

Školitelé: Doc. RNDr. František Šmíd, CSc.
Doc. RNDr. František Novák, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Františka Šmída, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum: Podpis:

Poděkování

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr Františku Šmídovi, CSc. za jeho vysoce odborné vedení, podporu a nesmírnou ochotu, kterou mi poskytoval po celou dobu zpracování této práce. Dále děkuji Mgr. Tomáši Petrovi a 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.

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 žlučovodů 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 17α– ethinylestradiolem, ale nárůst gangliosidů *b*-série je v naší studii mírnější.

Dále tato práce zkoumala vliv modulace aktivity hemoxygenasy 1 (HO-1) při cholestáze vyvolané podvazem žlučovodů (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 složení gangliosidů zůstalo nezměněno. U skupin zvířat s heminem aktivovanou HO-1 nebyla zvýšená celková lipidně vázaná kyselina sialová, ani nebyly zjištěny změny ve složení gangliosidů.

Exprese GD3 synthasy jako klíčového enzymu v biosyntéze gangliosidů *b*-série nebyla ovlivněna při cholestáze, ale 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 17α– 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 cholestatic rats (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 without significant changes in gangliosides composition. Lipid sialic acid and gangliosides were not changed in animals with hemine activated HO-1.

Expression of mRNA of key enzyme in biosynthesis *b*-series gangliosides, GD3 synthase was not affected by cholestasis but significantly increased in Sn-mesoporphyrin treated animals.

„ (In Czech)“

Obsah

Seznam zkratek 8
1.Úvod- Současný stav řešené problematiky 9
1.1. Glykosfingolipidy 10
1.2. Názvosloví glykosfingolipidů podle IUPAC- IUB 11
1.3. Biosyntéza glykosfingolipidů 13
1.3.1. Biosyntéza gangliosidů gangliosérie 14
1.3.2. Biosyntéza glykosfingolipidů lakto- a neolakto- série 15
1.3.3. Regulace biosyntézy 15
1.4. Chemické vlastnosti gangliosidů 18
1.4.1. Prostorová konformace molekuly gangliosidů 18
1.4.2. Amfifilní vlastnosti gangliosidů 19
1.5. Molekulárně- fyziologická úloha glykosfingolipidů v biologických membránách 19
1.6. Žlučový systém 20
1.7. Hepatocyt a tvorba žluči 20
1.8. Cholestáza 21
1.9. Gangliosidy u cholestázy indukované ethinylestradiolem 23
1.10. Histologické změny v lokalizaci gangliosidů u cholestázy indukované ethinyl-estradiolem a cholestázy indukované podvázáním žlučovodů 25
1.11. Význam hemoxygenasy v hepatoprotekci 26
2. Cíl diplomové práce 29
3. Materiál a metodika 30
3.1. Materiál 30
3.1.1. Biologický materiál 30
3.1.2. Chemikálie 30
3.1.3. Používané roztoky 31
3.1.4. Přístrojové vybavení 31
3.2. Metodika 31
3.2.1. Experiment na zvířatech 31
3.2.2. Izolace gangliosidů 32
3.2.3. TLC gangliosidů 35
3.2.4. Denzitometrické vyhodnocení TLC chromatogramu 35
3.2.5. Fotometrické stanovení celkové kyseliny sialové 35

3.2.6. Stanovení exprese mRNA pro GD3 synthasu (SAT-2) 36
3.2.7. Statistická analýza 37
4. Výsledky 38
4.1. Jaterní testy 38
4.2. Stanovení celkové lipidně vázané kyseliny sialové 41
4.3. Vyhodnocení TLC chromatogramů 42
4.4. Stanovení exprese mRNA pro GD3 synthasu 47
5. Diskuse 49
6. Souhrn 57
7. Seznam použité literatury 58

Seznam zkratek

ALP- alkalická fosfatasa

ALT- alaninaminotransferasa

AST- aspartátaminotransferasa

BSEP- bile- salt export pump

CŽK- celkové žlučové kyseliny

cMOAT- canalicular multispecific organic-anion transporter

EE- 17 α-ethinylestradiol

GalT- galaktosyltransferasa

GalNAcT 1- N-acetylgalaktosamintransferasa 1

GlcT- glukosyltransferasa

GMT- γ- glutamyltranspeptidasa

GSL- glykosfingolipid

HO-1- hemoxygenasa 1

HO-2- hemoxygenasa 2

HO-3- hemoxygenasa 3

HPTLC- tenkovrstvá chromatografie s vysokým rozlišením

CH- chloroform

M- methanol

MDR 1- multidrug resistance P glycoprotein 1

MDR 3- multidrug resistance P glycoprotein 3

MRP-2- multidrug resistance associated protein

NeuNAc- kyselina N-acetylneuraminová

NTCP- Na/Taurocholate cotransporting polypetide, 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

SAT-2- sialyltransferasa 2

SAT-3- sialyltranferasa 3

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[1]. 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[2]. A právě gangliosidům je připisována schopnost zpevňování 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 zpevňování vnější vrstvy plazmatické membrány.

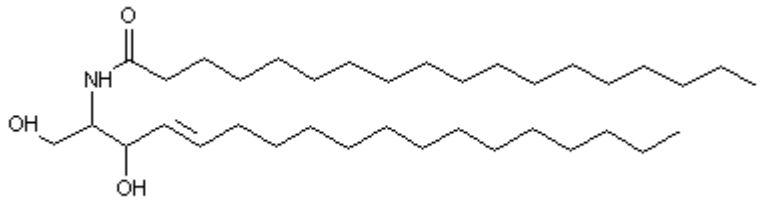
Podobně jsou v této diplomové práci u cholestázy indukované podvazem chromatografické analýzy spolu se stanovením mRNA příslušných glykosyltrasferas dávány do souvislosti s histologickými nálezy, popisovanými v diplomové práci Václava Šmída, obhájené na 1.LF UK[3].

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

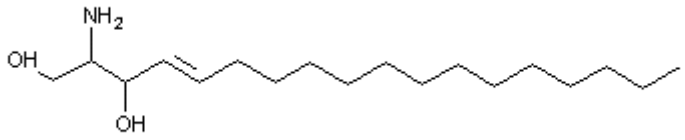
1.1. Glykosfingolipidy

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, D-N-glukosaminu a D-N-galaktosaminu. Monosacharidové jednotky mohou být α- i β- 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 deriáty vázané na aminoskupinu nebo hydroxyskupinu.

Glykosfingolipidy je tedy bohatá skupina 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, D-N-glukosamin a D-N-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[4,5]

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- a gala-

Tab. 1: Série glykosfingolipidů a jejich strukturní motivy

Série	**Strukturní motiv glykosylu**
globo-	Gal(α1→4)Gal(β1→4)Glc-
muko-	Gal(β1→4)Gal(β1→4)Glc-
lakto-	GlcNAc(β1→3)Gal(β1→4)Glc-
ganglio-	GalNAc(β1→4)Gal(β1→4)Glc-
gala-	Gal(α1→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 subtituent , používá se také pro popis větvení oligosacharidového řetězce
- specifikace anomerních struktur sacharidů (α-, β-)

Tab.2: Názvosloví glykosfingolipidů dle IUPAC- IUB[4,5]

Struktura	**Triviální název**	**Symbol (zkrácený symbol)**
Gal(α1→4)Gal(β1→4)GlcCer	globotriaosylceramid	$GbOsa_3Cer$ (Gb_3Cer)
GalNAc(β1→3) Gal(α1→4)Gal(β1→4)GlcCer	globotetraosylceramid	$GbOsa_4Cer$ (Gb_4Cer)
Gal(α1→3)Gal(β1→4)GlcCer	isoglobotriaosylceramid	$iGbOsa_3Cer$ (iGb_3Cer)
GalNAc(β1→3) Gal(α1→3)Gal(β1→4)GlcCer	isoglobotetraosylceramid	$iGbOsa_4Cer$ (iGb_4Cer)
Gal(β1→4)Gal(β1→4)GlcCer	mukotriaosylceramid	$McOsa_3Cer$ (Mc_3Cer)
Gal(β1→3)Gal(β1→4)Gal(β1→4)GlcCer	mukotetraosylceramid	$McOsa_4Cer$ (Mc_4Cer)
GlcNAc(β1→3)Gal(β1→4)GlcCer	laktotriaosylceramid	$LcOsa_3Cer$ (Lc_3Cer)
Gal(β1→3) GlcNAc(β1→3)Gal(β1→4)GlcCer	laktotetraosylceramid	$LcOsa_4Cer$ (Lc_4Cer)
Gal(β1→4) GlcNAc(β1→3)Gal(β1→4)GlcCer	neolaktotetraosylceramid	$nLcOsa_4Cer$ (nLc_4Cer)
GalNAc(β1→4)Gal(β1→4)GlcCer	gangliotriaosylceramid	$GgOsa_3Cer$ (Gg_3Cer)
Gal(β1→3) GalNAc(β1→4)Gal(β1→4)GlcCer	gangliotetraosylceramid	$GgOsa_4Cer$ (Gg_4Cer)
Gal(α1→4)GalCer	galabiosylceramid	$GaOsa_2Cer$ (Ga_2Cer)
Gal(β1→4)Gal(α1→4)GalCer	galatriaosylceramid	$GaOsa_3Cer$ (Ga_3Cer)

Pro značnou jednoduchost se u gangliosidů často používá názvosloví podle Svennerholma[6,7]. 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 [6,7]

Zkratka dle Svennerholma	Struktura gangliosidu
GM4	Neu5AcGalCer
GM3	Neu5Acα3Galβ4GlcCer
GM2	GalNAcβ4(Neu5Acα3)Galβ4GlcCer
GM1a	Galβ3GalNAcβ4(Neu5Acα3)Galβ4GlcCer
GM1b	Neu5Acα3Galβ3GalNAcβ4Galβ4GlcCer
GD3	Neu5Acα8Neu5Acα3Galβ4GlcCer
GD2	GalNAcβ4(Neu5Acα8Neu5Acα3)Galβ4GlcCer
GD1a	Neu5Acα3Galβ3GalNAcβ4(Neu5Acα3)Galβ4GlcCer
GD1b	Galβ3GalNAcβ4(Neu5Acα8Neu5Acα3)Galβ4GlcCer
GT1a	Neu5Acα8Neu5Acα3Galβ3GalNAcβ4(Neu5Acα3)Galβ4GlcCer
GT1b	Neu5Acα3Galβ3GalNAcB4(Neu5Acα8Neu5Acα3)Galβ4GlcCer
GT1c	Galβ3GalNAcβ4(Neu5Acα8Neu5Acα8Neu5Acα3)Galβ4GlcCer
GQ1b	Neu5Acα8Neu5Acα3Galβ3GalNAcβ4(Neu5Acα8Neu5Acα3)Galβ4GlcCer

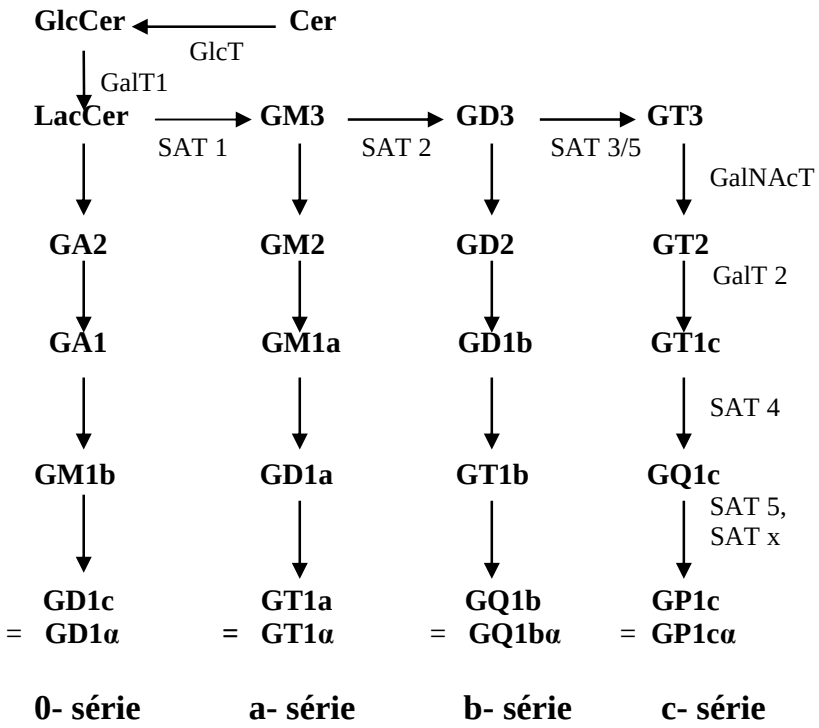
1.3. Biosyntéza glykosfingolipidů

Biosyntéza je zahájena na cytosolické straně endoplazmatického retikula[8] syntézou ceramidu jako jednoho ze základních stavebních kamenů sfingolipidů. Syntéza ceramidu začíná kondenzací serinu a palmitoyl-CoA katalyzované pyridoxalfosfátem vázaném na serin.[9,10,11] 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 sacharid-nukleotidů. 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 této publikaci[12].

