

UNIVERZITA KARLOVA, 1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

# Patofyziologický význam katabolické dráhy hemu

Habilitační práce

MUDr. Lucie Muchová, Ph.D.



Praha 2018

## Obsah

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | ÚVOD .....   | 4  |
| 1.1     | Katabolická dráha hemu .....   | 5  |
| 1.1.1   | Hem .....  | 5  |
| 1.1.2   | Hemoxygenasa .....   | 8  |
| 1.1.2.1 | Hemoxygenasa 1 .....   | 9  |
| 1.1.2.2 | Hemoxygenasa 2 .....   | 11 |
| 1.1.2.3 | Fyziologický a patofyziologický význam hemoxygenasy .....              | 12 |
| 1.1.3   | Oxid uhelnatý .....  | 13 |
| 1.1.4   | Bilirubin .....  | 16 |
| 1.1.4.1 | Struktura bilirubinu .....   | 16 |
| 1.1.4.2 | Transport bilirubinu v krevním řečišti .....                           | 18 |
| 1.1.4.3 | Vychytávání bilirubinu jaterní buňkou .....                            | 19 |
| 1.1.4.4 | Konjugace bilirubinu .....   | 19 |
| 1.1.4.5 | Sekrece bilirubinu do žluči .....                                      | 20 |
| 1.1.4.6 | Střevní metabolismus bilirubinu .....                                  | 23 |
| 1.1.4.7 | Toxické účinky bilirubinu .....  | 24 |
| 1.1.4.8 | Cytoprotektivní účinky bilirubinu .....                                | 24 |
| 1.1.5   | Klinický význam produktů katabolické dráhy hemu .....                  | 25 |
| 1.1.6   | Potenciální terapeutické využití produktů katabolické dráhy hemu ..... | 27 |
| 1.1.6.1 | Molekuly uvolňující oxid uhelnatý .....                                | 27 |
| 1.1.6.2 | Látky zvyšující systémové koncentrace bilirubinu .....                 | 29 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2     | OBECNÉ CÍLE.....  | 31 |
| 3     | SPECIFICKÉ CÍLE .....   | 32 |
| 3.1   | Charakterizovat důsledky regulace exprese hemoxygenasy in vivo a in vitro.....                                | 32 |
| 3.2   | Objasnit roli katabolické dráhy hemu v patogenezi jaterních onemocnění .....                                  | 33 |
| 3.3   | Zhodnotit úlohu produktů katabolické dráhy hemu (bilirubinu a oxidu uhelnatého) v biologických systémech..... | 33 |
| 4     | KOMENTÁŘE A DISKUSE.....  | 35 |
| 4.1   | Důsledky regulace exprese hemoxygenasy in vivo a in vitro .....   | 35 |
| 4.1.1 | Regulace exprese hemoxygenasy pomocí statinů .....  | 35 |
| 4.1.2 | Regulace exprese hemoxygenasy pomocí kyseliny valproové .....   | 36 |
| 4.1.3 | Vliv (GT) <sub>n</sub> mikrosatelitu proximálního promotoru na expresi a cytoprotektivní účinky HMOX1 .....   | 37 |
| 4.1.4 | Exprese HMOX1 u modelu chemicky indukovaného dlaždicobuněčného karcinomu kůže .....                           | 38 |
| 4.2   | Katabolické dráha hemu v patogenezi jaterních onemocnění .....  | 39 |
| 4.2.1 | Role hemoxygenasy a jejích biologicky aktivních produktů v cholestáze.....                                    | 39 |
| 4.2.2 | Vztah mezi katabolickou dráhou hemu a hepatoprotektivními účinky kurkuminu .....                              | 41 |
| 4.3   | Úloha produktů katabolické dráhy hemu (bilirubinu a CO) v biologických systémech.....                         | 42 |
| 4.3.1 | Metabolismus bilirubinu a jeho význam jako antioxidační, protizánětlivé a organoprotektivní molekuly.....     | 42 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.3.2 | Biologické účinky tetrapyrrolických sloučenin podobných bilirubinu z jedlých řas ..... | 44 |
| 4.3.3 | Produkce, tkáňová distribuce a biologické účinky oxidu uhelnatého .....                | 45 |
| 5     | ZÁVĚR .....  | 47 |
| 6     | SEZNAM ZKRATEK .....   | 48 |
| 7     | LITERATURA .....   | 50 |
| 8     | PŘÍLOHY .....  | 74 |

# 1 ÚVOD

Zájem vědců o molekulu hemu, cyklického tetrapyrrolu s centrálně vázaným atomem železa, lze datovat hluboko do 18. století, kdy italský lékař Vincenzo Antonio Menghini poprvé popsal ve svém díle „De ferrearum particularum sede in sanguin” výskyt železa v červených krvinkách [1]. Trvalo však bezmála sto let, než se podařilo Friedrichu Ludwigovi Hünefeldovi vykristalizovat hemoglobin [2] a Johanu Josephovi von Schererovi izolovat porfyrin a prokázat, že červená barva krve není závislá na přítomnosti železa [3]. Mezi řadou dalších důležitých objevů byly naprosto zásadními práce laureáta Nobelovy ceny Hanse Fischera z počátku minulého století, který úspěšně syntetizoval porfyriny, hemin a bilirubin a definitivně určil jejich strukturu [4]. Tyto objevy umožnily intenzivní studium fyziologického i patofyziologického významu hemu při přenosu kyslíku v hemoglobinu, jako prostetické skupiny řady klíčových enzymů a molekuly účastnící se buněčných procesů, například buněčné diferenciace, proliferace nebo regulace transkripce a translace. Nesmíme rovněž opominout porfyrie, poruchy syntézy hemu, a také toxické účinky volného hemu, který, pokud není navázán na bílkoviny, působí jako prooxidant a prozánětlivý faktor [5, 6].

Nelze se tedy divit, že mezi všemi těmito objevy zůstal článek Raimo Tenhunena z laboratoře Rudi Schmida z roku 1968, ve kterém popsal první krok degradace hemu enzymem hemoxygenasou [7], bez větší odezvy. Rovněž objev biliverdinreduktasy stejnou skupinou o dva roky později [8] byl považován pouze za chybějící střípek v mozaice katabolické dráhy hemu, kterou jsou vytvořeny potenciálně toxické produkty bilirubin, železo a oxid uhelnatý (CO), určené k vyloučení nebo recyklaci. Toto vnímání zcela změnilo práce z poloviny osmdesátých let minulého století. Ty ukázaly, že oxid dusnatý může sloužit jako významná signální molekula [9] a znamenaly tak nový impuls ve výzkumu plynných molekul včetně oxidu uhelnatého. Další klíčovou prací byla publikace Rolanda Stockera [10], která jako jedna

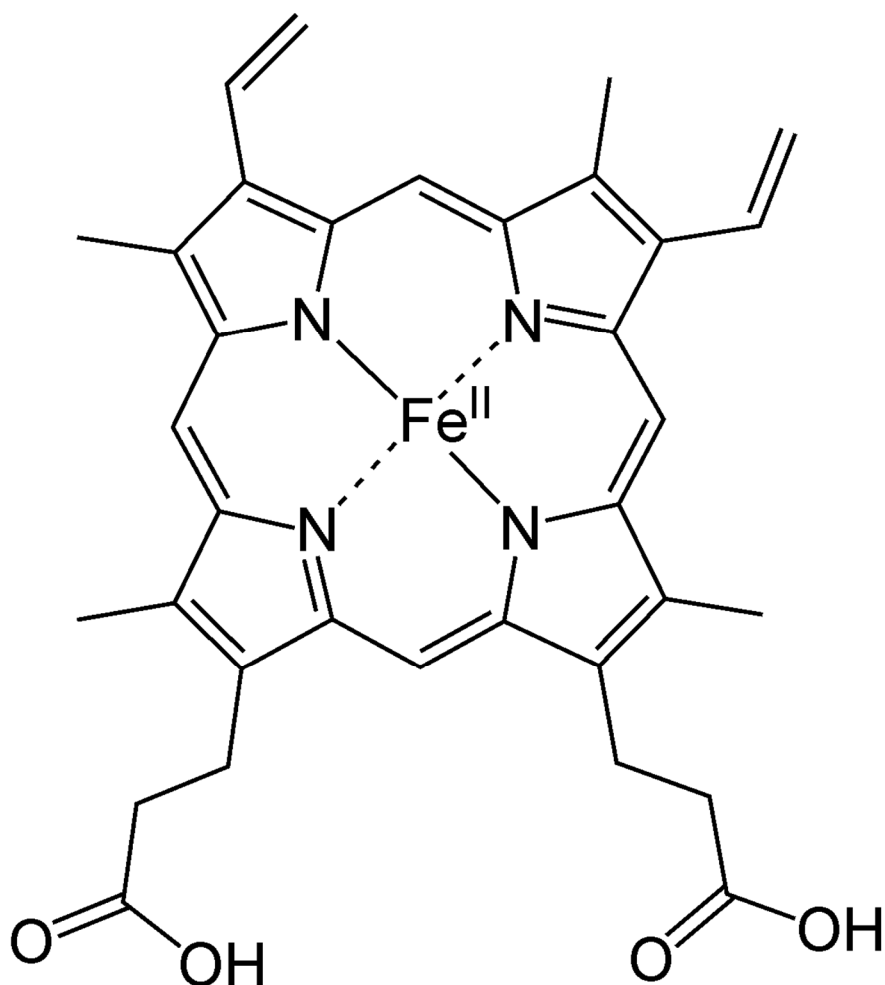
z prvních představila bilirubin jako fyziologicky významný antioxidant. Rázem se v centru pozornosti vědeckých týmů z celého světa ocitla nejen biosyntetická, ale především degradační dráha hemu a její role v regulaci řady fyziologických a především patofyziologických procesů.

## ***1.1 Katabolická dráha hemu***

### ***1.1.1 Hem***

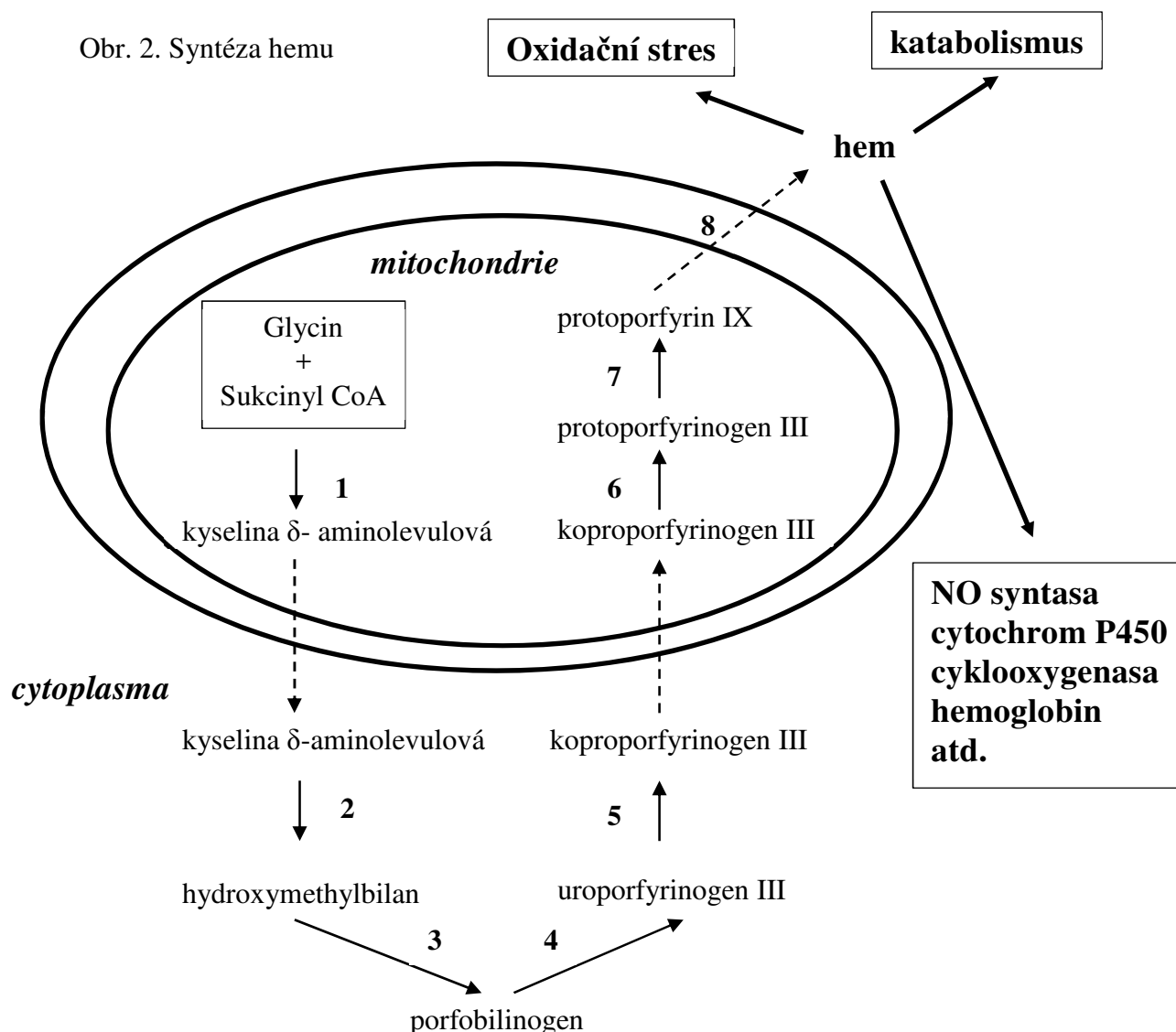
Hem, neboli Fe-protoporfyrin IX, je planární tetrapyrrolická molekula složená ze čtyř molekul pyrrolu vzájemně spojených  $\alpha$ -methinovými můstky s typickými substituenty (methyl, vinyl a propionát) na  $\beta$ -uhlících pyrrolových kruhů (obr. 1). Konjugované uspořádání vazeb v tetrapyrrolovém makrocyklu je zodpovědné za typické vlastnosti porfyrinů- planaritu, barevnost a fluorescenci. Uprostřed planárního kruhu je vázán koordinačně kovalentní vazbou atom kovu, v případě hemu je to dvojmocné železo. Struktura hemu byla definitivně potvrzena po jeho organické syntéze provedené Hansem Fischerem (1881-1945) a spolupracovníky v roce 1927 [11].

Obr. 1. Struktura hemu



Hem je syntetizován prakticky ve všech lidských jaderných buňkách, nicméně jeho potřeba se dramaticky liší mezi různými buňkami i tkáněmi. Syntéza zahrnuje sérii enzymatických reakcí, které se odehrávají částečně v mitochondriích a částečně v cytoplazmě (obr. 2). Nejvyšší syntézu hemu nacházíme v erythroidních buňkách kostní dřeně a játrech, kde je inkorporován do hemoproteinů hemoglobinu nebo cytochromu P450. Hemoproteiny jsou ubikviterní v biologických systémech a vykazují širokou škálu funkcí- od klasických přenašečových a zásobních proteinů pro plynné molekuly (hemoglobin, myoglobin) přes transport elektronů (cytochromy) až po regulaci transkripce, cirkadiálního rytmu, iontových kanálů a mikroRNA [12].

Obr. 2. Syntéza hemu



**Obr. 2. Syntéza hemu.** Tvorba hemu z glycinu a sukcinylkoenzymu A probíhá kaskádou navazujících reakcí za účasti osmi různých enzymů: 1:  $\delta$ -aminolevulátsynthasa (ALA-S); 2:  $\delta$ -aminolevulátdehydratasa (ALA-D); 3: porfobilinogendeaminasa (PBGD); 4: uroporphyrinogen III synthasa (URO-S); 5: uroporphyrinogen III dekarboxylasa (URO-D); 6: koproporphyrinogen III oxidasa (CPO); 7: protoporphyrinogen III oxidasa (PPO); 8: ferrochelataasa (FC). Syntetizovaný hem je buď zabudován do hemoproteinů nebo degradován. Hromadění intracelulárního (nebo exogenního) hemu může poškozovat buňky a tkáň zvyšováním oxidačního stresu. Zpracováno podle [13].



Hem se rovněž podílí na regulaci vlastního metabolismu inhibicí biosyntézy a stimulací katabolismu (viz níže). Zcela odlišnou regulaci metabolismu hemu pak nacházíme v erythroidních buňkách [14]. Na rozdíl od mnohočetných pozitivních funkcí hemoproteinů může nadbytek volného hemu způsobit poškození buněk a tkání. Volný hem podporuje tvorbu reaktivních forem kyslíku a spouští oxidační stres [15]. Tímto mechanismem se může podílet na poškození lipidové dvojvrstvy a některých organel jako například mitochondrií nebo jádra a na destabilizaci cytoskeletu [16].

### **1.1.2 Hemoxygenasa**

Hemoxygenasa (HMOX; EC 1.14.99.3), mikrozomální enzym poprvé popsán v roce 1968 [7], je prvním a zároveň klíčovým enzymem katabolismu hemu. Produktem hemoxygenasové reakce je CO,  $Fe^{2+}$  a biliverdin, který je vzápětí enzymem biliverdinreduktasou přeměněn na bilirubin. Oxidace hemu zahrnuje sekvenci reakcí počínající  $\alpha$ -meso-hydroxylací, následuje fragmentace vzniklého  $\alpha$ -meso-hydroxyhemu na verdohem a CO za účasti kyslíku a nakonec oxidativní štěpení verdohemu na biliverdin a uvolnění železnatého iontu. Reakce probíhá za účasti tří molekul  $O_2$  a redukčních ekvivalentů poskytovaných NADPH cytochrom P450 reduktasou [17].

U člověka byly popsány dvě izoformy HMOX, indukibilní HMOX1 a konstitutivní HMOX2. I když oba enzymy metabolizují stejný substrát, liší se ve svých fyziologických účincích a způsobu regulace.

