

MASARYKOVA UNIVERZITA

Lékařská fakulta

Brno

**ANALÝZA ŽLUČOVÝCH KYSELIN V MYŠÍCH
VZORCÍCH POMOCÍ HPLC**

Bakalářská práce

Obor zdravotní laborant

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Karel Chalupský PhD

Autor:

Markéta Pícková

Brno, duben 2015

Jméno a příjmení autora: Markéta Pícková

Název bakalářské práce: Analýza žlučových kyselin v myších vzorcích pomocí HPLC

Pracoviště: Ústav molekulární genetiky AV ČR v Praze

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Karel Chalupský PhD

Rok obhajoby bakalářské práce: 2015

Souhrn: Stanovení žlučových kyselin může sloužit jako ukazatel jaterního poškození či funkčnosti jater. Cílem této práce je optimalizace detekce žlučových kyselin s fluorescenčním značením, pomocí HPLC. Konečná metoda bude využívána pro analýzu žlučových kyselin ve vzorcích myšního séra, jaterního extraktu a žluči, jako sekundární fenotypizační screening pro International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC).

Abstract: The analysis of bile acids can be used as a marker of liver damage or liver function. The aim of this work is optimization of bile acid detection with fluorescent labelling and detection on HPLC. Finalized method will be used for bile acids analysis in mouse serum, liver extract and bile as a secondary phenotyping screening for International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC).

Klíčová slova: HPLC, žlučové kyseliny, analýza, myš

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením

RNDr. Karla Chalupského PhD a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

V Brně dne

.....

Poděkování

Touto cestou bych chtěla velice poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce, panu RNDr. Karlovi Chalupskému PhD. Nejen za cenné rady a čas, který mi věnoval, ale také za jeho nekonečnou trpělivost a přátelský přístup.

Dále bych ráda poděkovala panu docentu Radislavu Sedláčkovi PhD a všem svým kolegům z laboratoře Transgenních modelů nemocí, ÚMG AV ČR za vstřícnost a toleranci během mého studia a také děkuji rodině a přátelům za velkou podporu.

Seznam použitých zkratek:

ADAM A Disintegrin And Metalloproteinase

ALP Alkalická fosfatáza

ALT Alaninaminotransferáza

AMK Aminokyselina(y)

BrAMN 2-bromoacetyl-6-methoxynaphthalen

CA Kyselina cholová

CDC Kyselina chenodeoxycholová

CYP27A1 Sterol 27- hydroxyláza

CYP7A1 Cholesterol 7 α -hydroxyláza

CYP8B1 Sterol 12 α -hydroxyláza

DC Kyselina deoxycholová

EDC N-(3 Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid hydrochlorid

FGF15/19 Fibroblast growth factor 15/19

FGFR4 Fibroblast growth factor receptor 4

FLD Fluorescenční detektor

FXR Farnesoid X receptor

GC Kyselina glykocholová

GCDC Kyselina glykochenodeoxycholová

GDC Kyselina glykodeoxycholová

GUDC Kyselina glykoursodeoxycholová

HNF4a Hepatocyte nuclear factor 4

HPLC Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IL Interleukin

KHCO₃ hydrogenuhličitan draselný

LCA Kyselina lithocholová

L_D Mez detekce

L_Q Mez stanovitelnosti

LRH-1 Liver-related homolog-1

MCA Kyselina muricholová

MMP Matrix metaloproteináza

MPAC-Br 3-[4-(Bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarin

NBD-F 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan

NBD-H 4-Hydrazino-7-nitro-benzofurazan hydrazin addukt

PXR Pregnane X receptor

SHP Small heterodimer partner

TDeABr Tetrakis (decyl) ammonium bromid

TGF α Transforming growth factor α

TNF α Tumor necrosis factor α

UDCA Kyselina ursodeoxycholová

ŽK Žlučové kyseliny

Obsah

1	Cíle práce	10
2	Úvod.....	10
3	Biosyntéza žlučových kyselin.....	11
3.1	Enterohepatální cirkulace.....	12
3.2	Žlučové kyseliny jako signální molekuly	13
3.3	Farnesoid X receptor a regulace syntézy žlučových kyselin	14
3.3.1	Inhibice cholesterol 7 α -hydroxylázy	14
3.3.2	Inhibice sterol 12 α -hydroxylázy	14
3.4	Cholesterol	15
3.5	Metabolismus lipidů.....	16
3.6	Žlučové cesty	17
3.6.1	Intrahepatální žlučové cesty.....	17
3.6.2	Extrahepatální žlučové cesty	18
3.7	Toxicita versus léčebné účinky žlučových kyselin	19
4	Praktická část	22
4.1	Úvod do praktické části.....	22
4.2	Možnosti analýzy žlučových kyselin	23
4.2.1	Fotometrické metody	23
4.2.2	Chromatografické metody	23
4.2.3	Imunoeseje	26
4.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	26
4.3.1	Separace	27

4.3.2	Součásti HPLC přístroje	30
4.3.3	Fluorescenční detektor	32
5	Metodika	33
5.1	Modifikace značení karboxylu hydrazinem (Novak a Kruppa 2008).....	33
5.1.1	Derivatizační reakce	33
5.1.2	Příprava standardů žlučových kyselin	33
5.1.3	HPLC podmínky	34
5.2	Označení ŽK 2-(Bromoacetyl)-6-methoxynaftalenem (Gatti et al. 1997).....	34
5.2.1	Derivatizační reakce	34
5.2.2	Příprava standardů žlučových kyselin	34
5.2.3	HPLC podmínky	35
5.3	Označení karboxylu 3-[4-(Bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarinem (Kurosawa et al. 1997, s. 27)	35
5.3.1	Derivatizační reakce s acetonitrilem.....	35
5.3.2	Derivatizační reakce s metanolem	36
5.3.3	Příprava standardů žlučových kyselin	36
5.3.4	HPLC podmínky	36
6	Výsledky	38
6.1	Značení žlučových kyselin fluoroforem.....	38
6.1.1	Změny derivatizační reakce	39
6.1.2	Změny derivatizační reakce	40
6.2	Označení karboxylu 3-[4-(Bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarinem.....	40
6.2.1	Optimalizace gradientu	42

6.3	Kalibrace	45
6.4	Stabilita retenčních časů.....	47
6.5	Lineární regrese.....	48
6.6	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	49
6.7	Kyselina muricholová	50
7	Závěr	51
8	Soupis literatury	52
9	Přílohy.....	57

1 Cíle práce

- Optimalizace a zavedení vhodné metody pro stanovení jednotlivých žlučových kyselin a jejich konjugátů, ve vzorcích myšního séra, žluči a jaterním extraktu
- Potvrzení či vyvrácení hypotézy o polaritě konjugovaných a volných ŽK

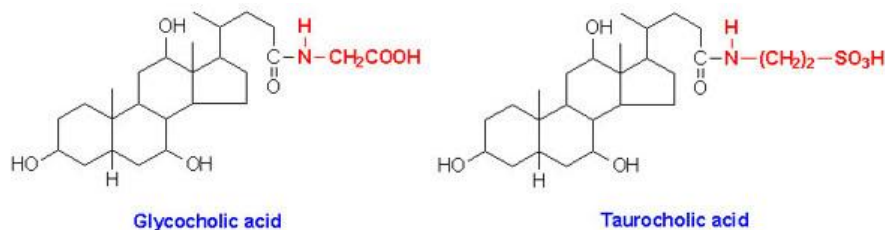
2 Úvod

Žlučové kyseliny (ŽK) jsou organické látky steroidní povahy a jsou nedílnou součástí žluči. Ve své molekule mají steroidní jádro, hydroxylové skupiny -OH a karboxylovou skupinu -COOH. Díky této chemické struktuře jsou to amfipatické sloučeniny, přirozené tenzidy. Jejich funkce v organismu je zejména emulgace a vstřebávání tuků přijatých potravou, tím pádem také absorpce lipofilních látek (vitaminy A, D, E, K). Dále pak eliminují cholesterol z organismu a napomáhají jeho rozpouštění ve žluči. V posledních letech se zjistilo, že mohou sloužit i jako signální molekuly, které regulují některé metabolické procesy v těle. Některé ŽK se využívají při léčbě jaterních onemocnění, zejména cholesterolových žlučnickových kamenů, ale některé jsou pro organismus toxické. Slouží také jako další ukazatelé jaterního poškození či funkce jater. Proto je důležité hladinu ŽK v organismu sledovat.

3 Biosyntéza žlučových kyselin

Biosyntéza žlučových kyselin je hlavním mechanismem odbourání cholesterolu u savců (Russell 2003). Cholesterol je transformován na rozpustnější molekuly, žlučové kyseliny, které lze snadněji vyloučit z jater do žluči (Russell 2003). Podle místa a mechanismu vzniku je rozdělujeme na primární a sekundární. *Kyselina cholová (CA)*, *chenodeoxycholová (CDC)*, u hlodavců také α a β *muricholová (α a β MCA)* (Fu et al. 2014), a *ursodeoxycholová (UDCA)* u medvědů (Alnouti et al. 2008), vznikají jako primární žlučové kyseliny v hepatocytech, hydroxylací cholesterolu na sedmém uhlíku. Reakce je katalyzována enzymem cholesterol 7 α -hydroxylázou (CYP7A1), který patří do skupiny cytochromů P450 (King 1996). Tato cesta syntézy je označována jako klasická. U myši ale syntéza primárních žlučových kyselin může probíhat až z 25% alternativní cestou, hydroxylací cholesterolu na sedmadvacátém uhlíku, za účasti mitochondriálního enzymu sterol 27- hydroxylázy (CYP27A1) (King 1996). V poslední fázi syntézy dochází ke zkrácení postranního řetězce o tři uhlíky (Chiang 2009).

Před exkrecí do žluče mohou být primární ŽK konjugovány s aminokyselinami (Obr.1). Nejčastěji s glycinem nebo taurinem (Alnouti et al. 2008). Tyto glyko- a tauro- konjugáty mají výrazně nižší pKa a tím pádem jsou lépe rozpustné v alkalickém pH tenkého střeva (Gu et al. 1992). Zde mají velký význam při tvorbě micel a emulgaci tuků přijatých potravou. Jsou také nezbytné pro vstřebávání vitaminů rozpustných v tucích - A,D,E,K.



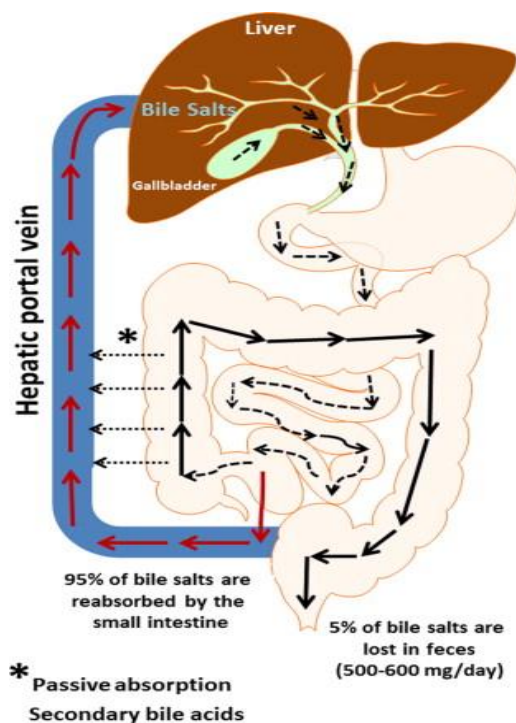
Obrázek 1: Konjugace CA s aminokyselinami (King 1996)

Celkově je v syntéze žlučových kyselin zahrnuto přes 17 enzymů (Alnouti et al. 2008). Mutace v genech kódujících tyto enzymy mohou způsobovat široké spektrum onemocnění, od jaterního selhání v dětství po progresivní neuropatie v dospělosti (Russell 2003).

3.1 Enterohepatální cirkulace

V tenkém střevě jsou primární ŽK modifikovány střevní mikroflorou. Dochází k dekonjugaci aminokyselin pomocí enzymu ze skupiny hydroláz, který se nachází ve většině střevních bakterií. 7 α -dehydroxylace probíhá v několika kmenech rodu *Clostridium* (Zhou a Hylemon 2014). Tímto mechanismem vznikají sekundární žlučové kyseliny (Mayes 2001). Mezi ně patří *kyselina deoxycholová (DC)*, která vzniká přeměnou kyseliny cholové, *litocholová (LCA)* z kyseliny chenodeoxycholové (Mayes 2001), *ω muricholová (ω MCA)* a *murideoxycholová (MDCA)* (Fu et al. 2014), obě přeměnou muricholové kyseliny.

V poslední části tenkého střeva, *ileu*, se většina ŽK resorbuje. Až 95% žlučových kyselin vyloučených do střeva je transportováno portálním systémem zpět do jater. Tento děj se nazývá *enterohepatální cirkulace* (Obr.2). Může proběhnout až desetkrát denně, přičemž ztráty ŽK stolicí jsou malé. Ty jsou doplněny syntézou ŽK z cholesterolu. (Mayes 2001)



Obrázek 2: Enterohepatální cirkulace (Zhou a Hylemon 2014)

3.2 Žlučové kyseliny jako signální molekuly

ŽK jsou přirozené ligandy specifických jaderných receptorů - Farnesoid X receptoru (FXR), Pregnane X receptoru (PXR), vit D receptoru a receptorů spřažených s G proteinem. Svým navázáním jsou schopny je aktivovat. Tyto jaderné receptory jsou transkripční faktory, které po aktivaci regulují expresi cílových genů (Claudel et al. 2005). Afinity jednotlivých ŽK k receptorům se liší. Pro FXR receptor je nejlepším aktivátorem kyselina chenodeoxycholová (CDCA). Kyselina lithocholová (LCA), má největší afinitu k vit D receptoru a PRX. To koresponduje s tím, že PRX a vit D receptory mají pro buňky ochrannou funkci. Jejich aktivací totiž dochází k tomu, že se zvýší exprese genů, které kódují enzymy štěpící LCA na hydrofilnější molekuly, (Zhou a Hylemon 2014) a tím odstraňují tuto hydrofobní žlučovou kyselinu, která je v nadbytku cytotoxická.