1.3.1. Biosyntéza gangliosidů gangliosérie

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[13, 14]. Enzymy jsou svým aktivním místem orientovány do lumen Golgiho aparátu[15]. Sialylace probíhá v *cis*- části, následující glykosylace v *trans*- části. Enzymy katalyzující glykosylaci mají širší specifitu než sialyltransferasy.
N-Acetylgalaktosamintransferasa 1 (GalNAcT-1) 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[16,17]. 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[16], sialyltransferasa 5 (SAT-5) syntézu GD1c, GT1a, GQ1b a GP1c z GM1b, GD1a, GT1b a GQ1b[17, 18]a GD3 na GT3 (viz. Obr.3)



Obr.3: Schéma větví (sérií) biosyntézy gangliosidů. Účinkem specifických sialyltrasferas (SAT- 1, SAT- 2 a SAT- 3) vznikají z laktosylceramidu postupně gangliosidy GM3, GD3 a GT3 a z nich dalšími glykosyltransferasami další gangliosidy[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[19,20,21].

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[22].

1.3.2. Biosyntéza glykosfingolipidů lakto- a neolakto- série

Biosyntéza sfingolipidů lakto- a neolakto- série probíhá především v žlázových epitheliáních buňkách a pravděpodobně i endotheliálních buňkách. Tyto glykosfingolipidy jsou nositely antigenní specifity krevních skupin ABH, Lewis, I a i. Krevní skupina je charakterizována právě oligosacharidem glykosfingolipidu. Tyto glykolipidy často obsahují fukosylové a sialylové skupiny.

1.3.3. Regulace biosyntézy

Kompletní regulace biosyntézy sfingolipidů dosud nebyla 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.

Uvažuje se o zpětné kontrole biosyntézy glykolipidů, kdy jsou jednotlivé série inhibovány jejich vyššími produkty. V pokusech in vitro bylo třeba zjištěno, že GM2 synthasa Golgiho aparátu krysích jater je silně inhibována GD1a, GD3 synthasa je inhibována GQ1b[23,24]. Tento jev nebyl dosud pozorován in vivo nebo na pokusech s buněčnými kulturami. Bylo ukázáno, že bionsyntéza *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[25]. Je možno to vysvětlit různými pH optimy dvou klíčových regulačních glykosyltransferas- GalNAc-transferasy (GalNAcT-1) a sialyltransferasy 2 (SAT-2). Jiný experiment ukázal vliv inhibitoru GalNAcT-1 z kuřecího krevního séra, který po přidání ke kultivačnímu médiu buněk embrionální kuřecí retiny ovlivňuje poměr GM3/GD1 a inhibuje diferenciaci[26].

Široké možnosti pro výzkum regulace biosyntézy v eukaryotických buňkách poskytují geneticky upravené myši[27,28]. 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 myší melanomové linie ukázali, 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[29]. Pozdější experimenty s geneticky upravenými myšmi ukázaly, že experimenty in vitro nedokáží dostatečně objasnit fukci metabolitů, které jsou zapojeny do mezibuněčné interakce a jejich využití pro tyto studie je omezené.

Pokusy s geneticky upravenými myšmi naopak ukázaly důležitou funkci při vývoji mnohobuněčných organismů. Myši s poškozeným genem pro ceramid glukosyltransferasu hynou kolem 7- 8 dne embryonálního vývoje zřejmě v důsledku nárůstu apoptózy v ektodermu. Diferencovala se zde pouze primitivní zárodečná vrstva. Pokud byly v embryonálních kmenových buňkách narušeny obě alely genu pro ceramid-glukosyltransferasu, schopnost těchto buněk tvořit zralé diferencované tkáně v teratomech rostoucích na myši byla také silně omezena. Tyto výsledky ukazují, že glukosylceramid a následně vyšší glykolipidy by mohly hrát důležitou roli v procesu diferenciace a vývoje[30]. Zároveň nelze úplně vyloučit možnost, že na poškození diferenciace buněk může mít vliv i akumulace výchozího substrátu- ceramidu.

Experimenty s defektem glukosyltransferasy byly prováděny i na buněčných kulturách embryonálních kmenových buněk. Mutantní buňky ale narozdíl od „knockout“ myší vykazovaly podobné růstové křivky jako normální buňky, byly tedy schopné diferenciace[31].

U myší s inaktivovaným genem pro ceramid galaktosyltransferasu 1 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.[32,33]. Byla poškozena i spermatogeneze vzhledem k biosyntéze seminolipidu z monogalaktosylglycerolu.

Myš s poškozením genu pro sulfotransferasu netvoří sulfo-galaktosylceramidy, sulfo-laktosylceramid a seminolipid[34]. Projevují se velmi podobné neurologické příznaky jako u myší s poškozením tvorby galaktosylceramidu.

Byly vytvořeny dva kmeny myší s poškozením tvorby hlavních mozkových gangliosidů. Kmen s poškozením genu pro GalNAcT 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[35]. U myší se projevovaly progresivní poruchy motorických funkcí[36]. Byly nalezeny i defekty mimo nervovou tkáň. Samci byly sterilní s morfologickými a funkčními poruchami varlat[37]. Byla narušena i funčnost imunitního systému v odpovědi T buněk sleziny na interleukin 2[38]. Homozygotní kmen myší s poškozeným genem pro SAT-2 neprojevoval pozorovatelnou změnu ve vývoji, nebyla ovlivněna délka života zvířat[28]. Tyto experimenty vyvrátily domněnku účasti GD3 a *b*-větve gangliosidů na neuronální diferenciaci, protože u tohoto mutantního kmenu myší dochází k diferenciaci bez přítomnosti gangliosidů *b*-větve. Křížením kmene myší s defektem SAT-2 a kmene s defektem beta1-4 GalNAcT vznikly myši s dvojitou mutací. Dokázaly exprimovat pouze GM3 jako hlavní gangliosid. Tyto myši projevovaly vysokou citlivost na zvukové podněty s následujícími smrtelnými záchvaty. Pokus ukázal životně důležitou úlohu fyziologického složení pro nervovou funkci a otvírá tím další možnosti studií[28].

Myš s poškozeným genem pro SAT-1 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, GD1a, GD1α) v množství, které odpovídá celkovému obsahu gangliosidů u normálních zvířat. Mutované myši mají změněnou homeostázu glukosy, z čehož vyplývá role GM3 jako regulátoru insulinem zprostředkované signalizační cesty.

Nejnovější model mutovaného kmene jsou myši s dvojitou mutací- na GalNAcT a SAT-1. Tyto myši nejsou schopny tvořit žádný glykolipid z ganglio-série. Koncentrace laktosylceramidu je až 100x zvýšena. Navíc laktosylceramid-sulfát má složení sfingoidů a mastných kyselin podobné gangliosidům detekovaným u těchto myší. Po odstavení se u mladých myší vyvíjí těžké neurodegenerativní onemocnění končící smrtí[39].

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 ohyb ceramidu vzhledem k oligosacharidové části. Toto uspřádání 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* konformací. *A*midová vazba určuje paralelní orientaci os obou uhlíkatých řetězců, což zvyšuje možnosti vzájemných hydrofóbních 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[40].

Stabilizujícím prvkem v oligosacharidové části je kyselina sialová udržující vysoce stabilní konformaci danou přítomností tří vodíkových vazeb v její molekule. 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[41]. V organismech je významná především vazba Ca^{2+}, následná změna konformace molekuly má vliv na uspořádání gangliosidů ve shlucích na povrchu membrán.

Ve vodných disperzích v kyselém prostředí tvoří gangliosidy vnitřní estery-laktony. 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[42,43]. Tvorbou laktonu se redukuje negativní náboj sialových kyselin. Laktony jsou stabilní v rozmezí pH 2- 7, v mezních hodnotách pH dochází ke štěpení vnitřní esterové vazby a obnově negativního náboje. Tvorba a rozpad laktonů může v přírodě sloužit jako regulátor negativního náboje v mikrosprostředí buněčného povrchu a k expresi nových antigenních struktur.

1.4.2. Amfifilní vlastnosti gangliosidů

Gangliosidy jsou díky přítomnosti hydrofilní sacharidové a hydrofóbní ceramidové části látky s amfifilními vlastnosti, což vede k jejich agregaci ve vodných roztocích[44].

Ve vodě se orientují hydrofilní částí volně do vody a hydrofóbní směrem k jiným hydrofóbním částem ostatních molekul gangliosidů. Vytváří tak micely s ceramidovým jádrem obklopeným oligosachardovými 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[45].

Molekulární hmotnost micel klesá s rostoucím počtem sialylových skupin v molekule a stoupá se zvyšující se nasyceností v ceramidové části a délkou sfingosinových bází[46].

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 lidpidů, 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[40]. V liposomech jsou gangliosidy lokalizovány do vnější vrstvy fosfolipidové dvojvrstvy s oligosacharidovým zbytkem vystaveným na povrchu, což se velmi podobá uspořádání v plazmatické membráně[47,48].

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 dvěmi důvody:

- glykosfingolipidy zvyšují pevnost struktury plazmatické membrány

- oligosacharidové zbytky glykosfingolipidů zprostředkovávají interakce s exogenními ligandy[49,50]

Gangliosidy se na povrchu plazmatické membrány často shlukují do oblastí zvaných mikrodomény[51]. Model tekuté mozaiky Singerse a Nicolsona[52], kde jsou proteiny náhodně rozmístěny v homogenní kapalné lipidní dvojvrstvě, byl později nahrazen „deskovým" modelem[53]. Tato představa ukazuje membránu složenou z uspořádaných a neuspořádaných oblastí, jejichž heterogenita je dána stupněm nenasycenosti mastných kyselin. Poprvé byly klastry GSL spatřeny pomocí skenovací elektronové mikroskopie na erytrocytární membráně[54], později i na dalších typech membrán[55,56] a na liposomech[57].

Bylo zjištěno, že GSL a glykosylfosfatidyl inositolem (GPI)- zakotvené proteiny byly v polarizovaných buňkách přednostně směrovány do apikální membrány. Dalším zajímavým poznatkem bylo zjištění, že membránové biologicky aktivní proteiny jsou asociovány s GSL, které je obklopují[58].

1.6. Žlučový systém

Hepatocyt vylučuje do kanalikulu žlučové soli, konjugovaný bilirubin, cholesterol, fosfolipidy, proteiny, elektrolyty a vodu. K tomu slouží žlučový sekreční aparát, který sestává z kanalikulární membrány s proteinovými nosiči, intracelulárních organel a buněčné kostry hepatocytu.

Žlučové kanalikuly se vlévají do kanálků zvaných Heringovy nebo též cholangioly. Heringovy kanálky ústí do interlobulárních žlučovodů, kolem kterých se již větví jaterní arterie a portální žíly. Další spojování kanálků vytváří septální žlučovody, které z jater vyústují jako levý a pravý jaterní vývod. Žlučové cesty vystýlají cholangiocyty.

Žluč je vytvářena v hepatocytech a je upravována cholangiocyty.

1.7. Hepatocyt a tvorba žluči

Hepatocyt je funkčně a morfologicky polarizovaná buňka sekrečního epitelu. Svou bazolaterální (sinusoidální) membránou zprostředkovává přes membránové bílkovinné přenašeče absorbci 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 Na^+-K^+-ATPázy 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 Na^+-K^+-ATPázy je ovlivněna membránovou fluiditou.