### 1.1.2.1 *Hemoxygenasa 1*

HMOX1 je protein o velikosti 32kDa zakotvený svou C-terminální transmembránovou částí do endoplazmatického retikula [18] vytvářející zde proteinový komplex společně s biliverdinreduktasou a NADPH cytochrom P450 reduktasou [19]. Kromě toho byla HMOX1 prokázána i v dalších buněčných kompartmentech, jako jsou mitochondrie, kaveoly a jádro. V kaveolách a mitochondriích nacházíme kompletní HMOX1 kolokalizující s biliverdinreduktasou a NADPH cytochrom P450 reduktasou, pravděpodobně tedy její primární úloha v těchto buněčných strukturách spočívá v degradaci hemu. V jádře se oproti tomu vyskytuje pouze zkrácená varianta HMOX1 vznikající proteolytickým odštěpením transmembránové domény. Translokaci HMOX1 do jádra stimuluje například hem nebo oxidační stres. Úloha HMOX1 v jádře zřejmě spočívá v aktivaci transkripčních faktorů vedoucí k expresi genů chránící buňku před zvýšeným oxidačním stresem [20]. Zda se i v jádře uplatňuje katalytická aktivita HMOX1, je stále předmětem výzkumu a vědeckých diskusí.

*HMOX1* je za fyziologických okolností vysoce exprimována ve slezině a dalších tkáních podílejících se na degradaci erytrocytů, jako například specializovaných retikuloendotelových buňkách jater a kostní dřeni. V ostatních tkáních je její exprese typicky velmi nízká, nicméně reaguje rychlou transkripční aktivací na řadu fyzikálních i chemických stimulů. Indukční efekt na genovou expresi *HMOX1* mají především podněty, které nějakým způsobem zvyšují oxidační stres, například těžké kovy, bakteriální lipopolysacharid, hyperoxie, tepelný šok, ischemie, UV záření, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cytokiny, oxid dusnatý, hem a látky snižující intracelulární glutathion [13, 21]. Velká variabilita výše zmíněných induktorů naznačuje, že k aktivaci transkripce *HMOX1* může vést řada různých signálních kaskád. Mezi nejprozkoumanější patří dráhy aktivující mitogeny aktivované proteinkinasy (MAPK), fosfatidylinositol 3 kinasy a proteinkinasy A, C a G [22].

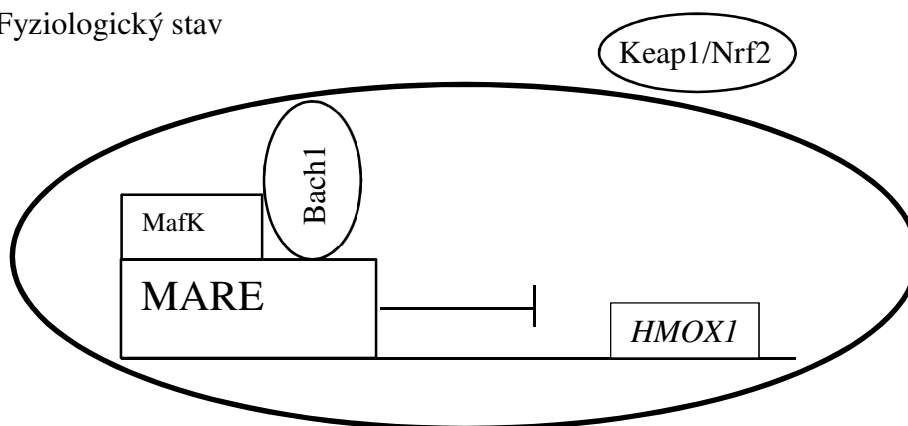
U člověka je gen pro *HMOX1* lokalizován na 22q12 a skládá se ze čtyř intronů a pěti exonů. Regulační oblast *HMOX1* zahrnuje pětisetbázový promotor, proximální enhancer a minimálně dva distální enhancery E1 a E2. V promotoru nacházíme vazebná místa pro transkripční faktory AP-1, AP-2, nukleární faktor kappa B (NF- $\kappa$ B), HIF-1 a oblasti zodpovědné za reakci na stres či těžké kovy (metal response elements MtRE, CdRE, stress response elements (StRE), heat shock consensus (HSE) sequences) [23, 24].

Klíčový je mechanismus regulace exprese *HMOX1* pomocí jejího substrátu hemu. Za normálních okolností je v buňce přítomen represor transkripce Bach1. Bach1 vytváří heterodimery s malými Maf proteiny (MafF, MafG, MafK) a společně se vážou na Maf rozpoznávací element MARE v oblasti enhancerů E1 a E2 a tím zabrání transkripci *Hmox1*. Zároveň cytosolický protein KEAP1 (Kelch-like ECH Associated Protein 1) nasměruje nově syntetizovaný transkripční faktor Nrf2 k degradaci v proteazomu. Při vysoké koncentraci hemu jsou vyvázány jak Bach1, tak KEAP1 proteiny, dojde k translokaci Nrf2 do jádra, jeho navázání na MARE oblast a aktivaci transkripce *HMOX1* [25, 26] (Obr. 3).

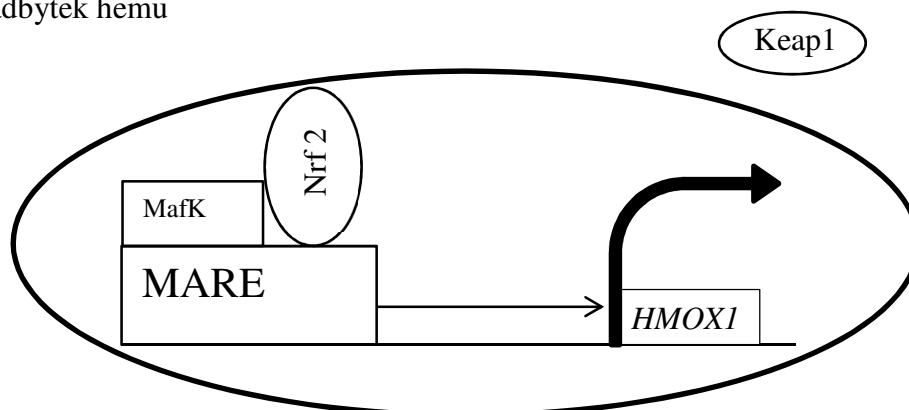
V oblasti proximálního promotoru se nachází variabilní oblast, tzv. (GT)<sub>n</sub> mikrosatelit, obsahující 11 až 42 GT repetice. Dlouhý úsek alternujících purinových a pyrimidinových bazí podporuje vznik Z konformace DNA, která se může podílet na regulaci transkripce cílového genu [27]. Reportérové experimenty s různými konstrukty promotoru pro *HMOX1* jednoznačně ukázaly, že delší promotor obsahující více než 28 GT repetice je mnohem méně aktivní než ten s krátkou GT ( $\leq 23$ ) oblastí [28].

Obr. 3. Regulace exprese *HMOX1*

a) Fyziologický stav



b) Nadbytek hemu



**Obr. 3. Regulace exprese *Hmox1*.** a) Za fyziologických okolností je na Maf rozpoznávací element MARE navázán inhibitor transkripce Bach 1 v komplexu s Maf proteinem, který zabraňuje transkripci *Hmox1*. b) Při zvýšené koncentraci hemu dojde k uvolnění transkripčního faktoru Nrf2 z vazby na Keap1, jeho translokaci do jádra, vazbě na MARE oblast a aktivaci transkripce *Hmox1*.

#### 1.1.2.2 Hemoxygenasa 2

HMOX2 je protein o velikosti 36 kDa, jehož gen je lokalizován na 16p13.3 a s HMOX1 je homologní asi jen ze 40% [29]. Na rozdíl od *HMOX1*, která patří k nejinducibilnějším enzymům v těle, je exprese *HMOX2* konstitutivní, respektive v jejím promotoru byla zatím prokázána jediná funkční regulační oblast, tzv. glucocorticoid response element (GRE),

prostřednictvím které dochází po stimulaci některými kortikosteroidy ke zvýšení exprese *HMOX2* [30, 31]. *HMOX2* také obsahuje unikátní hemové regulační sekvence (heme regulatory motifs, HRM) regulující aktivitu a stabilitu enzymu v závislosti na dostupnosti substrátu [32]. Přestože je exprese *HMOX2* na úrovni mRNA relativně stabilní, její aktivita může být ovlivněna posttranslačními modifikacemi. Popsána byla aktivace *HMOX2* pomocí proteinkinasy C, oxidu dusnatého nebo reaktivních forem kyslíku [33-35]. Specifickým účinným aktivátorem *HMOX2* je menadion (vitamin K<sub>3</sub>) [36]. *HMOX2* je exprimována prakticky ve všech tkáních, za zmínku stojí především její vysoká exprese v mozku [37].

### ***1.1.2.3 Fyziologický a patofyziologický význam hemoxygenasy***

HMOX, především díky vzniku biologicky aktivních produktů, ale i nezávisle na své katalytické aktivitě, hraje v organismu významnou roli v homeostáze železa, ochraně před oxidačním stresem, regulaci zánětlivých pochodů, regulaci vaskulárního tonu, hypoxii a buněčné signalizaci. Její fyziologický význam ještě podtrhují fenotypické nálezy u *Hmox1* deficientních myši a popsaného případu vrozené deficiencie HMOX1 u člověka.

Dospělé *Hmox1*<sup>-/-</sup> myši se vyznačují anémií s abnormálně nízkými hladinami sérového železa, akumulací železa v játrech a ledvinách vedoucí k oxidačnímu poškození tkání, chronickým zánětem a celkově kratší dobou přežívání ve srovnání s kontrolními zvířaty [38]. Zajímavé je, že myši s deficitem *Hmox2* izoformy mají mnohem mírnější fenotyp a normální dobu přežití. Přestože zde nacházíme kompenzatorní zvýšení exprese *Hmox1*, tyto jedinci jsou náchylnější k hyperoxickému poškození plic a akumulaci železa ve tkáních [39, 40]. Tyto nálezy svědčí o tom, že funkce *Hmox1* a *Hmox2* se zcela nepřekrývají, ale spíše doplňují.

U člověka byl deficit *HMOX1* popsán u chlapce s asplenií, růstovou retardací, intravaskulární hemolytickou anémií a nízkými hladinami bilirubinu. U dítěte byly rovněž

nalezeny vysoké koncentrace hemu, depozita železa v játrech a ledvinách a poškození endotelu [41]. Podobný klinický průběh byl pozorován i u druhého zdokumentovaného případu *HMOX1* deficiencie u mladé dívky s asplenií, hemolytickou anémií, systémovým zánětem a nefritidou [42]. Oba pacienti zemřeli v dětském věku 6, respektive 15 let [42, 43].

Klinický význam mohou mít rovněž polymorfismy v promotoru pro *HMOX1*, které jsou spojeny se změnou aktivity enzymu. Tzv. „dlouhý promotor“ obsahující více než 28 GT repetice (viz kapitola 1.1.2.1) je asociován s nízkou aktivitou HMOX a zároveň vyšší pravděpodobností vzniku emfyzému u kuřáků [28], ischemické choroby srdeční u diabetiků [44] i nediabetických pacientů [45], abdominálního aneurysmatu [46], plicního adenokarcinomu u kuřáků mužského pohlaví [47] a preeklamsií u žen kuřaček [48]. Na druhé straně může mít tato varianta ochrannou funkci před vznikem cerebrální malárie [49].

### **1.1.3 Oxid uhelnatý**

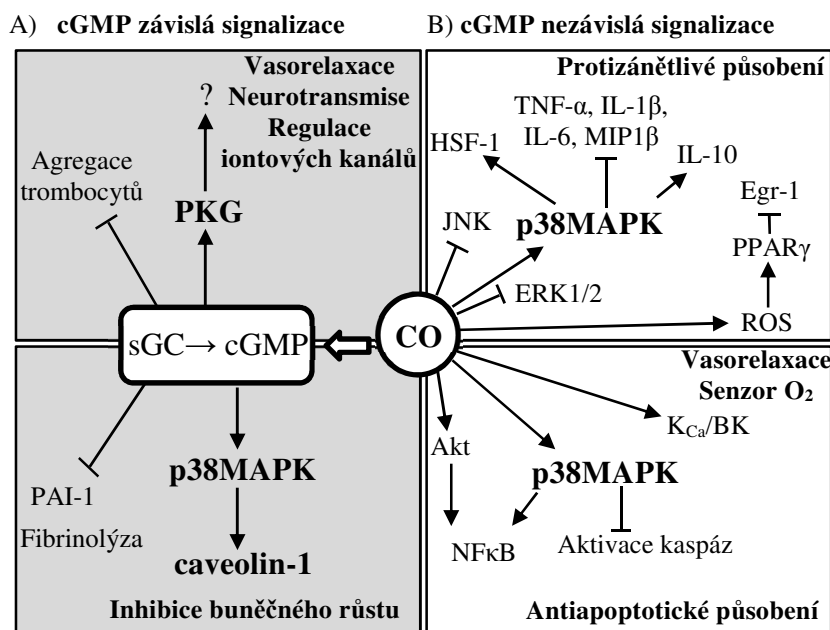
Oxid uhelnatý je malá plynná molekula bez barvy, chuti nebo zápachu nejčastěji vznikající jako typický primární polutant během nedokonalého spalování fosilních paliv a biomasy. Vyznačuje se vysokou afinitou k hemu, který tvoří prostetickou skupinu buněčných hemoproteinů zajišťujících životně důležité aerobní funkce. Vazba CO na hemoglobin, která je přibližně 200x pevnější než vazba kyslíku, vede ke vzniku karboxylhemoglobinu a následné hypoxii organismu. Již v roce 1857 popsal francouzský fyziolog Claude Bernard mechanismus toxicity CO tak, že po vazbě CO na hemoglobin dochází ke snížení transportní kapacity krve pro kyslík a následné hypoxii tkání [50]. CO rovněž posouvá disociační křivku oxyhemoglobinu doleva a tím dále snižuje tkáňový  $P_{aO_2}$ . Kromě tkáňové hypoxie však způsobuje otrava CO i přímé buněčné změny řadou dalších mechanismů, mezi které patří

například vazba na intracelulární hemoproteiny, tvorba NO a peroxynitritu, lipoperoxidace, mitochondriální oxidační stres, apoptóza a zánětlivé poškození [51].

CO je rovněž produkován *in vivo*, a to především během degradace hemu katalyzované enzymem HMOX. Až 80% endogenního CO pochází z degradovaných červených krvinek, zatímco většina zbývajících CO je uvolněna z ostatních hemoproteinů (myoglobin, cytochromy, katalasa atd.). Malé, ale nezanedbatelné procento CO může pocházet z nehemových procesů, jako jsou fotooxidace, lipoperoxidace, aktivita xenobiotik a bakterií v krevním řečišti a trávicím systému [52-54]. Po desetiletí byl endogenní CO považován za pouhou odpadní látku, kterou je nutno vyloučit dýchacím systémem. Výzkumy z posledních let však jasně ukázaly, že CO, podobně jako další plynné molekuly NO nebo H<sub>2</sub>S, je významnou signální molekulou podílející se na regulaci řady fyziologických i patofyziologických procesů v organismu [55].

CO jako plynná molekula volně difunduje přes buněčné membrány a váže se na cílové molekuly, kterými jsou především solubilní guanylát cyklasa (sGC), draslíkové kanály, kaveolární NO syntasa (NOS), NADPH oxidasa nebo transkripční faktory obsahující hem, jako například BACH1 nebo NPAS2. Vazba CO na hemovou podjednotku uvnitř proteinů mění jejich konformaci a může pozitivně regulovat jejich aktivitu. V případě sGC nebo NOS vede tato vazba ke zvýšené produkci cyklického GMP nebo NO, které jsou důležitými regulátory vaskulárního tonu a neurotransmise [56]. Některé základní metabolické dráhy ovlivněné CO jsou znázorněny na obrázku 4.

Obr. 4. Mechanismus intracelulárního působení CO



**Obr. 4. Mechanismus intracelulárního působení CO. A) Signalizace závislá na cGMP:** Vazba CO na sGC (solubilní guanylát cyklasu) vede ke konverzi GTP na cGMP (cyklický guanosin monofosfát), který funguje jako druhý posel hrající důležitou úlohu v řadě fyziologických procesů, jako jsou agregace trombocytů, fibrinolýza, regulace vaskulárního tonu, buněčného cyklu nebo neurotransmise. **B) Signalizace nezávislá na cGMP:** CO může přímo ovlivňovat řadu signálních kaskád, například p38 MAPK (mitogeny aktivované proteinkinasy), podílejících se mimo jiné na buněčném růstu a regulaci zánětlivé odpovědi. Egr-1: protein časné růstové odpovědi 1, ERK1/2: proteinkinasa 1/2 regulující extracelulární signály, HSF-1: protein 1- faktor teplotního šoku, IL: interleukiny, JNK: c-Jun N-terminální kinasy, K<sub>Ca</sub>/BK: draslíkové kanály aktivované kalciovými ionty, NFκB: nukleární faktor κB, PAI-1: inhibitor aktivátoru plasminogenu 1, PKG: proteinkinasa G, PPARγ: receptory aktivované peroxizómovými proliferátory, ROS: reaktivní formy kyslíku, TNF-α: tumor nekrotizující faktor α.



Játra jsou orgánem bohatým na hemoproteiny s relativně vysokou hemoxygenasovou aktivitou. CO se zde podílí na regulaci jaterní perfuze [57], toku žluči [58] a imunitní odpovědi [59]. Hepatoprotektivní působení CO bylo popsáno u jaterní transplantace a ischemicko-reperfuzního poškození jater [60]. Kromě toho má CO důležitou roli v modulaci intrahepatální vaskulární rezistence a tím i portální hypertenze a jeho hladiny mohou úzce souviset s hyperdynamickou cirkulací u cirhózy [61]. Protizánětlivé účinky CO byly prokázány na modelu jaterního poškození vyvolaného lipopolysacharidem [62] nebo lipopolysacharidem v kombinaci s D-galaktosaminem [63]. CO může rovněž vykazovat protektivní účinky u různých typů cholestatických onemocnění, především díky ovlivnění kontraktility žlučovýchodů [64], stimulace toku žluči [65] a modulaci exprese jaterních transportérů [66].

#### **1.1.4 Bilirubin**

##### **1.1.4.1 Struktura bilirubinu**

Bilirubin je lineární tetrapyrrolová molekula vznikající během katabolismu hemu účinkem enzymů hemoxygenasy a biliverdinreduktasy. Základní strukturu bilirubinu poprvé popsal a v roce 1941 provedl jeho syntézu laureát Nobelovy ceny Hans Fischer [67], nicméně jeho trojrozměrné uspořádání a především vznik intramolekulových vodíkových vazeb, které jsou naprosto zásadní pro pochopení fyzikálně chemických vlastností bilirubinu a jeho chování v biologických systémech, byly objasněny až o několik desítek let později [68].