3.3 Farnesoid X receptor a regulace syntézy žlučových kyselin

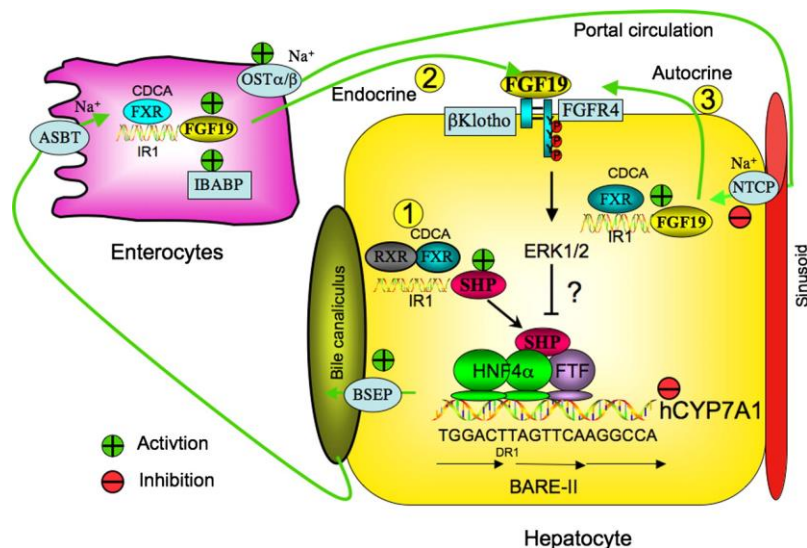
Syntéza žlučových kyselin musí být velmi striktně regulována. Při jejich trvalé nadprodukci a hromadění může docházet k chronickému poškození jater, následně vzniku jaterních onemocnění včetně karcinomu jater. Regulace syntézy ŽK je zajištěna systémem negativní zpětné vazby. To znamená, že pokud se ŽK začnou akumulovat, dojde ke snížení exprese dvou hlavních enzymů syntézy, CYP7A1 a CYP8B1 (Russell 2003). Právě v tomto procesu má největší úlohu FXR. Je to specifický jaderný receptor, který je aktivován navázáním ŽK a blokuje syntézu z cholesterolu. Tento receptor je nejvíce zastoupený v játrech a střevě (Claudel et al. 2005).

3.3.1 Inhibice cholesterol 7 α -hydroxylázy

Aktivací FXR ve střevech se indukuje *fibroblast growth factor 15/19* (FGF15/19). Ten se pak váže na specifický receptor *fibroblast growth factor receptor 4* (FGFR4) v hepatocytech a dojde tak ke spuštění signální kaskády, která vede ke snížení exprese genu pro CYP7A1 (Obr.3) (Zhou a Hylemon 2014).

3.3.2 Inhibice sterol 12 α -hydroxylázy

Enzym 12 α -hydroxyláza (CYP8B1), je nezbytný pro syntézu CA. Jeho aktivita udává také poměr CA/CDCA při klasické cestě biosyntézy ŽK (Zhou a Hylemon 2014). Jeho inhibice exprese začíná vazbou aktivovaného FRX na DNA, tzv. „*FXR response elements*“ (FXREs) a zvýšením exprese genu kódující atypický jaderný receptor (SHP) (Claudel et al. 2005). Promotor SHP, totiž obsahuje FXREs, což vysvětluje, že FXR stimuluje jeho transkripci (Russell 2003). SHP se na DNA neváže, ale interaguje s několika transkripčními faktory, jako jsou *hepatocyte nuclear factor 4* (HNF4a) a *liver related homolog-1* (LRH-1). Tím dojde k inhibici transkripce genu CYP8B1 (Zhou a Hylemon 2014).



Obrázek 3: Inhibice CYP7A1 (Chiang 2009)

3.4 Cholesterol

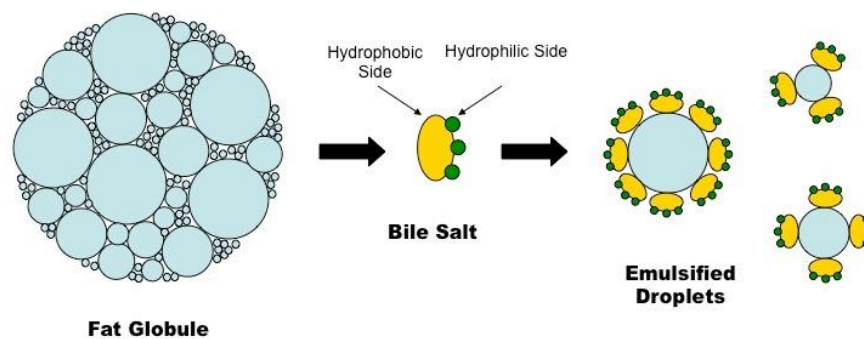
Cholesterol je organická látka, která patří mezi nejvýznamnější steroidy. Základem struktury je *steran*, složený ze 17 uhlíkových atomů (Dostál et al. 2012). Do organismu může být cholesterol přijímán potravou ve formě esterů cholesterolu nebo je syntetizován *de novo*. Zdrojem jsou hlavně živočišné tuky. Syntéza probíhá téměř ve všech tkáních, ale nejvíce v játrech z AcetylCoA, za katalýzy HGM-AcetylCoA syntázy. Cholesterol je součástí buněčných membrán, prekurzorem steroidních hormonů (kortikoidy, androgeny, estrogeny a gestageny), vit D a žlučových kyselin (Soška 2011). V krvi je transportován navázaný na protein. Tyto vzniklé lipoproteinové částice, jsou více polární, a tudíž lze hydrofobní cholesterol snadněji transportovat ve vodném prostředí plazmy. Podle hustoty, kterou udává poměr proteinů a triacylglycerolů rozdělujeme lipoproteiny (LP) do pěti skupin: *chylomikrony*, *VLDL* (*very low density lipoprotein*), *IDL* (*intermediate density lipoprotein*), *LDL* (*low density lipoprotein*) a *HDL* (*high density lipoprotein*) částice. HDL transportují cholesterol z periferních tkání zpět do jater, odkud je vylučován do žluče a dále eliminován. LDL částice transportují naopak estery cholesterolu z jater do tkání.

3.5 Metabolismus lipidů

V metabolismu lipidů mají ŽK důležitou roli při jejich absorpci ve střevě. Lipidy jsou hydrofobní látky rostlinného či živočišného původu. Základem molekuly jsou mastné kyseliny (MK) a alkohol. Reakcí těchto složek pak vznikají estery. Kromě MK a alkoholů mohou obsahovat i další složku, většinou polární (protein, kyselinu fosforečnou, sacharid, apod.). Tyto lipidy se nazývají *složené lipidy* a mají vždy hydrofilnější charakter. V těle mají tuky mnoho důležitých funkcí (Dostál et al. 2012).

- Zásoba energie
- Součásti buněčných membrán
- Příjem esenciálních MK potravou
- Prekurzory některých regulačních molekul (prostaglandiny, leukotrieny, tromboxany)
- Tepelná izolace

Trávení tuků začíná v žaludku. Jsou štěpeny žaludeční lipázou, což je enzym ze skupiny hydroláz. Nejzásadnější fáze metabolismu lipidů probíhá v tenkém střevě, v *duodenu*. Dochází zde k jejich emulgaci žlučovými kyselinami (Obr.4) (Dostál et al. 2012). Svoji hydrofobní částí se naváží k lipidům a hydrofilní část směřuje do okolního prostředí. Emulgace usnadňuje přístup pro pankreatickou lipázu, která zahájí další hydrolytické štěpení. Produktem jsou volné MK a 2-monoacylglycerol (alkohol) nebo také volný cholesterol (Dostál et al. 2012). Všechny tyto molekuly vstupují do *enterocytů*, které pokrývají sliznici střeva. Pro usnadnění difúze se vytvářejí tzv. *směsné micely*. Vznikají na rozhraní mezi lumen a membránou buněk. Zde mají ŽK klíčovou roli (Dostál et al. 2012).



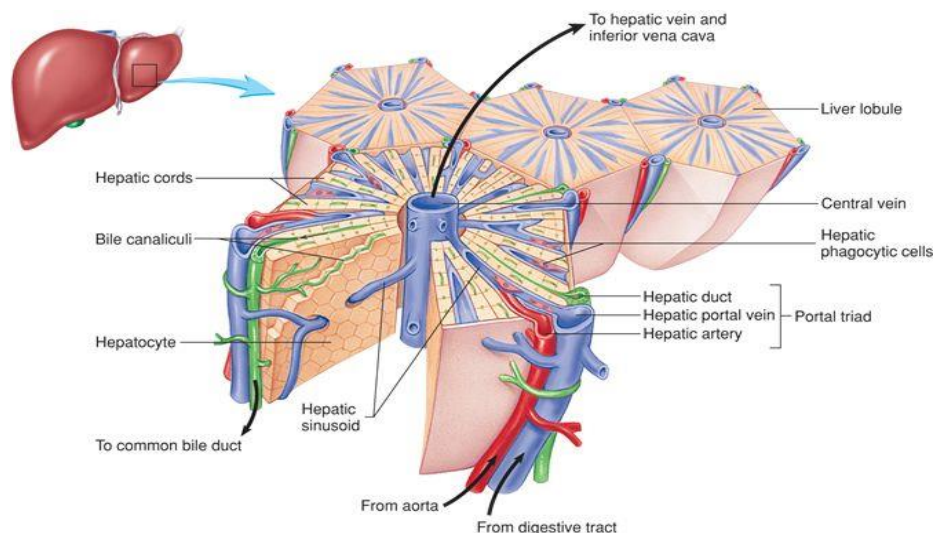
Obrázek 4: Emulgace lipidů (ANON. 2013)

3.6 Žlučové cesty

Slouží k odvádění žluče do žlučníku a do tenkého střeva. Z hlediska anatomie je rozdělujeme na intrahepatální (Obr.5) a extrahepatální (Obr.6).

3.6.1 Intrahepatální žlučové cesty

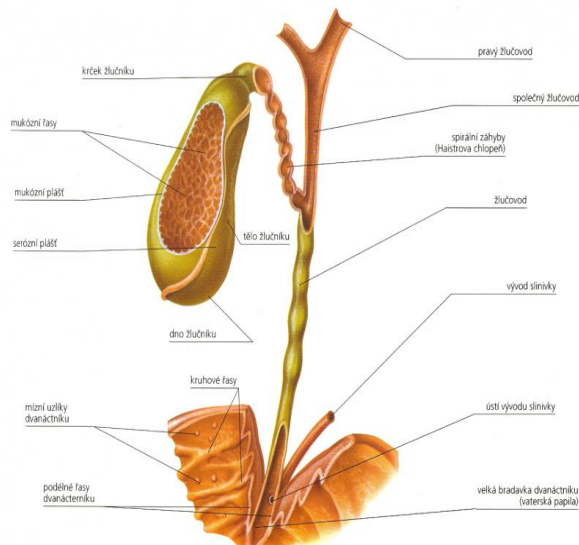
Začínají v parenchymu jater jako systém kapilár bez vlastní výstelky (*Canaliculi biliferi*). Procházejí uvnitř jaterního lalůčku mezi trámcí hepatocytů. Směrem k portobiliárnímu prostoru, tzn. od centrální žíly k periférii lalůčku, se formuje Herringův kanálek (*ductus bilifer*), vystlaný kubickým epitelem. Ten odvádí žluč do interlobulárního žlučvodu (*ductus bilifer interlobularis*) v portobiliárním prostoru (Šafka 2010).



Obrázek 5: Intrahepatální žlučové cesty (Karoliska Institutet 2014)

3.6.2 Extrahepatální žlučové cesty

Navazují na intrahepatální cesty spojením interlobulárních žlučovodů v lobární vývody (*ductus hepaticus dexter et sinister*). Těmi žluč opouští játra. Extrahepatální žlučové cesty pokračují společným jaterním vývodem (*ductus hepaticus communis*), který vzniká spojením lobárních vývodů. K němu se připojuje vývod žlučníku (*ductus cysticus*) v oblasti *ligamentum hepatoduodenale*. Poslední částí žlučového traktu je žlučovod (*ductus choleductus*). Jím je žluč odváděna do tenkého střeva. K extrahepatickým žlučovým cestám patří také žlučník (*vesica biliaris*), který slouží jako zásobník žluči (Šafka 2010). Přestože se žlučník nachází u většiny savců, u některých druhů, např. krysa (Hebel a Stromberg 1986) nebo kůň (Nickel et al. 1979), zcela chybí.



Obrázek 6: Extrahepatální žlučové cesty (Svojtka a Vašut 1996)

3.7 Toxicita versus léčebné účinky žlučových kyselin

Biologické vlastnosti a aktivita ŽK je úzce spojena s chemickou strukturou jednotlivých molekul. Nejvíce závisí na:

- počtu -OH skupin
- α a β pozici -OH skupin (prostorová orientace)
- konjugaci s aminokyselinou (AMK)

Tyto faktory ovlivňují hydrofobicitu ŽK, což udává jejich toxicitu a litogenicitu (Thomas et al. 2008). Obecně platí, čím hydrofilnější (polárnější) molekula, tím méně je toxická pro organismus. Z hlediska hydroxylových skupin, jsou hydrofilnější ty žlučové kyseliny, které mají ve své molekule větší počet -OH. Více než na počtu ale záleží na jejich prostorové α či β orientaci. Jestli-že se hydroxylové skupiny nacházejí pouze v pozici α , je molekula žlučové kyseliny méně hydrofilní než ta, ve které jsou hydroxyly orientovány ekvatoriálně, tzn. v β pozici, a to i v případě, že počet -OH je stejný. Např. Ursodeoxycholová (UDCA) a chenodeoxycholová (CDCA) (Obr.7) (Thomas et al. 2008).

Ursodeoxycholová a muricholová (MCA) jsou nejvíce hydrofilní žlučové kyseliny. UDCA se využívá pro léčbu cholesterolových žlučnickových kamenů (Wang a Tazuma 2002). Principem léčby je snížení rychlosti sekrece žluči a snížená absorpce cholesterolu v tenkém střevě, tím pádem nižší saturace žluči cholesterolem (Wang a Tazuma 2002). Bylo zjištěno, že má další pozitivní účinky a dá se využít k léčbě i jiných jaterních onemocnění, a to *primární biliární cirhózy, intrahepatální cholestázy* a dalších *cholangiopatií* (Buryova et al. 2013). Souhrně mezi tyto účinky patří:

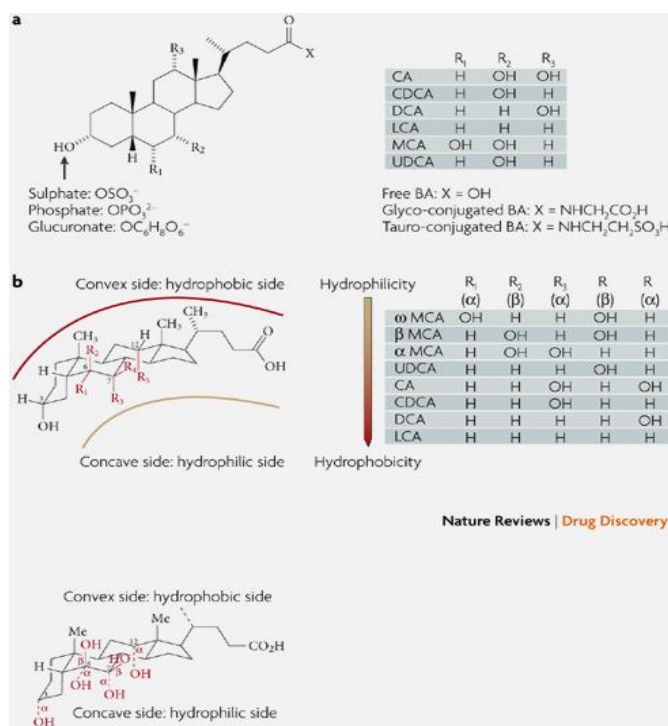
- zvýšení rozpustnosti endogenních ŽK
- stimulace hepatocelulární a duktulární sekrece žluči
- ochrana buněk před poškozením cytokiny a žlučovými kyselinami
- protizánětlivé účinky – snížení množství prozánětlivých cytokinů TNF α , TGF α a sMet
- ochrana buněk proti apoptóze

MCA je primární trihydroxylová ŽK a je nejvíce zastoupena ve žluči myší a potkanů. Bylo prokázáno, že velmi účinně snižuje riziko vzniku cholesterolových kamenů i jejich léčbu u myší (Wang a Tazuma 2002).