Na bazolaterální (sinusoidální) membráně se nachází řada transportních proteinů pro absorbci 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 žlučové kyseliny, bromsulftaleinu, bilirubinu a jiných organických aniontů. Není závislý na kotransportu sodíkových iontů. Přenašeč OCT 1 přenáší organické kationty[59,60,61]. Mezi další přenašečové proteiny na bazolaterální membráně patří vyměnný Na^+-H^+ a Na^+-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 dehydrogenase 3-α-hydroxysteroidu. 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[62]. Je to MDR 1, který transportuje exogenní hydrofóbní organické kationty a MDR 3, fosfolipidový translokátor přenášející fosfatidylcholin. Voda a anorganické ionty (především sodík) 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, které jsou společně se žlučí hepatocytem vylučovány, v krvi, tzn. vody a organických aniontů (žlučové kyseliny, bilirubin). V séru je poté zvýšená koncentrace žlučových kyselin. Vedle toho dochází v séru ke zvýšení koncentrace enzymů-ALP a GMT.

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, je sem rovněž řazen i hilový cholangiogenní karcinom vznikající v hlavních nitrojaterních vývodech. Nejčastější příčinou extrahepatální cholestázy je konkrement ve společném žlučovodu, dále rakovina pankreatu a ampuly, benigní striktury žlučovodu a již zmíněný cholangiokarcinom. Obstrukční typ nejčastěji způsobuje akutní cholestázu.

U intrahepatální cholestázy se překážka nenachází ve velkých žlučovodech. Příčinou rozvinutí syndromu cholestázy mohou být léky (poléková cholestáza), hormony či primární biliární cirhóza či septikémie. Poměrně vzácným případem cholestázy je Bylerova choroba (PFIC typu 1), benigní rekurentní cholestáza, Hodgkinova choroba a amyloid. Intrahepatální typ může způsobovat akutní i chronickou formu. Akutní bývá způsobena léky. Chronický průběh je u primární biliární cirhózy a u primární sklerózující cholangitidy.

Zatímco extrahepatální cholestáza je způsobena mechanickým bráněním odtoku žluči, u intrahepatálního typu je jeho příčinou porucha buněčných mechanismů hepatocytu, jako postižení funkce membránových transportérů. Jejich funkčnost je modifikována řadou pro tělo exogenních látek. Experimentálně bylo potvrzeno, že endotoxin snižuje aktivitu Na^+-K^+-ATPázy. Endotoxin pravděpodobně působí také na snížení exprese kanalikulárního multispecifického transportéru cMOAT při pokusném modelu cholestázy sdružené s kolitidou[63]. Cyklosporin A způsobuje inhibici na ATP závislém přenosu žlučových kyselin přes kanalikulární membránu. Nedostatečná funkce membránových transportérů může nastat v důsledku mutace v genu pro příslušný transportní protein. Onemocnění se v tomto případě označuje jako progresivní familiární intrahepatální cholestáza (PFIC). Jedná se o vzácné autozomálně recesivní onemocnění s výskytem cholestázy v dětství. Rozeznávají se 3 typy. U PFIC typu 1 (Bylerova nemoc) byla nalezena mutace na chromozomu 18q21-q22[64], který obsahuje gen kódující ATPázu typu P. PFIC typu 2 je charakteristický mutací BSEP. PFIC typu 3 vzniká v důsledku mutací v genu MDR3

(fosfolipasa). Žlučové kyseliny se při ní do kanalikulů a žlučových kanálků dostávají bez protektivního fosfolipidu.

Jinou příčinou intrahepatální cholestázy je vliv látek na fluiditu sinusoidální membrány. Takový účinek vykazuje hormon ethinylestradiol, čehož se využívá pro umělé vyvolání cholestázy při experimentech studujících toto onemocnění. Účinek lze pokusně potlačit podáním S-adenosyl-L-methioninu.

Zadržování toxických látek při cholestáze způsobuje poškození hepatocytu. Nejvíce se na hepatocelulárním poškození podílí hydrofóbní žlučové kyseliny, které mají různé účinky. Vyvolávají jednak buněčnou nekrózu a jsou spouštěči apoptózy[65]. 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 β-oxidace[66].

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 jaterních synthas gangliosidů v jaterní tkáni a séru po podvázání žlučovodů u krys typu Wistar[67]. Byl pozorován zřetelný nárůst syntézy gangliosidů *b*- větve, ovšem bez odpovídajícího zvýšení exprese GD3 synthasy. Mechanismus tohoto jevu nebyl jasně vysvětlen.

První studie zabývající se sledováním složení gangliosidů v jaterní tkáni po vyvolání cholestázy podáváním 17 α-ethinylestradiolu (EE) byly uskutečněny Majerem a spol.(2007)[1]. Cholestáza indukovaná EE se používá jako modelového experimentu pro těhotenskou cholestázu. U samic krys typu Wistar byla vyvolána těžká cholestáza subkutánní injikací EE rozpuštěném 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 krys v porovnání s kontrolní skupinou krys, 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- krys, 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 částích jaterních laloků. U zvířat s cholestázou došlo k výraznému úbytku hmotnosti (212 ± 43 g) oproti kontrolním zvířatům (293 ± 32 g), P- hodnota 0,004.

Tab. 4: Jaterní testy jako markery cholestázy u kontrolních zvířat a zvířat s EE indukovanou cholestázou (Majer a kol., 2007)[1]

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

Výsledky ukázaly, že EE- cholestáza způsobuje celkové zvýšení lipidově vázané kyseliny sialové z 44,1 ± 15,2 nmol/g vlhké jaterní tkáně u kontrolních zvířat na 79,1 ± 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*-větvě, 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.

Výsledky této studie Majera a kol. (2007) jsou ve shodě s pozorováním Mesarica a Deckera (1990)[68], kteří studovali vliv pohlavních steroidních hormonů na aktivitu GM3 a GD3 synthas v kultuře hepatocytů. Progesteron, β- estradiol a testosteron zvyšovaly aktivitu GD3 synthasy, ale nikoli GM3 synthasy.

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 krysách (1993)[69] s vyblokovanými geny pro biosyntézu *b*- větve, které vedlo k těžkým jaterním poruchám.

Tab. 5: Změny v zastoupení gangliosidů u kontrolních zvířat a zvířat s EE indukovanou cholestázou (Majer a kol., 2007)[1]

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

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

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

Zmíněné práce upozornily na možnost zpevňování sinusoidální membrány hepatocytů přesunem gangliosidů. Tento přesun je interpretován jako obrana hepatocytů proti detergentnímu působení vysoké koncetrace 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 žlučovodů 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 choleratoxinu.

Práce dospěla k následujícím hlavním zjištěním:

a) Neprokázal se zvýšený přesun GM1 pozitivity z cytoplazmy do sinusoidální membrány na rozdíl od výsledků pozorovaných u EE cholestázy, lze však pozorovat expresi GM1 gangliosidu u cholestatických zvířat v sinusoidání i kanalikulární membráně, což lze vykládat odlišným mechanismem, tj. atakováním hepatocytu žlučovými kyselinami i ze strany kanalikulární membrány.

b) Byl zjištěn kvalitativní rozdíl v expresi gangliosidů

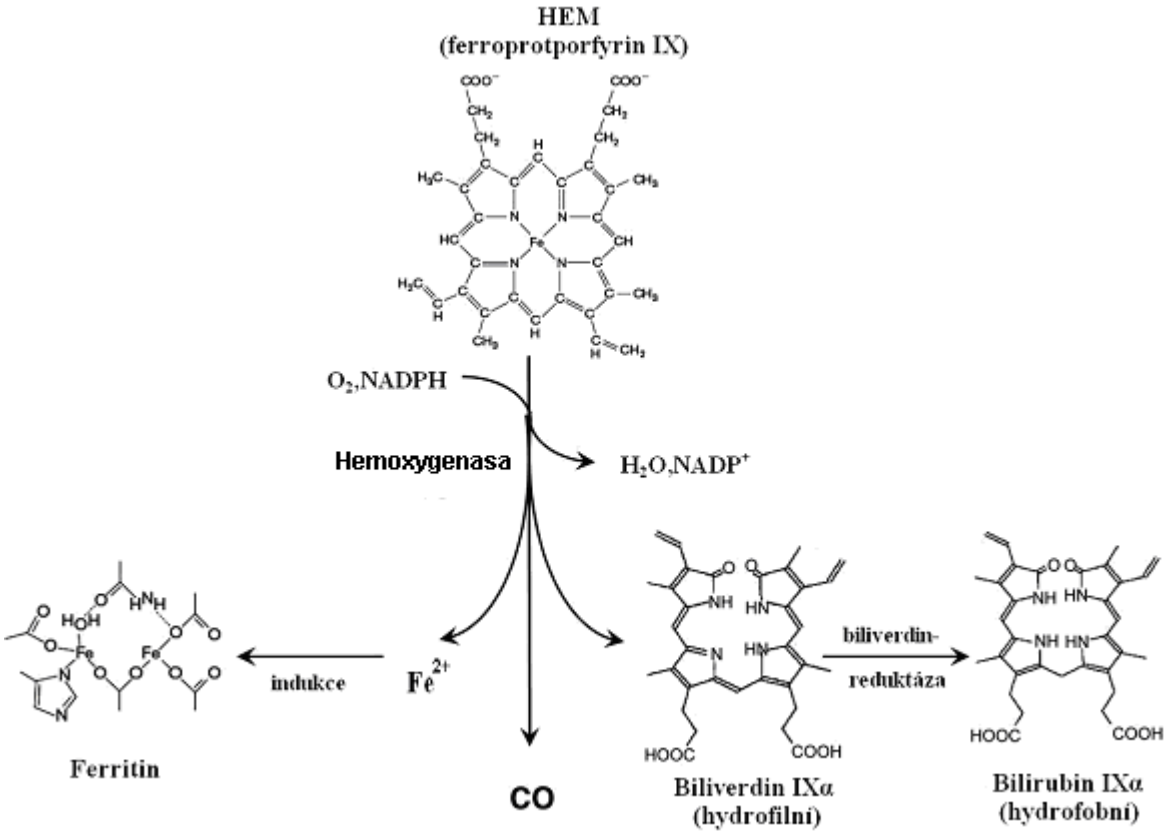
- u kontrolních zvířat, kde exprese GM1 plynule lemovala sinusoidální membrány (občas se vyskytovala i bodová)
- u zvířat s obstrukční cholestázou byla lokalizace vyznačena plynule v sinusidálních i kanalikulárních membránách..
- u zvířat kontrolních (slepě operovaných) s aplikací Sn-mesoporfyrinu i heminu se vyskytovala bodová exprese GM1, tj. nelemující plynule membrány

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^{2+} a biliverdin[70,71,72]. Biliverdin se dále působením biliverdinreduktasy metabolizuje na bilirubin[73] (viz. Obr. 4).

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_2 je porfyrinový kruh hemu štěpen a oxidován na methenovém můstku za vzniku již zmíněných katabolických produktů.

Produkty katabolizmu hemu již dnes nemohou být chápány pouze jako odpadní látky s toxickými účinky. Bylo totiž zjištěno, že pro organismus vykazují řadu pozivních 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 (jsou známy 3 isoenzymy hemoxygenasy-HO-1, HO-2, HO-3) v přizpůsobování tkání proti rozdílným formám stresu[74].



Obr. 4: Katabolická funkce hemoxygenasy.

Bilirubin má silné antioxidační účinky[75,76]. Bilirubin v malém množství chrání vitamin A před autooxidací, rovněž chrání kyselinu linolovou a další nenasycené mastné kyseliny před autooxidací[77]. Bilirubin působí jako vychytávač singletového kyslíku, reaguje se superoxidovými radikály a je substrátem pro peroxidasy v přítomnosti H_2O_2 a organických hydroperoxidů[76]. Studie Wu a kol.[78] 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[79]. 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 atomů železa a vykazuje cytoprotektivní účinky ve smyslu ochrany před oxidačními účinky železa. Kation 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[80], naopak u cytotoxicity vyvolané oxidačním stresem byla indukce HO-1 závislá na ferritinu[81]. Dalším mechanismem ochrany buňky před oxidačními vlastnostmi Fe^{2+} je zvýšení aktivity ATPázové pumpy společně s expresí ferritinu, ATPázová pumpa zvyšuje odstraňování železa z intracelulárního prostředí[82].

2. Cíl diplomové práce

Cílem diplomové práce je sledování změn ve složení gangliosidů u cholestázy vyvolané podvazem žlučovodů srovnání proti výsledkům publikovaným u cholestázy indukované ethinylestradiolem.