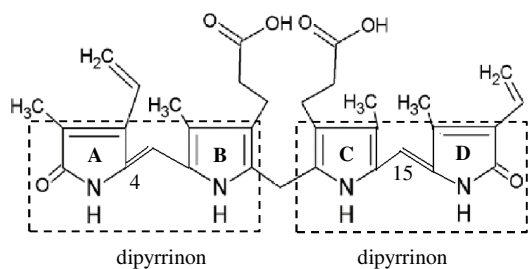
Nejběžněji se v těle dospělého člověka vyskytuje 4Z,15Z-bilirubin IX $\alpha$  vznikající z izomeru IX protoporfyrinu a obsahující dvojně vazby na uhlících C4 a C15 v stereochemickém uspořádání *cis* (neboli Z). Spektroskopické studie ukázaly, že v roztocích i krystalické formě zaujímá bilirubin stabilní zalomenou střečovitou strukturu („ridge-tile

structure“) umožňující vznik vodíkových můstků mezi postranními řetězci tvořenými kyselinou propionovou a polárními skupinami protilehlých pyrrolových kruhů (viz obr. 5) [68, 69]. Toto uspořádání dává bilirubinu lipofilní charakter a zároveň vysvětluje, proč nemůže být bez konjugace s kyselinou glukuronovou v játrech vyloučen do žluče. Zajímavé je, že konstituční izomery bilirubinu IX  $\beta$ ,  $\gamma$  nebo  $\delta$ , vznikající štěpením methinových můstků na odlišných místech porfyrinového cyklu hemu, nejsou schopny tvořit intramolekulové vodíkové vazby, jsou tedy méně lipofilní a mohou být vyloučeny játry bez potřeby konjugace [70]. Tyto izomery se ovšem vyskytují u dospělých jedinců pouze ve stopových množstvích.

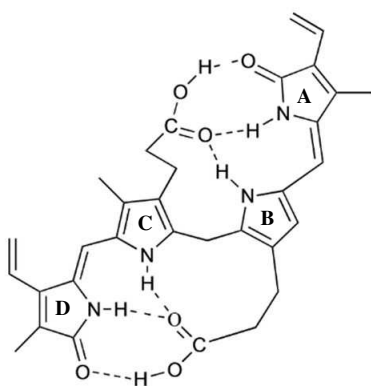
Na rozdíl od konstitučních mohou konfigurační izomery bilirubinu 4Z, 15Z podléhat fotoexcitaci a měnit se působením světla na 4Z 15E/ 4E 15Z izomery snadno přecházející na stabilnější a hlavně polárnější deriváty lumirubin, fotobilirubin II nebo cyklobilirubin, které mohou být opět vylučovány játry bez nutnosti konjugace. Tento princip se využívá při fototerapii novorozenecké žloutenky či těžkých nekonjugovaných hyperbilirubinemií [71].

Obr. 5. Struktura bilirubinu

a)



b)



Obr. 5. Struktura bilirubinu

- a) Lineární zobrazení bilirubinu IXa složeného ze dvou dipyrinonových podjednotek a uspořádání 4Z, 15Z.
- b) Nejstabilnější trojrozměrné uspořádání bilirubinu IXa s vodíkovými můstky mezi karboxylovými skupinami na pyrrolovém kruhu B a C a polárními skupinami na kruhu D a A.

#### 1.1.4.2 Transport bilirubinu v krevním řečišti

Vzhledem ke svému hydrofobnímu charakteru musí být bilirubin v krevním řečišti transportován ve vazbě na transportní protein, kterým je především albumin. Malé množství

bilirubinu (kolem 10%) je transportováno ve vazbě na apoprotein D v lipoproteinu HDL [72, 73]. Albumin obsahuje specifická vazebná místa, kam se bilirubin váže iontovou vazbou a je z ní tedy snadno disociovatelný. Tato vlastnost je klíčová během vychytávání bilirubinu jaterní buňkou, kdy dojde k uvolnění bilirubinu z vazby na albumin a jeho transportu přes membránu hepatocytu [74]. Méně než 0,01% bilirubinu pak zůstává nnavázáno na přenašečový protein jako takzvaný volný bilirubin ( $B_f$ ). Tato frakce, ač minoritní, může procházet biologickými membránami a je zodpovědná za patofyziologické účinky bilirubinu v buňkách a tkáních [75].

#### ***1.1.4.3 Vychytávání bilirubinu jaterní buňkou***

Otázka transportu bilirubinu do hepatocytu ještě není zcela uspokojivě vyřešena. Předpokládá se, že při nízkých sérových koncentracích volného bilirubinu ( $B_f < 40-50$  nM) přechází bilirubin do buňky aktivním transportem, zatímco při vysokých koncentracích  $B_f$  (okolo 70 nM) se jedná spíše o pasivní difuzi. Přestože nebyl jednoznačně identifikován konkrétní sinusoidální transportér pro nekonjugovaný bilirubin, mezi vážné kandidáty se řadí skupina přenašečů pro organické ionty OATP, a to především OATP1B1 (též známý jako SLC01B1, OATP2 nebo OATP-C) [76].

#### ***1.1.4.4 Konjugace bilirubinu***

V jaterní buňce je bilirubin vázán na skupinu transportních proteinů, především se jedná o glutathion S- transferasu B (ligandin či protein Y) a FABP1 (fatty acid binding protein 1 neboli protein Z). Tyto proteiny slouží jak k intracelulárnímu transportu bilirubinu, tak brání jeho úniku zpět do cirkulace. Nezanedbatelná část bilirubinu se může v buňce vyskytovat ve vazbě na membrány [77].

V endoplazmatickém retikulu je pak bilirubin konjugován enzymem UGT1A1 (UDP-glukuronosyltransferasa 1A1), který je jako jediný enzym z široké superrodiny UGT schopen přenést glukuronosyl z uridindifosfoglukuronátu na jeden nebo oba postranní propionátové řetězce bilirubinu. Vzniká monoglukuronosyl (cca 20 %) nebo majoritní bisglukuronosyl (cca 80 %) bilirubinu, který je polární a může být vyloučen do žluči [78]. Vzhledem k nezastupitelnosti UGT1A1 v konjugaci bilirubinu vede kvantitativní nebo funkční deficeience tohoto enzymu k akumulaci nekonjugovaného bilirubinu v cirkulaci. Dosud byly popsány tři syndromy familiární nekonjugované hyperbilirubinémie. Strukturální mutace v některém z pěti exonů *UGT1A1* vede ke vzniku Criglerova-Najjarova syndromu typu 1 (úplná absence enzymové aktivity) nebo typu 2 (závažný pokles aktivity UGT1A1), změny v promotoru *UGT1A1* pak mohou vyústit ke snížení jeho konjuguační aktivity, mírně zvýšeným hladinám nekonjugovaného bilirubinu v plazmě a rozvoji tzv. Gilbertova syndromu [79].

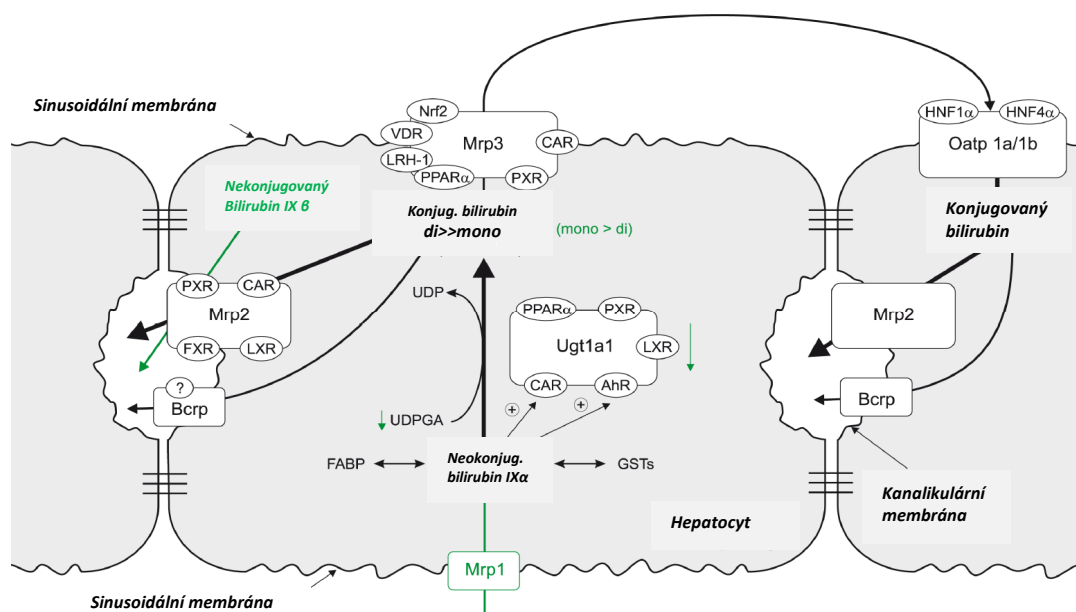
#### **1.1.4.5 Sekrece bilirubinu do žluči**

Konjugáty bilirubinu jsou secernovány proti koncentračnímu gradientu přes kanalikulární membránu hepatocytu do žluči. Jedná se o aktivní transport pomocí kanalikulárního transportéru ABCC2 (MRP2, multidrug resistance protein 2), patřícího do rodiny ABC transportérů, které ke své činnosti využívají hydrolýzu ATP [80]. Substrátová specifita ABCC2 transportéru je poměrně široká a kromě bilirubinu zahrnuje i glutathion, sulfatované a glukuronidované konjugáty řady léčiv a organických aniontů a některá neutrální a pozitivně nabitá xenobiotika. Mutace v kódující sekvenci genu *ABCC2* vede ke vzniku konjugované hyperbilirubinémie, takzvanému Dubin-Johnsonovu syndromu [81]. Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění popsané v roce 1954 Dubinem a Johnsonem [82] charakterizované mírnou konjugovanou či smíšenou hyperbilirubinemií bez jakýchkoliv dalších abnormalit a je

považováno za benigní syndrom bez nutnosti léčby. Přítomnost konjugátů bilirubinu ve žluči u zvířat s deficiencí ABCC2 naznačuje existenci dalších možných přenašečů konjugovaného bilirubinu, které však zatím nebyly jednoznačně identifikovány.

Rotorův syndrom je dalším typem konjugované hyperbilirubinémie, ale na rozdíl od Dubin-Johnsonova syndromu se zcela funkčním transportérem ABCC2. Přestože byl popsán Rotorem již v roce 1948 [83] jako benigní autozomálně recesivní syndrom, jeho molekulární podstata byla objasněna teprve nedávno [84]. Bylo zjištěno, že část konjugovaného bilirubinu není transportována přímo přes kanalikulární membránu do žluči, ale zpět pomocí transportéru MRP3 do sinusoidální krve a odtud znovu vycytána transportéry OATP1A/1B sousedních hepatocytů [85]. Tento mechanismus má zřejmě zabránit přetížení kanalikulárních transportních mechanismů periportálních hepatocytů, které jsou vzhledem ke své anatomické lokalizaci nejvíce exponované xenobiotikům a endotoxinu. Podstatou Rotorova syndromu je pak úplná absence obou sinusoidálních transportérů OATP1A a OATP1B [84].

Obr. 5. Intracelulární metabolismus a sekrece bilirubinu jaterní buňkou



Obr. 5. Intracelulární metabolismus a sekrece bilirubinu jaterní buňkou

Hydrofobní nekonjugovaný bilirubin IX $\alpha$  se váže na cytosolické proteiny glutathion-S-transferasu B (GSTs) a protein vázající mastné kyseliny (FABP1). Mikrozomální enzym uridin difosfát glukuronosyltransferasa 1A1 (Ugt1a1) katalyzuje přenos glukuronosylu z uridindifosfoglukuronátu (UDPGA) na molekulu bilirubinu za vzniku konjugovaného mono- a bisglukuronosyl bilirubinu (mono, di). Exprese Ugt1a1 může být aktivována některými nukleárními receptory, jako jsou například konstitutivní androstanový receptor (CAR), arylhydrokarbonový receptor (AhR), pregnanový X receptor (PXR), jaterní X receptor (LXR) nebo receptor aktivovaný peroxizómovými proliferátory  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ). Nekonjugovaný bilirubin může indukovat svou vlastní konjugaci prostřednictvím aktivace CAR nebo AhR. Konjugovaný bilirubin je secernován do žluči přes kanalikulární membránu aktivním transportem pomocí transportéru Mrp2 (multidrug resistance protein 2, Abcc2). Existují i nepřímé důkazy pro alternativní transport bilirubinu, nicméně konkrétní transportér ještě nebyl identifikován.

*Kandidátním přenašečem může být Bcrp (brest cancer resistance protein) s podobnou substrátovou specificitou jako Mrp2. Část konjugovaného bilirubinu je transportována pomocí sinusoidálního Mrp3 (multidrug resistance protein 3, Abcc3) do sinusoidální krve, odkud je zpět vychytána polypeptidy transportujícími organické anionty (OATP), jejichž exprese je řízena jaterními nukleárními faktory (HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ ). Odlišnosti metabolismu bilirubinu v novorozeneckém období jsou znázorněny zeleně. U novorozenců jsou aktivita UGT1A1 a koncentrace UDPGA signifikantně sníženy a monoglucuronosyl bilirubin je majoritním konjugátem bilirubinu ve žluči (mono>di). Nekonjugovaný bilirubin může být při vysokých koncentracích transportován z hepatocytu pomocí Mrp1 (multidrug resistance protein 1, Abcc1). Kromě toho, nekonjugovaný bilirubin IX $\beta$  exkluzivně přítomný u novorozenců může být secernován do žluči bez potřeby konjugace. Zpracováno podle [86].*

#### **1.1.4.6 Střevní metabolismus bilirubinu**

Konjugovaný bilirubin se žlučí dostane až do tenkého a posléze tlustého střeva, kde dochází k jeho dekonjugaci mikrobiální beta-glukuronidasou na nekonjugovaný bilirubin, který je posléze redukován střevní mikroflórou na celou řadu hydroderivátů nazývaných urobilinoidy. K nejznámějším a nejvíce zastoupeným produktům redukce bilirubinu patří bezbarvý urobilinogen a sterkobilinogen, které se následnou oxidací  $\gamma$  methinového můstku stávají barevnými sloučeninami urobilinem a sterkobilinem [87].

Zatímco denní produkce urobilinoidů je u zdravého dospělého jedince cca 50-250  $\mu$ g/den (tedy 17-83 % produkce bilirubinu), v novorozeneckém období je díky absenci redukující střevní mikroflóry prakticky nulová. Tento fakt se považuje za významný aspekt při vzniku novorozenecké žloutenky [88, 89], neboť nekonjugovaný bilirubin se dostává enterohepatální cirkulací do krevního řečiště a podílí se tak na zvýšení hladin bilirubinu v plazmě [90].



#### ***1.1.4.7 Toxické účinky bilirubinu***

Bilirubin, vzhledem ke svým fyzikálně-chemickým vlastnostem, může pronikat hematoencefalickou bariérou a dostávat se tak do centrálního nervového systému. Ve vysokých koncentracích zde bilirubin působí neurotoxicky, což je závažným medicínským problémem zejména u těžké novorozenecké hyperbilirubinémie, která může vést ke klinicky manifestní akutní bilirubinové encefalopatii a jádrovému ikteru [91]. Toxické působení bilirubinu vykazuje buněčnou i regionální selektivitu, kdy nejnáchylnějším typem buněk jsou neurony a nejčastěji postiženými oblastmi bývají bazální ganglia a kochleární a okulomotorická jádra [92]. Mechanismy bilirubinové toxicity stále nejsou plně objasněny a jsou předmětem intenzivního výzkumu. Je zřejmé, že bilirubin se podílí v nezralých nervových buňkách novorozenců na zvýšeném oxidačním stresu, apoptóze, mitochondriální dysfunkci, stresu endoplazmatického retikula, poruše homeostázy kalcia a integrity plazmatické membrány a bioenergetické krizi [93-95]. Podrobnější výzkum si rovněž zaslouží role bilirubinu v myelogenezi a jeho vliv na reaktivitu astrocytů a mikroglíí [96].

#### ***1.1.4.8 Cytoprotektivní účinky bilirubinu***

Bilirubin byl dlouhou dobu považován za pouhou odpadní molekulu katabolismu hemu s potenciálně cytotoxickými účinky. Přestože se první zmínky o tom, že bilirubin může mít i antioxidační účinky, objevily již v padesátých letech minulého století [97], intenzivní výzkum na tomto poli odstartovala až práce Rolanda Stockera publikovaná v časopise Science v roce 1987 [10]. Od té doby řada prací potvrdila roli bilirubinu jako významného lipofilního antioxidantu, který velmi účinně vychytává volné radikály [98], snižuje produkci superoxidu inhibicí NADPH oxidázy [99], je schopen ochránit proteiny, mastné kyseliny i fosfolipidy před

peroxidací [100] a zabraňuje oxidaci LDL lipoproteinů s mnohonásobně větší účinností než analog vitamínu E [101]. Přestože je bilirubin přítomen v cirkulaci pouze v mikromolárních koncentracích, může být regenerován v tzv. biliverdin-bilirubinovém redoxním cyklu a tak významně ovlivňovat celkovou antioxidační kapacitu séra [102].

Existují také přesvědčivá experimentální data o tom, že bilirubin má významné protizánětlivé a imunomodulační účinky. Mechanismus protizánětlivého účinku bilirubinu spočívá zejména v jeho schopnosti potlačovat produkci některých prozánětlivých cytokinů (IL-2, TNF $\alpha$ , INF) a v translokaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B do jádra [103], interferenci s C1 složkou komplementu [104], snižování exprese adhezních molekul a blokování adheze leukocytů, transendotelové migrace monocytů nebo aktivace lymfocytů [105, 106]. Imunomodulační působení bilirubinu je připisováno jeho schopnosti inhibovat polyklonální aktivaci T-lymfocytů a vystavení MHC II molekul na antigen prezentujících buňkách [107], ovlivnit expresi Fc receptorů na makrofázích [108] a aktivovat regulační T lymfocyty (Treg) [109].