V roce 2002 proběhla studie, ve které byly srovnávány účinky UDCA a β MCA na rozpouštění a prevenci vzniku cholesterolových kamenů u myší. Experimentální zvířata byla 8 týdnů krmena speciální dietou, která vyvolala tvorbu cholesterolových kamenů. Část myší dostávala navíc UDCA nebo β MCA. Výsledek byl takový, že se u všech myší vytvořily cholesterolové kameny. Příměs UDCA snížila výskyt na 50%, β MCA na 20%. Obě ŽK snížily sekreci žluči, saturaci žluči cholesterolem a absorpci cholesterolu v tenkém střevě. Dále bylo sledováno, jaký efekt mají na prevenci vzniku cholelitiázy, neboli na prevenci tvorby kamenů. V případě β MCA došlo k rozpouštění 100% kamenů, u UDCA 60%. Závěrem této studie lze říci, že β MCA je efektivnější v léčbě i prevenci cholesterolových kamenů u myší. Mohla by být dalším potenciálním lékem pro lidské pacienty (Wang a Tazuma 2002).

Oproti tomu za nejvíce toxickou žlučovou kyselinu je považována lithocholová kyselina (LCA). Je to monohydroxylová sekundární žlučová kyselina, která vzniká z primární CDCA a u člověka může být metabolizována z UDCA v tlustém střevě (Hofmann 2004). Při cholestatických

onemocněních (např. obstrukce žlučových cest) dochází k akumulaci ŽK v játrech, což má toxické účinky na tkáň. U myši, kde byla obstrukce simulována podvázáním žlučovodů (*BDL-bile duct ligation*), se rozvinuly charakteristické lokalizované nekrózy v jaterním parenchymu (Woolbright et al. 2014). Dále bylo prokázáno, že hromadění LCA a jejích metabolitů u myši, které byly touto žlučovou kyselinou krmeny, vede k precipitaci LCA v intralobulárních žlučovodech a uzávěru žlučového systému, připomínající cholestázu z BDL (Woolbright et al. 2014) a indukuje fibrózu jater (Fickert et al. 2006). V plazmě těchto myši byly naměřeny vysoké aktivity enzymů signalizující jaterní poškození. Pomocí *real time PCR* metody, se zjišťovala exprese genů, kódující prozánětlivé cytokiny. Silně zvýšená exprese byla u několika genů, zahrnující *interleukiny* (IL-6, IL-1 β , IL-10), *chemokiny* a *adhezivní molekuly* (*ICAM-1*) (Woolbright et al. 2014).



Obrázek 7: Obecná struktura molekuly ŽK a tabulka hydrofobicity (Thomas et al. 2008)

4 Praktická část

4.1 Úvod do praktické části

Pracuji v laboratoři oddělení Transgenních modelů nemocí na Ústavu molekulární genetiky AV ČR v.v.i. jako histologický laborant.

„Laboratoř se zabývá vývojem nových modelů nemocí pomocí moderních transgenních technologií a soustřeďuje se na výzkum fyziologické a patologické role vybraných proteáz, tj. proteolytických enzymů, které se specificky podílejí nejen na vývoji různých tkání, ale jsou spoluzodpovědné například za vývoj imunitních chorob, zánětů nebo rakovinových procesů. Výzkumné projekty se zaměřují na studium procesů spojených s vývojem zánětu a fibrózy jater. V těchto procesech zkoumáme funkci metaloproteináz rodin MMP a ADAM a jejich inhibitorů. Studujeme zejména úlohu ADAM10 při regeneraci, zánětu a vývoji fibrózy v játrech pomocí myšího modelu, který je kondicionálně deficientní pro gen proteinázy ADAM10 v játrech. Vytváříme transgenní myší modely pro studium role aktivace jaterních hvězdicových buněk (HSC) a myofibroblastů v jaterní fibrogenезi.“ (Sedláček 2012)

Problematika žlučových kyselin se v naší laboratoři řadí mezi sekundární fenotypizační analýzy, jako doplňující informace o míře jaterního poškození, které je indukováno u experimentálních zvířat různými modely na úrovni DNA. V současné době jsme schopni změřit celkové žlučové kyseliny ve vzorcích myšího séra, žluči a jaterního extraktu, na biochemickém analyzátoru. Tato metoda je dostatečně citlivá, což je nezbytné pro nízké koncentrace ŽK v séru. Nicméně nevýhodou je, že je pouze kvantitativní. Další možností je analýza myší žluči na HPLC s UV/VIS detekcí. Toto stanovení je výhodnější v tom, že lze jednotlivé ŽK rozdělit, ale rozmezí detekce není dostačující pro analýzu séra a jaterního extraktu.

V mé bakalářské práci se budu věnovat vývoji a optimalizaci metody pro stanovení ŽK v myším biologickém materiálu pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Oproti měření celkových ŽK na biochemickém analyzátoru je to také kvalitativní metoda a ve srovnání s UV/VIS detekcí je citlivější a specifitější.

4.2 Možnosti analýzy žlučových kyselin

V dnešní době existuje několik možností, jak ŽK stanovit. Využívají se metody fotometrické, chromatografické, a imunologické (Griffiths a Sjövall 2010).

4.2.1 Fotometrické metody

Nejvíce používané metody v klinických laboratořích jsou metody enzymatické (Diazyme 2014). Fotometricky se měří nárůst či intenzita vzniklých produktů, na biochemických analyzátoch. Principem měření je oxidační reakce, při níž se ŽK oxidují a kofaktor NAD^+ se redukuje na $\text{NADH}+\text{H}^+$. Nárůst produktu lze stanovit UV nebo fluorimetricky (Griffiths a Sjövall 2010) a nebo další reakcí s nitrotetrazoliem blue (NTB) za vzniku barevného formazanu, jehož intenzitu měříme při 504 nm. Intenzita je pak přímo úměrná koncentraci ŽK ve vzorku (Diazyme 2014). V námi používané metodě, je první reakce katalyzována enzymem *3 α -hydroxysteroid dehydrogenázou* (3 α HSD), vznik formazanu pak enzymem *diaforázou*. Tyto metody slouží ke stanovení celkových ŽK v biologických materiálech. Využívají se pro monitorování hladiny ŽK v plasmě u pacientů s jaterním onemocněním (Griffiths a Sjövall 2010) nebo u těhotných žen (Diazyme 2014).

Žlučové kyseliny + NAD^+ \longrightarrow Oxidovaná forma žlučových kyselin + $\text{NADH}+\text{H}^+$ (3 α HSD)

$\text{NADH}+\text{H}^+$ + nitrotetrazolium blue (NTB) \longrightarrow Formazan + NAD^+ (diaforáza)

4.2.2 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou založené na separaci jednotlivých analytů ze vzorku na jednotlivé frakce, které opouštějí kolonu v určitém čase, který je specifický pro každou látku. Podle typu mobilní fáze rozdělujeme chromatografii na plynovou (GC), kde je nosnou fází plyn

nebo kapalinovou (LC), kdy je vzorek unášen kapalinou do kolony. Plynová chromatografie se pro analýzu ŽK používala spíše v minulosti, kvůli nižší specifitě, oproti HPLC (Griffiths a Sjövall 2010). Chromatografické metody jsou vysoce citlivé a používané v mnoha výzkumných laboratořích, které se analýzou ŽK také zabývají. Největší vliv na limit detekce má u chromatografie detektor. Pro analýzu ŽK můžeme použít detektory spektrofotometrické, fluorescenční nebo hmotnostní.

4.2.2.1 Spektrofotometrické detektory

Měří absorbanci v oblasti UV/VIS v rozmezí 190-800nm (Cvačka 2010). Vlnová délka je buď fixně stanovená přímo od výrobce, tudíž lze měřit pouze určité analyty, nebo si ji můžeme nastavit (Cvačka 2010). V současnosti je nejvíce používaný *detektor s diodovým polem* (DAD), který dovoluje měřit absorbanci rozseparovaných analytů v celém světelném spektru (Dastych 2007). Výpočet koncentrace se řídí Lambert-Beerovým zákonem.

4.2.2.2 Fluorescenční detektory

Jsou citlivější než detektory spektrofotometrické. Principem měření na fluorescenčním detektoru (FLD) je detekce záření, které je emitované fluorescenční látkou (λ_{em}), při návratu z excitovaného stavu zpět do původní hladiny (Cvačka 2010). Podmínkou je dodání excitační energie ve formě elektromagnetického záření (λ_{ex}). Podrobněji vysvětleno v kapitole 4.3.3.

4.2.2.3 Hmotnostní spektrometr

Dalším často využívaným typem detekce je detekce na hmotnostním spektrometru. Tento detektor je velice selektivní a citlivý (Cvačka 2010). Identifikuje danou látku na základě poměru hmotnosti a náboje iontu (m/z) (Dastych 2007). Proto pro měření na hmotnostním spektrometru

je nutné převést molekuly látek rozdělených v koloně do plynné fáze s následnou ionizací. Toho lze dosáhnout několika způsoby. Např. metodou ESI (Electrospray ionization) nebo MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) (Dastych 2007).

4.2.2.3.1 ESI

Na jednotlivé frakce vycházející z kolony se aplikuje vysoké elektrické napětí. Tím dojde k odpaření rozpouštědla a vzniku iontů (Cvačka 2010).

4.2.2.3.2 MALDI

Tato technika využívá k ionizaci laserový paprsek. Eluát z kolony vykrytalizuje na podložní destičce, na které je *matrix*, což je směs nízkomolekulárních aromatických AMK. Tyto AMK absorbují světelné záření vycházející z laserového paprsku. Ionty vznikají po ozáření látky laserem a prudkým odpařením do vakua (Dastych 2007).

Po ionizaci jsou ionty v místě vzniku urychlovány vysokým stejnosměrným elektrickým napětím k detektoru. Díky různému pohybu iontů ve vakuu lze vypočítat poměr m/z . Tento způsob měření se nazývá *TOF (time of flight)* (Dastych 2007).

Stanovení ŽK pomocí LC/MS v lidských i myších biologických materiálech, jako je plasma, moč, jaterní extrakt či žluč, se podařilo již mnohým výzkumným týmům (Gatti et al. 1997; Kurosawa et al. 1997; Alnouti et al. 2008; Griffiths a Sjövall 2010; Qiao et al. 2011; Woolbright et al. 2014).

Jedinou nevýhodou u analýzy ŽK na tomto detektoru je, že pokud se molekula liší pouze α/β prostorovou orientací -OH skupiny, nejsme schopni jednoznačně říci, o kterou ŽK se jedná, protože hmotnost molekuly, či jejího fragmentu, je zachována. Obecně je ale detekce na hmotnostním spektrometru hojně využívána.

4.2.3 Imunoeseje

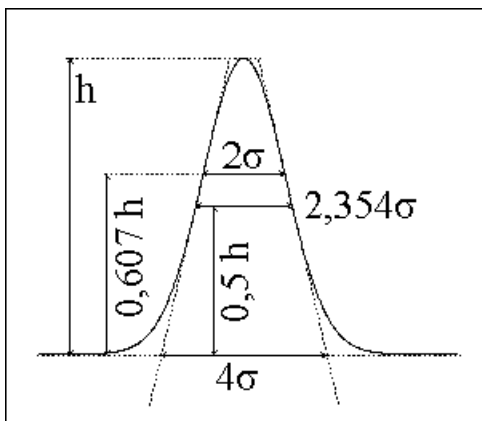
Reakce na principu interakce antigenu (Ag) s protilátkou (Ab) za vzniku imunokomplexu, kde ŽK jsou jako Ag, byly využívány před 20-25 lety. Dnes se od nich upustilo, z důvodu nízké specifity, zejména u nízkých koncentrací ŽK ve vzorku. Poslední situací, kdy tyto metody využít, je monitorování léčby žlučovými kyselinami. Konkrétně stanovení UDCA metodou ELISA při léčbě cholelitiázy (Griffiths a Sjövall 2010).

4.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

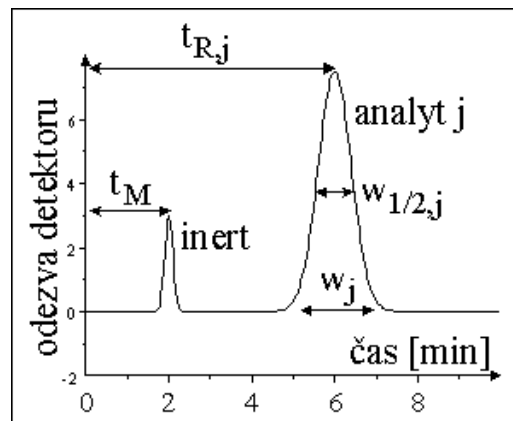
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu vzorku. Je to modernizovaná forma kapalinové chromatografie (LC), kde je mobilní fáze vháněna do kolony pod velkým tlakem pomocí vysokotlaké pumpy (Dong 2006b).