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

Spektrum gangliosidů je dáváno do souvislosti s mRNA klíčové glykosyltransferasy- GD3 synthasy (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, Utah, USA)

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

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

Standard GA (vyroben v laboratoři)

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

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

Silikagel 60 (Merck, Darmstandt, Německo)

Resorcinol (Merck, Darmstandt, 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)

Síran mědnatý, pentahydrát (Penta, CZ)

n-Buthanol (Penta, CZ)

n-Buthylacetát (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

3.1.3. Používané roztoky

Základní roztok resorcinolu

Resorcinol 2 g se rozpustí ve 100 ml vody. Uchovává se v lednici v hnědé láhvi.

Resorcinolové činidlo

Složení: 40 ml koncentrované HCl, 5 ml základního roztoku resorcinolu, 0,125 ml 0,1 M $CuSO_4.5\ H_2O$, doplněno destilovanou vodou do 50 ml.

3.1.4. Přístrojové vybavení

ABI PRISM 7900 pro qPCR (AME Bioscience AIS)
Analytické váhy (GR 202- EC)
Centrifuga (Beckman GPR)
Denzitometr Camag (Muttenz, Švýcarsko, TLC scanner II, software CATS3)
Lyofilyzátor (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, rupturu intrahepatálních žlučovodů a vznik biliózní peritonitidy.

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

Inhibice HO-1 byla navozena jednorázovou dávkou 15 μmol/kg Sn-mesoporfyrinu 1.den intraperitoneální injekcí.

Aktivace HO-1 byla navozena dávkou 30 μmol/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 zmražena. Z krevního séra byly provedeny jaterní testy pro posouzení stupně rozvoje cholestázy. Konkrétně byly sledovány tyto markery- celkové žlučové kyseliny (CŽK), celkový bilirubin, ALT, AST a ALP. Jaterní testy byly provedeny v Centrální biochemické laboratoři ÚKBLD 1.LF UK akreditovanými metodami.

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

- čisté podvazy žlučovodů: SH- slepá operace, 5 dní
  BL- podvaz žlučovodů, 5 dní
  SX- slepá operace, 18 dní
  BX- podvaz žlučovodů, 18 dní
- podvazy žlučovodů + aktivace HO-1: HH- slepá operace, hemin, 5 dní
  BH- podvaz žlučovodu, hemin, 5 dní
- podvazy žlučovodů + inhibice HO-1: SS- slepá operace, Sn-mesoporfyrin, 5 dní
  BS- podvaz žlučovodů, Sn-mesoporfyrin,5 dní

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 finálně 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 (CH: M: voda-30: 60: 8-v/v/v) po dobu 30 minut na orbitální třepačce. Suspenze byla zfiltrována a spojené filtráty doplněny na poměr složek směsi A přídavkem 15 ml methanolu a 4 ml destilované vody.

Chromatografie na DEAE anexu

Byl použit Sephadex- DEAE A-50, který oddělí kyselé lipidy, tzn. gangliosidy, sulfatidy a fosfolipidy, od neutrálních a obojetných lipidů.

Byly připraveny následující eluční směsi:

- A - chloroform- methanol- 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

Sephadex- DEAE A-50 byl převeden do acetátového cyklu následujícím způsobem:
suchý ionex byl rozmíchán v podílu celkového objemu eluční směsi B (15g/500 ml), nechal se usadit, supernatant se slil a sediment se rozmíchal s novým podílem směsi B, směs B se vyměnila na ionexu ještě potřetí a tímto posledním podílem se ionex nechal ekvilibrovat přes noc.

Na kolonku o průmeru 1 cm byl nanesen Sephadex v acetátovém cyklu do výšky sloupce 3 cm po usazení. Sephadex v kolonce byl 3x promyt roztokem A o objemu 20 ml pro odstranění volného octanu.

. Po odpuštění roztoku A na několik mm nad sloupcem byl na kolonku opatrně nanesen vzorek tak, aby nedošlo k přílišnému rozvíření usazeného Sephadexu. Průtok o přibližné hodnotě 0,7 ml/min umožňuje řádné navázání gangliosidů na anex.

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

Gangliosidy společně s dalšími kyselými lipidy jsou z kolonky vymyty 20 ml 0,2 M octanu amonného v methanolu.

Alkalicky katalyzovaná methanolýza a dialýza

Po anexové chromatografii jsou v roztoku vedle gangliosidů přítomny další kyselé lipidy, převážně fosfolipidy. Pro jejich odstranění se využívá 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 lze v dalším kroku k přečištění od hydrolyzovaných fosfolipidů a ostatních

nízkomolekulárních látek využít dialýzu. Dialyzační membránou projdou pouze nízkomolekulární látky, zatímco micely gangliosidů jsou zadrženy[83]. K roztoku po chromatografii se přidaly 2 ml 1 M NaOH v methanolu a nechaly se temperovat při 37°C 1 hod. Poté byla provedena neutralizace 2 ml 1 M kyseliny octové v methanolu.

Z roztoku byl odstraněn methanol na vakuové rotační odparce (60°C, 60 ot/min) a zahuštěn na objem asi 1 ml. K roztoku bylo přidáno 6 ml destilované vody. Vzorek se dialyzoval 2- 4 dny proti destilované vodě.

Voda byla odstraněna lyofilizací.

Přečištění na koloně silikagelu

Silikagel 60 (63- 100 μm) byl přečištěn promýváním v centrifugačních zkumavkách 4x 15 objemy směsi CH: M: 2,5M NH_4OH- 30:60:8 (v/v/v) a poté byl stejným způsobem promyt 4x 15 objemy roztoku A (viz. Chromatografie na DEAE anexu). Po každém promývání byl silikagel odcentrifugován (5 min, 3tis ot/min, 10°C).

Suspendovaný silikagel v poslední směsi byl vnesen do kolony o průměru 1 cm do výše 2 cm. Sloupec byl promýván 20 ml směsi CH (redestilovaný): M- 2:1 (v:v), poté 20 ml směsi CH (redestilovaný): M- 95: 5 (v/v).

Vzorek s gangliosidy byl rozpuštěn v 1 ml směsi CH: M- 1: 1 (v/v) a dále byl přidán 1,5 ml chloroformu na konečný poměr chloroformu 4: 1. Roztok s rozpuštěnými gangliosidy byl nanesen kolonu. Sulfatidy byly eluovány 18 ml CH: M- 4: 1 (v/v). Gangliosidy byly eluovány 20 ml CH: M- 1: 2 (v/v).

Přečištění vzorků

Vzorky jater SS a BS byly po aplikaci Sn-mesoporfyrinu i po předchozím čištění kontaminovány nečistotami, které se na HPTLC jeví jako hnědé zabarvení, značně zkreslující denzitometrické vyhodnocení. Bylo přistoupeno k dalšímu přečistění vzorku modifikací vytřepávání dle Folcha[84,85] založeném na rozdílné polaritě nečistot (hydrofóbní) a gangliosidů (hydrofilní).

Ke vzorkům byl přidán 1 ml směsi CH: M, 2: 1 (v/v) a 200 μl destilované vody, vše bylo důkladně promícháno na Wortex mixéru. 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 Wortex mixéru 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_2.

3.2.3. TLC gangliosidů

Byla připravena vyvíjecí směs CH: M: 0,2% $CaCl_2$- 50: 45: 11, v/v/v. Vyvíjecí komora byla vyložena filtračním papírem Whatmann 3 a vyvíjecí směs nalita do výšky asi 1 cm.

Vzorky gangliosidů po přečištění na silikagelu byly odpařeny ve vakuové rotační odparce na objem 1- 2 ml a poté doodpařeny pod N_2 a rozpuštěny v 80 µl CH:M 1:1, v:v. Vzorky byly na TLC desku nanášeny injekční stříkačkou Hamilton v objemu 5 µl rovnoměrně v malých kapkách na šířce dráhy 0,5 cm umístěné 1 cm od dolního okraje destičky. Jako standard bylo na každou desku naneseno 5 µl GM1. TLC deska se nechala vyvíjet, dokud čelo vyvíjecí směsi nedosáhlo 1 cm pod její horní okraj. Poté byla důkladně osušena.

K detekci gangliosidů bylo použito resorcinolové činidlo[86]. Po přestříkání činidlem se deska překryla sklem a nechala sušit v sušárně při 95°C po dobu 35 min.

3.2.4. 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.

3.2.5. Fotometrické stanovení celkové kyseliny sialové

Metoda fotometrického stanovení celkové kyseliny sialové[86] je vhodná pouze pro přečištěné gangliosidy, nelze ji provádět z celkového lipidního extraktu.

Ředěním zásobního standardního roztoku NeuNAc o koncetraci 0,1 mM (navážka 1,5 mg NeuNAc do 25 ml) byla připravena kalibrační řada s hodnotami 0, 10, 20, 40 nM NeuNAc viz. Tab.6.

Tab.6: Kalibrační řada roztoků NeuNAc

Koncentrace NeuNAc/nM	**0**	**10**	**20**	**40**
Roztoku stadardu NeuNAc/µl	0	50	100	200
Resorcinolového činidla/µl	200	200	200	200
Destilovaná voda/µl	200	150	100	0

Pro stanovení NeuNAc ve vzorku bylo odebráno 20 µl vzorku, přidáno 200 µl vody a 200 µl resorcinolového činidla. Připravené roztoky byly řádně promíchány na Wortex mixéru a 15 min zahřívány ve vroucí vodní lázni. Po vyjmutí byly zkumavky ochlazeny a ke všem roztokům přidáno 0,6 ml roztoku buthylacetát : buthanolu (85:15, v/v). Po protřepání se oddělila vodná a organická fáze. Horní fáze byla odebrána a změřena absorbance při λ= 580 nm.

3.2.6. Stanovení exprese mRNA pro GD3 synthasu (SAT-2)

Homogenizace jaterní tkáně

Zmražená jaterní tkáň byla uchovávána v RNA lateru při -80°C. Homogenizace byla provedena rozdrcením 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_2 (l). Zbylý homogenát byl vrácen zpět do RNA lateru a uložen do -80°C.

Izolace mRNA z jaterní tkáně

Bylo postupováno dle návodu výrobce izolačního kitu. K přibližně 10 mg jaterního homogenátu bylo přidáno 350µl lyzačního RTL^+ pufru, dále centrifugováno 2 min při rychlosti 6000 ot/min, následně důkladně promícháno na 1 min Wortex mixéru a opět centrifugováno 1 min při rychlosti 10tis ot/min. Takto upravený lyzát byl poté veškerý přenesen na QIAshredder mini kolonku a centrifugován 2min při 20tis g. Následovalo odstranění genomové DNA. Supernatant byl přenesen na gDNA eliminační mini spin kolonku a centrifugován 1 min při 8tis g. K supernatantu bylo následně přidáno 350µl ethanolu (70%) a důkladně promícháno. Dalším krokem byla již separace vlastní mRNA. Supernatant byl přenesen na QIA spin kolonky a centrifugován 1 min při 8tis g. Prošlý supernatant byl odstraněn, na kolonku bylo naneseno 700µl promývacího RW1 pufru a centrifugováno 1 min při 8tis g. Supernatant byl opět odstraněn, na kolonku přidáno 500 µl RPE pufru (rozředěný 95% ethanolem) a centrifugováno 2 min při 8tis g. Supernatant byl odstraněn a kolonka byla vložena do nové sběrné zkumavky (Collection

Tube, 2 ml) a na sucho centrifugováno 1min při 10tis g. Sběrná zkumavka (2 ml) byla odstraněna a kolonka přemístěna do nové 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky. Přímo na membránu kolonky bylo naneseno 50µl vody prosté RNas a centrifugováno 1min při 8tis g. Tím se z kolonky uvolní zachycená mRNA. Izolovaná mRNA byla uchovávána při -80°C.

Přepis mRNA na cDNA

Pro přepis jednoho vzorku mRNA na cDNA bylo postupováno následovně: do Eppendorfovy zkumavky bylo pipetováno 5 µl RNA vody (tzn. bez obsahu RNas), 2 µl Master Mixu (AppliedBiosystems) a 3 µl mRNA. Následovala centrifugace při 3,5tis ot/min. Poté byl proveden vlastní přepis na cDNA v termocycleru. Získaná cDNA byla bud´ 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 (GD3 synthasa). Jako endogenní kontrola byl zvolen β-aktin, který vykazuje běžně stabilní expresi a slouží k porovnání exprese cílového genu. Směs pro RT-PCR obsahovala 5 µl cDNA (poměr ředění cDNA:voda- 1:4), 0,6 µl směsi primerů a fluorescenčně značené sondy, 6 µl TaqMan master mix a 0,4 µl 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 β-aktin. CT hodnota (treshold cycle) uvádí počet cyklů, při kterém fluorescence uvolněné sondy dosáhne prahové hodnoty.