### ***1.1.5 Klinický význam produktů katabolické dráhy hemu***

Přestože existují experimentální důkazy o působení HMOX jako signální molekuly, většina protektivních účinků katabolické dráhy hemu je připisována tvorbě a intracelulární akumulaci jejích biologicky aktivních produktů, především CO a biliverdinu, respektive bilirubinu [55]. Studie na zvířecích modelech jednoznačně prokázaly pozitivní účinky nízkých koncentrací CO v terapii systémového zánětu, hyperoxického poškození plic a ischemicko-reperfúzního poškození různých orgánů, nicméně s humánními studii se začíná velmi opatrně, a to především díky potenciální toxicitě CO. Toxicita inhalovaného CO nezávisí pouze na dávce, ale také na době inhalace a může být velmi individuální [110]. První dvojitě slepá

randomizovaná studie se zdravými dobrovolníky, kteří inhalovali CO (500 ppm) a poté jim byl aplikován lipopolysacharid (2 ng/kg), neukázala žádný rozdíl mezi zánětlivými parametry v kontrolní (bez CO) a terapeutické (s CO) skupině [111]. Bathoorn a spol. ukázali, že pacienti s chronickou obstrukční plicní nemocí ve stabilizované fázi měli po inhalaci 100-125ppm CO nižší obsah eozinofilů ve sputu a sníženou reaktivitu dýchacích test měřenou metacholinovým testem [112]. Na první výsledky se čeká u studií zjišťujících vliv CO na plicní hypertenzi (NCT01523548), plicní fibrózu (NCT01214187), syndrom akutní respirační tísně (NCT02425579) či transplantaci Langerhansových ostrůvků (NCT02567240).

Na rozdíl od CO jsou protektivní účinky bilirubinu poměrně dobře dokumentovány v klinických studiích. Bylo prokázáno, že nízké hladiny bilirubinu jsou asociovány s vyšším výskytem onemocnění spojených s oxidačním stresem [113]. Metaanalýza jedenácti humánních studií zahrnující více než deset tisíc mužů prokázala negativní korelaci mezi sérovými hladinami bilirubinu a aterosklerózou. Jako riziková byla určena koncentrace bilirubinu v séru nižší než 10  $\mu\text{mol/l}$  a zároveň bylo zjištěno, že její nárůst o 1  $\mu\text{mol/l}$  snižoval riziko vzniku ischemické choroby srdeční o 6,5% [114]. Toto ovšem neplatí pro pacienty s jaterními chorobami, kde je naopak bilirubin považován za nepříznivý prognostický faktor progrese onemocnění a je proto také součástí řady skórovacích systémů v klinické hepatologii. Dalšími onemocněními, v jejichž patogenezi hraje roli oxidační stres a kde byla rovněž prokázána negativní korelace se systémovými koncentracemi bilirubinu, jsou například idiopatické střevní záněty [115], systémový lupus erythematosus (SLE) [116], revmatoidní artritida [117], obstrukční choroba bronchopulmonální [118], psoriáza [119], roztroušená skleróza [120] či preeklampsie [121].

Samostatnou kapitolou je role bilirubinu v regulaci nádorového bujení. Kromě antioxidačních mechanismů mohou do procesu karcinogeneze zasahovat antigenotoxické a antimutagenní účinky bilirubinu [122, 123]. Zucker a spol. [124] v rozsáhlé studii na americké populaci zjistili

negativní korelaci mezi sérovými koncentracemi bilirubinu a rizikem vzniku kolorektálního karcinomu. Podobné výsledky potvrdila studie z našeho pracoviště na české populaci [125]. Negativní asociace mezi sérovými koncentracemi bilirubinu a rizikem úmrtí na zhoubné nádorové onemocnění byla pozorována rovněž v belgické studii [126] a existují práce popisující protektivní roli bilirubinu u bronchogenního karcinomu [118] a rakoviny prsu [127].

### ***1.1.6 Potenciální terapeutické využití produktů katabolické dráhy hemu***

Velmi slibné výsledky z experimentálních i klinických studií vyvolávají logicky otázku, zda by nešlo využít produkty katabolické dráhy hemu k prevenci či terapii některých onemocnění. Problémem zůstává způsob podání potenciálních terapeutik. Inhalace CO naráží na jeho vysokou afinitu k hemoglobinu a toxicitu při vyšších koncentracích, u exogenně podaného bilirubinu je to jeho stabilita a biologická dostupnost. Snahou vědců je proto vyvinout takové molekuly, které by uvolňovaly CO přímo v cílových tkáních nebo v případě bilirubinu stimulovaly jeho produkci a zároveň inhibovaly jeho biotransformaci v játrech.

#### ***1.1.6.1 Molekuly uvolňující oxid uhelnatý***

Jak vyplývá z jeho struktury, CO je schopen poskytnout elektronový pár k vytvoření donor-akceptorové vazby. Pokud je akceptorem tohoto páru přechodný kov, vznikají sloučeniny nazývané karbonyly kovů, které se staly základem prvních molekul uvolňujících CO (CORM) [110]. Jádro molekuly CORM tvoří nejčastěji mangan, ruthenium nebo železo, které obklopuje několik karbonylových skupin jako koordinační ligandy. Podle mechanismu uvolnění CO rozdělujeme molekuly CORM do tří skupin. U první skupiny CORMs dojde k uvolnění CO po výměně za ligand obsažený v médiu, druhá skupina potřebuje k uvolnění CO

odpovídající externí nebo interní stimul a třetí reaguje na změny v buněčném prostředí, například pH nebo expresi enzymů [128, 129].

První CORM molekulou používanou v *in vitro* a *ex vivo* systémech byl lipofilní dekarbonyl manganatý  $[\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}]$  neboli CORM-1 [130]. Tato molekula byla schopna uvolnit CO po stimulaci světlem a pilotní experimenty na izolovaných potkaních srdcích prokazující vasodilatační potenciál CO naznačily, že použití CORM molekul v biologických systémech by mohlo být krokem správným směrem [131]. Následoval vývoj řady dalších molekul, které by byly schopny uvolnění CO jiným mechanismem než fotodisociací, byly rozpustné ve vodě a minimálně toxické. Molekulu CORM-2 na bázi ruthenia  $([\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ , která byla stále rozpustná pouze v organických rozpouštědlech a vyznačovala se rychlým uvolněním CO po rozpuštění v dimethylsulfoxidu, brzy nahradily ve vodě rozpustné CORM-3  $([\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinát})]$  s krátkým poločasem rozpadu ( $t_{1/2}=1$  min) [132] a molekule CORM-A1 s centrální molekulou boru  $(\text{Na}_2\text{H}_3\text{BCO}_2)$ , jejíž poločas je 21 min [133].

Hlavními kritérii, která je nutno splnit, aby byly molekuly plně využitelné v *in vivo* studiích, jsou možnost kontrolovat uvolnění CO, transport molekuly do cílových tkání a nízká toxicita, ev. absence potenciálně toxických kovů. Vývoj „nových“ molekul CORM se proto snaží nahradit centrální atom kovu jinými prvky, jako je tomu u boranokarbonátů [134] nebo systému „click and release“ [135], najít alternativní cesty aktivace CORM například pomocí enzymů (ET-CORM) [136] nebo zlepšit farmakokinetické vlastnosti využitím makromolekulárních nosičů a nanočástic [137, 138].

Samostatnou kapitolou je vývoj molekul uvolňujících CO po stimulaci zářením, tzv. foto-CORM. Uvolnění CO z molekuly fotoexcitací je alternativní aktivační strategií, která umožňuje kontrolu produkce CO v biologických systémech [139]. Molekuly foto-CORM založené na komplexech přechodných kovů nabízejí značnou variabilitu struktur i efektivitu uvolnění CO, bohužel jen málo z nich je schopno absorbovat biologicky neškodné viditelné

světlo [129]. Navíc řada z nich nespĺňuje kritéria chemické stability a minimální toxicity. Proto se pozornost výzkumných týmů obrátila k čistě organickým sloučeninám, které by tyto problémy překonaly. Některé organické molekuly, jako např. cyklopropenony [140] nebo 1,3-cyklobutandiony [141] uvolňují CO po excitaci světlem v UV oblasti (<420nm). Pouze několik organických molekul je schopno uvolnit CO po excitaci světlem ve viditelné oblasti, mezi kterými se nejslibnějšími zdají být sloučeniny mesokarboxy BODIPY [142].

#### ***1.1.6.2 Látky zvyšující systémové koncentrace bilirubinu***

Xenobiotik zvyšujících sérové hladiny bilirubinu existuje celá řada. Problémem je, že se většinou jedná o vedlejší projev hepatotoxicity daných látek. Ideální terapeutikum, které by se dalo použít v klinické praxi, nesmí být hepatotoxické a zároveň by mělo mít minimum nežádoucích účinků. Nekonjugovanou hyperbilirubinémií lze vyvolat buď aktivací HMOX, inhibicí konjugačního UGT1A1 nebo kompeticí s transportem bilirubinu do jaterní buňky. Aktivátorů HMOX je popsáno velké množství, od hemu a některých metaloporfyrinů [143] až po kyselinu acetylsalicylovou [144], diklofenak [145], statiny [146], kurkumin [147], resveratrol [148], aktivátory PPAR $\gamma$  [149], inhibitory COX-2 [150] a řadu dalších [151]. Mnohem potentnějšími léky zvyšujícími hladiny bilirubinu jsou látky interferující s enzymem UGT1A1, jako například dnes již nepoužívané urikosurikum probenecid [152] nebo virostatikum atazanavir [153]. Hyperbilirubinémie způsobená cyklosporinem A je zřejmě způsobena jeho kompeticí s potenciálním transportérem pro bilirubin, jaterním OATP1B1 [154]. Cyklosporin A však rovněž blokuje transpotér MRP2 na kanalikulární membráně hepatocytu, proto můžeme u pacientů na terapii tímto lékem najít i smíšenou či konjugovanou hyperbilirubinémií [155].

Je zcela zřejmé, že většinu těchto terapeutik nelze využít pro dlouhodobou a profylaktickou indukci hyperbilirubinémie, proto je pozornost vědců upřena k některým potravním doplňkům a rostlinným tetrapyrrolům, především chlorofylu, molekule strukturálně odvozené od hemu a fykobilinům sinic, bakterií a řas, které jsou podobně jako bilirubin lineárními tetrapyrroly s analogickými bioaktivními vlastnostmi [156-158].

## 2 OBECNÉ CÍLE

Cílem práce je charakterizovat patofyziologický význam katabolické dráhy hemu, především důsledky farmakologické regulace HMOX *in vivo* a *in vitro*, objasnit roli katabolické dráhy hemu v patogenezi jaterních onemocnění a zhodnotit úlohu produktů metabolismu hemu (bilirubinu a CO) v biologických systémech.



### 3 SPECIFICKÉ CÍLE

#### 3.1 Charakterizovat důsledky regulace exprese hemoxygenasy *in vivo* a *in vitro*

1. Zaměřit se na regulaci exprese HMOX1 pomocí inhibitorů HMG-CoA reductasy (statinů) a pokusit se objasnit, zda tento mechanismus nemůže alespoň z části vysvětlit antioxidační, vasoprotektivní a antiproliferativní účinky těchto široce používaných hypolipidemik.

Hsu M., **Muchová L.**, Morioka I., Wong RJ, Schröder H, Stevenson DK. Tissue-specific effects of statins on the expression of heme oxygenase-1 *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343(3):738-44 (2006).

**Muchová L.**, Wong RJ, Hsu M, Vitek L., Zelenka J, Schröder H, Stevenson DK. Statin treatment increases formation of carbon monoxide and bilirubin in mice: a novel mechanism of *in vivo* antioxidant protection. *Can J Physiol Pharmacol* 85(8):800-10 (2007).

Vitek L., **Muchová L.**, Žák A. Statin use and serum bilirubin levels. *Atherosclerosis* 219(2):969 (2011).

Váňová K., Boukalová Š., Gbelcová H., **Muchová L.**, Neužil J., Gurlich R., Ruml T., Vitek L. Heme oxygenase is not involved in the anti-proliferative effects of statins on pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* 16(309):1-11 (2016).

2. Charakterizovat mechanismus, kterým kyselina valproová snižuje expresi HMOX1.

Jez M., Ciesla M., Stepinewski J., Langrzyk A., **Muchová L.**, Vitek L., Jozkowicz A., Dulak J. Valproic acid downregulates heme oxygenase-1 independently of Nrf2 by increasing ubiquitination and proteasomal degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 485(1):160-166 (2017).

3. Objasnit vliv (GT)<sub>n</sub> mikrosatelitu proximálního promotoru *Hmox1* na expresi a cytoprotektivní účinky HMOX1.

Taha H., Skrzypek K., Guevara I., Nigisch A., Mustafa S., Grochot-Przeczek A., Ferdek P., Was H., Kotlinowski J., Kozakowska M., Balcerczyk A., **Muchová L.**, Vitek L., Weigel G., Dulak J., Jozkowicz A. Role of Heme Oxygenase-1 in Human Endothelial Cells: Lesson From the Promoter Allelic Variants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30 (8) 1634-1641 (2010).

4. Studovat roli exprese HMOX1 v karcinogenezi na modelu chemicky indukovaného dlaždicobuněčného karcinomu kůže.

Was H., Sokolowska M., Sierpinowska A., Dominik P., Skrzypek K., Lackowska B., Pratkanicki A., Grochot-Przeczek A., Taha H., Kotlinowski J., Kozakowska M., Mazan A., Nowak W., **Muchová L.**, Vitek L., Ratajska A., Dulak J., Jozkowicz A. Effects of heme oxygenase-1 on induction and development of chemically induced squamous cell carcinoma in mice. *Free Radic Biol Med* 51(9):1717-1726 (2011).

### 3.2 **Objasnit roli katabolické dráhy hemu v patogenezi jaterních onemocnění**

1. Studovat úlohu HMOX, bilirubinu a CO v různých experimentálních modelech

cholestázy

**Muchová L.**, Váňová K., Zelenka J., Leníček M., Petr T., Vejražka M., Sticová E., Vreman H.J., Wong R.J., Vitek L. Bile Acids Decrease Intracellular Bilirubin Levels in Cholestatic Liver: Implications for Bile Acid-Mediated Oxidative Stress. *J Cell Mol Med* 15(5):1156-1165 (2011).

**Muchová L.**, Váňová K., Šuk J., Mičuda S., Doleželová E., Fuksa L., Černý D., Farghali H., Zelenková M., Leníček M., Wong R.J., Vreman H.J., Vitek L. Protective effect of heme oxygenase induction in ethinylestradiol-induced cholestasis. *J Cell Mol Med*. 19(5):924-933 (2015).

Petr T., Šmíd V., Kučerová V., Váňová K., Leníček M., Vitek L., Šmíd F., **Muchová L.** The effect of heme oxygenase on ganglioside redistribution within hepatocytes in experimental estrogen-induced cholestasis. *Phys. Res.* 63(3):359-67 (2014).

Šmíd V., Petr T., Váňová K., Jašprová J., Šuk J., Vitek L., Šmíd F., **Muchová L.** Changes in Liver Ganglioside Metabolism in Obstructive Cholestasis- the Role of Oxidative Stress. *Folia Biol (Praha)*. 62(4): 148-159 (2016).

Váňová K., Šuk J., Petr T., Černý D., Slanař O., Vreman H.J., Wong R.J., Zima T., Vitek L., **Muchová L.** Protective effects of inhaled carbon monoxide in endotoxin-induced cholestasis is dependent on its kinetics. *Biochimie*. 97:173-80 (2014).

2. Objasnit vztah mezi katabolickou dráhou hemu a hepatoprotektivními účinky

kurkuminu.

Černý D., Lekić N., Váňová K., **Muchová L.**, Hořínek A., Kmoníčková E., Zídek Z., Kameníková L., Farghali H. Hepatoprotective effect of curcumin in lipopolysaccharide/D-galactosamine model of liver injury in rats: Relationship to HO-1/CO antioxidant system. *Fitoterapia* 82:786-791 (2011).

### 3.3 **Zhodnotit úlohu produktů katabolické dráhy hemu (bilirubinu a oxidu uhelnatého)**

**v biologických systémech**

1. Zaměřit se na metabolismus bilirubinu a jeho význam jako antioxidantní, protizánětlivé a organoprotektivní molekuly.

Zelenka J., Leníček M., **Muchová L.**, Jirsa M., Kudla M., Balaž P., Zadinová M, Ostrow J.D., Wong R.J., Vítek L. Highly sensitive method for quantitative determination of bilirubin in biological fluid and tissues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 867: 37-42 (2008).

Zelenka J., **Muchová L.**, Zelenková M., Váňová K., Vreman H.J., Wong R.J., Vítek L. Intracellular accumulation of bilirubin as a defense mechanism against increased oxidative stress. *Biochimie* 94:1821-1827 (2012).

Vítek L., Kráslová I., **Muchová L.**, Novotný L., Yamaguchi T. Urinary excretion of oxidative metabolites of bilirubin in subjects with Gilbert syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 22(6):841-5 (2007).

Vítek L., **Muchová L.**, Jančová E., Pešičková S., Tegzová D., Peterová V., Pavelka K., Tesař V. Association of systemic lupus erythematosus with low serum bilirubin levels. *Scand J Rheumatol* 39(6): 480-4 (2010).

Vítek L., Majer F., **Muchová L.**, Zelenka J., Jirásková A., Branný P., Malina J., Ubík K. Identification of bilirubin reduction products formed by *Clostridium perfringens* isolated from human neonatal fecal flora. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 833 (2):149-57 (2006).

Vítek L., **Muchová L.**, Zelenka J., Zadinová M, Malina J. The effect of zinc salts on serum bilirubin levels in hyperbilirubinemic rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 40(2):135-40 (2005).

## 2. Popsat biologické účinky jedlých řas jako možných zdrojů tetrapyrrolických sloučenin podobných bilirubinu.

Stráský Z., Zemánková L., Němečková I., Rathouská J., Wong R.J., **Muchová L.**, Subhanová I., Vaníková J., Váňová K., Vítek L., Nachtigal P. *Spirulina platensis* and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: a possible implication for atherogenesis. *Food Funct.* 4(11):1586-94 (2013).

Koníčková R., Vaňková K., Vaníková J., Váňová K., **Muchová L.**, Subhanová I., Zadinová M., Zelenka J., Dvořák A., Kolář M., Strnad H., Rimpelová S., Ruml T., Wong R.J., Vítek L. Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. *Ann Hepatol.* 13(2):273-83 (2014).