Základní pojmy: (Coufal 1996; Dong 2006a; Dastych 2007)

- Mobilní fáze – kapalina, jíž je vzorek unášen z injektoru do kolony a dále do detektoru
- Stacionární fáze – pevná látka (sorbent) umístěná uvnitř kolony
- Frakce – rozseparovaný vzorek na jednotlivé složky
- Průtoková rychlost – rychlost průtoku mobilní fáze kolonou (ml/min)
- Retenční čas – doba zadržení analytu v koloně od nástřiku po detekci
- Pík – grafický záznam signálu vycházející z detektoru
- Výška píku – hodnota mezi základnou a vrcholem píku
- Šířka píku – vzdálenost dvou bodů ohraničující pík při základně
- Eluce – vymývání látek z kolony eluentem
- Eluát – frakce opouštějící kolonu



Obrázek 8: Výška a šířka píku (Coufal 1996)

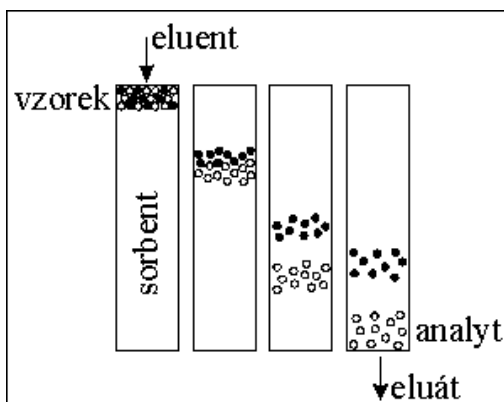


Obrázek 9: Retenční čas (Coufal 1996)

4.3.1 Separace

Rozdělení látek ze vzorku (Obr.10) na jednotlivé frakce probíhá v koloně mezi dvěma nemísitelnými fázemi (Dastych 2007). Jedna fáze je mobilní (pohyblivá) a unáší vzorek celým systémem. Druhá je stacionární (nepohyblivá), z pravidla tvoří povrch uvnitř kolony. Princip dělení látek může být založen na několika fyzikálně-chemických zákonech (Dastych 2007), které závisejí právě na použitém typu kolony, respektive stacionární fázi.

- adsorpční chromatografie (polárně-nepolární interakce)
- rozdělovací chromatografie
- iontoměničová chromatografie
- gelová chromatografie
- afinitní chromatografie

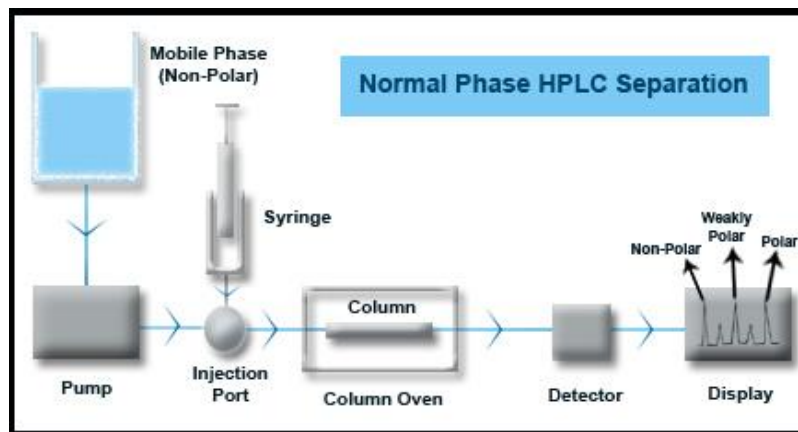


Obrázek 10: Separace vzorku v koloně (Coufal 1996)

V této kapitole se zaměřím pouze na adsorpční chromatografii a její modifikovanou verzi, protože na tomto principu byla analýza ŽK provedena.

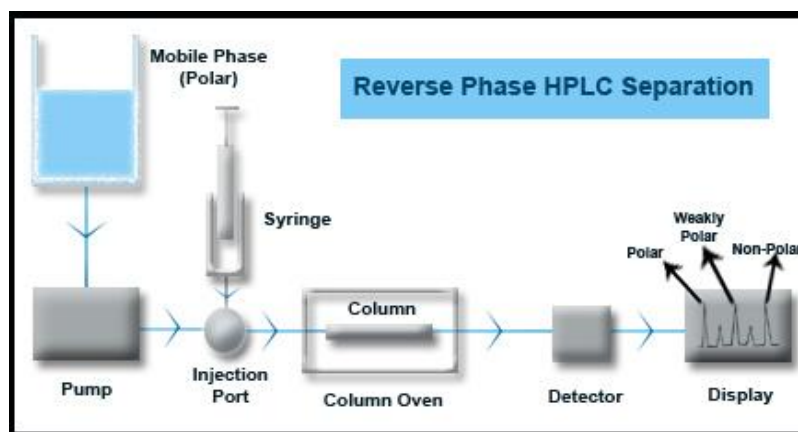
4.3.1.1 Adsorpční chromatografie

Stacionární fáze neboli *adsorbent*, váže různé látky podle jejich polarit. Povrch adsorbentu je tvořen polárními strukturami (např. Si-OH) a tudíž se na něj nejsilněji vážou polární (hydrofilní) látky. Naopak nepolární (hydrofobní) analyty interagují s adsorbentem velmi málo a proto opouštějí kolonu jako první. Mobilní fáze se používá nejprve nepolární (např. hexan), dochází k eluci nepolárních složek a postupně se zvyšuje podíl polárnější kapaliny (např. metanol) k uvolnění silnějších vazeb mezi polárními látkami a adsorbentem (Dastych 2007). Stacionární fáze je tedy polárnější než mobilní fáze a slouží k separaci nepolárních složek ze vzorku. Tento typ adsorpční chromatografie se nazývá „*Chromatografie normální fáze*“ (Obr. 11). Nevýhodami této separace jsou nutnost použití drahých a nebezpečných chemikálií pro mobilní fázi a častá kontaminace kolony látkami ze vzorku (Dastych 2007).



Obrázek 11: Separace normální fáze (ANON. 2011)

Dalším typem adsorpční chromatografie je tzv. „*Chromatografie reverzní fáze*“. Jedná se o modifikaci, která se velice osvědčila a využívá se v 70% všech analýz na HPLC (Dong 2006b). Princip této separace je opačný než u chromatografie normální fáze. Adsorbent uvnitř kolony je potažený nepolární látkou (např. oktadecyl C_{18}) (Dastyh 2007). Z toho vyplývá, že v tomto případě je stacionární fáze nepolární a lépe interaguje s nepolárními molekulami ze vzorku. Ty se v koloně zdrží nejdéle a polární látky jsou eluovány jako první. Mobilní fáze tedy nemusí být nepolární organické rozpouštědlo, ale lze použít polární roztoky, jako jsou vodné pufrы, metanol, acetonitril, apod. Chromatografie reverzní fáze se používá k separaci polárních, středně polárních a některých nepolárních látek (Dong 2006b). Pro analýzu ŽK jsem využila tento systém separace.



Obrázek 12: Separace reverzní fáze (ANON. 2011)

4.3.2 Součásti HPLC přístroje

V laboratoři máme HPLC analyzátor od firmy *Agilent Technologies, 1260 Infinity*. Přístroj se skládá z několika funkčních částí, které na sebe navazují a jsou propojeny průchodným systémem kapilár.

Zásobník pro mobilní fáze

Nachází se v horní části přístroje a slouží pro umístění lahví s mobilními fázemi. Do každé zásobní lahve se umístí tzv. *frita* se speciálním filtrem, přes kterou se kapalina odvádí dále pomocí hadiček.

Vysokotlaká peristaltická pumpa

Slouží k čerpání mobilní fáze ze zásobních lahví do kolony. Musí zajistit plynulý průtok kapaliny přes malé částice v koloně, k čemuž je zapotřebí velkého tlaku. V přístroji *Agilent 1260 Infinity* jsou dvě pumpy, které nám umožňují různě kombinovat a míchat mobilní fázi ze dvou zásobníků dohromady.

Zásobník vzorků

Pod peristaltickou pumpou je umístěn zásobník pro vzorky. Jelikož je množství vzorku potřebné k analýze velmi nízké (cca 10 μ l), je každý vzorek pipetován do plastových insertů o objemu 250 μ l a vkládán do speciálních skleněných lahvíček (vialek). Nakonec se vialka se vzorkem uzavře víčkem s gumovým středem, aby mohl být vzorek nasát injektorem. Kapacita je 100 vzorků. Zásobník má také k dispozici chlazení.

Injektor

Automatizovaný injektor nasává nastavený objem vzorku z vialky a vstříkuje ho do kolony. Je velice důležité, aby ve vzorku nebyly žádné bubliny, protože by mohlo dojít k jejich nasátí, což má také negativní vliv na výslednou separaci.

Kolona

Kolona je nejdůležitější součástí chromatografu. Dochází zde ke stěžejní části celého procesu a výběr kolony může dramaticky ovlivnit výsledky celého měření. Chromatografická kolona je stacionární fáze, chráněná vnějším obalem. Ten je většinou vyroben z nerezové oceli, skla nebo plastu. Musí být průchodná z obou stran – vstup vzorku na začátku kolony a výstup jednotlivých frakcí na konci. Izolace a těsnění při obou koncích je zajištěno speciálním šroubem, do kterého je napojena kovová kapilára, jíž je vzorek spolu s mobilní fází přiváděn i odváděn z kolony.

Detektor

Detektor je zařízení, které převádí světelný signál ze vzorku na elektrický. Pro analýzy na HPLC může být použito několik druhů detektorů, některé jsou zmíněny v kapitole 4.2.2 .

Počítač

Počítač slouží jednak jako software pro přístroj, ale také jako vyhodnocovací a zapisovací zařízení. Lze z něj přesně naprogramovat veškeré analýzy a jejich průběh, ovládat jednotlivé funkční části chromatografu, případně odstraňovat chyby, které přístroj nahlásí během měření a monitorovat průběh analýz. Také převádí odezvu z detektoru do grafické podoby, tzv. *chromatogram*.

Odpadová nádoba

Do odpadové nádoby jsou shromažďovány všechny kapaliny, které prošly celým systémem. Mohou to být mobilní fáze, vzorek, promývací roztoky, atd.

4.3.3 Fluorescenční detektor

Fluorescenční detektor měří míru fluorescence vznikající v průtokové cele, která je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku.

Konstrukce FLD:

Zdroj: xenonová výbojka, která produkuje světelné záření.

Excitační mřížka: slouží k výběru nastavené excitační vlnové délky (monochromátor)

Štěrbina: propouští danou excitační vlnovou délku do měřicí cely a emisní vln. délku na fotonásobič

Průtoková cela: místo měření vzorku

Emisní mřížka: odráží nastavenou emisní vlnovou délku

Fotonásobič: zesílení signálu fluorescence

Ze zdroje je vyzařováno světlo o různých vlnových délkách. Excitační mřížkou je separováno záření o takové vlnové délce, která je zapotřebí k excitaci elektronů (λ_{ex}). Toto záření je propuštěno šterbinou do průtokové cely. Zde je vzorek ozářen a elektrony se dostávají do vyšších excitačních hladin. Při návratu do původní hladiny ztrácí elektrony energii, která se projeví jako emisní záření o specifické vlnové délce (λ_{em}), které prochází další šterbinou a dopadá na fotonásobič. Ten slouží k zesílení signálu. Pro ochranu fotonásobiče před excitačním zářením je umístěn kolno ke zdroji.

Fluorescenční detektor v přístroji *Agilent 1260 Infinity* umožňuje naprogramovat excitační a emisní vlnovou délku s přesností 2 nm, což zabezpečuje maximální citlivost a specifičnost detekce.

5 Metodika

Pro zavedení HPLC metody jsem použila tři odborné publikace, které se zabývají podobnou problematikou (Novak a Kruppa 2008; Gatti et al. 1997; Kurosawa et al. 1997). Snažila jsem se modifikovat derivatizační reakci pro označení ŽK fluorescenční látkou. Princip reakce byl vždy založen na navázání fluoroforu na karboxylovou skupinu COOH.

5.1 Modifikace značení karboxylu hydrazinem (Novak a Kruppa 2008)

5.1.1 Derivatizační reakce

Do reakce jsem napipetovala 84 μ l 50 mmol/l pyridin/hydrochloridového pufru o pH 5.5, které bylo upraveno hydroxidem sodným. Dále jsem přidala 12 μ l 2 mmol/l N-(3 Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid hydrochloridu (EDC) a 12 μ l standardu ŽK. Jako fluorescenční značky jsem použila 12 μ l 1 mmol/l 4-Hydrazino-7-nitro-benzofurazan hydrazin addukt (NBD-H) nebo 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F). NBD-H byl připravený ve 100% metanolu, NBD-F ve 100% acetonitrilu. Reakce probíhala v kyselém prostředí, které je nutné pro EDC a následnou aktivaci COO⁻. Blank byl připraven stejným postupem, ale místo standardu ŽK obsahoval pouze 12 μ l metanolu.

Všechny připravené vzorky byly zamíchány a inkubovány 2h při pokojové teplotě v temnu. Před aplikací do HPLC byly vzorky centrifugovány při 20000g 10 min, pro odstranění případných nečistot, které by mohly kontaminovat kolonu a supernatant byl napipetován do insertů. Chemikálie EDC, NBD-H, NBD-F i ŽK byly od firmy *Sigma Aldrich, USA*.

5.1.2 Příprava standardů žlučových kyselin

Pro přípravu standardů ŽK jsem použila čisté substance kyseliny cholové a lithocholové. Připravila jsem 10 mmol/l zásobní roztoky, rozpuštěné ve 100% metanolu. Z nich jsem dále

ředila standardy o nižší koncentraci dle potřeby. Pro tento protokol jsem připravila koncentrace 1mmol/l, 0,1mmol/l, 0,01mmol/l, 1 μmol/l, 0,1 μmol/l, a 0,01 μmol/l.

5.1.3 HPLC podmínky

Pro separaci ŽK jsem použila kolonu HISEP (25cm x 4,6mm i.d.) s gradientovou elucí. Mobilní fáze o složení z roztoků A:B, kde A je acetonitril (ACN) a B je destilovaná voda (d.H₂O), se měnila v čase následovně: t = 0 min 30% A, t = 15 min 85% A, t = 30 min 30% A. Průtok mobilní fáze byl 1,5 ml/min a teplota kolony 45°C. Fluorescence byla měřena na fluorescenčním detektoru *Agilent FLD*. Nastavené vlnové délky: pro NBD-H λ_{ex} 445 nm, λ_{em} 522 nm, NBD-F λ_{ex} 470 nm, λ_{em} 550 nm.

5.2 Označení ŽK 2-(Bromoacetyl)-6-methoxynaftalenem (Gatti et al. 1997)

5.2.1 Derivatizační reakce

Pro tento protokol jsem postupovala podle použitého článku. Pro reakci jsem připravila 10 mmol/l tetrakis (decyl) ammonium bromid (TDeABr) rozpuštěný ve 100 mmol/l fosfátovém pufru pH 7 a fluorofor 2-bromoacetyl-6-methoxynaphthalene (Br-AMN) v acetonu. Konečná derivatizační reakce obsahovala 300 μl 10 mmol/l TDeABr ve fosfátovém pufru, 200 μl standardu ŽK a 50 μl fluoroforu. Směs byla 10 minut ultrasonikována při 40°C. Před vložením vzorků do HPLC byla nutná centrifugace. Blank byl opět připraven stejným postupem, ale místo standardu ŽK obsahoval 200 μl metanolu : d. H₂O (1:9 v/v).