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.

4. Výsledky

V této práci byl sledován a porovnáván vliv inibice HO-1 Sn-mesoporfyrinem a vliv aktivace HO-1 heminem na zastoupení jednotlivých gangliosidů v játrech potkana kmene Wistar s experimentální cholestázou. Byla srovnávána skupina kontrolních zvířat, na kterých byla provedena slepá operace, se skupinou zvířat s extrahepatální cholestázou indukovanou podvazem žlučovodů. Jednotlivé skupiny zvířat byly označeny takto:

- SH kontrolní zvířata k 5 denním podvazům
- SX kontrolní zvířata k 18 denním podvazům
- SS kontrolní zvířata s inhibovanou HO-1 Sn-mesoporfyrinem
- HH kontrolní zvířata s aktivovanou HO-1 heminem
- BL zvířata s cholestázou vyvolanou podvazem žlučovodů, 5 denní
- BX zvířara s cholestázou vyvolanou podvazem žlučovodů, 18 denní
- BS zvířata s cholestázou vyvolanou podvazem + inhibice HO-1
- BH zvířara s cholestázou vyvolanou podvazem + aktivace HO-1

4.1. Jaterní testy

Pro zjištění stupně vývoje cholestázy byly stanoveny hodnoty sérových markerů, tzv. jaterní testy: ALT, AST, ALP, bilirubin, CŽK. Skupiny zvířat byly porovnány pro zjištění statisticky významných rozdílů (Tab.7-17).

Tab.7: Srovnání hodnot sérových markerů kontrol SH a podvazů BL

Sérový marker	SH (n=6)	BL (n=7)	P-hodnota
ALT (μkat/l)	0,7 ±0,06	0,91 ± 0,20	0,0151
AST (μkat/l)	2,42±0,57	3,27 ±0,47	0,0271
ALP (μkat/l)	2,00±0,32	4,41±0,32	0,0034
Bilirubin (μmol/l)	1,35±0,71	250,3±43,32	0,0034
CŽK (μmol/l)	17,33±10,05	372,00±142,94	0,0034

Tab.8: Srovnání hodnot sérových markerů kontrol SX a podvazů BX

Sérový marker	SX (n=6)	BX (n=11)	P-hodnota
ALT (μkat/l)	0,81±0,52	0,95±0,26	0,0703
AST (μkat/l)	1,96±1,03	6,69±2,55	0,0022
ALP (μkat/l)	1,71±0,49	4,59±0,47	0,0045
Bilirubin (μmol/l)	2,27±0,90	233,25±32,72	0,0022
CŽK (μmol/l)	11,83±6,24	304,64±77,32	0,0022

Tab.9: Srovnání hodnot sérových markerů kontrol SS s inhibicí HO-1 a podvazů BS s inhibicí HO-1

Sérový marker	SS (n=6)	BS (n=8)	P-hodnota
ALT (μkat/l)	0,65 ±0,06	0,98±0,40	0,065
AST (μkat/l)	1,55±0,21	4,36±1,48	0,015
ALP (μkat/l)	1,85±0,31	3,51±0,98	0,033
Bilirubin (μmol/l)	2,00±0,30	192,90±78,76	0,0045
CŽK (μmol/l)	14,00±13,83	562,75±216,30	0,0037

Tab.10: Srovnání hodnot sérových markerů kontrol HH s aktivací HO-1 a podvazů BH s aktivací HO-1

Sérový marker	HH (n=5)	BH (n=8)	P-hodnota
ALT (μkat/l)	0,54 ±0,03	1,21±0,39	0,048
AST (μkat/l)	1,53±0,50	6,40±3,90	0,022
ALP (μkat/l)	2,08±2,06	4,60±3,70	0,051
Bilirubin (μmol/l)	3,76±0,97	291,31±40,69	0,0032
CŽK (μmol/l)	29,8±21,28	638,38±201,23	0,0022

Tab.11: Srovnání hodnot sérových markerů u kontrol SH a podvazů SS s inhibicí HO-1

Sérový marker	SH (n=6)	SS (n=6)	P-hodnota
ALT (μkat/l)	0,7 ±0,06	0,65 ±0,06	0,1738
AST (μkat/l)	2,42±0,57	1,55±0,21	0,0051
ALP (μkat/l)	2,00±0,32	1,85±0,31	0,4715
Bilirubin (μmol/l)	1,35±0,71	2,00±0,30	0,0549
CŽK (μmol/l)	17,33±10,05	14,00±13,83	0,2983

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

Sérový marker	SX (n=6)	SS (n=6)	P-hodnota
ALT (μkat/l)	0,81±0,52	0,65 ±0,06	0,4715
AST (μkat/l)	1,96±1,03	1,55±0,21	0,5755
ALP (μkat/l)	1,71±0,49	1,85±0,31	0,8729
Bilirubin (μmol/l)	2,27±0,90	2,00±0,30	0,9362
CŽK (μmol/l)	11,83±6,24	14,00±13,83	0,6892

Tab.13: Srovnání hodnot sérových markerů u kontrol SH a podvazů HH s aktivací HO

Sérový marker	SH (n=6)	HH (n=5)	P-hodnota
ALT (μkat/l)	0,7 ±0,06	0,54 ±0,03	0,008
AST (μkat/l)	2,42±0,57	1,53±0,50	0,0357
ALP (μkat/l)	2,00±0,32	2,08±2,06	0,1211
Bilirubin (μmol/l)	1,35±0,71	3,76±0,97	0,008
CŽK (μmol/l)	17,33±10,05	29,8±21,28	0,5222

Tab.14: Srovnání hodnot sérových markerů u kontrol SX a podvazů HH s aktivací HO-1

Sérový marker	SX (n=6)	HH (n=5)	P-hodnota
ALT (μkat/l)	0,81±0,52	0,54 ±0,03	0,0444
AST (μkat/l)	1,96±1,03	1,53±0,50	0,6132
ALP (μkat/l)	1,71±0,49	2,08±2,06	0,5222
Bilirubin (μmol/l)	2,27±0,90	3,76±0,97	0,0549
CŽK (μmol/l)	11,83±6,24	29,8±21,28	0,9283

Tab.15: Srovnání hodnot sérových markerů u podvazů BL a podvazů BH s inhibicí HO-1

Sérový marker	BL (n=7)	BH (n=8)	P-hodnota
ALT (μkat/l)	0,91 ± 0,20	1,21±0,39	0,093
AST (μkat/l)	3,27 ±0,47	6,40±3,90	0,0324
ALP (μkat/l)	4,41±0,32	4,60±3,70	0,0238
Bilirubin (μmol/l)	250,3±43,32	291,31±40,69	0,1188
CŽK (μmol/l)	372±142,94	638,38±201,23	0,0324

Tab.16: Srovnání hodnot sérových markerů podvazů BX a podvazů BH s inhibicí HO-1

Sérový marker	BX (n=11)	BH (n=8)	P-hodnota
ALT (μkat/l)	0,95±0,26	1,21±0,39	0,0989
AST (μkat/l)	6,69±2,25	6,40±3,90	0,6527
ALP (μkat/l)	4,59±0,47	4,60±3,70	0,0093
Bilirubin (μmol/l)	233,25±32,72	291,31±40,69	0,0044
CŽK (μmol/l)	304,64±77,32	638,38±201,23	0,0044

Tab.17: Srovnání hodnot sérových markerů podvazů BL a podvazů BS s inhibicí HO-1

Sérový marker	BL (n=7)	BS (n=8)	P-hodnota
ALT (μkat/l)	0,91 ± 0,20	0,98±0,40	0,4533
AST (μkat/l)	3,27 ±0,47	4,36±1,48	0,2225
ALP (μkat/l)	4,41±0,32	3,51±0,98	0,1471
Bilirubin (μmol/l)	250,3±43,32	192,90±78,76	0,1188
CŽK (μmol/l)	372±142,94	562,75±216,30	0,093

4.2. Stanovení celkové lipidně vázané kyseliny sialové

Ve vzorcích izolovaných gangliosidů byla stanovena celková lipidně vázaná kyselina sialová. Výsledky uvádí Tab. 18. Rozdíly v obsahu kyseliny sialové mezi skupinami byly statisticky vyhodnoceny (viz. Tab. 19).

Tab.18: Koncentrace celkové lipidně vázané kyseliny sialové u sledovaných skupin (SH, BL, SX, BX, SS, BS, HH, BH) uváděná v nM/g vlhké jaterní tkáně

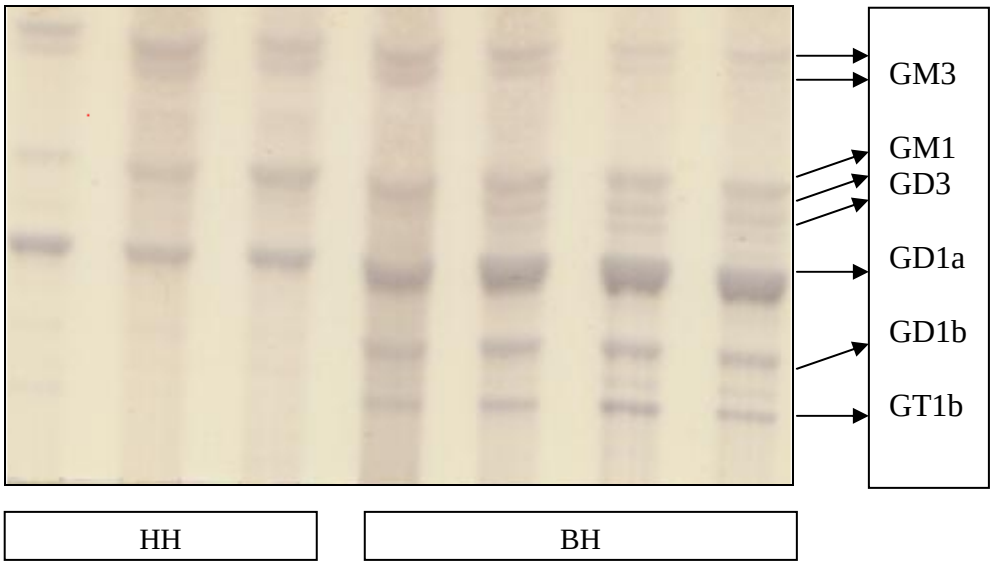
Skupina	Počet vzorků ve skupině	c(nM/g) Průměr±SD
SH	6	13,39±2,68
BL	7	20,48±3,01
SX	6	13,65±8,11
BX	11	34,67±16,76
SS	3	22,67±1,22
BS	8	39,87±4,8
HH	4	22,82±7,58
BH	8	40,15±6,99

Tab.19: Změny v obsahu celkové kyseliny sialové v uvedených skupinách. Posouzení významnosti

Srovnávané skupiny		P- hodnota
SH	BL	0,00099
SX	BX	0,0197
SS	BS	0,0002
HH	BH	0,0027
SH	HH	0,238
SH	SS	0,0008

4.3. Vyhodnocení TLC chromatogramů

Obsah jednotlivých gangliosidů ve vzorcích bylo zjištěn denzitometrickým proměřením TLC desek po detekci resorcinolovým činidlem. Tato metoda, jak zjistili Šmíd a Reinišová (1973)[87], poskytuje srovnatelné výsledky s fotometrickou metodou publikovanou Suzukim (1965)[88]. V práci Šmída a Reinišové bylo zjištěno, že stejné množství mono-, di-, trisialogangliosidů dává denzitometrickým měřením plochu píků v poměru 1:2:3 a fotometrickým měřením poskytly lineární kalibraci do 0,4 μmol gangliosidu (tj. přibližně do 6 nmol lipidně vázané kyseliny sialové). Lineární kalibraci pro 0,1- 6nmol lipidně vázané kyseliny sialové u různých gangliosidů zjistili také Chigorno a kol.(1982)[89] za použití alternativní metody detekce kyseliny sialové s Ehrlichovým činidlem (*p*-dimethylaminobenzaldehydem-HCl). Vzhledem k těmto pozorováním byl pro kvantitativní analýzu jednotlivých gangliosidů použit standard monosialogangliosidu GM1 o známé koncentraci. Množství jednotlivých gangliosidů byla přepočítána dle poměru denzitometrických ploch píků vzhledem ke standardu aplikovaném na každou TLC desku a vyjádřena v množství vázané kyseliny sialové. Vlivem rozdílů mezi TLC deskami způsobenými rozdíly v detekci resorcinolovým činidlem, tj. intenzitou postřiku, zahřátím aj., bylo nutné denzitometrické odezvy z jednotlivých TLC desek sjednotit korekčním faktorem vztaženým na stejné množství standardu GM1. Ukázka TLC chromatogramu je uvedena na Obr.5.