## 3. Zkoumat produkci, tkáňovou distribuci a biologické účinky oxidu uhelnatého.

Vítek L., Gbelcová H., **Muchová L.**, Váňová K., Zelenka J., Koníčková R., Šuk J., Zadinová M., Knejzlík Z., Ahmad S., Fujisawa T., Ahmed A., Ruml T. Antiproliferative effects of carbon monoxide on pancreatic cancer. *Dig Liver Dis.* 46(4):369-75 (2014).

Váňová K., Šuk J., Petr T., Černý D., Slanař O., Vreman H. J., Wong R. J., Zima T., Vítek L., **Muchová L.** Protective effects of inhaled carbon monoxide in endotoxin-induced cholestasis is dependent on its kinetics. *Biochimie.* 97:173-80 (2014).

Palao E., Slanina T., **Muchová L.**, Šolomek T., Vítek L., Klán P. Transition-Metal-Free CO-Releasing BODIPY Derivatives Activatable by Visible to NIR Light as Promising Bioactive Molecules. *J Am Chem Soc.* 138(1):126-33 (2016).

## 4 KOMENTÁŘE A DISKUSE

### 4.1 *Důsledky regulace exprese hemoxygenasy in vivo a in vitro*

#### 4.1.1 *Regulace exprese hemoxygenasy pomocí statinů*

Mezi řadu induktorů HMOX1 patří i široce používaná hypolipidemika statiny. Indukční efekt statinů byl však pozorován pouze na tkáňových kulturách a po jednorázové nebo nefyziologicky vysoké dávce statinu [146, 159, 160]. V naší studii na myším modelu jsme zjistili, že dlouhodobé podávání statinů indukuje HMOX1 *in vivo*, přičemž míra indukce je specifická jak pro jednotlivé tkáně, tak pro individuální statiny [161]. Podávání těchto terapeutik v klinicky relevantních dávkách je rovněž spojeno s mírným nárůstem tkáňových i systémových koncentrací bilirubinu a CO a tento efekt je doprovázen zvýšením antioxidační kapacity [162]. Indukce HMOX1 tak může být zodpovědná za pleiotropní (antioxidační, protizánětlivé a organoprotektivní) účinky statinů, které přímo nesouvisí s jejich hypolipidemickým účinkem.

V návaznosti na výše zmíněné *in vitro* a *in vivo* studie se nabízí otázka, zda rovněž pacienti dlouhodobě léčení statiny vykazují nárůst koncentrace bilirubinu a antioxidační kapacity. Ong a spol. [163] pozorovali u pacientů léčených statiny naopak nižší systémové hladiny bilirubinu ve srovnání se zdravými kontrolami, nicméně nevzali v úvahu hladiny bilirubinu před zahájením léčby, které u pacientů s diabetem a kardiovaskulárními onemocněními bývají vzhledem k vysoké míře oxidačního stresu signifikantně nižší [114, 164]. V naší pilotní studii na terapeuticky naivních hypercholesterolemických pacientech bez diabetu nebo kardiovaskulárního onemocnění jsme pozorovali mírný, avšak statisticky nevýznamný nárůst sérových hladin bilirubinu po léčbě atorvastatinem nebo simvastatinem (54 pacientů, sérový bilirubin  $10,58 \pm 3,6$  vs.  $11,06 \pm 4,2$   $\mu\text{mol/l}$ ) [165]. Vzápětí však byla publikována studie na 514 pacientech, kde byla po terapii simvastatinem popsána signifikantní elevace bilirubinu o 7% z

10,0 na 10,8  $\mu\text{mol/l}$  [166]. Přestože se jedná o zdánlivě malý nárůst, může mít významný klinický dopad, neboť zvýšení bilirubinu o 1  $\mu\text{mol/l}$  je asociováno se snížením rizika aterosklerózy o 6% [114].

Dalším z pleiotropních účinků statinů je jejich antiproliferační působení na některé nádorové buněčné linie, například buňky kolorektálního karcinomu [167], karcinomu plic [168] a pankreatu [169]. Hlavním mechanismem je deplece intermediátů cholesterolové biosyntézy a následná porucha prenylace klíčových proteinů signálních drah regulujících buněčnou proliferaci [170, 171]. Na rozdíl od statinů zůstává role HMOX v nádorové proliferaci kontroverzní. Zvýšená exprese HMOX1 u karcinomu pankreatu byla negativně asociována s odpovědí na terapii [172] a zvyšovala agresivitu a invazivitu tumoru [173], na druhé straně v naší studii měl CO, jeden z produktů HMOX reakce, jednoznačně antikancerogenní účinky [174]. Proto jsme se snažili odpovědět na otázku, zda antiproliferační účinky statinů nemohou alespoň částečně být zprostředkovány aktivací HMOX dráhy. V experimentech na několika liniích karcinomu pankreatu jsme zjistili, že statiny s výjimkou pravastatinu mají významné antiproliferační účinky, nicméně v těchto buněčných kulturách nebyly schopny zvyšovat aktivitu ani expresi HMOX a jejich protinádorové účinky nijak nezávisely na HMOX [175].

#### **4.1.2 Regulace exprese hemoxygenasy pomocí kyseliny valproové**

Zatímco aktivátorů HMOX1 existuje celá řada, mnohem méně látek je schopných inhibovat aktivitu tohoto enzymu. Ve studii provedené ve spolupráci s Jagellonskou univerzitou v Krakově jsme zjistili, že mezi inhibitory HMOX1 patří široce používané antiepileptikum kyselina valproová. Kyselina valproová snižuje expresi *HMOX1* prostřednictvím aktivace ubikvitin-proteazomového systému ovlivňujícího stabilitu HMOX1 proteinu. V tomto

mechanismu nehraje roli transkripční faktor Nrf2, který klasicky aktivuje HMOX1 prostřednictvím vazby na ARE sekvenci promotoru. Kyselina valproová snižovala expresi Bach1 proteinu fungujícího jako represor pro Nrf2 a kromě toho byla exprese a aktivita Hmox1 snížena po expozici kyselině valproové i ve tkáních a buňkách izolovaných z Nrf2 deficientních myší [176].

#### **4.1.3 Vliv (GT)<sub>n</sub> mikrosatelitu proximálního promotoru na expresi a cytoprotektivní účinky HMOX1**

(GT)<sub>n</sub> mikrosatelit v proximálním promotoru *HMOX1* obsahuje dinukleotidové repetic, jejichž množství se pohybuje mezi 11 a 42 a délka promotoru negativně koreluje s úrovní transkripce *HMOX1* [28, 44, 149]. I když velké studie nepotvrdily roli tohoto polymorfismu u ischemické choroby srdeční a akutního infarktu myokardu [177], existují klinická data, která ukazují, že by mohl hrát roli v rozvoji kardiovaskulárních komplikací u některých skupin pacientů. Výskyt dlouhé varianty (nad 29 GT repetic) byl spojen se zvýšeným rizikem selhání arteriovenózní fistule u hemodialyzovaných pacientů [178], vyšší incidencí ischemické choroby srdeční u pacientů s diabetem typu 2 [44], zvýšeným počtem restenóz po balónkové angioplastice [179], častějším výskytem aortálního aneuryzmatu [180] a cerebrovaskulárních příhod [181]. Vzhledem k těmto kontroverzním klinickým datům jsme se rozhodli objasnit, zda se protektivní účinky HMOX1 mohou lišit v závislosti na (GT)<sub>n</sub> polymorfismu. V experimentech na primárních endoteliálních buňkách jsme potvrdili, že počet GT repetic ovlivňuje expresi a aktivitu HMOX1. Kromě toho, buňky s „kratší“ variantou promotoru lépe přežívaly po expozici oxidačnímu stresu, efektivněji proliferovaly po stimulaci VEGF-A a produkovaly méně prozánětlivých mediátorů. Tyto experimenty tedy potvrdily cytoprotektivní,

promitogenní a protizánětlivou roli HMOX1 v endotelu a naznačily, že v lidské populaci s různou délkou (GT)<sub>n</sub> mikrosatelitu se mohou účinky HMOX1 lišit [182].

#### ***4.1.4 Exprese HMOX1 u modelu chemicky indukovaného dlaždicobuněčného karcinomu kůže***

Jak již bylo zmíněno výše (4.1.1.), role HMOX1 v karcinogenezi zůstává nevyřešena. Exprese HMOX1 může být přímo indukovaná některými onkogeny [183], bývá vyšší v nádorové než v okolní zdravé tkáni a může chránit nádorovou buňku před účinkem chemoterapeutik [184], ovlivňovat angiogenezi [185], buněčný cyklus [186] a proliferaci [184]. Úloha HMOX1 v karcinogenezi však bude zřejmě buněčně specifická a zatímco u některých typů nádorů podporuje indukce HMOX1 buněčnou proliferaci [184, 187], u jiných tumorů je tento efekt zcela opačný [188].

Ve studii na modelu chemicky indukovaného dlaždicobuněčného karcinomu kůže jsme se u myší úplně nebo částečně deficientních pro hemoxygenasu 1 (Hmox1<sup>-/-</sup> a Hmox1<sup>-/+</sup>) a kontrolních s normální expresí hemoxygenasy (Hmox1<sup>+/+</sup>) sledovali vývoj, progresi a malignitu tumoru. Zjistili jsme, že myši Hmox1<sup>-/-</sup> a Hmox1<sup>-/+</sup> s deficitem Hmox1 vyvinuly mnohem dříve a významně větší nádorové léze, nicméně se jednalo o benigní papilomy. Naproti tomu, kontrolní zvířata vyvinula nádory později a menšího rozsahu, histologicky se ovšem jednalo o maligní karcinomy. Hmox1 tedy byla schopna oddálit ve zdravé kůži vznik tumoru, ale pokud vznikl, urychlila jeho klonální proliferaci [189].

## **4.2 Katabolické dráha hemu v patogenezi jaterních onemocnění**

### **4.2.1 Role hemoxygenasy a jejích biologicky aktivních produktů v cholestáze**

Cholestáza je patologický stav definovaný jako neschopnost tvořit nebo secernovat žluč z jater do duodena spojený s nahromaděním složek žluči, například bilirubinu nebo žlučových kyselin, v krvi [190]. Současná akumulace žlučových kyselin v hepatocytech je považována za hlavní příčinu cholestatického poškození jater [191], dochází k buněčné apoptóze a nekróze [192], aktivaci fibrogenních a zánětlivých signálních drah [193], strukturálnímu a funkčnímu poškození membrán hepatocytu [194] a zvýšenému oxidačnímu stresu [195].

HMOX je exprimována v jaterní tkáni se zcela specifickou topografií. Zatímco inducibilní HMOX1 je lokalizována převážně v Kupfferových buňkách, konstitutivní HMOX2 se nachází hlavně v hepatocytech [196]. CO produkovaný HMOX se podílí na relaxaci jaterních sinusoidálních kapilár [58], udržení krevního průtoku v játrech [57], kontraktilitě žlučovodů [64] a sekreci žluči [65], zatímco bilirubin působí jako velmi účinný antioxidant [102].

Na modelu obstrukční cholestázy u potkanů jsme se pokusili objasnit protichůdnou roli vysokých koncentrací prooxidačních žlučových kyselin a antioxidantního bilirubinu v patogenezi tohoto onemocnění. Prokázali jsme, že žlučové kyseliny způsobují zvýšenou lipoperoxidaci v cholestatické jaterní tkáni. Na druhé straně, bilirubin skutečně působí jako silný antioxidant a je zodpovědný za zvýšenou antioxidantní kapacitu v plazmě cholestatických zvířat. Zajímavým zjištěním je, že žlučové kyseliny jsou schopny inhibovat Hmox1 a snižovat intracelulární hladiny bilirubinu v játrech. Stupeň jaterního poškození u cholestázy pak závisí na poměru žlučových kyselin a bilirubinu [197].

Abychom zjistili, zda indukce Hmox1 může mít skutečně anticholestatický účinek, zvolili jsme model intrahepatální cholestázy u potkanů vyvolané 17- $\alpha$  ethynylestradiolem. Jedná se o model estrogeny indukované cholestázy u člověka, která se může rozvinout u



predisponovaných žen v těhotenství, během hormonální substituční terapie nebo po užívání antikoncepce [198, 199]. Indukce Hmox1 jejím substrátem hemem zvýšila expresi některých jaterních membránových transportérů a zvyšovala tok žluči u cholestatických zvířat. Kromě toho hem zvyšoval expresi bazolaterálního transportéru Mrp3 v hepatocytech mechanismem závislým na transkripčním faktoru Nrf2. Konjugované žlučové kyseliny, které byly prostřednictvím tohoto přenašeče transportovány do krevního řečiště, byly efektivně odstraněny ledvinami, což vedlo k normalizaci plazmatických hladin žlučových kyselin. Zdá se tedy, že indukce Hmox1 by mohla být potenciální terapeutickou strategií v terapii tohoto typu cholestázy [200].

Specifickou úlohu v cholestatických onemocněních hrají gangliosidy. Jedná se o glykosfingolipidy složené z lipofilní ceramidové a hydrofilní sacharidové části, která obsahuje kyselinu sialovou. Gangliosidy se vyskytují ve vnější vrstvě plazmatické membrány, kde mají funkci jak signální, tak se podílejí na rigiditě a odolnosti buňky [201, 202]. Při cholestáze dochází v játrech ke zvýšení biosyntézy gangliosidů, především b-větve obsahující více molekul kyseliny sialové, a jejich přesunu z cytoplazmy do membrán hepatocytů. [203, 204]. Gangliosidy jsou, díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem, schopny chránit buňky před detergentními účinky žlučových kyselin, a to především tvorbou mechanicky a chemicky odolných rigidních domén [205]. V experimentu na potkanech s cholestázou indukovanou estrogeny jsme pozorovali, že syntéza a distribuce gangliosidů se rovněž mění s úrovní oxidačního stresu. Pokud jsme aktivovali u experimentálních zvířat Hmox1, syntéza a distribuce gangliosidů se vrátila ke kontrolním hodnotám [206]. Rovněž jsme zjistili, že i obstrukční cholestáza je doprovázena zvýšením syntézy jaterních gangliosidů a jejich akumulací v membránách hepatocytů. Zatímco inhibice Hmox dále prohloubila tyto změny, aktivace tohoto enzymu měla opačný účinek. Tato pozorování dále potvrzují důležitou úlohu oxidačního stresu v metabolismu jaterních gangliosidů [207].

Dalším cholestatickým modelem je cholestáza vyvolaná endotoxinem (lipopolysacharidem), která patří k závažným komplikacím sepse. Protože existují literární data, která poukazují na úlohu CO při regulaci toku žluči a jaterní perfuse (viz výše), rozhodli jsme se studovat, zda inhalační podání CO se může podílet na ochraně před cholestatickým jaterním poškozením. Prokázali jsme, že expozice 250 ppm CO před podáním lipopolysacharidu významně snížila sérové markery cholestázy (ALP, žlučové kyseliny) a hepatocelulárního poškození (AST). Rovněž jsme pozorovali zvýšenou expresi mRNA protizánětlivého IL-10, snížení prozánětlivého TNF- $\alpha$  a modulaci exprese klíčových jaterních transportérů, vysvětlující anticholestatický účinek CO [66].

#### ***4.2.2 Vztah mezi katabolickou dráhou hemu a hepatoprotektivními účinky kurkuminu***

Další látkou, jejíž hepatoprotektivní účinky by mohly být zprostředkovány katabolickou dráhou hemu, je polyfenol kurkumin. Kurkumin je induktor Hmox1 s antioxidačními, protizánětlivými a cytoprotektivními účinky, který je považován za hepatoprotektant s antifibrotickým působením [208-211]. Na modelu reverzibilního jaterního selhání vyvolaného lipopolysacharidem v kombinaci s D- galaktosaminem (DG+LPS) u potkanů kmene Wistar jsme testovali, zda kurkumin může chránit játra před fulminantním jaterním selháním a rovněž jsme sledovali roli Hmox a bilirubinu. Zjistili jsme, že aplikace kurkuminu vedla k signifikantnímu poklesu aktivity sérových aminotransferas ALT a AST a zároveň nárůstu sérových hladin bilirubinu současně s aktivací Hmox1 u DG+LPS zvířat. Rovněž vysoká úroveň lipoperoxidace, aktivace NOS-2 a produkce nitrátů u jaterního selhání byla významně snížena po aplikaci kurkuminu. Hepatoprotektivní působení kurkuminu v tomto modelu bylo tedy spojeno s modulací dráhy Hmox/NO [212].

### **4.3 Úloha produktů katabolické dráhy hemu (bilirubinu a CO) v biologických systémech**

#### **4.3.1 Metabolismus bilirubinu a jeho význam jako antioxidantní, protizánětlivé a organoprotektivní molekuly**

Bilirubin produkovaný během katabolismu hemu prostřednictvím enzymů Hmox a biliverdinreduktasy působí jako významný antioxidant a cytoprotektant ve fyziologických nebo mírně zvýšených koncentracích, zatímco jeho vysoké koncentrace mohou být neurotoxické. Studium bilirubinu za fyziologických podmínek je velmi obtížné kvůli citlivosti této molekuly na světlo a kyslík, rychlé degradaci v alkalickém i kyselém prostředí, vysoké afinitě k proteinům a nízkým koncentracím ve tkáních. Proto jsme vyvinuli velmi citlivou HPLC metodu pro kvantifikaci nekonjugovaného bilirubinu v biologických tkáních, tekutinách a buněčných kulturách, která se stala základem pro další biologické studie metabolismu bilirubinu [213].

V další studii jsme se zabývali metabolismem bilirubinu v buňkách a tkáních během oxidačního stresu. Zjistili jsme, že indukce Hmox1 nebo systémová hyperbilirubinémie vede k akumulaci bilirubinu ve tkáních, která vyvažuje konzumpci bilirubinu během oxidačního stresu a chrání tkáňové a buněčné lipidy před peroxidací [214].

Během oxidačního stresu dochází mimo jiné ke vzniku biopyrinů, diazo negativních oxidačních produktů metabolismu bilirubinu vylučovaných do moči [215]. Tyto tripyrrolické struktury mohou sloužit jako markery oxidačního stresu ve zvířecích i humánních studiích [216-218]. V naší práci jsme objasnili vztah mezi hladinami sérového bilirubinu a exkrecí biopyrinů do moči u jedinců s benigní hyperbilirubinemií, tzv. Gilbertovým syndromem, a normobilirubinemickými dárce krve. Pozorovali jsme negativní korelaci mezi vylučováním biopyrinů do moči a hladinou sérového bilirubinu díky antioxidantním účinkům mírné hyperbilirubinémie u pacientů s Gilbertovým syndromem [219].