5.2.2 Příprava standardů žlučových kyselin

Pro přípravu standardů ŽK jsem použila čisté substance kyseliny cholové a lithocholové. Připravila jsem 10 mmol/l zásobní roztoky, rozpuštěné ve 100% metanolu. Z nich jsem dále

ředila standardy o koncentraci 1 mmol/l, 0,1 mmol/l, 0,01 mmol/l, 1 μ mol/l, 0,1 μ mol/l, a 0,01 μ mol/l v metanolu : d.H₂O (1:9 v/v).

5.2.3 HPLC podmínky

Separace probíhala na koloně ODS 5 (25cm x 4,6mm i.d.). Mobilní fáze se skládala ze dvou roztoků A:B, kde *A* je destilovaná voda (d. H₂O) a *B* je acetonitril:metanol, (60:40, v/v). Změna mobilní fáze v čase byla: t = 0 min 45% B, t = 20 min 45% B, t = 30 min 70% B, t = 55 min 70% B, t = 60 min 45% B. Průtok mobilní fáze byl 1,5 ml/min a teplota kolony 35°C. Fluorescence byla měřena na fluorescenčním detektoru *Agilent FLD* při těchto vlnových délkách: λ_{ex} 300 nm, λ_{em} 460 nm.

5.3 Označení karboxylu 3-[4-(Bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarinem (Kurosawa et al. 1997, s. 27)

V tomto experimentu jsem pro derivatizační reakci použila dvě rozpouštědla - acetonitril a metanol.

5.3.1 Derivatizační reakce s acetonitrilem

Tato derivatizace byla provedena smícháním 100 μ l standardu ŽK se 150 μ l 0,2% 3-[4-(Bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarinu (MPAC-Br) v acetonitrilu a 150 μ l 0,4% 18-crown-6 v acetonitrilu, saturovaného hydrogenuhličitanem draselným (KHCO₃). V posledním kroku byly vzorky inkubovány 20 min při 60 °C. Před vložením do HPLC byly opět centrifugovány 10 min při 20000g pro odstranění nerozpustných nečistot.

5.3.2 Derivatizační reakce s metanolem

Tato derivatizace probíhala stejným způsobem, jako derivatizace s acetonitrilem, tj. 100 μ l standardu ŽK se 150 μ l 0,2% 3-[4-(Bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarinu (MPAC-Br) v acetonitrilu a 150 μ l 0,4% 18-crown-6 v acetonitrilu, saturovaného hydrogenuhličitanem draselným (KHCO_3). Vzorky byly inkubovány při 60 °C po dobu 20 min. Následně byl ale acetonitril odpařen při 60°C. Místo něj byl do reakce přidán stejný objem chloroformu s metanolem v poměru 8:1 v/v a směs se inkubovala 10 min při pokojové teplotě. Poté byl chloroform/metanol odpařen při 60°C a nakonec byly vzorky standardů rozpuštěny v metanolu. Toto konečné uspořádání vzorků bylo zcentrifugováno a aplikováno do HPLC.

S blankem bylo v obou případech zacházeno stejně. MPAC-Br, 18-crown-6, KHCO_3 i ŽK byly od firmy *Sigma Aldrich, USA*.

5.3.3 Příprava standardů žlučových kyselin

Pro přípravu standardů ŽK jsem použila čisté substance kyseliny cholové a lithocholové. Připravila jsem 10 mmol/l zásobní roztoky, rozpuštěné ve 100% metanolu. Z nich jsem dále ředila standardy geometrickou řadou o koncentraci 1 mmol/l, 0,1 mmol/l, 0,01 mmol/l, 1 μ mol/l, 0,1 μ mol/l, a 0,01 μ mol/l.

5.3.4 HPLC podmínky

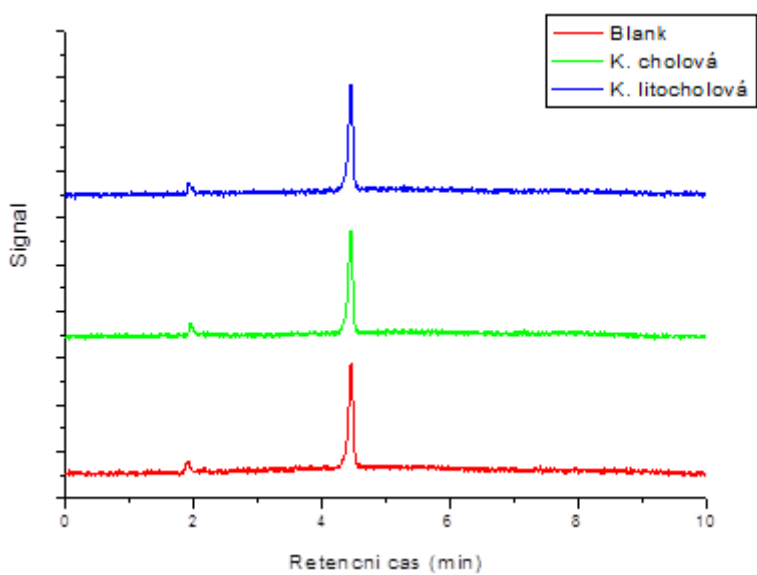
Vzorky byly rozděleny na koloně SUPELCOSIL (25cm x 4,6mm i.d.) pomocí gradientové eluce. Mobilní fáze byla směs dvou roztoků A:B, kde A je 20 mmol/l TRIS pufr o pH 7,5. Hodnota pH byla upravena ledovou kyselinou octovou. Roztok B je metanol. Složení mobilní fáze se měnilo následovně: t = 0 min 78% B, t = 10 min 78% B, t = 25 min 81,3% B, t = 35 min 88,5% B, t = 45 min 97,5% B, t = 50 min 100% B, t = 52 min 78% B, t = 60 min 78% B. Průtok

mobilní fáze byl 1 ml/min a teplota kolony 25°C. Fluorescence byla měřena na fluorescenčním detektoru *Agilent FLD* při těchto vlnových délkách: λ_{ex} 400 nm, λ_{em} 475 nm.

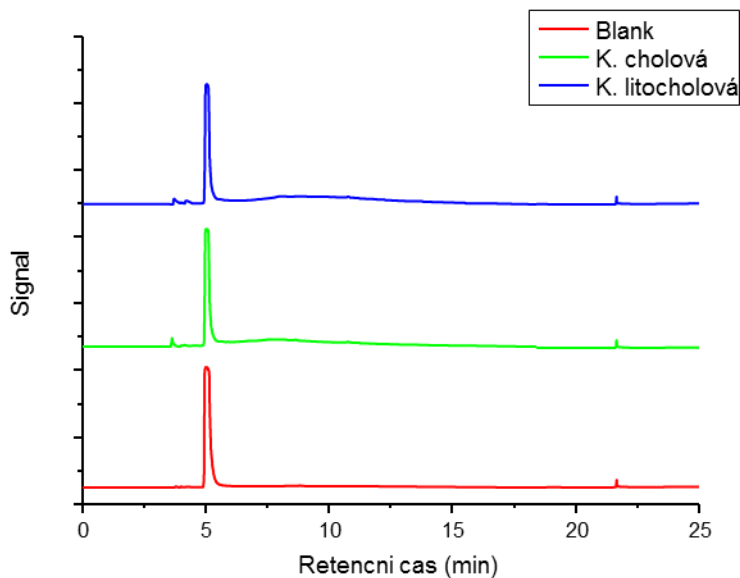
6 Výsledky

6.1 Značení žlučových kyselin fluoroforem

Pro zavedení analýzy detekce ŽK, jsem vyzkoušela různé derivatizační postupy se čtyřmi fluorofory (NBD-H, NBD-F, BrAMN a MPAC-Br). *Graf 1-3* zobrazuje chromatogramy 1 mmol/l kyseliny cholové, kyseliny lithocholové a blanku s různým fluoroforem. Po srovnání těchto chromatogramů je zřejmé, že ani v jednom případě k separaci ŽK nedošlo, protože vzorky s obsahem standardů se shodují mezi sebou i s blankem.



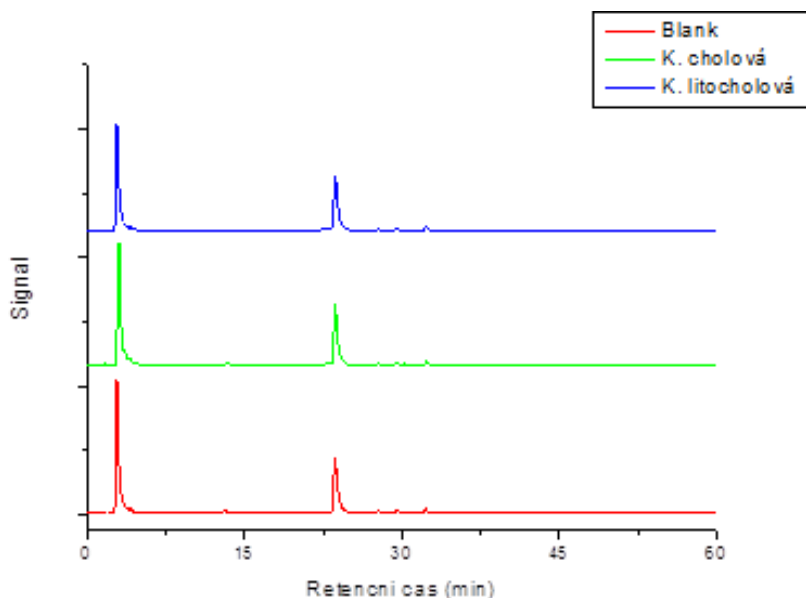
Graf 1: Chromatogram blanku, 1mmol/l kyseliny cholové a 1 mmol/l kyseliny lithocholové, značení NBD-H.



Graf 2: Chromatogram blanku, 1 mmol/l kyseliny cholové a 1 mmol/l kyseliny lithocholové, značení NBD-F.

6.1.1 Změny derivatizační reakce

Po neúspěšném označení jsem pozměnila některé kroky v derivatizaci. Pro reakci jsem zvolila zásadité pH pyridin/hydrochloridového pufru (pH 8,6). U HPLC jsem zkusila použít jiný typ kolony nebo změnit gradient z 20% na 50% A za 15 minut. Přestože jsem se pokoušela o změny v derivatizační reakci i HPLC podmínkách, nic nevedlo k úspěšnému závěru a výsledné chromatogramy vypadaly podobně.



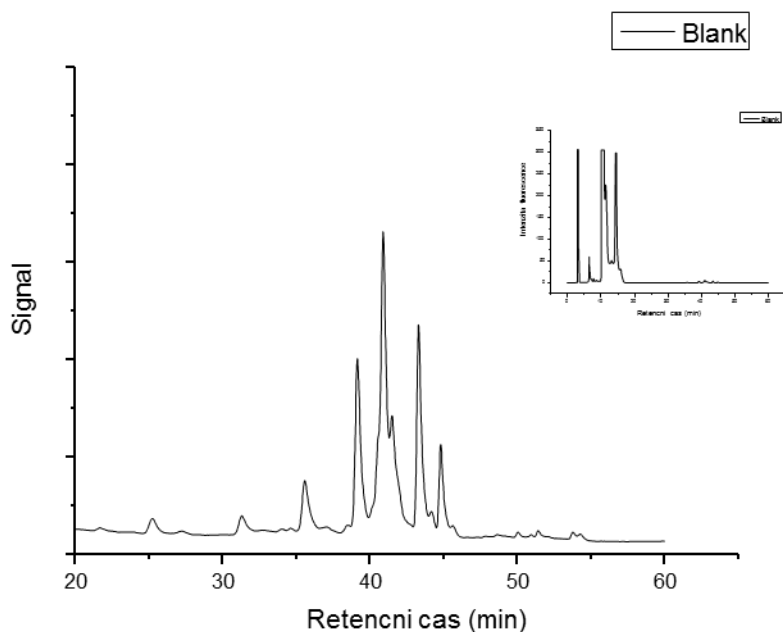
Graf 3: Chromatogram blanku, 1 mmol/l kyseliny cholové a 1 mmol/l kyseliny litocholové, značení BrAMN.

6.1.2 Změny derivatizační reakce

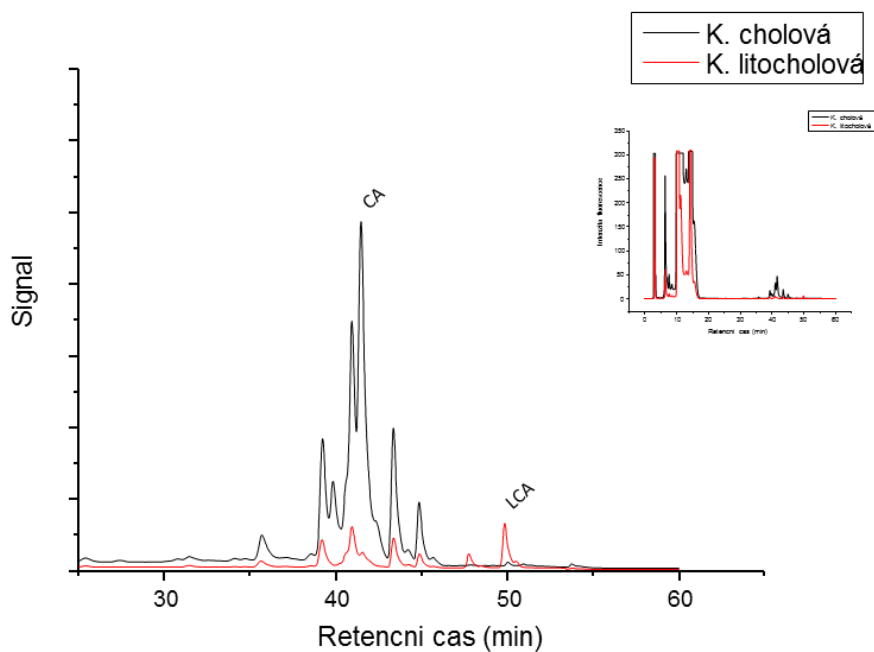
V článku autor uvádí, že do reakce použil 10 mmol/l tetrakis (decyl) ammonium bromid (TDeABr) rozpuštěný ve 100 mmol/l fosfátovém pufru pH 7. Během přípravy roztoků jsem zjistila, že se v něm TDeABr nerozpouští, ale že je rozpustný v etanolu nebo v metanolu. Konečná reakce tedy obsahovala 50 μ l 2-(Bromoacetyl)-6 methoxy-naftalenu (BrAMN), 200 μ l standardu ŽK, 30 μ l 100 mmol/l TDeABr v metanolu. Po přidání 270 μ l 100 mmol/l fosfátového pufru o pH 7 se opět TDeABr ze směsi vysrážel. Jeho rozpustnost neovlivnila ani následná ultrasonikace při 40°C po dobu 10 minut.

6.2 Označení karboxylu 3-[4-(Bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarinem

Derivatizační reakce s tímto fluoroforem, byla úspěšná a k označení ŽK došlo. Následující dva grafy zobrazují chromatogram blanku a 1 mmol/l k. cholové spolu s 1mmol/l k. litocholovou.



Graf 4: Chromatogram blanku, značení MPAC-Br, gradient *varianta 1*, injikovaný objem vzorku byl 2 μ l



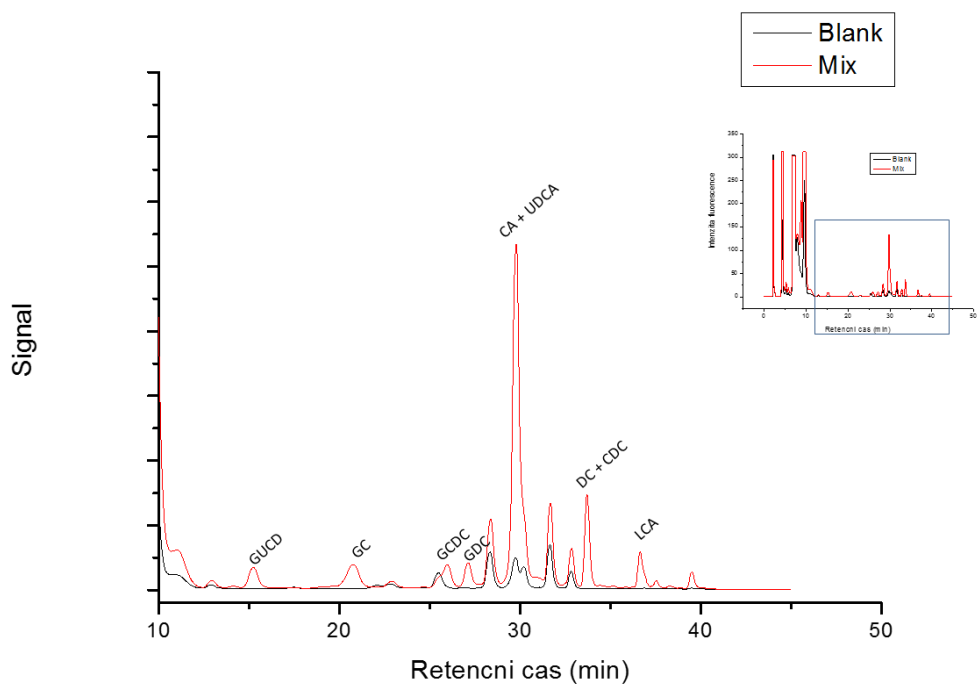
Graf 5: Chromatogram 1 mmol/l kyseliny cholové (CA) a 1 mmol/l kyseliny lithocholové (LCA), značení MPAC-Br, gradient *varianta 1*, injikovaný objem vzorku 2 μ l. Z grafu lze vyčíst, že chromatogram k. lithocholové se liší od chromatogramu k. cholové o jeden pík s retenčním časem 50 minut.

6.2.1 Optimalizace gradientu

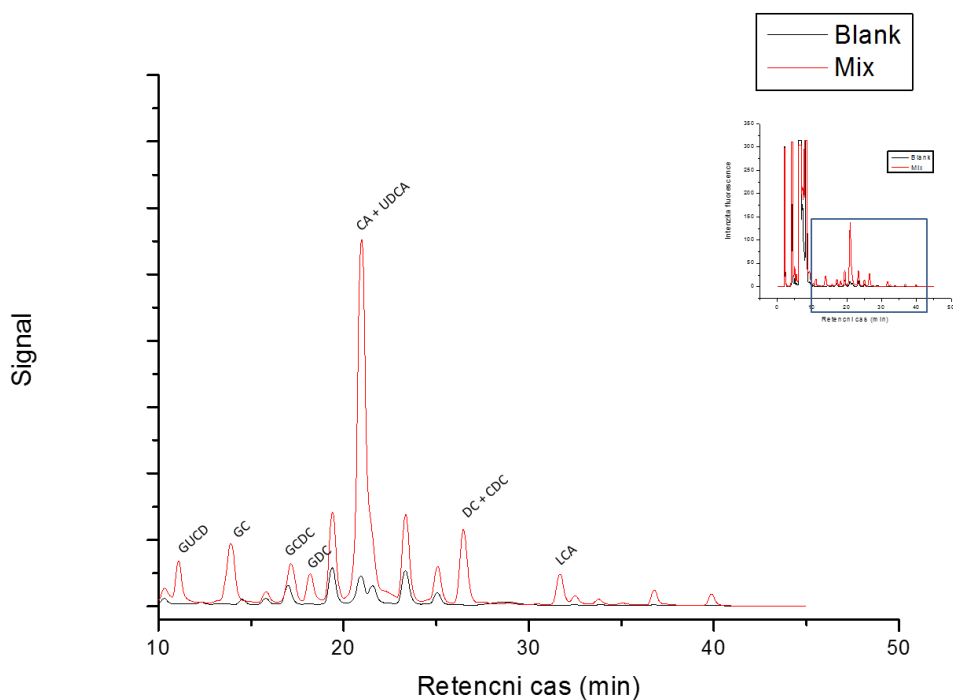
Po srovnání chromatogramů standardů ŽK s blankem bylo zřejmé, že k derivatizaci a separaci došlo. Derivatizace proběhla lépe v reakci s acetonitrilem. Proto jsem připravila řadu standardů ŽK o známé koncentraci 1 mmol/l, mix všech standardů a blank. Derivatizace a separace ŽK byla opět úspěšná. HPLC podmínky byly pozměněny pouze úpravou gradientu pro lepší oddělení jednotlivých píků a změnou průtoku mobilní fáze z 1 ml/min na 1,5 ml/min (Tab.1), čímž se doba analýzy zkrátila na 45 minut, včetně equilibrace kolony. Jednotlivé chromatografické výsledky jsou zaznamenány v *grafech 6-9*.

Tabulka 1: Změna podílu metanolu v mobilní fázi v čase

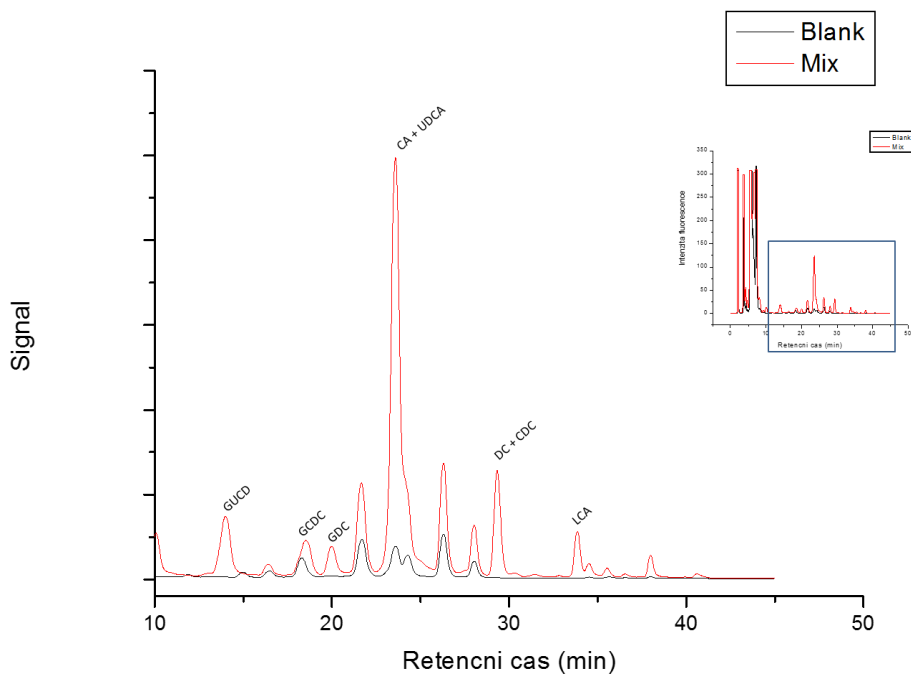
Čas (min)	Varianta 1	Varianta 2	Varianta 3	Varianta 4	Varianta 5
0	78%	78%	78%	81%	78%
7,5	-	78%	-	81%	-
10	78%	-	-	-	-
18,8	-	81,3%	-	86%	81,3%
25	81,3%	-	-	-	-
26,3	-	88,5%	-	92%	92%
33,8	-	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%
35	88,5%	-	-	-	-
37,5	-	100%	100%	100%	100%
39	-	78%	78%	81%	78%
45	97,5%	78%	78%	81%	78%
50	100%	-	-	-	-
52	78%	-	-	-	-
60	78%	-	-	-	-
Průtok (ml/min)	1	1,5	1,5	1,5	1,5



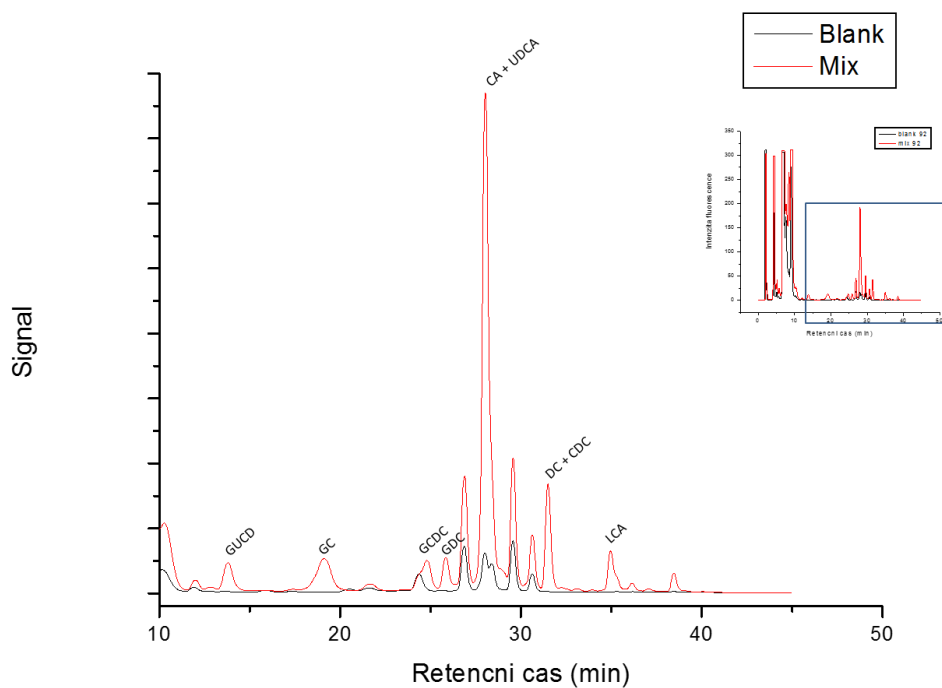
Graf 6: Chromatogram blanku a 1 mmol/l mixu všech ŽK, značení MPAC-Br, gradient *varianta 2*, injikovaný objem vzorku 2 μ l.



Graf 7: Chromatogram blanku a 1 mmol/l mixu všech ŽK, značení MPAC-Br, gradient *varianta 3*, injikovaný objem vzorku 2 μ l.



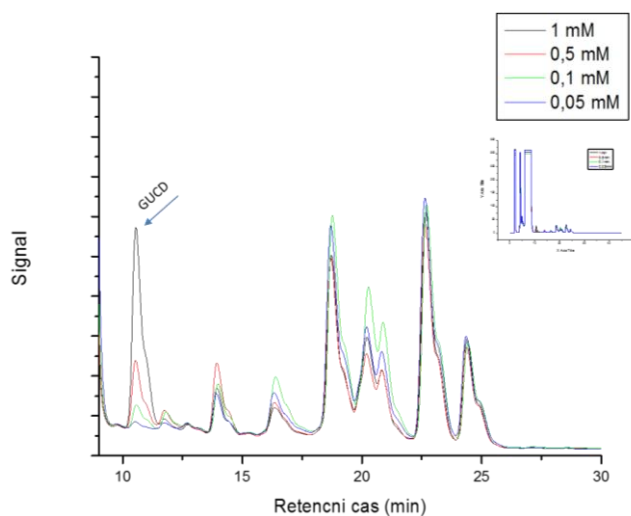
Graf 8: Chromatogram blanku a 1 mmol/l mixu všech ŽK, značení MPAC-Br, gradient *varianta 4*, injikovaný objem vzorku 2 μ l.



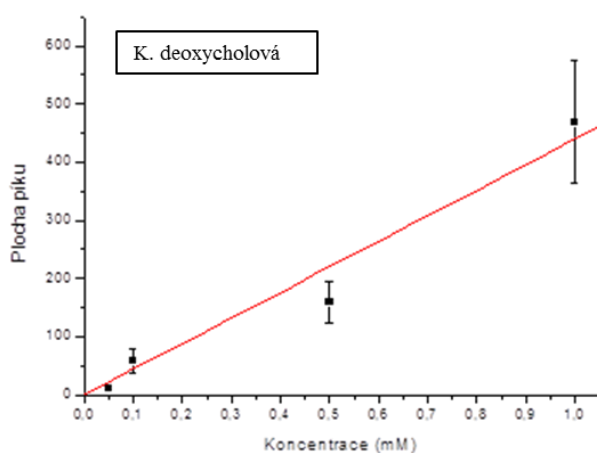
Graf 9: Chromatogram blanku a 1 mmol/l mixu všech ŽK, značení MPAC-Br, gradient *varianta 5*, injikovaný objem vzorku 2 μ l.

6.3 Kalibrace

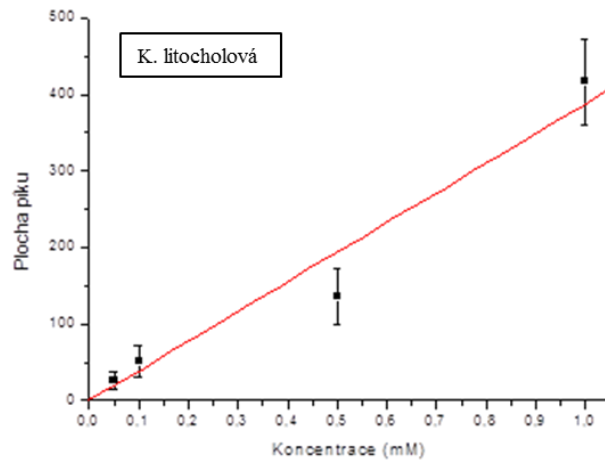
Kalibrace metody byla provedena třemi nezávislými analýzami standardů ŽK o koncentracích 1 mmol/l, 0,5 mmol/l, 0,1 mmol/l, 0,05 mmol/l, ze kterých byly sestaveny kalibrační křivky pro jednotlivé ŽK. Na *grafu 10* je příklad kalibrace (*kyselina glykoursodeoxycholová GUDC*) o čtyřech koncentracích. Je zřejmé, že plochy jednotlivých píků klesají s klesající koncentrací standardu. Kalibrační křivky jsou sestaveny pro individuální ŽK v *grafech 11-17*.



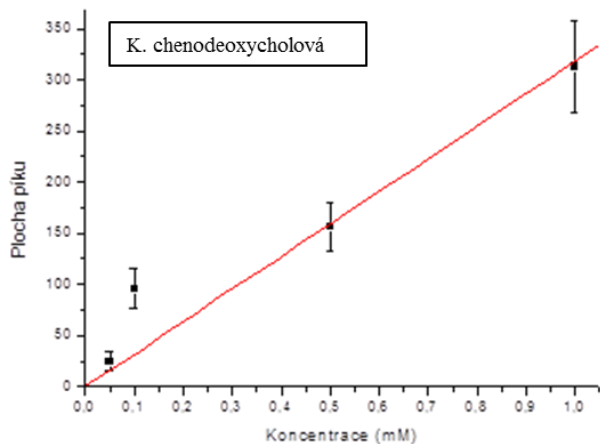
Graf 10: Příklad čtyřbodové kalibrace GUDC, gradient *varianta 3*.



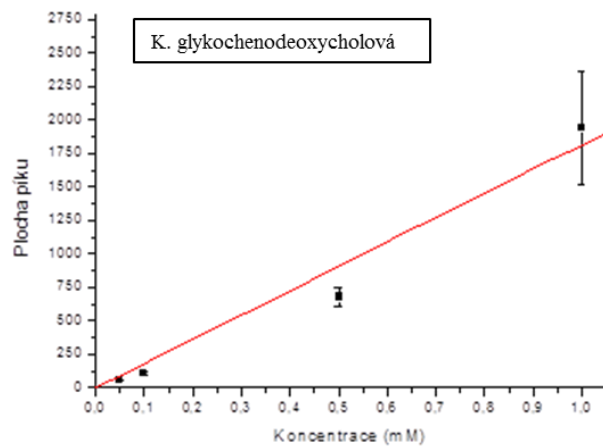
Graf 11: Kalibrační křivka DC



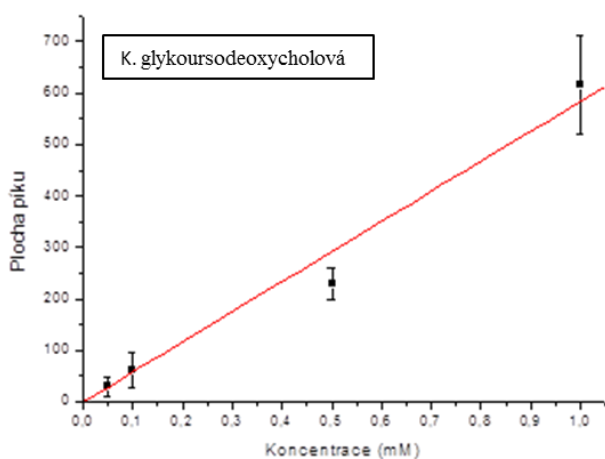
Graf 12: Kalibrační křivka LC



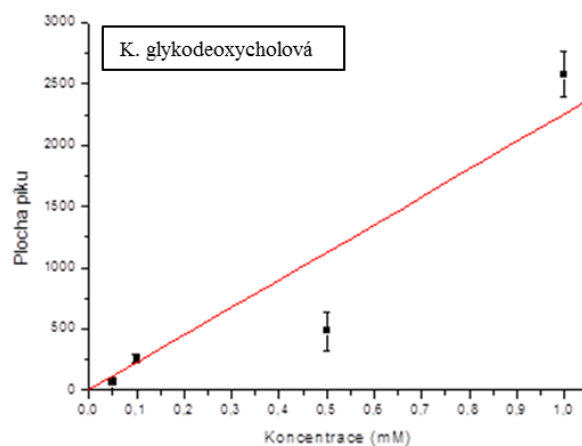
Graf 13: Kalibrační křivka CDC



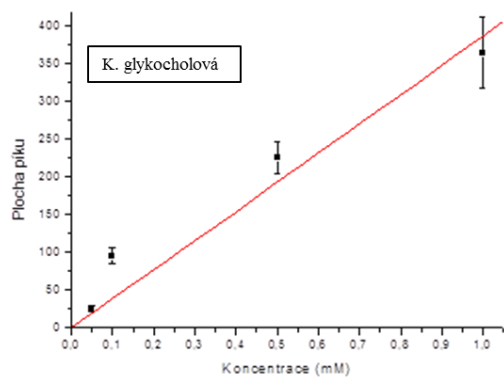
Graf 14: Kalibrační křivka GCDC



Graf 15: Kalibrační křivka GUDC



Graf 16: Kalibrační křivka GDC



Graf 17: Kalibrační křivka GC

6.4 Stabilita retenčních časů

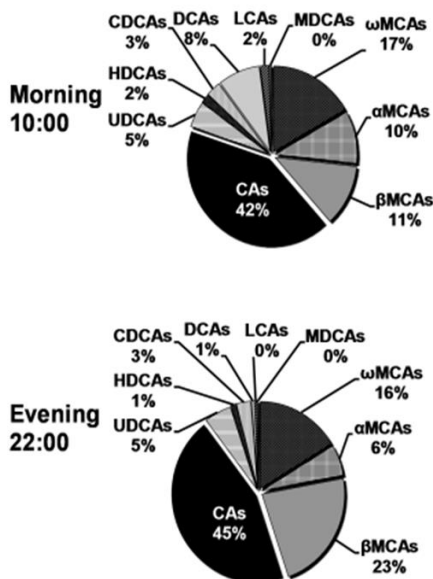
Retenční časy získané během kalibrace jsou uvedeny v *tabulce 2*. Rozdíly v retenčních časech individuálních ŽK jsou z nezávislých měření malé a lze usuzovat dobrou reprodukovatelnost metody. *Tabulka 3 a obrázky 13-14*, obsahují výsledky získané jiným experimentálním měřením (Zhang et al. 2011). Uvádějí rozsah hodnot celkových ŽK (Tab.3) a procentuální zastoupení individuálních ŽK v séru (Obr.13) a jaterním extraktu (Obr.14) u myši.

Tabulka 2: Stabilita retenčních časů ŽK ze třech nezávislých měření

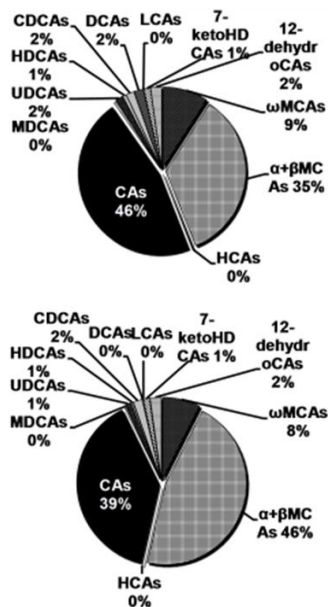
Žlučové kyseliny	Retenční čas (min)			Gradient
K. α muricholová (α MCA)	17,20	17,20	17,12	varianta 3
K. cholová (CA)	20,22	20,34	20,33	varianta 3
K. ursodeoxycholová (UDCA)	20,21	20,33	20,23	varianta 3
K. glykoursodeoxycholová (GUDC)	10,55	10,72	10,59	varianta 3
K. glykocholová (GC)	13,31	13,51	13,33	varianta 3
K. glykochenodeoxycholová (GCDC)	16,51	16,71	16,53	varianta 3
K. deoxycholová (DC)	25,78	25,99	25,72	varianta 3
K. glykodeoxycholová (GDC)	17,468	17,7	17,49	varianta 3
K. chenodeoxycholová (CDC)	25,66	25,86	26,00	varianta 3
K. lithocholová (LCA)	30,97	31,18	30,96	varianta 3

Tabulka 3: Hodnoty celkových ŽK u kontrolních myši

Sérum	0,9 -2,9 $\mu\text{mol/l}$
Jaterní extrakt	117 – 204 $\mu\text{mol/g}$



Obrázek 13: Individuální ŽK v séru



Obrázek 14: Individuální ŽK v jaterním extraktu

6.5 Lineární regrese

Sklon kalibrační křivky udává směrnice přímky, vyjádřená koeficientem k . Vztah pro výpočet lineární regrese je: $y = kx$

Tím zjistíme, pro kterou ŽK je daná metoda nejcitlivější - čím větší k , tím je metoda pro analyt citlivější. Směrnice kalibračních přímek jsou uvedeny v *tabulce 4*, pro každou naměřenou žlučovou kyselinu.

Tabulka 4: Směrnice kalibračních přímek

ŽK	Směrnice přímky k
GUDC	585,07
GC	416,22
GCDC	1813,91
GDC	2247,51
DC	439,84
CDC	318,41
LC	388,91

6.6 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce L_D je definována jako „nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno a je spolehlivě odlišitelné od přístrojového šumu, ale nemusí být stanovitelné jako přesná hodnota (Dastych a Breinek 2011)“. L_D lze vypočítat jako trojnásobek směrodatné odchylky blanku.

Pro zjištění L_D jednotlivých ŽK, jsem použila hodnoty blanků získané během kalibrace metody. Výsledné L_D přepočítané na jednotky koncentrace jsou zaznamenány v *tabulce 5*.

Mez stanovitelnosti L_Q je definována jako „nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako přesná hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty (Dastych a Breinek 2011)“. L_Q lze vypočítat jako desetinásobek směrodatné odchylky blanku.

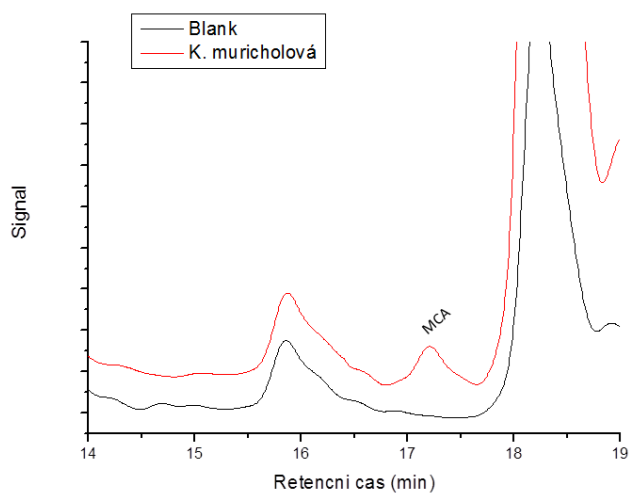
Pro zjištění L_Q jednotlivých ŽK, jsem použila hodnoty blanků, získané během kalibrace metody. Výsledné L_Q přepočítané na jednotky koncentrace jsou zaznamenány v *tabulce 5*.

Tabulka 5: Hodnoty blanku, L_D a L_Q jednotlivých ŽK

Průměrná plocha píku blanku	Směrodatná odchylka blanku	L_D (mmol/l)	L_Q (mmol/l)	ŽK
2,10	0,70	0,0039	0,0120	GU DC
2,23	0,86	0,0068	0,0206	GC
3,87	1,66	0,0030	0,0092	GC DC
2,03	1,01	0,0015	0,0045	GDC
2,27	0,40	0,0030	0,0092	DC
2,27	0,40	0,0042	0,0127	CDC
2,43	1,70	0,0144	0,0438	LC

6.7 Kyselina muricholová

Kyselinu muricholovou se podařilo derivatizační reakcí fluorescenčně označit. Změny v retenčním čase byly minimální. Přestože se plocha píku s koncentrací měnila, kalibrační přímku s lineární regresí nebylo možné sestavit. Záznam chromatografu kyseliny muricholové s blankem je na *grafu 18*.



Graf 18: Chromatogram blanku a 1 mmol/l kyseliny muricholové (MCA).

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zavedení a optimalizace metody, pro detekci žlučových kyselin v myších vzorcích, s fluorescenční detekcí pomocí HPLC. Tato citlivá a kvalitativní metoda by mohla být využívána jako sekundární fenotypizační screening pro International Mouse phenotyping centre.

Pro sestavení protokolů byly použity odborné publikace, které se zabývají podobným tématem a derivatizační reakce byly upraveny, dle možností laboratoře. Vyzkoušeny byly tři reakce a čtyři různé fluorescenční látky. Jediná derivatizační reakce, která vedla k úspěšnému označení karboxylové skupiny žlučových kyselin, byla reakce s MPAC-Br (Kurosawa et al. 1997).

Po analýze prvních výsledků, následovala optimalizace gradientu mobilní fáze, která zlepšila separaci píků a doba analýzy se zkrátila z 60 minut na 45 minut. Jako nejvhodnější gradient byl vybrán gradient *varianta 3*. Tímto konečným protokolem, bylo možné označit a stanovit sedm žlučových kyselin, se stabilním retenčním časem, vytvořit kalibraci a zjistit další analytické parametry metody.

Ve srovnání s doposud používanou HPLC metodou s detekcí při 245 nm, je tato metoda 15x citlivější. Nepodařilo se však rozlišit kyselinu cholovou a ursodeoxycholovou, které mají za těchto podmínek stejné retenční časy. Na žlučové kyseliny konjugované s taurinem se fluorofor nepodařilo navázat. Kyselina muricholová v námi zaváděné metodě, byla fluorescenčně označena, má stabilní retenční čas, ale nepodařilo se sestavit kalibrační křivku s lineární regresí. Díky tomuto výsledku tedy zatím není možné tuto metodu plně využít k analýze myšího biologického materiálu, ale je třeba se dále věnovat jejímu zdokonalování, pro dosažení co nejlepších výsledků.

Protože separace probíhala na principu reverzní fáze, lze na základě zjištěných retenčních časů, potvrdit hypotézu o polaritě žlučových kyselin. Kyselina lithocholová, nepolární sekundární žlučová kyselina, má nejdelší retenční čas, zatímco glykokonjugáty žlučových kyselin jsou eluovány jako první.

8 Soupis literatury

ALNOUTI, Yazen, Ivan L. CSANAKY a Curtis D. KLAASSEN, 2008. Quantitative-Profiling of Bile Acids and their Conjugates in Mouse Liver, Bile, Plasma, and Urine Using LC-MS/MS. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* [online]. 1.10., roč. 873, č. 2, s. 209–217 [vid. 30. říjen 2014]. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2008.08.018

ANON., 2011. High Performance Liquid Chromatography: Module 4. *Lab-Training.com* [online]. [vid. 8. březen 2015]. Dostupné z: <http://lab-training.com/landing/free-hplc-training-programme-6/>

ANON., 2013. *H2 Digestion / BioNinja* [online] [vid. 25. březen 2015]. Dostupné z: <http://www.ib.bioninja.com.au/options/option-h-further-human-2/h2-digestion.html>

BURYOVA, Halka, Karel CHALUPSKY, Olga ZBODAKOVA, Ivan KANCHEV, Marketa JIROUSKOVA, Martin GREGOR a Radislav SEDLACEK, 2013. Liver protective effect of ursodeoxycholic acid includes regulation of ADAM17 activity. *BMC Gastroenterology* [online]. roč. 13, č. 1, s. 155 [vid. 9. listopad 2014]. ISSN 1471-230X. Dostupné z: doi:10.1186/1471-230X-13-155

CLAUDEL, Thierry, Bart STAELS a Folkert KUIPERS, 2005. The Farnesoid X Receptor A Molecular Link Between Bile Acid and Lipid and Glucose Metabolism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 10.1., roč. 25, č. 10, s. 2020–2030 [vid. 30. listopad 2014]. ISSN 1079-5642, 1524-4636. Dostupné z: doi:10.1161/01.ATV.0000178994.21828.a7

COUFAL, Pavel, 1996. *HPLC* [online] [vid. 8. březen 2015]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>

CVAČKA, Josef, 2010. *Detekce ve vysokoúčinné chromatografii* [online] [vid. 26. únor 2015]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>

DASTYCH, Milan, 2007. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4226-1.

DASTYCH, Milan a Petr BREINEK, 2011. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-87192-18-4.

DIAZYME, 2014. Methods for Serum Total Bile Acids Test. *Total bile acids test & Clinical diagnosis* [online] [vid. 25. únor 2015]. Dostupné z: <http://www.diazyme.com/total-bile-acids-enzyme-cycling-method>

DONG, Michael W., 2006a. Basic Terms and Concepts. In: *Modern HPLC for Practicing Scientists*. B.m.: John Wiley & Sons, Inc., s. 15–46. ISBN 978047172789-7.

DONG, Michael W., 2006b. Introduction. In: *Modern HPLC for Practicing Scientists*. B.m.: John Wiley & Sons, Inc., s. 1–14. ISBN 978047172789-7.

DOSTÁL, Jiří, HANA PAULOVÁ, JIŘÍ SLANINA a EVA TÁBORSKÁ, 2012. *Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-5020-4.

DOSTÁL, JIŘÍ., HANA PAULOVÁ, JIŘÍ SLANINA a EVA TÁBORSKÁ, 2012. Metabolismus cholesterolu. In: *Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, s. 106. ISBN 978-80-210-5020-4.

FICKERT, Peter, Andrea FUCHSBICHLER, Hanns-Ulrich MARSCHALL, Martin WAGNER, Gernot ZOLLNER, Robert KRAUSE, Kurt ZATLOUKAL, Hartmut JAESCHKE, Helmut DENK a Michael TRAUNER, 2006. Lithocholic acid feeding induces segmental bile duct obstruction and destructive cholangitis in mice. *The American Journal of Pathology* [online]. 2., roč. 168, č. 2, s. 410–422. ISSN 0002-9440. Dostupné z: [doi:10.2353/ajpath.2006.050404](https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050404)

FU, Zidong Donna, Yue Julia CUI a Curtis D. KLAASSEN, 2014. Atorvastatin Induces Bile Acid-synthetic Enzyme Cyp7a1 by Suppressing FXR Signaling in Both Liver and Intestine in Mice. *Journal of Lipid Research* [online]. 2.10., s. jlr.M053124 [vid. 9. listopad 2014]. ISSN 0022-2275, 1539-7262. Dostupné z: [doi:10.1194/jlr.M053124](https://doi.org/10.1194/jlr.M053124)

GATTI, R., A. RODA, C. CERRE, D. BONAZZI a V. CAVRINI, 1997. HPLC-fluorescence determination of individual free and conjugated bile acids in human serum. *Biomedical chromatography: BMC* [online]. 2., roč. 11, č. 1, s. 11–15. ISSN 0269-3879. Dostupné z: [doi:10.1002/\(SICI\)1099-0801\(199701\)11:1<11::AID-BMC608>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0801(199701)11:1<11::AID-BMC608>3.0.CO;2-2)

GRIFFITHS, William J. a Jan SJÖVALL, 2010. Bile acids: analysis in biological fluids and tissues. *Journal of Lipid Research* [online]. 1., roč. 51, č. 1, s. 23–41. ISSN 0022-2275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.R001941-JLR200

GU, J. J., A. F. HOFMANN, H. T. TON-NU, C. D. SCHTEINGART a K. J. MYSELS, 1992. Solubility of calcium salts of unconjugated and conjugated natural bile acids. *Journal of Lipid Research*. 5.1., roč. 33, č. 5, s. 635–646. ISSN 0022-2275, 1539-7262.

HEBEL, Rudolf a Melvin W. STROMBERG, 1986. *Anatomy and embryology of the laboratory rat*. Wörthsee: BioMed Verlag. ISBN 3980123405.

HOFMANN, A.f., 2004. Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile-acid: Relevance to drug hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews* [online]. roč. 36, č. 3-4, s. 703–722 [vid. 23. únor 2015]. ISSN 03602532. Dostupné z: doi:10.1081/DMR-200033475

CHIANG, John Y. L., 2009. Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research* [online]. 1.10., roč. 50, č. 10, s. 1955–1966 [vid. 10. leden 2015]. ISSN 0022-2275, 1539-7262. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.R900010-JLR200

KAROLISKA INSTITUTET, 2014. *Leverceller* [online] [vid. 25. březen 2015]. Dostupné z: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Leverceller&lang=6

KING, Michael W., 1996. Bile Acid Synthesis, Metabolism and Biological Functions. *The medical biochemistry page* [online] [vid. 30. listopad 2014]. Dostupné z: <http://themedicalbiochemistrypage.org/bileacids.php>

KUROSAWA, T., H. SATO, M. SATO, H. TAKECHI, M. MACHIDA a M. TOHMA, 1997. Analysis of stereoisomeric C27-bile acids by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 6., roč. 15, č. 9-10, s. 1375–1382. ISSN 0731-7085.

MAYES, Peter A., 2001. Synthesa, transport a vylučování cholesterolu. In: ROBERT K. MURRAY, ed. *Harperova Biochemie*. Vyd. v ČR 3., v H + H 2. Jinočany: H&H, A Lange medical book, s. 279–291. ISBN 80-7319-003-6.

NICKEL, Robert, August SCHUMMER a Eugen SEIFERLE, 1979. *Viscera of Domestic Animals*. Oxford: Blackwell Science Ltd. ISBN 978-3489558187.

- NOVAK, Petr a Gary H. KRUPPA, 2008. Intra-molecular cross-linking of acidic residues for protein structure studies. *European Journal of Mass Spectrometry (Chichester, England)* [online]. roč. 14, č. 6, s. 355–365. ISSN 1469-0667. Dostupné z: doi:10.1255/ejms.963
- QIAO, Xue, Min YE, De-lin PAN, Wen-juan MIAO, Cheng XIANG, Jian HAN a De-an GUO, 2011. Differentiation of various traditional Chinese medicines derived from animal bile and gallstone: Simultaneous determination of bile acids by liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 7.1., roč. 1218, č. 1, s. 107–117 [vid. 2. březen 2015]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2010.10.116
- RUSSELL, David W., 2003. The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annual Review of Biochemistry* [online]. roč. 72, č. 1, s. 137–174 [vid. 30. říjen 2014]. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712
- SEDLÁČEK, Radislav, 2012. *Oddělení transgenních modelů nemocí | Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.* [online] [vid. 25. únor 2015]. Dostupné z: <http://www.img.cas.cz/vyzkum/radislav-sedlacek/>
- SOŠKA, Václav, 2011. Ateroskleróza a dyslipidémie. In: MILAN DASTYCH, ed. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. 1.vyd. vyd. Brno: Masarykova univerzita, s. 133. ISBN 978-80-87192-18-4.
- SVOJTKA A VAŠUT, 1996. *Atlas anatomie*. Čes. vyd. 1. Poznej a chraň své tělo. ISBN 80-7180-092-9.
- ŠAFKA, Václav, 2010. Makroanatomie jater. In: JIŘÍ EHRMANN, ed. *Hepatologie*. 1.vyd. vyd. Praha: Grada, s. 22–23. ISBN 978-80-247-3118-6.
- THOMAS, Charles, Roberto PELLICCIARI, Mark PRUZANSKI, Johan AUWERX a Kristina SCHOONJANS, 2008. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 8., roč. 7, č. 8, s. 678–693 [vid. 30. listopad 2014]. ISSN 14741776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd2619
- WANG, David Q.-H. a Susumu TAZUMA, 2002. Effect of β -muricholic acid on the prevention and dissolution of cholesterol gallstones in C57L/J mice. *Journal of Lipid Research* [online].

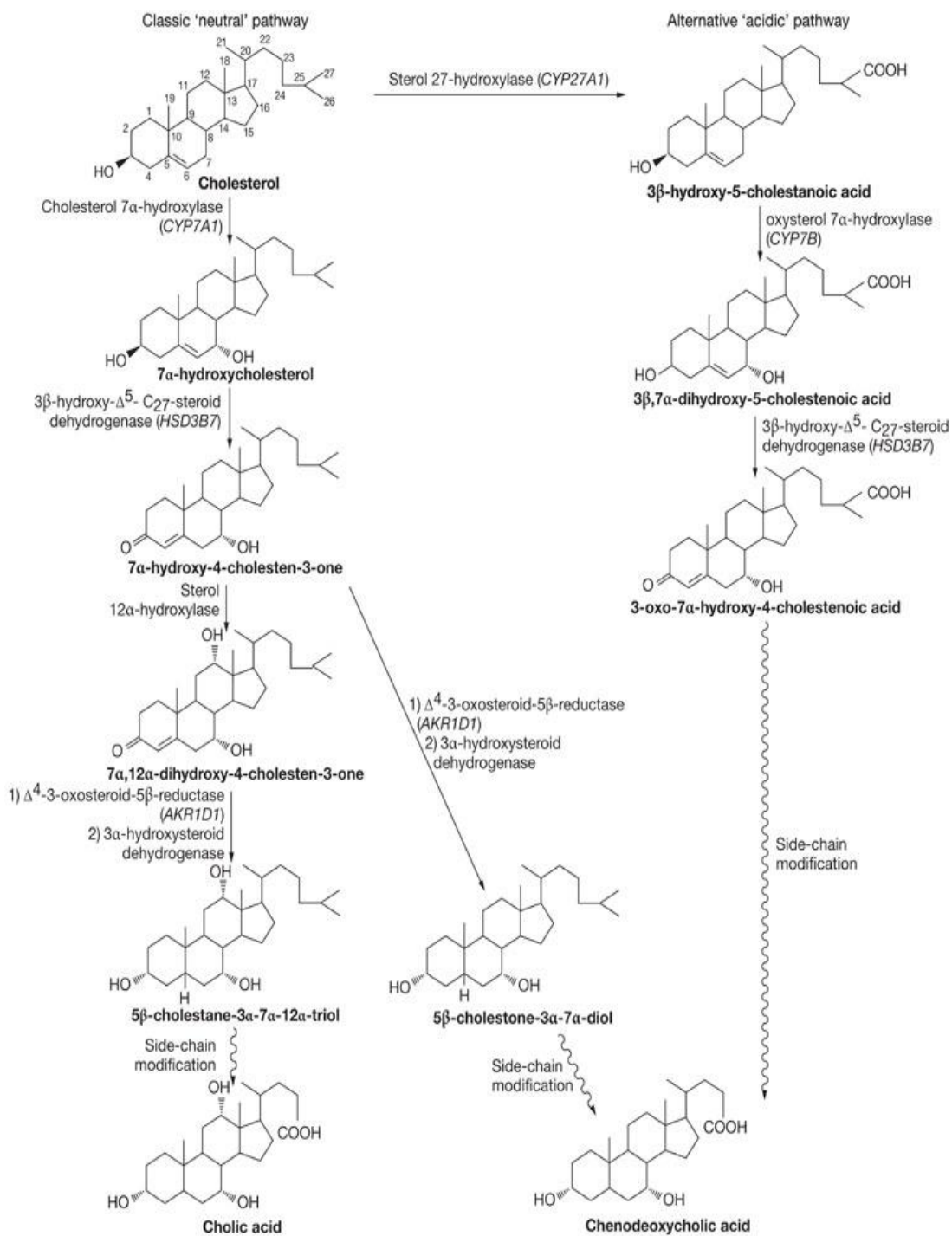
11.1., roč. 43, č. 11, s. 1960–1968 [vid. 14. leden 2015]. ISSN 0022-2275, 1539-7262. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.M200297-JLR200

WOOLBRIGHT, Benjamin L., Feng LI, Yuchao XIE, Anwar FARHOOD, Peter FICKERT, Michael TRAUNER a Hartmut JAESCHKE, 2014. Lithocholic acid feeding results in direct hepato-toxicity independent of neutrophil function in mice. *Toxicology Letters* [online]. roč. 228, č. 1, s. 56–66 [vid. 11. leden 2015]. ISSN 0378-4274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2014.04.001

ZHANG, Yu-Kun Jennifer, Grace L. GUO a Curtis D. KLAASSEN, 2011. Diurnal Variations of Mouse Plasma and Hepatic Bile Acid Concentrations as well as Expression of Biosynthetic Enzymes and Transporters. *PLoS ONE* [online]. roč. 6, č. 2, s. e16683 [vid. 17. duben 2015]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0016683

ZHOU, Huiping a Phillip B. HYLEMON, 2014. Bile acids are nutrient signaling hormones. *Steroids* [online]. 8., roč. 86, s. 62–68 [vid. 17. listopad 2014]. ISSN 0039-128X. Dostupné z: doi:10.1016/j.steroids.2014.04.016

9 Přílohy



Příloha I. Syntéza CA a CDCA



Příloha II: HPLC Agilent Technologies, 1260 Infinity



Příloha III: Inzert, vialka, víčko



Příloha IV: Zásobník vzorků