Obr. 5: Srovnání gangliosidů skupin HH a BH (ukázka chromatogramu). Zatímco ve skupině HH převládají gangliosidy a- série, ve skupině BH se zřetelně objevují gangliosidy b- série.

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

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		SH (nmol/g)	BL (nmol/g)	
		n= 4	n= 4	
a-	GM3	2,73±0,95	4,11±2,31	0,074
	GM1a	2,37±2,16	3,07±1,79	0,653
	GD1a	2,47±1,62	5,42±3,13	0,0734
b-	GD3	0,79±0,53	1,41±0,83	0,339
	GT1b	0,31±0,28	0,73±0,37	**0,045**
	GD1b	0,77±0,58	1,83±0,71	**0,035**

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

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		SX (nmol/g)	BX (nmol/g)	
		n= 4	n= 7	
a-	GM3	2,56±2,01	1,76±0,66	0,721
	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	**0,00016**
	GT1b	0,35±0,26	0,67±0,47	0,162
	GD1b	0,44±0,16	1,56±1,23	**0,05**

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

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		SS (nmol/g)	BS (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	0,520
	GT1b	0,17±0,12	0,31±0,17	0,099
	GD1b	0,36±0,29	0,82±0,44	**0,05**

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

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		HH (nmol/g)	BH (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	0,194
b-	GD3	0,92±0,67	2,10±1,32	0,190
	GT1b	0,11±0,04	1,06±0,43	**0,0006**
	GD1b	0,37±0,24	2,75±1,56	**0,007**

Tab.24: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny SH a SS, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		SH (nmol/g)	SS (nmol/g)	
		n= 4	n= 3	
a-	GM3	2,73±0,95	3,36±2,67	1,000
	GM1a	2,37±2,16	1,66±1,37	0,602
	GD1a	2,47±1,62	1,50±1,02	0,245
b-	GD3	0,79±0,53	0,64±0,44	0,485
	GT1b	0,31±0,28	0,17±0,12	0,310
	GD1b	0,77±0,58	0,36±0,29	0,156

Tab.25: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny BL a BS, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		BL (nmol/g)	BS (nmol/g)	
		n= 4	n= 7	
a-	GM3	4,11±2,31	1,78±1,39	**0,05**
	GM1a	3,07±1,79	1,42±1,26	0,069
	GD1a	5,42±3,13	2,65±1,56	**0,05**
b-	GD3	1,41±0,83	0,76±0,48	0,099
	GT1b	0,73±0,37	0,31±0,17	**0,05**
	GD1b	1,83±0,71	0,82±0,44	**0,00794**

Tab.26: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny SH a HH, n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		SH (nmol/g)	HH (nmol/g)	
		n= 4	n= 3	
a-	GM3	2,73±0,95	12,11±7,06	0,096
	GM1a	2,37±2,16	9,47±8,04	0,067
	GD1a	2,47±1,62	4,88±2,71	0,535
b-	GD3	0,79±0,53	0,92±0,67	0,268
	GT1b	0,31±0,28	0,11±0,04	0,144
	GD1b	0,77±0,58	0,37±0,24	0,181

Tab.27: Koncentrace gangliosidů (nmol/g jaterní tkáně) vzorků ze skupiny BL a BH
n- počet zvířat ve skupině

Série	Gangliosid	Skupina zvířat		P-hodnota
		BL (nmol/g)	BH (nmol/g)	
		n= 4	n= 7	
a-	GM3	4,11±2,31	10,01±7,59	**0,004**
	GM1a	3,07±1,79	7,00±4,83	0,0655
	GD1a	5,42±3,13	7,90±4,94	0,126
b-	GD3	1,41±0,83	2,10±1,32	0,764
	GT1b	0,73±0,37	1,06±0,43	0,0823
	GD1b	1,83±0,71	2,75±1,56	0,183

V práci byly zjištěny následné významné změny v zastoupení gangliosidů mezi skupinami zvířat.

Vliv cholestázy je patrný na následujícím porovnání:

- BL proti SH (5-denní podvaz)- signifikantní zvýšení u gangliosidů GT1b, GD1b a celkové NeuNAc
- BX proti SX (18-denním podvazem)- zvýšení u gangliosidů GD1b a GD3, a celkové NeuNAc

Podobný trend je patrný i ze srovnání následujících skupin:

- BH proti SH- zvýšení u GT1b, GD1b
- BS proti SS- zvýšení u GD1b
- BH proti HH signifikantní zvýšení celkové NeuNAc a gangliosidů GT1b, GD1b

Vliv Sn-mesoporfyrinu je patrný ze srovnání:

- SS proti SH- signifikantní zvýšení celkové NeuNAc, ale nikoli gangliosidů, vypovídá o účinku Sn- mesoporfyrinu
- BS proti BL- zvýšení GT1b, GD1b, GM3, zvýšení celkové lipidní NeuNAc, rovněž vypovídá o vlastních účincích mesoporfyrinu (v kombinaci s vlivem cholestázy)

Vliv heminu se v zastoupení gangliosidů neprojevil:

- HH proti SH- není významný rozdíl v celkové NeuNAc, ani v gangliosidech

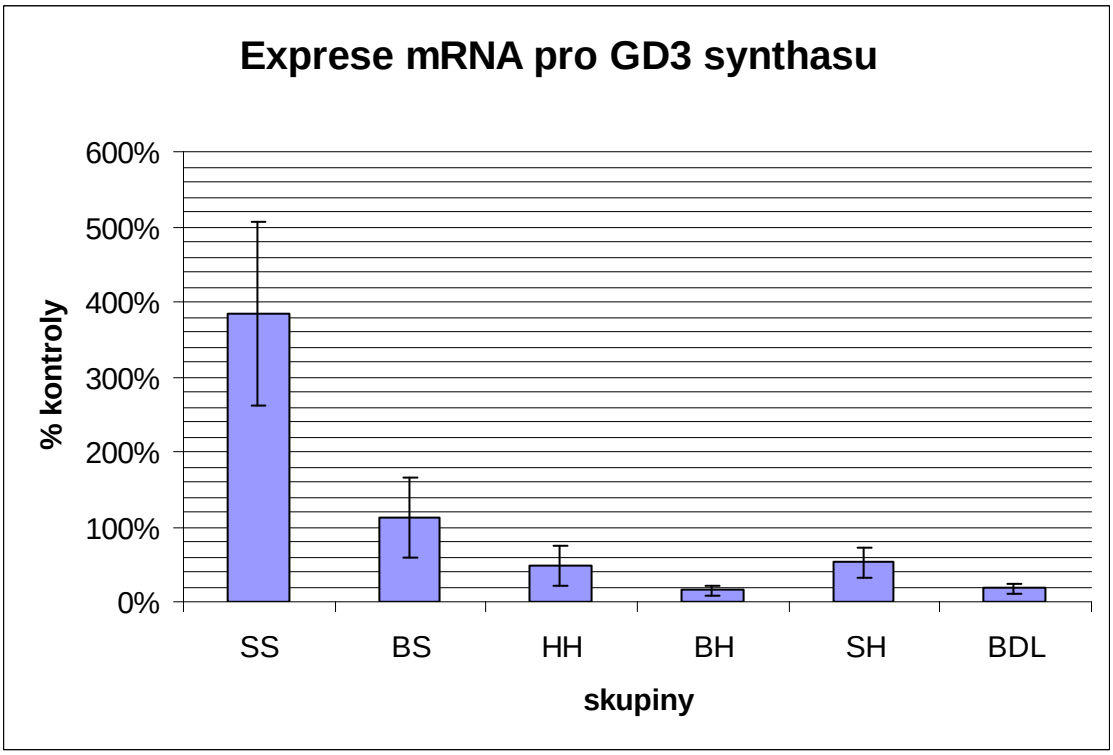
Výsledky lze shrnout v tom smyslu, že cholestáza způsobuje zvýšení celkové kyseliny sialové (celkových gangliosidů) a gangliosidů *b*- větvě (GD1b, GT1b, případně GD3). Vliv inhibice Sn-mesoporfyrinem se projevuje zvýšením celkové NeuNAc. Vliv heminu se neprojevil v hodnotách NeuNAc ani gangliosidů.

4.4. Stanovení exprese mRNA pro GD3 synthasu

Vzhledem k tomu, že u cholestázy docházelo ke zvýšení gangliosidů *b*- větve, bylo přistoupeno ke stanovení mRNA klíčového enzymu b- větve, GD3 synthasyy.

Tab.28: Exprese mRNA pro GD3 synthasu u jednotlivých skupin zvířat vyjádřená v % vůči kontrole

Skupina zvířat	Exprese mRNA / % kontroly průměr±SD
SH	52,9±20,0
BL	17,5±6,9
HH	48,2±26,2
BH	15,3±6,8
SS	383,8±123,1
BS	111,7±54,3



Graf 1: Výsledky stanovení mRNA odpovídající GD3 synthase u sledovaných skupin. Zatímco vlivem cholestázy (srovnání skupin SH s BL) dochází k poklesu mRNA, u skupin s inhibovanou HO-1 dochází ke zřetelnému nárůstu mRNA pro GD3 synthasu.

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[90]. Může být ovlivňováno hormony[91] , chemikáliemi nebo maligní transformací buněk. Toto složení může procházet změnami, které jsou ovlivňovány změnami v aktivitách glykosyltransferas, účastnících se v biosyntéze[92,93,94]. V myších játrech byly pozorovány změny v expresi gangliosidů v závislosti na věku[95].

Detailní vyšetření jednotlivých variací ve složení gangliosidů zjistilo odchylky ve složení gangliosidů v játrech potkana kmene Wistar, kde byly zvýšeny gangliosidy *b*- série (GD3, GD1b, GT1b), což korelovalo s aktivitou GD3 synthasy. Tyto změny vykazovaly odchylky mezi mladými a staršími zvířaty i rozdíly mezi samci a samicemi[22].

Vzhledem k uvedeným zjištěním je třeba poznamenat, že jak v publikaci Majera a spol.[1] , tak v práci prováděné mnou, byly použity samice potkanů kmene Wistar , v daném experimentu vždy stejného stáří (12 týdnů), u nichž byla zjištěna zvýšená míra gangliosidů *b*- série až po indukci EE -cholestázy.

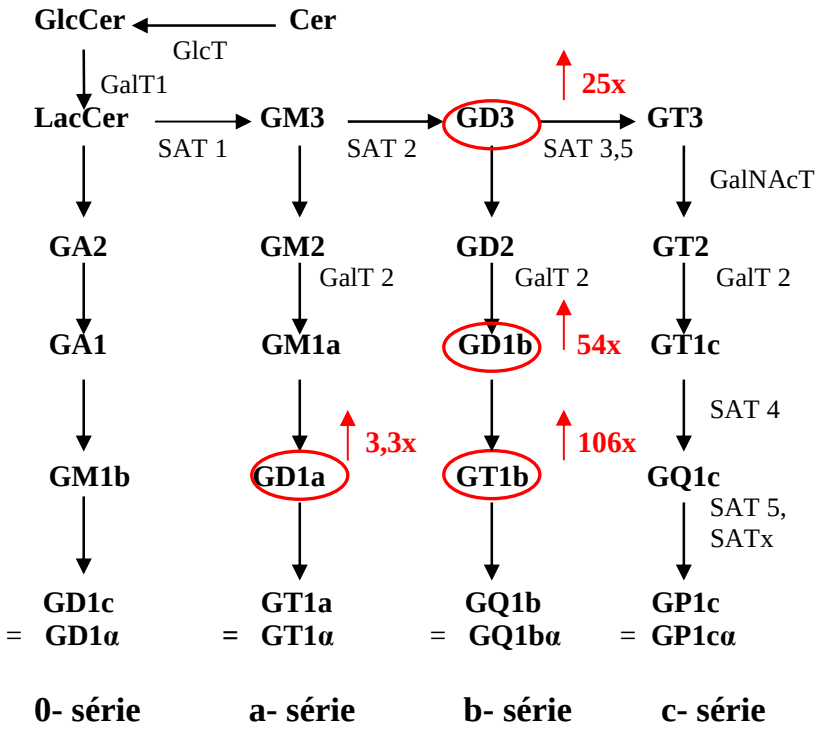
Zatímco Majer a spol. (2007)[1] sledovali změny gangliosidů v játrech u potkana kmene Wistar po vyvolání intrahepatální cholestázy 17-α-ethinyl estradiolem, v mé diplomové práci byly sledovány změny v gangliosidech u stejného kmene potkana po vyvolání obstrukční extrahepatální cholestázy, při níž se uzávěr žlučovými kameny experimentálně napodobuje podvazem žlučovodů.