Koncentrace sérového bilirubinu pozitivně koreluje s celkovou antioxidační kapacitou séra u novorozenců s novorozeneckou žloutenkou [220] i dospělých pacientů s Gilbertovým syndromem [221, 222]. Kromě toho je bilirubin považován za silný negativní prediktor onemocnění spojených s oxidačním stresem, jako jsou ateroskleróza [221] nebo některá neuropsychiatrická onemocnění [223]. Mezi choroby, jejichž patogeneze je úzce spojena s oxidačním stresem, patří i autoimunitní SLE. Díky multiorgánovému postižení a systémovému zánětu je SLE spojen s vysokým rizikem rozvoje aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění [224]. Na souboru 259 pacientů se SLE jsme zjišťovali vztah mezi sérovými hladinami bilirubinu a manifestací symptomů SLE. Ve srovnání s kontrolami měli pacienti se SLE významně nižší hladiny sérového bilirubinu, bilirubin byl rovněž negativně asociován s aktivitou a rozsahem onemocnění. Pokles o 1  $\mu\text{mol/l}$  sérového bilirubinu znamenal 37% nárůst pravděpodobnosti diagnózy SLE. Kromě toho byla pravděpodobnost diagnózy nekonjugované hyperbilirubinémie čtyřikrát nižší u SLE pacientů než u zdravých kontrol. Nejpravděpodobnější vysvětlení pro tyto nálezy je konsumpce bilirubinu způsobená vysokým oxidačním stresem, který doprovází SLE. Pacienti s vyššími systémovými koncentracemi bilirubinu, například ti s Gilbertovým syndromem, mohou být chráněni před rozvojem SLE [116].

Neméně zajímavá je problematika střevního metabolismu bilirubinu, který se podílí na homeostáze sérového bilirubinu. Pokud chybí ve střevě bakterie redukující bilirubin, jako například v časném novorozeneckém období nebo po léčbě širokospektrými antibiotiky, nekonjugovaný bilirubin prochází enterohepatální cirkulací [88]. Samotná redukce bilirubinu střevními bakteriemi je poměrně komplexní a málo prozkoumaný proces [87]. Zabývali jsme se proto detailní analýzou bakteriální redukce bilirubinu novým kmenem *Clostridium perfringens* izolovaným ze stolice novorozenců. Izolovali jsme velké množství redukovaných žlučových pigmentů a zjistili jsme, že střevní anaerobní organismy redukují široké spektrum

různých žlučových pigmentů, což ukazuje na význam těchto enzymatických procesů pro homeostázu intestinálních mikroorganismů. *C. perfringens* redukovalo přednostně nekonjugovaný bilirubin, ale pouze na úroveň urobilinogenu. Rovněž jsme prokázali, že redukci na urobilinoidy musí předcházet hydrolýza konjugátů bilirubinu [225].

Ovlivnění střevního metabolismu bilirubinu a zablokování jeho enterohepatální cirkulace pak může být účinným terapeutickým přístupem u pacientů s Criglerovým- Najjarovým syndromem nebo novorozeneckou hyperbilirubinemií [88]. Přestože byla vyzkoušena řada látek vázajících bilirubin, například aktivní uhlí, agar, cholestyramin, kalcium fosfát nebo inhibitory  $\beta$ -glukuronidasy, jako například hydrolyzát kaseinu, žádný z nich nebyl akceptován jako terapeutikum, především kvůli inkonzistentním hypobilirubinemickým účinkům a častým nežádoucím účinkům [226-229]. V naší práci jsme studovali hyperbilirubinemický efekt zinečnatých solí, především rozpustného sulfátu a nerozpustného metakrylátu, na modelu kongenitálně hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn a potkanů kmene Wistar s uměle navozenou hyperbilirubinemií. Zjistili jsme, že zinečnaté soli významně ovlivňují enterohepatální cirkulaci bilirubinu, snižují sérové hladiny bilirubinu u experimentálních zvířat a zároveň snižují biliární sekreci bilirubinu. Kromě toho, terapie nerozpustným metakrylátem zinečnatým nevedla k elevaci sérových hladin zinku. Tento přístup by mohl být slibnou terapeutickou alternativou v léčbě těžkých nekonjugovaných hyperbilirubinemií [230].

#### **4.3.2 Biologické účinky tetrapyrrolických sloučenin podobných bilirubinu z jedlých řas**

*Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*), je sladkovodní modrozelená řasa patřící mezi cyanobakterie. Je bohatá na bioaktivní substance, u kterých byly prokázány hypocholesterolemické, antioxidační a protizánětlivé účinky. Mezi tyto bioaktivní substance patří i fykobiliny, tetrapyrrolické látky strukturálně podobné bilirubinu. V experimentech jsme

se snažili ověřit hypotézu, že ateroprotektivní a protinádorové účinky produktů katabolické dráhy hemu mohou být napodobeny rovněž terapyrrolickými sloučeninami těchto řas. Jak extrakt ze *S. platensis*, tak fykocyanobilin signifikantně zvyšovaly expresi Hmox1 *in vitro* v endotelových buňkách i *in vivo* v ateromových plátech Apo-E deficientních myší a snižovaly markery oxidačního stresu a endoteliální dysfunkce [231]. Obě látky rovněž snižovaly proliferaci buněčné linie lidského karcinomu pankreatu PA-TU-8902 a rovněž významně inhibovaly růst nádoru u athymických nu/nu myší xenotransplantovaných PA-TU-8902 [232]. Popsané mechanismy se tak mohou významně podílet na ateroprotektivních a protinádorových účincích jedlých řas.

#### **4.3.3 Produkce, tkáňová distribuce a biologické účinky oxidu uhelnatého**

Oxid uhelnatý jako další z biologicky aktivních produktů katabolické dráhy hemu je významná endogenní signální molekula hrající důležitou roli především v regulaci zánětu, buněčné proliferace a cytoprotekce [233-235]. Z tohoto důvodu je považován za molekulu s výrazným terapeutickým potenciálem. Velká nevýhoda CO však tkví v jeho toxicitě při vyšších koncentracích. Aby bylo možné zaručit bezpečnost a efektivitu léčby během inhalace CO, je nutné monitorovat nejen hladiny karboxylhemoglobinu, ale také zajistit optimální koncentrace CO v cílových tkáních. Proto jsme se v naší práci detailně zabývali studiem kinetiky inhalovaného CO ve tkáních laboratorního potkana. Kromě distribuce CO jsme změřili eliminační profily pro jednotlivé orgány a kinetické parametry CO pro potkana. Zjistili jsme, že jak koncentrace, tak eliminační poločas CO jsou tkáňově závislé. Tento fakt by měl být brán v potaz při plánování frekvence podávání, délky expozice a způsobu aplikace CO v *in vivo* studiích [66].

Znalosti z kinetiky jsme pak využili při studiu biologických účinků CO. Kromě anticholestatických (viz kapitola 4.2.1.) jsme prokázali i antiproliferační účinky CO na *in vitro* a *in vivo* modelu karcinomu pankreatu. Jak inhalační, tak intraperitoneální aplikace CO ve formě CORM-2 molekuly signifikantně inhibovaly růst pankreatických tumorů xenotransplantovaných athymickým myším [174].

Slibné výsledky *in vivo* studií nás přivedly na myšlenku vyvinout takovou molekulu CORM, která by neobsahovala přechodný kov, byla by minimálně toxická a uvolňování CO by nebylo jednorázové, ale kontinuální a dalo by se do určité míry řídit. Toho se nám podařilo dosáhnout ve spolupráci se skupinou prof. Klána z Masarykovy univerzity v Brně. Molekulu s centrálním atomem boru založenou na BODIPY chromoforech je možno aktivovat viditelným až infračerveným světlem *in vitro* i *in vivo*. Míra uvolňování CO pak závisí na intenzitě záření, ve tmě k produkci CO nedochází [142].

## 5 ZÁVĚR

Od roku 1968, kdy byl v laboratoři R. Schmida objeven enzym HMOX, došlo k obrovskému rozvoji poznatků o katabolické dráze hemu. Již ji nepovažujeme za pouhý detoxifikační metabolický proces, kterým je nutno z těla odstranit potenciálně toxické degradační produkty, ale rovněž za zdroj biologicky aktivních molekul s širokou škálou patofyziologických účinků.

V souvislosti s antioxidačními, imunomodulačními a organoprotektivními účinky bilirubinu stejně tak jako antiproliferačními, protizánětlivými a signalizačními funkcemi CO se nabízí řada možností, jak katabolickou dráhu hemu terapeuticky využít. Předtím je ovšem nutné přesně definovat tenkou hranici mezi toxickými a protektivními účinky těchto látek a rozumět mechanismům jejich působení v organismu.

V našem výzkumu se nám podařilo prokázat, že účinky některých léků (např. statinů, kyseliny valproové) mohou být částečně vysvětleny ovlivněním katabolické dráhy hemu, zkoumali jsme roli bilirubinu a oxidu uhelnatého u některých typů nádorů, věnovali jsme se hepatoprotektivním účinkům HMOX při cholestáze, zaměřili jsme se na metabolismus bilirubinu v buňkách a tkáních během oxidačního stresu a detailně jsme popsali distribuci CO v organismu.

Velmi zajímavé bude sledovat vývoj nových molekul, které jsou schopny uvolňovat CO, stimulovat aktivitu HMOX nebo selektivně zvyšovat koncentrace sérového bilirubinu a jejich zavádění do klinické praxe. Rovněž jsou potřeba další klinické studie, které by jednoznačně definovaly roli katabolické dráhy hemu v patogenezi jak chronických, tak akutních patologických stavů.



## 6 SEZNAM ZKRATEK

|                     |   |
|---------------------|---|
| AhR                 | arylový uhlovodíkový nukleární receptor             |
| ALP                 | alkalická fosfatasa                                 |
| ALT                 | alanin aminotransferasa                             |
| AST                 | aspartát aminotransferasa                           |
| CAR                 | konstitutivní androstanový receptor                 |
| CO                  | oxid uhelnatý                                       |
| CORM                | molekula uvolňující oxid uhelnatý                   |
| COX-2               | cyklooxygenasa 2                                    |
| DG                  | D- galaktosamin                                     |
| Egr-1               | protein časně růstové odpovědi 1                    |
| ERK1/2              | proteinkinasa 1/2 regulující extracelulární signály |
| FABP1               | faktor vázající mastné kyseliny                     |
| sGC                 | solubilní guanylát cyklasa                          |
| GTP                 | guanosin trifosfát                                  |
| cGMP                | cyklický guanosin monofosfát                        |
| HMOX                | hemoxygenasa  |
| HNF                 | hepatální nukleární faktor                          |
| HSF-1               | protein 1- faktor teplotního šoku                   |
| IL                  | interleukin   |
| INF                 | interferon  |
| JNK                 | c-Jun N-terminální kinasy                           |
| K <sub>Ca</sub> /BK | draslíkové kanály aktivované kalciovými ionty       |
| LPS                 | lipopolysacharid                                    |
| LXR                 | jaterní X receptor                                  |

|       |  |
|-------|--|
| MAPK  | mitogeny aktivované proteinkinasy                              |
| MHC   | hlavní histokompatibilní komplex                               |
| Mrp   | transportér multilékové rezistence                             |
| NADPH | nikotinamid adenin dinukleotid fosfát                          |
| NFκB  | nukleární faktor κB  |
| NRF2  | nukleární faktor (nuclear factor erythroid-2 related factor 2) |
| NO    | oxid dusnatý   |
| NOS   | syntasa oxidu dusnatého  |
| OATP  | polypeptidový transportér organických aniontů                  |
| PAI-1 | aktivátor inhibitoru plasminogenu 1                            |
| PKG   | proteinkinasa G  |
| PPARγ | receptory aktivované peroxizómovými proliferátory              |
| PXR   | pregnanový X receptor  |
| ROS   | reaktivní formy kyslíku  |
| TNF-α | tumor nekrotizující faktor α                                   |
| SLE   | systemový lupus erytematodes                                   |
| UDPGA | kyselina uridin difosfát glukuronová                           |
| UGT1  | uridin difosfát glukuronosytransferasa                         |

## 7 LITERATURA

1. Menghini, V.A., *De ferrearum particularum sede in sanguine*. Bonon Sci Art Inst Acad Comment, 1746. **2**(2): p. 244-246.
2. Hünefeld, F.L., *Der Chemismus in der thierischen Organization*. Leipzig: Brockhaus, 1840: p. 158-163.
3. Scherer, J.J.v., *Chemische-physiologische untersuchungen*. Ann Chem Phar 1841. **40**: p. 1-64.
4. Fischer, H., *On haemin and the relationships between haemin and chlorophyll*. Nobel lecture, 1930.
5. Mense, S.M. and L. Zhang, *Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases*. Cell Res, 2006. **16**(8): p. 681-92.
6. Chiabrando, D., et al., *Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes*. Front Pharmacol. **5**: p. 61.
7. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, *The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **61**(2): p. 748-55.
8. Tenhunen, R., et al., *Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization*. Biochemistry, 1970. **9**(2): p. 298-303.
9. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
10. Stocker, R., et al., *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. Science, 1987. **235**(4792): p. 1043-6.

11. Watson, C.J., *Reminiscences of Hans Fischer and his laboratory*. *Perspect Biol Med*, 1965. **8**(4): p. 419-35.
12. Maines, M.D., *The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997. **37**: p. 517-54.
13. Wagener, F.A., et al., *Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation*. *Pharmacol Rev*, 2003. **55**(3): p. 551-71.
14. Ponka, P., *Cell biology of heme*. *Am J Med Sci*, 1999. **318**(4): p. 241-56.
15. Jeney, V., et al., *Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme*. *Blood*, 2002. **100**(3): p. 879-87.
16. Ryter, S.W. and R.M. Tyrrell, *The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(2): p. 289-309.
17. Montellano, P.R., *The mechanism of heme oxygenase*. *Curr Opin Chem Biol*, 2000. **4**(2): p. 221-7.
18. Shibahara, S., et al., *Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(23): p. 7865-9.
19. Yoshinaga, T., S. Sassa, and A. Kappas, *Purification and properties of bovine spleen heme oxygenase. Amino acid composition and sites of action of inhibitors of heme oxidation*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(13): p. 7778-85.
20. Dunn, L.L., et al., *New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(11): p. 1723-42.
21. Immenschuh, S. and G. Ramadori, *Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target*. *Biochem Pharmacol*, 2000. **60**(8): p. 1121-8.
22. Ryter, S.W., J. Alam, and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(2): p. 583-650.

23. Lavrovsky, Y., et al., *Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 5987-91.
24. Choi, A.M. and J. Alam, *Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. **15**(1): p. 9-19.
25. Sun, J., et al., *Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(6): p. 1461-6.
26. Zenke-Kawasaki, Y., et al., *Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(19): p. 6962-71.
27. Naylor, L.H. and E.M. Clark, *d(TG)n.d(CA)n sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(6): p. 1595-601.
28. Yamada, N., et al., *Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(1): p. 187-95.
29. Kutty, R.K., et al., *Chromosomal localization of the human heme oxygenase genes: heme oxygenase-1 (HMOX1) maps to chromosome 22q12 and heme oxygenase-2 (HMOX2) maps to chromosome 16p13.3*. Genomics, 1994. **20**(3): p. 513-6.
30. Maines, M.D., B.C. Eke, and X. Zhao, *Corticosterone promotes increased heme oxygenase-2 protein and transcript expression in the newborn rat brain*. Brain Res, 1996. **722**(1-2): p. 83-94.

31. Raju, V.S., W.K. McCoubrey, Jr., and M.D. Maines, *Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1351**(1-2): p. 89-104.
32. McCoubrey, W.K., Jr., T.J. Huang, and M.D. Maines, *Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(19): p. 12568-74.
33. Boehning, D., et al., *Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2*. *Neuron*, 2003. **40**(1): p. 129-37.
34. Ding, Y., W.K. McCoubrey, Jr., and M.D. Maines, *Interaction of heme oxygenase-2 with nitric oxide donors. Is the oxygenase an intracellular 'sink' for NO?* *Eur J Biochem*, 1999. **264**(3): p. 854-61.
35. Basuroy, S., et al., *Nox4 NADPH oxidase-derived reactive oxygen species, via endogenous carbon monoxide, promote survival of brain endothelial cells during TNF- $\alpha$ -induced apoptosis*. *Am J Physiol Cell Physiol*. **300**(2): p. C256-65.
36. Vukomanovic, D., et al., *Selective activation of heme oxygenase-2 by menadione*. *Can J Physiol Pharmacol*. **89**(11): p. 861-4.
37. Sun, Y., M.O. Rotenberg, and M.D. Maines, *Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain. Two HO-2 mRNAs are detected*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(14): p. 8212-7.
38. Poss, K.D. and S. Tonegawa, *Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(20): p. 10919-24.
39. Dennery, P.A., et al., *Oxygen toxicity and iron accumulation in the lungs of mice lacking heme oxygenase-2*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(5): p. 1001-11.
40. Poss, K.D., et al., *Hippocampal long-term potentiation is normal in heme oxygenase-2 mutant mice*. *Neuron*, 1995. **15**(4): p. 867-73.

41. Yachie, A., et al., *Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency*. J Clin Invest, 1999. **103**(1): p. 129-35.
42. Radhakrishnan, N., et al., *Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia*. J Pediatr Hematol Oncol, 2011. **33**(1): p. 74-8.
43. Kawashima, A., et al., *Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case*. Hum Pathol, 2002. **33**(1): p. 125-30.
44. Chen, Y.H., et al., *Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients*. Hum Genet, 2002. **111**(1): p. 1-8.
45. Kaneda, H., et al., *Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(10): p. 1680-5.
46. Schillinger, M., et al., *Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm*. Thromb Res, 2002. **106**(2): p. 131-6.
47. Kikuchi, A., et al., *Association of susceptibility to the development of lung adenocarcinoma with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism*. Hum Genet, 2005. **116**(5): p. 354-60.
48. Kaartokallio, T., et al., *Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 promoter is associated with nonsevere and late-onset preeclampsia*. Hypertension, 2014. **64**(1): p. 172-7.
49. Takeda, M., et al., *Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to cerebral malaria in Myanmar*. Jpn J Infect Dis, 2005. **58**(5): p. 268-71.
50. Bernard, C., ed. *Lecons sur les Effets des Substances Toxiques et Medicamenteuses*. 1857, J.B. Bailliere et Fils: Paris.