Po metodické stránce jsem použila postupy vedoucí k srovnavatelným výsledkům s prací Majera a spol.. V isolaci gangliosidů jsem použila důkladnější postup vedoucí k většímu zaostření zón v následující chromatografii na tenké vrstvě. Postup vlastního chromatografického dělení i densitometrie byly identické. Rovněž fotometrické stanovení celkové lipidní kyseliny sialové. Proto se pokusím o srovnání výsledků.

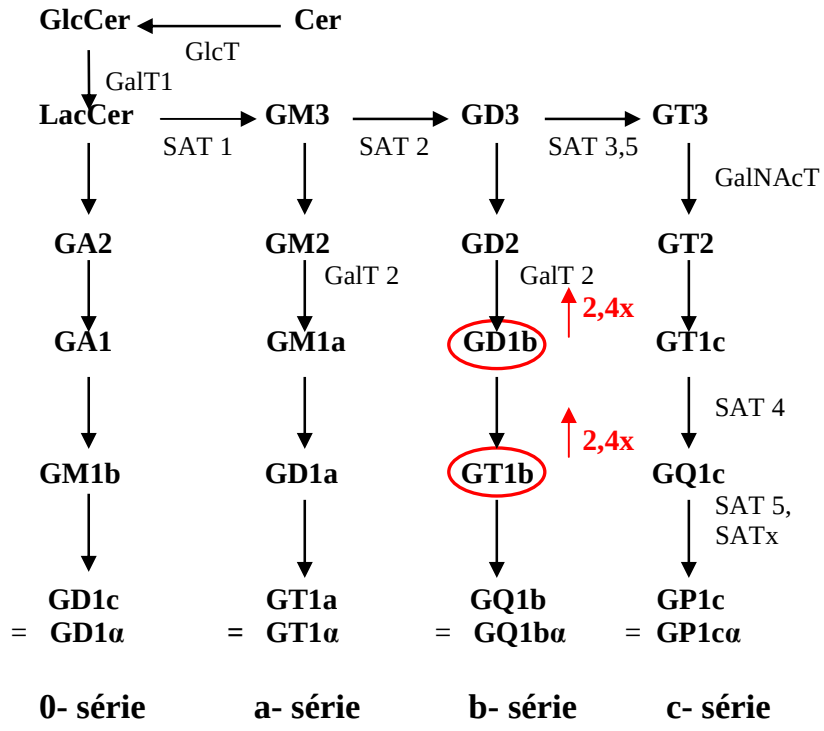
Nejprve srovnám kontrolní vzorky a vzorky s cholestázou:

Výsledky lze shrnout v tom smyslu, že cholestáza způsobuje zvýšení celkové kyseliny sialové (celkových gangliosidů) a gangliosidů *b*- větvě (GD1b, GT1b, případně GD3). Vliv inhibice Sn-mesoporfyrinem se projevuje zvýšením celkové NeuNAc. Vliv heminu se neprojevil v hodnotách NeuNAc ani gangliosidů.

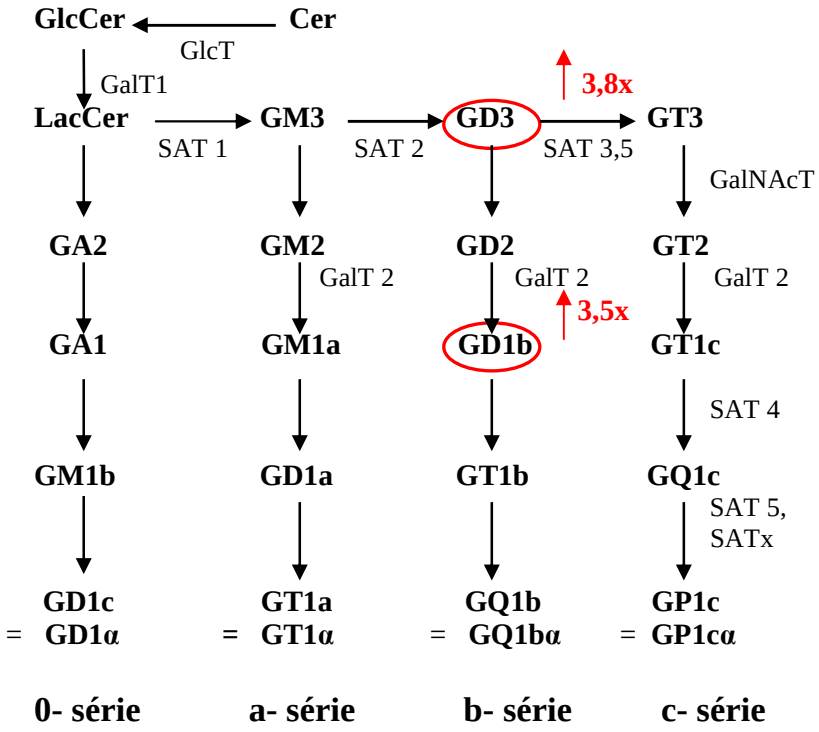
Signifikantních změny gangliosidů z chromatografických analýz uvádím přehledně zakreslené ve schématu biosyntézy gangliosidů s vyznačením násobku zvýšení.



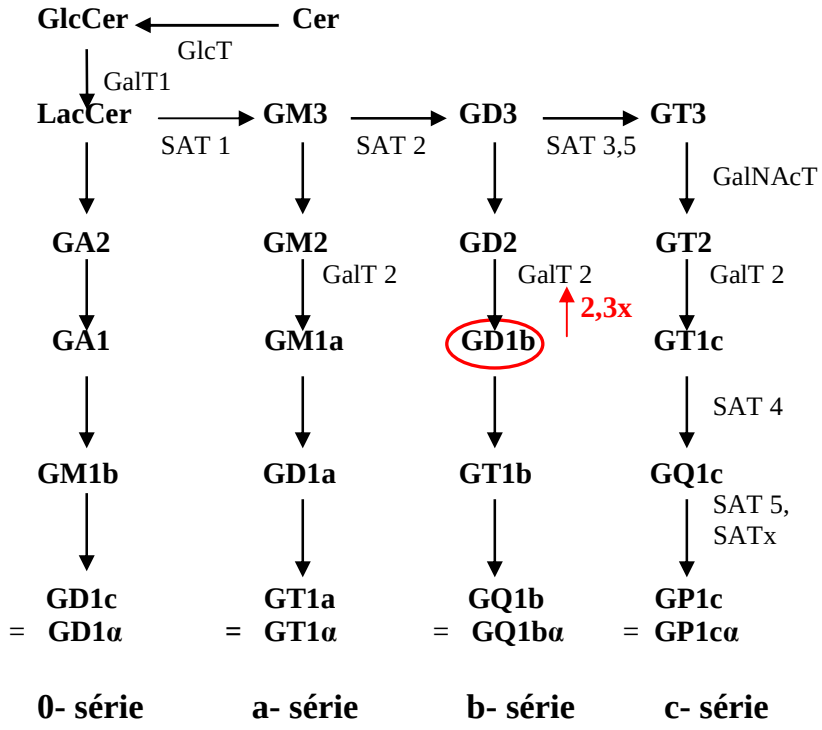
Obr. 6: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u EE-cholestázy.
Výrazně jsou zvýšeny gangliosidy GT1b (106x), GD1b (54x), GD3 (25x), GD1a (3,3x).
Podle práce Majera a kol. [1]



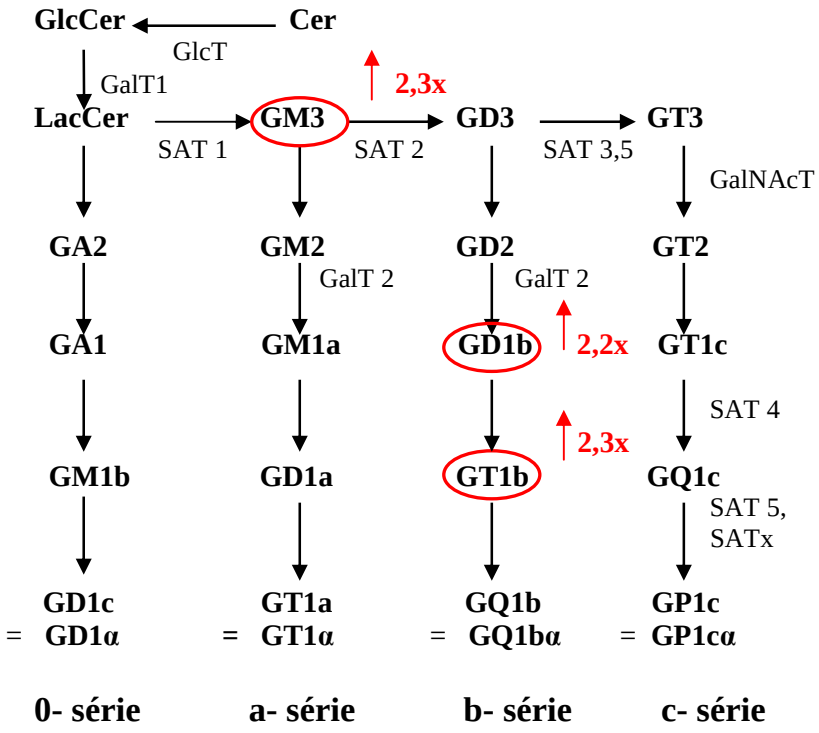
Obr. 7: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu proti slepě operovaným zvířatům, 5-denní (skupiny BL proti SH)



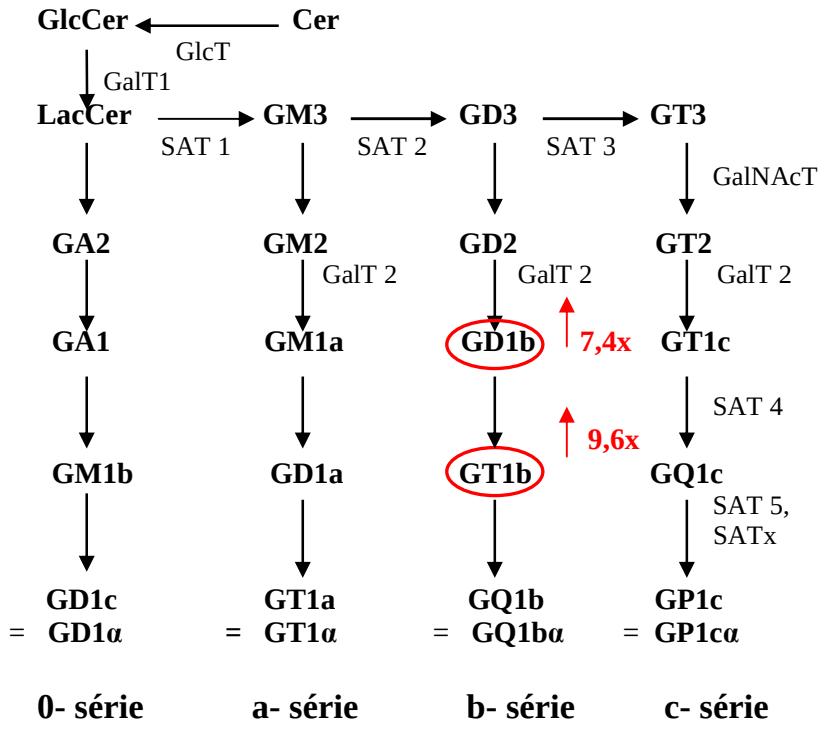
Obr. 8: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu proti slepě operovaným zvířatům, 18-denní (skupiny BX proti SX)



Obr.9: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu s inhibicí HO-1 proti slepě operovaným zvířatům s inhibicí HO-1 (skupiny BS x SS)



Obr.10: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu proti podvazu s inhibicí HO-1 (skupiny BL x BS)



Obr.11: Signifikantní změny ve složení gangliosidů u podvazu s aktivací HO-1 proti slepě operovaným zvířatům s aktivací HO-1 (skupiny BH x HH)

Srovnání zvýšení gangliosidů *b*- větve s mírou exprese mRNA pro klíčový enzym GD3 synthasu nepřineslo očekávané výsledky, protože při zvýšených gangliosidech *b*-větve odpovídající mRNA nebyla zvýšena. K podobným výsledkům nezvýšené mRNA pro GalT 2 a SAT 2, dospěl i Majer a spol. u EE cholestázy[1] a Šmíd pro GalT 2 u cholestázy indukované podvazem[3]. Senn a spol. (1991)[67] se však zmiňují o určité dosažené korelaci mezi stanovením aktivity glykosyltranferas a výsledky analýzy gangliosidů.Je tedy ještě potřebné v našem výzkumu sledovat aktivity glykosyktransferas. Toto stanovení aktivit glykosytransferas se vymyká možnostem řešení v rámci této diplomové práce (finančně nákladné substráty, zavedení metod pro stanovení enzymových aktivit). Stanovení aktivit bude řešeno v dalším výzkumu Hepatologické laboratoře.