51. Hampson, N.B., et al., *Practice recommendations in the diagnosis, management, and prevention of carbon monoxide poisoning*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **186**(11): p. 1095-101.
52. Coburn, R.F., W.J. Williams, and R.E. Forster, *Effect of Erythrocyte Destruction on Carbon Monoxide Production in Man*. J Clin Invest, 1964. **43**: p. 1098-103.
53. Levine, A.S., et al., *Metabolism of carbon monoxide by the colonic flora of humans*. Gastroenterology, 1982. **83**(3): p. 633-7.
54. Vreman, H.J., et al., *Determination of carbon monoxide (CO) in rodent tissue: effect of heme administration and environmental CO exposure*. Anal Biochem, 2005. **341**(2): p. 280-9.
55. Wu, L. and R. Wang, *Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 585-630.
56. Boczkowski, J., J.J. Poderoso, and R. Motterlini, *CO-metal interaction: Vital signaling from a lethal gas*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(11): p. 614-21.
57. Suematsu, M., et al., *Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **205**(2): p. 1333-7.
58. Suematsu, M. and Y. Ishimura, *The heme oxygenase-carbon monoxide system: a regulator of hepatobiliary function*. Hepatology, 2000. **31**(1): p. 3-6.
59. Zuckerbraun, B.S., et al., *Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1*. J Exp Med, 2003. **198**(11): p. 1707-16.
60. Kaizu, T., et al., *Carbon monoxide inhalation ameliorates cold ischemia/reperfusion injury after rat liver transplantation*. Surgery, 2005. **138**(2): p. 229-35.
61. Li Volti, G., et al., *Natural heme oxygenase-1 inducers in hepatobiliary function*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(40): p. 6122-32.



62. Sarady, J.K., et al., *Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver*. FASEB J, 2004. **18**(7): p. 854-6.
63. Wen, Z., et al., *Low dose of carbon monoxide intraperitoneal injection provides potent protection against GalN/LPS-induced acute liver injury in mice*. J Appl Toxicol, 2013. **33**(12): p. 1424-32.
64. Shinoda, Y., et al., *Carbon monoxide as a regulator of bile canalicular contractility in cultured rat hepatocytes*. Hepatology, 1998. **28**(2): p. 286-95.
65. Sano, T., et al., *Endogenous carbon monoxide suppression stimulates bile acid-dependent biliary transport in perfused rat liver*. Am J Physiol, 1997. **272**(5 Pt 1): p. G1268-75.
66. Vanova, K., et al., *Protective effects of inhaled carbon monoxide in endotoxin-induced cholestasis is dependent on its kinetics*. Biochimie, 2014. **97**: p. 173-80.
67. Fischer, H., H. Plieninger, and O. Weissbarth, *Über die konstitution des bilirubins und über bilirubinoide farbstoffe*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 1941. **268**: p. 231-260.
68. Bonnett, R., et al., *The structure of bilirubin*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1978. **202**(1147): p. 249-68.
69. Lightner, D.A. and A.F. McDonagh, *Structure and metabolism of natural and synthetic bilirubins*. J Perinatol, 2001. **21 Suppl 1**: p. S13-6; discussion S35-9.
70. Blanckaert, N., K.P. Heirwegh, and Z. Zaman, *Comparison of the biliary excretion of the four isomers of bilirubin-IX in Wistar and homozygous Gunn rats*. Biochem J, 1977. **164**(1): p. 229-36.
71. Mreihil, K., et al., *Early isomerization of bilirubin in phototherapy of neonatal jaundice*. Pediatr Res, 2010. **67**(6): p. 656-9.

72. Suzuki, N., T. Yamaguchi, and H. Nakajima, *Role of high-density lipoprotein in transport of circulating bilirubin in rats*. J Biol Chem, 1988. **263**(11): p. 5037-43.
73. Goessling, W. and S.D. Zucker, *Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(2): p. G356-65.
74. Jacobsen, J., *Binding of bilirubin to human serum albumin - determination of the dissociation constants*. FEBS Lett, 1969. **5**(2): p. 112-114.
75. Ostrow, J.D., et al., *New concepts in bilirubin encephalopathy*. Eur J Clin Invest, 2003. **33**(11): p. 988-97.
76. Cui, Y., et al., *Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 9626-30.
77. Gollan, J.L. and S.D. Zucker, *A new voyage of discovery: transport through the hepatocyte*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 1996. **107**: p. 48-55; discussion 55-6.
78. Vitek, L. and J.D. Ostrow, *Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(25): p. 2869-83.
79. Bosma, P.J., *Inherited disorders of bilirubin metabolism*. J Hepatol, 2003. **38**(1): p. 107-17.
80. Kamisako, T., et al., *Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2*. Hepatology, 1999. **30**(2): p. 485-90.
81. Kartenbeck, J., et al., *Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome*. Hepatology, 1996. **23**(5): p. 1061-6.
82. Dubin, I.N. and F.B. Johnson, *Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases*. Medicine (Baltimore), 1954. **33**(3): p. 155-97.

83. Rotor, A.B., L. Manahan, and A. Florentin, *Familial non-hemolytic jaundice with direct van den Bergh reaction*. Acta Med Phil, 1948. **5**(1): p. 37.
84. van de Steeg, E., et al., *Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver*. J Clin Invest, 2012. **122**(2): p. 519-28.
85. van de Steeg, E., et al., *Organic anion transporting polypeptide 1a/1b-knockout mice provide insights into hepatic handling of bilirubin, bile acids, and drugs*. J Clin Invest, 2010. **120**(8): p. 2942-52.
86. Bellarosa, C., et al., *Care of the Jaundiced Neonate*, in *Care of the Jaundiced Neonate*, D.K. Stevenson, M.J. Maisels, and J.F. Watchko, Editors. 2012, McGraw-Hill. p. 55-64.
87. Vitek, L. and L. Muchová, *Products of Microbial reduction of Bilirubin in Digestive Tract*. Klin Biochem Metab, 2003. **11**(32): p. 196-200.
88. Vitek, L., et al., *Intestinal colonization leading to fecal urobilinoid excretion may play a role in the pathogenesis of neonatal jaundice*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000. **30**(3): p. 294-8.
89. Poland, R.L. and G.B. Odell, *Physiologic jaundice: the enterohepatic circulation of bilirubin*. N Engl J Med, 1971. **284**(1): p. 1-6.
90. Lester, R., J.D. Ostrow, and R. Schmid, *Enterohepatic circulation of bilirubin*. Nature, 1961. **192**: p. 372.
91. Shapiro, S.M., V.K. Bhutani, and L. Johnson, *Hyperbilirubinemia and kernicterus*. Clin Perinatol, 2006. **33**(2): p. 387-410.
92. Roger, C., et al., *Autoradiographic mapping of local cerebral permeability to bilirubin in immature rats: effects of hyperbilirubinemia*. Pediatr Res, 1996. **39**(1): p. 64-71.

93. Brito, M.A., D. Brites, and D.A. Butterfield, *A link between hyperbilirubinemia, oxidative stress and injury to neocortical synaptosomes*. Brain Res, 2004. **1026**(1): p. 33-43.
94. Silva, R.F., C.M. Rodrigues, and D. Brites, *Bilirubin-induced apoptosis in cultured rat neural cells is aggravated by chenodeoxycholic acid but prevented by ursodeoxycholic acid*. J Hepatol, 2001. **34**(3): p. 402-8.
95. Watchko, J.F., *Kernicterus and the molecular mechanisms of bilirubin-induced CNS injury in newborns*. Neuromolecular Med, 2006. **8**(4): p. 513-29.
96. Silva, S.L., et al., *Dynamics of neuron-glia interplay upon exposure to unconjugated bilirubin*. J Neurochem, 2011. **117**(3): p. 412-24.
97. Bernard, K., G. Ritzel, and K.U. Steiner, *Über eine biologische bedeutung der gallenfarbstoffe: bilirubin und biliverdin als antioxydantien für das vitamin A und die essentiellen Fettsäuren*. Helv Chim Acta Med Phil, 1954. **37**: p. 306-313.
98. Stocker, R., *Antioxidant activities of bile pigments*. Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(5): p. 841-9.
99. Kwak, J.Y., et al., *Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1076**(3): p. 369-73.
100. Stocker, R. and B.N. Ames, *Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(22): p. 8130-4.
101. Neuzil, J. and R. Stocker, *Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation*. J Biol Chem, 1994. **269**(24): p. 16712-9.

102. Baranano, D.E., et al., *Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16093-8.
103. Mazzone, G.L., et al., *Bilirubin effect on endothelial adhesion molecules expression is mediated by the NF-kappaB signaling pathway*. Biosci Trends, 2009. **3**(4): p. 151-7.
104. Arriaga, S., A. Almara, and A. Mottino, *In vivo anti-complement effect of bilirubin-IXalpha*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(4): p. 741-4.
105. Keshavan, P., et al., *Unconjugated bilirubin inhibits VCAM-1-mediated transendothelial leukocyte migration*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3709-18.
106. Vogel, M.E. and S.D. Zucker, *Bilirubin acts as an endogenous regulator of inflammation by disrupting adhesion molecule-mediated leukocyte migration*. Inflamm Cell Signal, 2016. **3**(1).
107. Liu, Y., et al., *Bilirubin possesses powerful immunomodulatory activity and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 1887-97.
108. Vetvicka, V., et al., *The effect of bilirubin on the Fc receptor expression and phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages*. Folia Microbiol (Praha), 1985. **30**(4): p. 373-80.
109. Jangi, S., L. Otterbein, and S. Robson, *The molecular basis for the immunomodulatory activities of unconjugated bilirubin*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(12): p. 2843-51.
110. Motterlini, R. and L.E. Otterbein, *The therapeutic potential of carbon monoxide*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(9): p. 728-43.
111. Mayr, F.B., et al., *Effects of carbon monoxide inhalation during experimental endotoxemia in humans*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(4): p. 354-60.
112. Bathoorn, E., et al., *Anti-inflammatory effects of inhaled carbon monoxide in patients with COPD: a pilot study*. Eur Respir J, 2007. **30**(6): p. 1131-7.

113. Vitek, L., [*Role of bilirubin in the prevention of cardiovascular diseases and cancer*]. Cas Lek Cesk, 2016. **155**(2): p. 10-4.
114. Novotny, L. and L. Vitek, *Inverse relationship between serum bilirubin and atherosclerosis in men: a meta-analysis of published studies*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(5): p. 568-71.
115. Lenicek, M., et al., *The relationship between serum bilirubin and Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(3): p. 481-7.
116. Vitek, L., et al., *Association of systemic lupus erythematosus with low serum bilirubin levels*. Scand J Rheumatol, 2010. **39**(6): p. 480-4.
117. Fischman, D., et al., *Bilirubin as a Protective Factor for Rheumatoid Arthritis: An NHANES Study of 2003 - 2006 Data*. J Clin Med Res, 2010. **2**(6): p. 256-60.
118. Horsfall, L.J., et al., *Serum bilirubin and risk of respiratory disease and death*. JAMA, 2011. **305**(7): p. 691-7.
119. Balta, S., et al., *Bilirubin levels and their association with carotid intima media thickness and high-sensitivity C-reactive protein in patients with psoriasis vulgaris*. Am J Clin Dermatol, 2014. **15**(2): p. 137-42.
120. Peng, F., et al., *Serum bilirubin concentrations and multiple sclerosis*. J Clin Neurosci, 2011. **18**(10): p. 1355-9.
121. Breslin, E., A. Kaufmann, and S. Quenby, *Bilirubin influences the clinical presentation of pre-eclampsia*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013. **170**(1): p. 111-3.
122. Bulmer, A.C., et al., *The anti-mutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames Salmonella test*. Mutat Res, 2007. **629**(2): p. 122-32.
123. Wallner, M., et al., *Anti-genotoxic potential of bilirubin in vivo: damage to DNA in hyperbilirubinemic human and animal models*. Cancer Prev Res (Phila), 2013. **6**(10): p. 1056-63.

124. Zucker, S.D., P.S. Horn, and K.E. Sherman, *Serum bilirubin levels in the U.S. population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer*. *Hepatology*, 2004. **40**(4): p. 827-35.
125. Jiraskova, A., et al., *Association of serum bilirubin and promoter variations in HMOX1 and UGT1A1 genes with sporadic colorectal cancer*. *Int J Cancer*, 2012. **131**(7): p. 1549-55.
126. Temme, E.H., et al., *Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population*. *Cancer Causes Control*, 2001. **12**(10): p. 887-94.
127. Shatalova, E.G., et al., *Genetic polymorphisms in human SULT1A1 and UGT1A1 genes associate with breast tumor characteristics: a case-series study*. *Breast Cancer Res*, 2005. **7**(6): p. R909-21.
128. Zobi, F., *CO and CO-releasing molecules in medicinal chemistry*. *Future Med Chem*, 2013. **5**(2): p. 175-88.
129. Schatzschneider, U., *Novel lead structures and activation mechanisms for CO-releasing molecules (CORMs)*. *Br J Pharmacol*, 2015. **172**(6): p. 1638-50.
130. Motterlini, R., et al., *Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities*. *Circ Res*, 2002. **90**(2): p. E17-24.
131. Motterlini, R., B.E. Mann, and R. Foresti, *Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2005. **14**(11): p. 1305-18.
132. Clark, J.E., et al., *Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule*. *Circ Res*, 2003. **93**(2): p. e2-8.
133. Motterlini, R., et al., *CORM-A1: a new pharmacologically active carbon monoxide-releasing molecule*. *FASEB J*, 2005. **19**(2): p. 284-6.

134. Alberto, R., et al., *Synthesis and properties of boranocarbonate: a convenient in situ CO source for the aqueous preparation of [(99m)Tc(OH(2))<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(13): p. 3135-6.
135. Wang, D., et al., *A click-and-release approach to CO prodrugs*. Chem Commun (Camb), 2014. **50**(100): p. 15890-3.
136. Romanski, S., et al., *Acyloxybutadiene iron tricarbonyl complexes as enzyme-triggered CO-releasing molecules (ET-CORMs)*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(10): p. 2392-6.
137. Brückmann, N.E., et al., *Polymer Conjugates of Photoinducible CO Releasing Molecules*. Eur J Inorg Chem, 2011. **29**: p. 4571-4577.
138. Dordelmann, G., et al., *Silicium dioxide nanoparticles as carriers for photoactivatable CO-releasing molecules (PhotoCORMs)*. Inorg Chem, 2011. **50**(10): p. 4362-7.
139. Klan, P., et al., *Photoremovable protecting groups in chemistry and biology: reaction mechanisms and efficacy*. Chem Rev, 2013. **113**(1): p. 119-91.
140. Kuzmanich, G., M.N. Gard, and M.A. Garcia-Garibay, *Photonic amplification by a singlet-state quantum chain reaction in the photodecarbonylation of crystalline diarylcyclopropenones*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(32): p. 11606-14.
141. Kuzmanich, G., et al., *Oxyallyl exposed: an open-shell singlet with picosecond lifetimes in solution but persistent in crystals of a cyclobutanedione precursor*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(8): p. 2342-5.
142. Palao, E., et al., *Transition-Metal-Free CO-Releasing BODIPY Derivatives Activatable by Visible to NIR Light as Promising Bioactive Molecules*. J Am Chem Soc, 2016. **138**(1): p. 126-33.



143. Cable, E.E., et al., *Mechanism of induction of heme oxygenase by metalloporphyrins in primary chick embryo liver cells: evidence against a stress-mediated response*. Mol Cell Biochem, 1997. **169**(1-2): p. 13-20.
144. Grosser, N., et al., *Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of aspirin*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **308**(4): p. 956-60.
145. Cantoni, L., et al., *Induction of hepatic heme oxygenase-1 by diclofenac in rodents: role of oxidative stress and cytochrome P-450 activity*. J Hepatol, 2003. **38**(6): p. 776-83.
146. Grosser, N., et al., *The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(12): p. 2064-71.
147. Motterlini, R., et al., *Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(8): p. 1303-12.
148. Chen, C.Y., et al., *Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(4): p. 993-1000.
149. Kronke, G., et al., *Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(6): p. 1276-82.
150. Hou, C.C., et al., *Celecoxib induces heme-oxygenase expression in glomerular mesangial cells*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1042**: p. 235-45.
151. Ferrandiz, M.L. and I. Devesa, *Inducers of heme oxygenase-1*. Curr Pharm Des, 2008. **14**(5): p. 473-86.
152. Uchaipichat, V., et al., *Human udp-glucuronosyltransferases: isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic*

- solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid. Drug Metab Dispos, 2004. 32(4): p. 413-23.*
153. Zhang, D., et al., *In vitro inhibition of UDP glucuronosyltransferases by atazanavir and other HIV protease inhibitors and the relationship of this property to in vivo bilirubin glucuronidation. Drug Metab Dispos, 2005. 33(11): p. 1729-39.*
154. Shitara, Y., et al., *Long-lasting inhibitory effects of cyclosporin A, but not tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake. Drug Metab Pharmacokinet, 2012. 27(4): p. 368-78.*
155. Kadmon, M., et al., *Inhibition by cyclosporin A of adenosine triphosphate-dependent transport from the hepatocyte into bile. Gastroenterology, 1993. 104(5): p. 1507-14.*
156. Riss, J., et al., *Phycobiliprotein C-phycoerythrin from Spirulina platensis is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. J Agric Food Chem, 2007. 55(19): p. 7962-7.*
157. Cheong, S.H., et al., *Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2010. 56(1): p. 34-40.*
158. Bhat, V.B. and K.M. Madyastha, *C-phycoerythrin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 275(1): p. 20-5.*
159. Grosser, N., et al., *Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 325(3): p. 871-6.*
160. Lee, T.S., et al., *Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection. Circulation, 2004. 110(10): p. 1296-302.*
161. Hsu, M., et al., *Tissue-specific effects of statins on the expression of heme oxygenase-1 in vivo. Biochem Biophys Res Commun, 2006. 343(3): p. 738-44.*

162. Muchova, L., et al., *Statin treatment increases formation of carbon monoxide and bilirubin in mice: a novel mechanism of in vivo antioxidant protection*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2007. **85**(8): p. 800-10.
163. Ong, K.L., et al., *Association of lower total bilirubin level with statin usage: the United States National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2008*. *Atherosclerosis*, 2011. **219**(2): p. 728-33.
164. Fukui, M., et al., *Low serum bilirubin concentration in haemodialysis patients with Type 2 diabetes*. *Diabet Med*, 2011. **28**(1): p. 96-9.
165. Vitek, L., L. Muchova, and A. Zak, *Statin use and serum bilirubin levels*. *Atherosclerosis*, 2011. **219**(2): p. 969; discussion 392.
166. de Sauvage Nolting, P.R., et al., *Serum bilirubin levels in familial hypercholesterolemia: a new risk marker for cardiovascular disease?* *J Lipid Res*, 2011. **52**(9): p. 1755-1759.
167. Agarwal, B., et al., *Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells*. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(8): p. 2223-9.
168. Hawk, M.A., et al., *Inhibition of lung tumor cell growth in vitro and mouse lung tumor formation by lovastatin*. *Cancer Lett*, 1996. **109**(1-2): p. 217-22.
169. Gbelcova, H., et al., *Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(6): p. 1214-21.
170. Elson, C.E., et al., *Isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis: potential application to cancer*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999. **221**(4): p. 294-311.
171. Sebti, S.M., *Protein farnesylation: implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(4): p. 297-300.

172. Berberat, P.O., et al., *Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(10): p. 3790-8.
173. Sunamura, M., et al., *Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer*. Angiogenesis, 2003. **6**(1): p. 15-24.
174. Vitek, L., et al., *Antiproliferative effects of carbon monoxide on pancreatic cancer*. Dig Liver Dis, 2014. **46**(4): p. 369-75.
175. Vanova, K., et al., *Heme oxygenase is not involved in the anti-proliferative effects of statins on pancreatic cancer cells*. BMC Cancer, 2016. **16**: p. 309.
176. Jez, M., et al., *Valproic acid downregulates heme oxygenase-1 independently of Nrf2 by increasing ubiquitination and proteasomal degradation*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **485**(1): p. 160-166.
177. Lublinghoff, N., et al., *Genetic variants of the promoter of the heme oxygenase-1 gene and their influence on cardiovascular disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study)*. BMC Med Genet, 2009. **10**: p. 36.
178. Lin, C.C., et al., *Length polymorphism in heme oxygenase-1 is associated with arteriovenous fistula patency in hemodialysis patients*. Kidney Int, 2006. **69**(1): p. 165-72.
179. Gulesserian, T., et al., *Clinical restenosis after coronary stent implantation is associated with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism and the heme oxygenase-1 +99G/C variant*. Clin Chem, 2005. **51**(9): p. 1661-5.
180. Morgan, L., et al., *Polymorphism of the heme oxygenase-1 gene and cerebral aneurysms*. Br J Neurosurg, 2005. **19**(4): p. 317-21.

181. Funk, M., et al., *The effect of a promoter polymorphism in the heme oxygenase-1 gene on the risk of ischaemic cerebrovascular events: the influence of other vascular risk factors*. *Thromb Res*, 2004. **113**(3-4): p. 217-23.
182. Taha, H., et al., *Role of heme oxygenase-1 in human endothelial cells: lesson from the promoter allelic variants*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(8): p. 1634-41.
183. Was, H., J. Dulak, and A. Jozkowicz, *Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy*. *Curr Drug Targets*, 2010. **11**(12): p. 1551-70.
184. Was, H., et al., *Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(6): p. 2181-98.
185. Nishie, A., et al., *Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas*. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(5): p. 1107-13.
186. Abraham, N.G., G. Scapagnini, and A. Kappas, *Human heme oxygenase: cell cycle-dependent expression and DNA microarray identification of multiple gene responses after transduction of endothelial cells*. *J Cell Biochem*, 2003. **90**(6): p. 1098-111.
187. Mayerhofer, M., et al., *Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia*. *Cancer Res*, 2004. **64**(9): p. 3148-54.
188. Hill, M., et al., *Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase*. *FASEB J*, 2005. **19**(14): p. 1957-68.
189. Was, H., et al., *Effects of heme oxygenase-1 on induction and development of chemically induced squamous cell carcinoma in mice*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **51**(9): p. 1717-26.

190. Trauner, M., P.J. Meier, and J.L. Boyer, *Molecular regulation of hepatocellular transport systems in cholestasis*. J Hepatol, 1999. **31**(1): p. 165-78.
191. Kullak-Ublick, G.A. and P.J. Meier, *Mechanisms of cholestasis*. Clin Liver Dis, 2000. **4**(2): p. 357-85.
192. Guicciardi, M.E. and G.J. Gores, *Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury*. Gut, 2005. **54**(7): p. 1024-33.
193. Maher, J.J. and S.L. Friedman, *Parenchymal and nonparenchymal cell interactions in the liver*. Semin Liver Dis, 1993. **13**(1): p. 13-20.
194. Roma, M.G., F.A. Crocenzi, and E.A. Sanchez Pozzi, *Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects*. Clin Sci (Lond), 2008. **114**(9): p. 567-88.
195. Sokol, R.J., et al., *Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids*. Pediatr Res, 2001. **49**(4): p. 519-31.
196. Goda, N., et al., *Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation*. J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 604-12.
197. Muchova, L., et al., *Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver: implications for bile acid-mediated oxidative stress*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(5): p. 1156-1165.
198. Schreiber, A.J. and F.R. Simon, *Estrogen-induced cholestasis: clues to pathogenesis and treatment*. Hepatology, 1983. **3**(4): p. 607-13.
199. Simon, F.R., et al., *Ethinyl estradiol cholestasis involves alterations in expression of liver sinusoidal transporters*. Am J Physiol, 1996. **271**(6 Pt 1): p. G1043-52.
200. Muchova, L., et al., *Protective effect of heme oxygenase induction in ethinylestradiol-induced cholestasis*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(5): p. 924-33.

201. Pascher, I., et al., *Crystal structures of membrane lipids*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1113**(3-4): p. 339-73.
202. Guyot, C. and B. Stieger, *Interaction of bile salts with rat canalicular membrane vesicles: evidence for bile salt resistant microdomains*. J Hepatol, 2011. **55**(6): p. 1368-76.
203. Majer, F., et al., *Estrogen-induced cholestasis results in a dramatic increase of b-series gangliosides in the rat liver*. Biomed Chromatogr, 2007. **21**(5): p. 446-50.
204. Jirkovska, M., et al., *Changes in GM1 ganglioside content and localization in cholestatic rat liver*. Glycoconj J, 2007. **24**(4-5): p. 231-41.
205. Munro, S., *Lipid rafts: elusive or illusive?* Cell, 2003. **115**(4): p. 377-88.
206. Petr, T., et al., *The effect of heme oxygenase on ganglioside redistribution within hepatocytes in experimental estrogen-induced cholestasis*. Physiol Res, 2014. **63**: p. 359-367.
207. Smid, V., et al., *Changes in Liver Ganglioside Metabolism in Obstructive Cholestasis - the Role of Oxidative Stress*. Folia Biol (Praha), 2016. **62**(4): p. 148-59.
208. McNally, S.J., et al., *Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition*. Int J Mol Med, 2007. **19**(1): p. 165-72.
209. Wongcharoen, W. and A. Phrommintikul, *The protective role of curcumin in cardiovascular diseases*. Int J Cardiol, 2009. **133**(2): p. 145-51.
210. Ilbey, Y.O., et al., *Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways*. Hum Reprod, 2009. **24**(7): p. 1717-25.
211. Reddy, A.C. and B.R. Lokesh, *Effect of dietary turmeric (Curcuma longa) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver*. Food Chem Toxicol, 1994. **32**(3): p. 279-83.

212. Cerny, D., et al., *Hepatoprotective effect of curcumin in lipopolysaccharide/galactosamine model of liver injury in rats: relationship to HO-1/CO antioxidant system*. *Fitoterapia*, 2011. **82**(5): p. 786-91.
213. Zelenka, J., et al., *Highly sensitive method for quantitative determination of bilirubin in biological fluids and tissues*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008. **867**(1): p. 37-42.
214. Zelenka, J., L. Muchova, and L. Vitek, *The Role of Heme Oxygenase-1 Induction and Intracellular Metabolism of Bilirubin in Response to Oxidative Stress*. *Hepatology*, 2008. **48**(4): p. 1124a-1124a.
215. Yamaguchi, T., et al., *Chemical structure of a new family of bile pigments from human urine*. *J Biochem*, 1994. **116**(2): p. 298-303.
216. Yamaguchi, T., et al., *Bilirubin oxidation provoked by endotoxin treatment is suppressed by feeding ascorbic acid in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid*. *Eur J Biochem*, 1997. **245**(2): p. 233-40.
217. Shimoharada, K., et al., *Urine concentration of biopyrrins: a new marker for oxidative stress in vivo*. *Clin Chem*, 1998. **44**(12): p. 2554-5.
218. Shimomura, H., et al., *Comparison of urinary biopyrrin levels in acute myocardial infarction (after reperfusion therapy) versus stable angina pectoris and their usefulness in predicting subsequent cardiac events*. *Am J Cardiol*, 2002. **90**(2): p. 108-11.
219. Vitek, L., et al., *Urinary excretion of oxidative metabolites of bilirubin in subjects with Gilbert syndrome*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007. **22**(6): p. 841-5.
220. Belanger, S., J.C. Lavoie, and P. Chessex, *Influence of bilirubin on the antioxidant capacity of plasma in newborn infants*. *Biol Neonate*, 1997. **71**(4): p. 233-8.
221. Vitek, L., et al., *Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels*. *Atherosclerosis*, 2002. **160**(2): p. 449-56.



222. Muchova, L., et al., [*Gilbert's syndrome--myths and reality*]. Cas Lek Cesk, 2004. **143**(6): p. 375-80.
223. Ilzecka, J. and Z. Stelmasiak, *Serum bilirubin concentration in patients with amyotrophic lateral sclerosis*. Clin Neurol Neurosurg, 2003. **105**(4): p. 237-40.
224. Scalzi, L.V., et al., *Cardiovascular disease risk awareness in systemic lupus erythematosus patients*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(5): p. 1458-64.
225. Vitek, L., et al., *Identification of bilirubin reduction products formed by Clostridium perfringens isolated from human neonatal fecal flora*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006. **833**(2): p. 149-57.
226. Caglayan, S., et al., *Superiority of oral agar and phototherapy combination in the treatment of neonatal hyperbilirubinemia*. Pediatrics, 1993. **92**(1): p. 86-9.
227. Davis, D.R. and R.A. Yeary, *Activated charcoal as an adjunct to phototherapy for neonatal jaundice*. Dev Pharmacol Ther, 1987. **10**(1): p. 12-20.
228. Nicolopoulos, D., et al., *Combined treatment of neonatal jaundice with cholestyramine and phototherapy*. J Pediatr, 1978. **93**(4): p. 684-8.
229. Gourley, G.R., B.L. Kreamer, and M. Cohnen, *Inhibition of beta-glucuronidase by casein hydrolysate formula*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1997. **25**(3): p. 267-72.
230. Vitek, L., et al., *The effect of zinc salts on serum bilirubin levels in hyperbilirubinemic rats*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005. **40**(2): p. 135-40.
231. Strasky, Z., et al., *Spirulina platensis and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: a possible implication for atherogenesis*. Food Funct, 2013. **4**(11): p. 1586-94.
232. Konickova, R., et al., *Anti-cancer effects of blue-green alga Spirulina platensis, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds*. Ann Hepatol, 2014. **13**(2): p. 273-83.

233. Otterbein, L.E., et al., *Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 422-8.
234. Otterbein, L.E., et al., *Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury*. Nat Med, 2003. **9**(2): p. 183-90.
235. Ryter, S.W., D. Morse, and A.M. Choi, *Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(2): p. 175-82.

## 8 PŘÍLOHY

1. Hsu M., **Muchová L.**, Morioka I., Wong RJ, Schröder H, Stevenson DK. Tissue-specific effects of statins on the expression of heme oxygenase-1 in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343(3):738-44 (2006).
2. **Muchová L.**, Wong RJ, Hsu M, Vitek L., Zelenka J, Schröder H, Stevenson DK. Statin treatment increases formation of carbon monoxide and bilirubin in mice: a novel mechanism of in vivo antioxidant protection. *Can J Physiol Pharmacol* 85(8):800-10 (2007).
3. Vitek L., **Muchová L.**, Žák A. Statin use and serum bilirubin levels. *Atherosclerosis* 219(2):969 (2011).
4. Váňová K., Boukalová Š., Gbelcová H., **Muchová L.**, Neužil J., Gurlich R., Ruml T., Vitek L. Heme oxygenase is not involved in the anti-proliferative effects of statins on pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* 16(309):1-11 (2016).
5. Jez M., Ciesla M., Stepinewski J., Langrzyk A., **Muchová L.**, Vitek L., Jozkowicz A., Dulak J. Valproic acid downregulates heme oxygenase-1 independently of Nrf2 by increasing ubiquitination and proteasomal degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 485(1):160-166 (2017).
6. Taha H., Skrzypek K., Guevara I., Nigisch A., Mustafa S., Grochot-Przeczek A., Ferdek P., Was H., Kotlinowski J., Kozakowska M., Balcerzyk A., **Muchová L.**, Vitek L., Weigel G., Dulak J., Jozkowicz A. Role of Heme Oxygenase-1 in Human Endothelial Cells: Lesson From the Promoter Allelic Variants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(8) 1634-1641 (2010).
7. Was H., Sokolowska M., Sierpinowska A., Dominik P., Skrzypek K., Lackowska B., Pratnicki A., Grochot-Przeczek A., Taha H., Kotlinowski J., Kozakowska M., Mazan A., Nowak W., **Muchová L.**, Vitek L., Ratajska A., Dulak J., Jozkowicz A. Effects of

- heme oxygenase-1 on induction and development of chemically induced squamous cell carcinoma in mice. *Free Radic Biol Med* 51(9):1717-1726 (2011).
8. **Muchová L.**, Váňová K., Zelenka J., Leníček M., Petr T., Vejražka M., Sticová E., Vreman H.J., Wong R.J., Vitek L. Bile Acids Decrease Intracellular Bilirubin Levels in Cholestatic Liver: Implications for Bile Acid- Mediated Oxidative Stress. *J Cell Mol Med* 15(5):1156-1165 (2011).
  9. **Muchová L.**, Váňová K., Šuk J., Mičuda S., Doleželová E., Fuksa L., Černý D., Farghali H., Zelenková M., Leníček M., Wong R.J., Vreman H.J., Vitek L. Protective effect of heme oxygenase induction in ethinylestradiol-induced cholestasis. *J Cell Mol Med.* 19(5):924-933 (2015).
  10. Petr T., Šmíd V., Kučerová V., Váňová K., Leníček M., Vitek L., Šmíd F., **Muchová L.** The effect of heme oxygenase on ganglioside redistribution within hepatocytes in experimental estrogen-induced cholestasis. *Phys. Res.* 63(3):359-67 (2014).
  11. Šmíd V., Petr T., Váňová K., Jašprová J., Šuk J., Vitek L., Šmíd F., **Muchová L.** Changes in Liver Ganglioside Metabolism in Obstructive Cholestasis- the Role of Oxidative Stress. *Folia Biol (Praha).* 62(4): 148-159 (2016).
  12. Váňová K., Šuk J., Petr T., Černý D., Slanař O., Vreman H.J., Wong R.J., Zima T., Vitek L., **Muchová L.** Protective effects of inhaled carbon monoxide in endotoxin-induced cholestasis is dependent on its kinetics. *Biochimie.* 97:173-80 (2014).
  13. Černý D., Lekić N., Váňová K., **Muchová L.**, Hořínek A., Kmoníčková E., Zídek Z., Kameníková L., Farghali H. Hepatoprotective effect of curcumin in lipopolysaccharide/D-galactosamine model of liver injury in rats: Relationship to HO-1/CO antioxidant system. *Fitoterapia* 82:786-791 (2011).

14. Zelenka J., Leníček M., **Muchová L.**, Jirsa M., Kudla M., Balaž P., Zadinová M, Ostrow J.D., Wong R.J, Vítek L. Highly sensitive method for quantitative determination of bilirubin in biological fluid and tissues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 867: 37-42 (2008).
15. Zelenka J., **Muchová L.**, Zelenková M., Váňová K., Vreman H.J., Wong R.J., Vítek L. Intracellular accumulation of bilirubin as a defense mechanism against increased oxidative stress. *Biochimie* 94:1821-1827 (2012).
16. Vítek L., Kráslová I., **Muchová L.**, Novotný L., Yamaguchi T. Urinary excretion of oxidative metabolites of bilirubin in subjects with Gilbert syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 22(6):841-5 (2007).
17. Vítek L., **Muchová L.**, Jančová E., Pešičková S., Tegzová D., Peterová V., Pavelka K., Tesař V. Association of systemic lupus erythematosus with low serum bilirubin levels. *Scand J Rheumatol* 39(6): 480-4 (2010).
18. Vítek L., Majer F., **Muchová L.**, Zelenka J., Jirásková A., Branný P., Malina J., Ubík K. Identification of bilirubin reduction products formed by *Clostridium perfringens* isolated from human neonatal fecal flora. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 833 (2):149-57 (2006).
19. Vítek L., **Muchová L.**, Zelenka J., Zadinová M, Malina J. The effect of zinc salts on serum bilirubin levels in hyperbilirubinemic rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 40(2):135-40 (2005).
20. Stráský Z., Zemánková L., Němečková I., Rathouská J., Wong R.J., **Muchová L.**, Subhanová I., Vaníková J., Váňová K., Vítek L., Nachtigal P. Spirulina platensis and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: a possible implication for atherogenesis. *Food Funct.* 4(11):1586-94 (2013).

21. Koníčková R., Vaňková K., Vaníková J., Váňová K., **Muchová L.**, Subhanová I., Zadinová M., Zelenka J., Dvořák A., Kolář M., Strnad H., Rimpelová S., Ruml T., Wong R.J., Vitek L. Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. *Ann Hepatol.* 13(2):273-83 (2014).
22. Vitek L., Gbelcová H., **Muchová L.**, Váňová K., Zelenka J., Koníčková R., Šuk J., Zadinová M., Knejzlík Z., Ahmad S., Fujisawa T., Ahmed A., Ruml T. Antiproliferative effects of carbon monoxide on pancreatic cancer. *Dig Liver Dis.* 46(4):369-75 (2014).
23. Palao E., Slanina T., **Muchová L.**, Šolomek T., Vitek L., Klán P. Transition-Metal-Free CO-Releasing BODIPY Derivatives Activatable by Visible to NIR Light as Promising Bioactive Molecules. *J Am Chem Soc.* 138(1):126-33 (2016).