Porovnání výsledků ve složení gangliosidů u intrahepatální[1] a obstrukční cholestázy ukazuje, že zvýšení gangliosidů *b*-větve u zvířat stejného pohlaví, věku, nemusí být připisováno jen estrogenům, ale může se vyskytovat i u cholestázy obstrukční, ikdyž toto zvýšení je méně výrazné.

Spojení chromatografické analýzy v této a Majerově práci[1] a histologických studií[2,3] může přinést vysvětlení v tom, že zmnožení gangliosidů v plazmatické membráně je důležité pro její zpevnění proti detergenčním účinkům CŽK.

Zvýšení mRNA u vzorků s inhibicí HO vede naopak k myšlence, že toto zvýšení mRNA sice souvisí se zvýšením biosyntézy GD3 synthasy, ale ta nesouvisí s nutností zpevňovat membránu gangliosidy, o čemž svědčí bodová lokalizace popisovaná v práci Šmída[3].

.

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 extrahepatální cholestáza způsobuje zvýšení celkové kyseliny sialové (celkových gangliosidů) a gangliosidů *b*- větve (GD1b, GT1b, případně GD3), což koreluje s výsledky studie EE-cholestázy Majera a spol.[1]. Vliv inhibice HO-1 Sn-mesoporfyrinem se projevuje pouze zvýšením celkové NeuNAc, signifikantní rozdíly v zastoupení gangliosidů nebyly zjištěny. Vliv aktivace HO-1 heminem se neprojevil v hodnotách NeuNAc ani gangliosidů. Exprese mRNA klíčového enzymu v biosyntéze gangliosidů *b*- série, GD3 synthasy, neprokázala dle očekávání zvýšení. Zvýšená biosyntéza gangliosidů *b*- větve může být tedy vysvětlena zvýšením aktivity GD3 synthasy. Stanovení aktivit příslušných glykosyltranferas bude jedním z dalších cílů výzkumné skupiny Hepatologické laboratoře 1.LF UK.

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., Stříteský, 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 Commision on Biochemical Nomenclature, The nomenclature of Lipids. Recommendations Lipids, 12, 455- 468 (1977)

5 Bláha, K., Koštíř, 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 Schüz-Henninger, R., Ullmer, E., Prinz, C., Decker, K., Eur. J. Biochem., 185, 327- 330 (1989)

23 Nores, G. A., Caputto, R., J. Neurochem., 42, 1205- 1211 (1984)

24 Yusuf H. K. M., Schwarzmann, G., Pohlenz, G., Sandhoff, K., Hoppe Seyler´s Z. Physiol., 368, 455- 462 (1987)

25 Iber, H., van Echten, G., Klien, R. A., Sandhoff, K., Eur. J. Cell Biol., 52, 236- 240 (1990)

26 Qiroga, S., Panzetta, P., Capputo, R., J. Neurosci. Res., 30, 414- 420 (1991)

27 Farukawa, K., Takamiya, K., Okada, M., Inoue, M., Fukumoto, S., Biochim. Biophys. Acta, 1525, 1- 12 (2001)

28 Proia, R. L., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 358, 879- 883 (2003)

29 Ichikawa, S., Nakajo, N., Sakiyama, H., Hirabayashi, Y., Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 2703- 2707(1994)

30 Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreud, U., Sandhoff, K., Proia,R. L., Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 9142- 9147 (1999)

31 Kolter, T., Proia, R. L., Sandhoff K., Traffic, 1, 803- 804 (2000)

32 Bosio, A., Binczek, E., Stoffel, W., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.., 93, 13280- 13285 (1996)

33 Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Popko, B, Cell., 86, 209- 219 (1996)

34 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)

35 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)

36 Chiavegatto, S., Sun, J., Nelson, R. J., Schnaar, R. L., Exp. Neurol., 166, 227- 234 (2000)

37 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)

38 Zhao, J., Furukawa, K., Fukumato, S., Okada, M., Furugen, R., Miyazaki, H., Takamiya, K., Aizawa, S., Shiku, H., Matsuyana, T., J. Biol. Chem., 274, 13744- 13747 (1999)

39 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)

40 Tettamanti, G., Masserini, M., Giulliani, A., Pagani, A., Ann. Inst. Super. Sanita., 24, 23- 32 (1988)

41 Koerner, T. A. W., Prestegard, J. H., Demou, P. C., Yu, R. K., Biochemistry, 22, 2676- 2684 (1983)

42 Acquotti, D., Fronza, G., Riboni, L., Sonnino, S, Tettamanti, G., Glycoconjugate J., 4, 119- 127 (1987)

43 Levery, S. B., Roberts, C. E., Salyan, M. E. K., Bouchon, B., Hakomori, S., Biomed. Environ. Mass Spectrosc., 19, 311- 318 (1990)

44 Tettamanti, G., Preti, A., Cestaro, B., Masserini, M., Sonino, S., Ghidoni, G., Am. Chem. Soc. Symp. Ser., 128, 321- 343 (1980)

45 Curatolo, W., Small, D. W., Shipley, G., Biochim. Biophys. Acta, 468, 11- 20 (1977)

46 Catu, L., Corti, M., Sonnino, S., Tettamanti, G., Chem. Phys. Lipids, 41, 315- 328 (1976)

47 Felgner, P. L., Freire, E., Barenholz, Y., Thompson, T. E., Biochemistry, 20, 2168- 2172 (1981)

48 Masserini, M., Freire, E., Biochemistry, 26, 237- 242 (1987)

49 Hakomori, S., v knize Handbook of Lipid Research, Vol. 3 Sphingolipid Biochemistry, J. N. Kanfer end S. Hakomori (eds) Plenum, New York, 327- 379 (1983)

50 Karlsson, K. A., Annu. Rev. Biochem., 58, 309- 350 (1989)

51 Myers, M., Wortman, C., Freire, E., Biochemistry, 23, 1442- 1448 (1984)

52 Singer, S. J., Nicolson, Science, 185, 720- 731 (1972)

53 Jain, M. K., White, H. B., Adv. Lipid Res., 15, 1- 60 (1977)

54 Tillack, T.W., Allietta, M., Moran, R. E., Young, W. W. J., Biochim. Biophys. Acta, 733, 15- 24 (1983)

55 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)

56 Rahmann H, Rösner H, Körtje K-H, Beitinger H,, Seybold V., Prog. Brain. Res., 101, 127- 145 (1994)

57 Rock P., Allietta M., Young W. W. Jr, Thompson T. E., Tillack T. W., Biochemistry, 30, 19- 25 (1991)
58 Simons, K., Ikonen, E., Nature, 387, 569- 572 (1997)
59 Müller, M., Jansen, P. L. M., J. Hepatol., 28, 344- 354 (1998)
60 Trauner, M., Meier, P. J., Boyer, J. L., J. Hepatol., 31, 165- 178 (1999)
61 Jansen, P. L. M., Müller, M., Can. J. Gastroenterol., 14, 233- 238 (2000)
62 Oude Elferink, R. P. J., Groen, A. K., J. Hepatol., 23, 617- 625 (1995)
63 Kawaguchi, T., Sakisaka, S., Mitsuyama, K., Hapatology, 31, 1285- 1295 (2000)
64 Morton, D. H., Salen, G., Batta, A. K., Gastroenterology, 119, 188- 195 (2000)
65 Rodrigues, C. M. P., Steer, C. J., J. Hepatol., 32, 135- 141 (2000)
66 Krähenbuhl, L., Schäfer, M., Krähenbuhl, S., J. Hepatol., 28, 1000- 1007 (1998)
67 Senn, H. J., Geiser, T., Fitzke, E., Baumgartner, U., Scholmerich, J., Gerok, W., J.Hepatol., 13, 152- 160 (1991)
68 Mesaric, M., Decker, K., Biochem. Biophys. Res. Commun., 171, 1188- 1191 (1990)
69 Kasai, N., Kamimura, A., Miyoshi, I., Ariga, T., J. Biochem., 113, 251- 257 (1993)
70 Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 61, 748- 755 (1968)
71 Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R., J. Biol. Chem., 244, 6388- 6394 (1969)
72 Yoshida, T., Kikuchi, G. J., Biol. Chem., 253, 4230- 4236 (1978)
73 Tenhunen, R., Ross, M. E., Marver, H. S., Schmid, R., Biochemistry, 9, 298- 303 (1970)
74 Motterlini, R., Mann, B. E., Foresti, R., Expert. Opin. Investig. Drugs., 14, 1305- 1318 (2005)
75 Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glaker, A. N., Ames, B. N., Science, 235, 1043- 1047 (1987)
76 Vítek, L., Schwertner, H. A., Adv. Clin. Chem., 43, 1- 57 (2007)
77 Bliuger, A. F., Dudnik, L. B., Maiore Ala, Mieze, I. E., Biull. Eksp. Biol. Med., 99, 166- 168 (1985)
78 Wu, T. W., Wu, J., Li, R. K., Mickle, D., Carey, D., Biochem. Cell. Biol., 69, 683- 688 (1991)
79 Wu, T. W., Carey, D., Wu, J., Sugiyama, H., Biochem. Cell. Biol., 69, 828- 834 (1991)

80 Otterbein, L., Chin, B. Y., Otterbein, S. L., Lowe, V. C., Fessler, H. E., Choi, A. M., Am. J. Physiol., 272, 268- 275 (1997)

81 Jeney, V., Balla, J., Yachie, A., Varga, Z., Vercellotti, G. M., Eaton, J. W., Balla, G., Blood., 100, 879- 887 (2002)

82 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)

83 Leeden, R. W., Yu, R. K., Eng, L. F., J. Neurochem., 21, 829- 839 (1973)

84 Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H., J. Biol. Chem., 226, 497- 509 (1957)

85 Suzuki, K., J. Neurochem., 12, 629- 638 (1965)

86 Svennerholm, L., Biochim. Biophys. Acta, 24, 604- 611 (1957)

87 Smid, F., Reinisova, J., J. Chromatogr., 86, 200- 2004 (1973)

88 Suzuki, K., Life Sci., 3, 1227- 1233 (1964)

89 Chigorno, V., Sonnino, S., Ghidoni, R., Tettamanti, G., Neurochem. Int., 4, 397- 404 (1982)

90 Nakamura, K., Hashimoto, Y., Yamakawa, T., Suzuki, A., J. Biochem., 103, 201- 208 (1988)

91 Dahiya, R., Dudeja, P. K., Brasitus, T. A., Biochim. Biophys. Acta, 962, 390- 395 (1988)

92 Fishman, P. H., Simmons, J. L., Brady, R. O., Freese, E., Biochem. Biophys. Res. Commun., 59, 292- 299 (1974)

93 Momoi, T., Shinmoto, M., Kasuya, U., Senoo, H., Suzuki, Y., J. Biol. Chem., 261, 16270- 16273 (1986)

94 Hakomori, S., Chem. Phys. Lipids, 42, 209- 233 (1986)

95 Nakamura, Y., Hashimoto, Y., Yamakawa, T., Suzuki, A., J. Biochem., 103, 396- 398 (1988)

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

Jméno a přijmení (s adresou)	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka