

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biologických a lékařských věd



**Změna exprese transportních proteinů během  
obstrukční cholestázy u potkanů II**

**Alteration of transport proteins expression during  
obstructive cholestasis in rats II**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Eva Doleželová, Ph.D

Vypracovala:

Zuzana Skořepová

Hradec Králové 2013

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

.....  
Zuzana Skořepová

„Na tomto místě bych ráda poděkovala PharmDr. Evě Doleželové, Ph.D za cenné rady a připomínky při vypracování mé diplomové práce. Poděkování patří i celé mé rodině za podporu při studiu, trpělivost a tvorbu potřebného zázemí.“

# Abstrakt

Zuzana Skořepová

Změna exprese transportních proteinů během obstrukční cholestázy u potkanů II

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíle práce:

Cílem diplomové práce bylo ověření cholestatického poškození jater navozené podvazem žlučovodu po dobu trvání 28 dnů u potkanů analýzou exprese efluxních transportních proteinů v játrech (Bsep, Bcrp, Mrp2, Mdr1, Mdr2, Mrp3, Mrp4) na úrovni mRNA a proteinu.

Metody:

Potkani kmene Wistar (n = 6, v každé skupině; 280 – 320 g) byli rozděleni do dvou skupin: kontrolní skupina sham-operovaných potkanů (Sham) a BDO skupina (obstrukce žlučovodu v trvání 28 dnů). Byla provedena analýza exprese efluxních transportních proteinů na úrovni mRNA a proteinu metodou qRT-PCR a Western blot.

Výsledky:

Ve skupině BDO bylo pozorováno významné zvýšení mRNA exprese u Mdr2 proteinu na 303 %, Mdr1b na 340 % a Mrp3 na 9900 % v porovnání s kontrolní skupinou. Expresse Mrp2 mRNA byla snížena na 42 %. Významné zvýšení exprese proteinu ve skupině BDO bylo prokázáno u Bcrp na 160 %, Mdr1 na 1010 %, Mrp3 na 940 % a Mrp4 na 140 % v porovnání se Sham skupinou. Expresse proteinu byla významně snížena u Mrp2 na 31 %, Bsep na 59 % a Mdr2 na 82 % v porovnání s kontrolní skupinou.

Závěr:

Z výsledků diplomové práce vyplývá, že při obstrukční cholestáze dochází ke snížení exprese transportních proteinů na kanalikulární membráně hepatocytů a naopak ke zvýšení exprese bazolaterálních transportérů, což představuje kompenzační mechanismus pro eliminaci potenciálně toxických biliárních látek jako je bilirubin nebo žlučové kyseliny.

# Abstract

Zuzana Skořepová

Alteration of transport proteins expression during obstructive cholestasis in rats II

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

## Background:

The aim of the diploma thesis was the verification of cholestatic liver impairment induced by bile duct obstruction lasting for 28 days in rats, by analysis of mRNA and protein expression of liver efflux transport proteins (Bsep, Bcrp, Mrp2, Mdr1, Mdr2, Mrp3, Mrp4).

## Methods:

Wistar rats (n = 6, in each group; weighing 280 to 320 g) were divided into two groups: control rats were sham-operated (Sham) and BDO group (bile duct obstruction lasting for 28 days). mRNA and protein expression changes of the transporters were performed by qRT-PCR and Western blot.

## Results:

As compared to Sham group, BDO group showed increase of mRNA expression of Mdr2 transporter to 303%, Mdr1b to 340% and Mrp3 to 9900%. Mrp2 mRNA expression was decreased to 42%. Obstructive cholestasis led to significant increase of protein levels – Bcrp to 160%, Mdr1 to 1010%, Mrp3 to 940% and Mrp4 to 140%. Mrp2, Bsep and Mdr2 protein levels were increased to 31%, 59% and 82%, respectively.

## Conclusion:

Obstructive cholestasis led to decrease of canalicular liver transporters expression and increase of basolateral liver transporters expression, which represents compensatory mechanism for elimination of potentially toxic biliary compounds such as bilirubin or bile acids.

**Obsah**

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah .....	6
Seznam použitých zkratek .....	8
<b>1. Úvod.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Játra.....</b>	<b>12</b>
2.1. <i>Morfologie jater.....</i>	<i>12</i>
2.1.1. Hepatocyty.....	13
2.1.2. Endotelové buňky .....	13
2.1.3. Kupfferovy buňky .....	13
2.1.4. Itovy buňky.....	14
2.2. <i>Jaterní funkce .....</i>	<i>14</i>
2.2.1. Metabolické funkce .....	15
2.2.2. Nemetabolické funkce .....	15
<b>3. Transportní systémy v játrech .....</b>	<b>17</b>
3.1. <i>Bazolaterální transportní proteiny .....</i>	<i>17</i>
3.1.1. NTCP.....	18
3.1.2. OATP.....	18
3.1.3. OAT.....	18
3.1.4. OCT .....	18
3.1.5. OST $\alpha/\beta$ .....	18
3.1.6. MRP1, MRP3-MRP6 .....	19
3.2. <i>Kanalikulární transportní proteiny .....</i>	<i>20</i>
3.2.1. MRP2.....	21
3.2.2. BSEP .....	21
3.2.3. BCRP.....	22

---

3.2.4.	MDR1 .....	22
3.2.5.	MDR3 .....	22
<b>4.</b>	<b>Cholestáza .....</b>	<b>23</b>
4.1.	<i>Mechanismus cholestázy .....</i>	<i>23</i>
4.2.	<i>Klinický a laboratorní obraz cholestázy.....</i>	<i>24</i>
4.3.	<i>Extrahepatální cholestáza .....</i>	<i>24</i>
4.4.	<i>Intrahepatální cholestáza .....</i>	<i>25</i>
4.5.	<i>Terapie cholestázy .....</i>	<i>26</i>
<b>5.</b>	<b>Jaterní transportní systémy a cholestáza .....</b>	<b>28</b>
<b>6.</b>	<b>Zadání diplomové práce – cíle práce .....</b>	<b>30</b>
<b>7.</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>31</b>
7.1.	<i>Chemikálie .....</i>	<i>31</i>
7.2.	<i>Pokusná zvířata .....</i>	<i>31</i>
7.3.	<i>qRT-PCR.....</i>	<i>32</i>
7.4.	<i>Western blot.....</i>	<i>33</i>
7.5.	<i>Statistická analýza .....</i>	<i>33</i>
<b>8.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>35</b>
8.1.	<i>qRT-PCR.....</i>	<i>35</i>
8.2.	<i>Western blot.....</i>	<i>37</i>
<b>9.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>39</b>
<b>10.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>41</b>
<b>11.</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>42</b>

**Seznam použitých zkratek**

ABC	„ATP binding cassette“
ALP	Alkalická fosfatáza
ALT	Alaninaminotransferáza
AMA	„Antimitochondrial antibodies“
ANA	„Antinuclear antibodies“
AST	Aspartátaminotransferáza
BCRP	„Breast cancer resistance protein“
BSEP	„Bile salt export pump“
cAMP	Cyklický adenosin-3', 5'-monofosfát
CAR	„Constitutive androstane receptor“
cGMP	Cyklický guanosin-3', 5'-monofosfát
CYP	Isoformy cytochromu P450
FXR	„Farsenoid X receptor“
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GGT	Gama-glutamyltransferáza
HLA	„Human leukocyte antigen“
ICP	„Intrahepatic cholestasis of pregnancy“
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
LDL	„Low density lipoprotein“
MDR	„Multidrug resistance proteins“
MRP	„Multidrug resistance-associated proteins“
NBD	„Nucleotide binding domain“
NTCP	„Na <sup>+</sup> -taurocholate cotransporting polypeptide“
OAT	„Organic anion transporter“
OATP	„Organic anion transporting polypeptide“
OCT	„Organic cation transporter“
OST $\alpha/\beta$	„Organic solute transporter $\alpha/\beta$ “
pANCA	„Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies“
PBC	Primární biliární cirhóza
PFIC	Progresivní familiární intrahepatální cholestáza

---

PPAR- $\alpha$	„Peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$ “
PSC	Primární sklerotizující cholangitida
PXR	„Pregnane X receptor“
RT-PCR	„Reverse transcriptase-polymerase chain reaction“
SMA	„Smooth muscle antibodies“
SLC	„Solute carrier“
SPF	„Specific pathogen free“
TNF- $\alpha$	„Tumor necrosis factor $\alpha$ “
UDCA	„Ursodeoxycholic acid“
VLDL	„Very low density lipoprotein“
Ywhaz	Tyrosin 3-monooxygenáza/ tryptofan 5-monooxygenáza aktivující protein, zeta polypeptid

***Poznámka***

*Zkratky uvedených transportních proteinů a biotransformačních enzymů jsou popisovány velkými písmeny u lidí a malými písmeny vyskytují-li se u potkanů.*

## 1. Úvod

Játra, jako jeden ze životně důležitých orgánů v těle, patří mezi největší exokrinní žlázu, která je umístěna intraperitoneálně v úzké vazbě na bránici a dvanáctník. Játra se podílí na metabolizaci velkého množství látek endogenního (hormony, žlučové kyseliny aj.) a exogenního původu (léčiva, toxiny, xenobiotika) [1].

Funkce jater zajišťují parenchymové buňky – hepatocyty a neparenchymové buňky – Kupfferovy, Itovy a endotelové buňky. Játra se účastní metabolismu sacharidů, lipidů, proteinů, podílejí se na metabolismu hormonů i vitaminů, syntéze řady látek, detoxikují organismus a jsou významným depotem mnoha látek. Mezi významné sekreční funkce jater patří tvorba a vylučování žluče [2].

Žluč obsahuje žlučové kyseliny, cholesterol, fosfolipidy, konjugáty bilirubinu, proteiny a elektrolyty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ). Denně se vytvoří 500 – 750 ml žluči [2]. Je významnou exkreční cestou mnoha látek, které nemohou být vyloučeny ledvinami. Významně se podílí také na trávení a vstřebávání tuků [1]. Velký počet různorodých onemocnění jater a žlučových cest provází syndrom cholestázy [3].

Cholestáza je porucha vylučování žluči do střeva na různých úrovních biliárního traktu. Jako kompenzace vzniklé situace se aktivují spontánní anticholestatické obranné mechanismy, které částečně přeměrují exkreci látek z jater do ledvin. Dochází ke kumulaci látek v játrech a následně i k systémovému hromadění toxických substancí typu žlučových kyselin a bilirubinu, které mohou v závislosti na intenzitě a době trvání cholestázy závažně poškodit organismus [4]. Příčina extrahepatální cholestázy leží mimo játra, zatímco u intrahepatální cholestázy je překážka uvnitř jater. Mezi příčiny intrahepatální cholestázy, které ovlivňují tvorbu žluči, exkreci a navození cholestázy patří PBC (Primární biliární cirhóza), PSC (Primární sklerotizující cholangitida), cholestáza vyvolaná léčivy aj. K obstrukci jater dochází díky jaterním nebo biliárním tumorům, žlučovým kamenům aj. Při cholestatických onemocněních dochází ke změně exprese transportních proteinů, které jsou lokalizovány na membránách hepatocytů [5]. Pro eflux endogenních látek a xenobiotik z hepatocytů do žluče slouží transportní systémy lokalizované na kanalikulární membráně hepatocytů, přičemž jejich exkrece je zajištěna skupinou ABC („ATP binding cassette“) transportérů. Na bazolaterální membráně jsou lokalizované transportéry ze skupiny SLC („Solute carrier“), díky kterým je zajištěn obousměrný transport léčiv mezi krví a hepatocyty pomocí iontového gradientu ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ ) nebo elektrochemického potenciálu [6]. Při dlouhodobém trvání

cholestázy však dochází k rozsáhlému poškození funkce hepatocytů a řada cholestatických syndromů končí ireverzibilním poškozením jater a jaterním selháním. Cholestatických onemocnění v posledních letech stále významně přibývá a představují onemocnění, která jsou indikována k jaterní transplantaci [3].

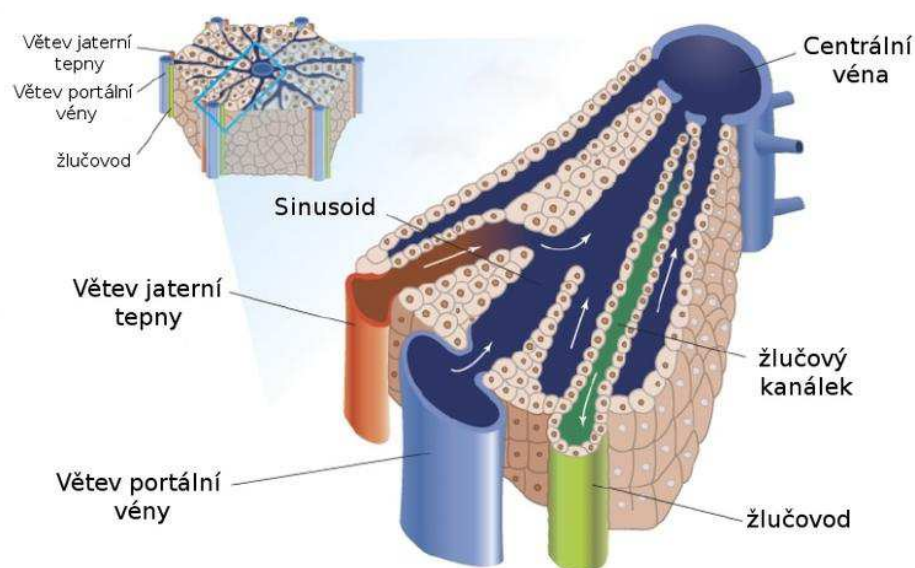
## 2. Játra

Játra patří mezi největší, nejtěžší a životně důležitý orgán. Zaujímají 1/18 celkové hmotnosti novorozence a 1/50 celkové tělesné hmotnosti dospělého člověka. Hmotnost jater se u žen pohybuje mezi 1200–1500 g, u mužů mezi 1500–1800 g. S přibývajícím věkem podíl hmotnosti jater k celkové tělesné hmotnosti klesá k 2–3 %. Umístěna jsou v intraperitoneální oblasti ve vazbě na pravou bránicí [7].

Játra se podílejí na řadě fyziologických funkcí, mezi něž patří intermediární a energetický metabolismus, tvorba a vylučování žluči, biotransformace xenobiotik a látek endogenního původu, vaskulární, imunitní funkce a tvorba, skladování a přeměna signálních molekul [1].

### 2.1. Morfologie jater

Jaterní tkáň je tvořena jaterními buňkami (hepatocyty), které jsou uspořádány do jaterních trámců. Jsou to sloupečky hepatocytů, které se paprscitě sbíhají k centrální véně. Mezi trámci probíhají jaterní sinusoidy (krevní kapiláry), kterými společně proudí krev z terminálních větví jaterní artérie a portální vény do centrální vény. Jaterní sinusoidy jsou tvořeny vrstvou endotelových fenestrovaných buněk. Mezi endotelovými buňkami a hepatocyty se nachází subendotelový Disseho prostor, do kterého je filtrována plazma protékající sinusoidami. Stěnu žlučové kapiláry a na ni navazujícího interlobulárního žlučového kanálku tvoří část hepatocytu, který nekomunikuje s Disseho prostorem (Obr. 1) [8].



**Obr. 1.** Jaterní lalůček a jeho uspořádání jaterních buněk, sinusoidů a žlučových cest na řezu. Převzato a upraveno z [9].

Jaterní funkce zajišťují parenchymové buňky – hepatocyty, které představují asi dvě třetiny jaterní tkáně a neparenchymové buňky, mezi které řadíme Kupfferovy buňky, Itovy buňky a endotelové buňky (Obr. 2) [1].

### 2.1.1. Hepatocyty

Hepatocyty jsou polarizované epitelové buňky. Jejich doba života je nejméně 150–200 dní a k eliminaci dochází apoptózou. Zaujímají 80 % objemu jater a 60–65 % celkového počtu jaterních buněk. Membránu hepatocytů můžeme rozdělit podle morfologie a funkce na tři části. Okolo 37 % celkového povrchu jaterních membrán tvoří **sinusoidální (bazolaterální) membrána**, která leží v Disseho prostoru a má absorpční a sekreční funkci. Zaručuje přímý kontakt mezi krví jaterních sinusoid a hepatocyty. Přibližně 15 % povrchu hepatocytu zajišťuje **kanalikulární (apikální) membrána**, která představuje exkreční pól buňky. Zbývajících 50 % se skládá z hladké intercelulární štěrbin, která je spojena s Disseho prostorem. Tato štěrbin je oddělena od kanalikulární membrány těsnými spoji („tight junctions“), které uzavírají kanalikulární lumen a brání tak návratu složek žluči do plazmy. Hepatocyty obsahují dále „gap junction“, které vytváří spoje mezi přilehlými hepatocyty a tím usnadňují intercelulární výměnu cAMP,  $Ca^{2+}$ , inositoltrifosfátu, glutathionu, vody, sacharidů, nukleotidů, aminokyselin, mastných kyselin, léků, karcinogenů [7].

### 2.1.2. Endotelové buňky

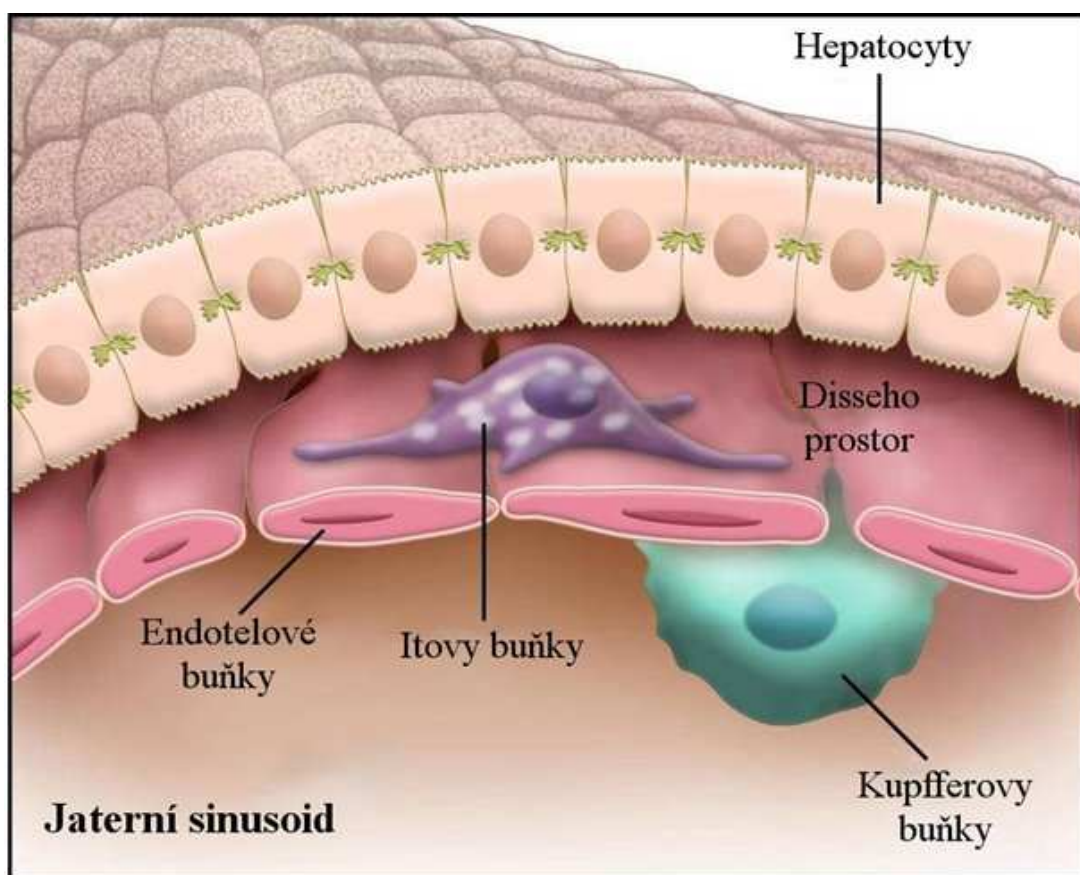
Endotelové buňky tvoří největší část z neparenchymových buněk. Představují důležitou bariéru mezi krví a hepatocyty, významně se podílejí na vychytávání malých částic a makromolekul z oběhu a mají mimořádnou schopnost endocytózy [1].

### 2.1.3. Kupfferovy buňky

Jedná se o hvězdicovité makrofágy, které patří do mononukleárního fagocytárního systému. Jsou lokalizovány na endoteliální výstelce jaterních sinusoid a jejich nejdůležitější funkcí je fagocytóza. Mezi další funkce těchto buněk řadíme pinocytózu, tvorbu signálních produktů (např. cytokiny, erytropoetin), proteinů nebo enzymů a vychytávání toxinů, antigenů, protilátek a purinů [7].

### 2.1.4. Itovy buňky

Itovy buňky jsou hvězdicovité útvary Disseho prostoru obsahující aktin, myozin a kontraktilní proteiny, které mohou být aktivovány endotelinem-1 a substancí P. V těchto buňkách je skladováno velké množství lipidů a retinoidů. Po poškození Itoových buněk dochází ke ztrátě tukových kapének, které proliferují a migrují do perivenózního prostoru (do okolí centrální vény) a tím přispívají k rozvoji jaterní fibrózy a cirhózy [1].



**Obr. 2.** Uspořádání jaterních a sinusoidálních buněk. Převzato a upraveno z [10].

## 2.2. Jaterní funkce

Játra jsou nejaktivnější metabolickou tkání v těle, kde dochází k metabolismu sacharidů, lipidů a proteinů. Mezi nemetabolické funkce řadíme tvorbu a sekreci žluči, imunitní, zásobní, endokrinní funkce, hemokoagulaci, biotransformaci, detoxikaci, exkreci, tvorbu a zánik erytrocytů [8].

### 2.2.1. Metabolické funkce

Játra hrají hlavní roli v regulaci metabolismu sacharidů a udržují fyziologické koncentrace glukózy. Dochází k intermitentnímu vychytávání sacharidů, které jsou po resorpci ve střevech transportovány do jater [11]. Jsou schopna vychytat až 87 % glukózy dodanou portální krví a v případě potřeby dokážou uvolnit glukózu ze své zásoby, vyrovnat deficit a udržet fyziologickou hodnotu krevního cukru. Ke glukózové homeostáze přispívají glykogenezí, glukogenolýzou, glukoneogenezí a glykolýzou [12].

Játra řídí katabolismus LDL, VLDL a chylomikronů, sekreci enzymů, syntézu plazmatických lipoproteinů, změnu lipoproteinů, vychytávání, přeměnu a oxidaci volných mastných kyselin [11].

Funkce jater v metabolismu bílkovin spočívá v deaminaci aminokyselin potřebné pro vstup aminokyselin do citrátového cyklu a jejich konverzi na tuky a cukry. Produktem deaminace je amoniak, který je vylučován s molekulou CO<sub>2</sub> játry ve formě močoviny. V hepatocytech vznikají všechny plazmatické proteiny kromě imunoglobulinů, které se tvoří v plazmatických buňkách. V metabolismu aminokyselin dochází ke konverzi neesenciálních aminokyselin pomocí transamináz. Při zvýšené koncentraci těchto enzymů dochází k patologickým jevům např. infarktu myokardu [8].

### 2.2.2. Nemetabolické funkce

#### Endokrinní funkce

Játra vedou k udržení hormonální homeostázy a zároveň jsou hormony i ovlivňovány. Mají důležitou roli v metabolismu štítné žlázy, kde dochází ke konverzi T<sub>4</sub> (tyroxin) na T<sub>3</sub> (trijodthyronin), který je ve vazbě na plazmatické bílkoviny dopraven k cílovým tkáním. Mezi další hormony, které souvisí s játry, patří steroidní hormony, inzulin, glukagon a katecholaminy [11]. Játra se podílejí i na metabolismu vitamínu D hydroxylací cholekalciferolu na 25-hydroxykalciferol.

#### Zásobní funkce

Játra jsou rezervoárem vitamínu A, D a B<sub>12</sub>, kde jejich zásoby vystačí na několik měsíců až několik let. Zde se ukládá i nevyužité železo a měď [8].

### **Biotransformační a exkreční funkce**

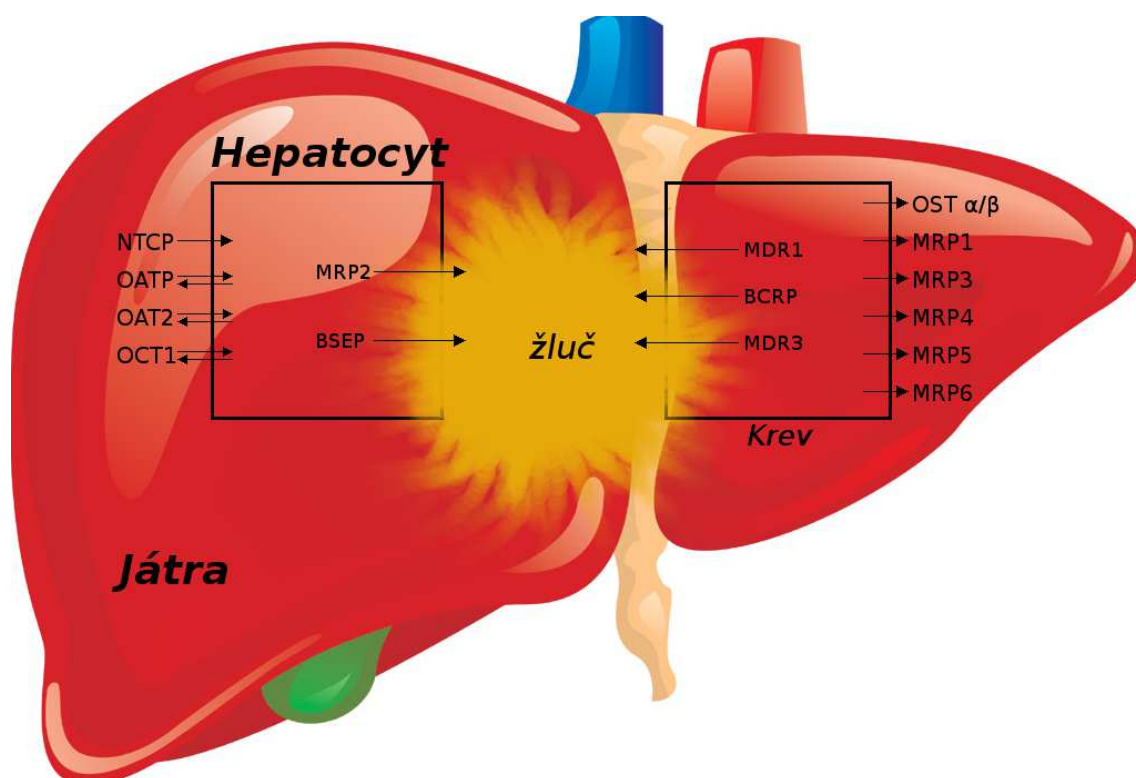
V biotransformaci toxických endogenních a exogenních látek jde ve většině případů o látky lipofilní povahy, které pro svou špatnou rozpustnost ve vodném prostředí nemohou být vylučovány ledvinami nebo žlučí [1]. K biotransformaci na polární hydrofilní látku dochází ve dvou fázích. V první fázi se uplatňují čtyři reakce – oxidace, redukce, hydratace a hydrolýza, které vedou ke zvýšení hydrofility látek. Základním enzymovým systémem, který odpovídá za eliminaci xenobiotik, je cytochrom P450. Exogenní látka nebo metabolit vzniklý v první fázi konjuguje s endogenními hydrofilními látkami – kyselinou glukuronovou, síranovým aniontem, kyselinou octovou, aminokyselinami (glycinem, glutaminem, taurinem) nebo S-adenosyl methioninem, pomocí specifických transferáz. Kyseliny konjugované produkty jsou vysoce hydrofilní a vylučují se do moči nebo žluči [11].

### **Tvorba a sekrece žluči**

Žluč je tvořena žlučovými kyselinami, cholesterolem, fosfolipidy, konjugáty bilirubinu, elektrolyty a enzymy. Má dvě důležité funkce, poskytuje exkreci látek, které nemohou být vylučovány ledvinami a podílí se na trávení a vstřebávání tuků. Tvorba žluči závisí na množství žlučových kyselin a na typu hormonů působících prostřednictvím cAMP (cyklický adenosin-3', 5'-monofosfát), které regulují sekreční funkci cholangiocyty (epitelové buňky žlučových cest). K stimulaci její produkce dochází pomocí sekretinu, glukagonu a vazoaktivního intestinálního peptidu, naopak inhibičně působí somatostatin [1]. Po vytvoření žluči v játrech se žlučovými vývody dostává do žlučníku, kde dochází k zahuštění [2]. Po příjmu potravy dochází k stahům hladké svaloviny v žlučníku, čímž stoupne tlak a žluč začne odtékat do hlavního žlučového vývodu ústícího do duodena [8].

### 3. Transportní systémy v játrech

K místu svého účinku musí léčivo prostoupit přes řadu buněčných membrán. Transport látek v játrech je umožněn buď prostou difúzí, nebo specifickými přenašeči (transportními proteiny) [13]. Transportéry hrají důležitou roli v absorpci, distribuci a eliminaci léčiv. Účastní se vychytávání, biliární exkrece a efluxu látek, tím určují jejich koncentraci v játrech a jejich vliv na farmakologický účinek a nežádoucí účinky (Obr. 3) [14].



**Obr. 3.** Transportní proteiny na membránách jaterních buněk. Převzato a upraveno z [15].

#### 3.1. Bazolaterální transportní proteiny

Na bazolaterální membráně jsou lokalizované především transportéry ze skupiny SLC („Solute carrier“). Zajišťují obousměrný transport léčiv mezi krví a hepatocyty pomocí elektrochemického potenciálu nebo iontového gradientu ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ ), který je tvořen primárními aktivními transportéry [6]. Souhrn bazolaterálních transportních proteinů, jejich symbolů genu a substrátů znázorňuje Tab. 1.

### 3.1.1. NTCP

NTCP („Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide“; Slc10A1) jako bazolaterální transportér přenáší konjugované a nekonjugované žlučové kyseliny z portální krve do hepatocytů, zprostředkované kotransportem Na<sup>+</sup> s taurocholátem. [16].

### 3.1.2. OATP

OATP („Organic anion transporting polypeptide“; SLCO1A) transportéry zodpovídají za obousměrný transport široké škály amfifilních endogenních a exogenních organických sloučenin nezávislých na Na<sup>+</sup>. Jejich zdrojem energie může být protitransport glutation-S-konjugátu, glutathionu a bikarbonátu. Tyto transportéry jsou lokalizovány v mnoha tkáních, v hematoencefalické bariéře, plicích, střevě, srdci, placentě a varlately [17]. Rodina OATP transportérů zahrnuje více než 80 členů, mezi jejich nejdůležitější zástupce patří OATP1A2 (SLCO1A2), OATP1B1 (SLCO1B1), OATP1B3 (SLCO1B3) a OATP2B1 (SLCO2B1) [18].

### 3.1.3. OAT

OAT („Organic anion transporter“; SLC22A) proteiny zajišťují obousměrný transport organických aniontů nezávislých na Na<sup>+</sup>. Hlavním transportérem lokalizovaným v játrech je OAT2 (SLC22A7). Ostatní transportéry této skupiny OAT1, OAT3, OAT4, OAT5 a OAT6 mají větší význam v ledvinách [19].

### 3.1.4. OCT

OCT („Organic cation transporter“; SLC22A) transportéry jsou obousměrnými přenašeči kationtů, přičemž hnací silou transportu je elektrochemický gradient přenášeného kationtu. Hlavní zástupce této skupiny je OCT1 (SLC22A1) protein, který vykazuje širokou tkáňovou distribuci. Vyskytuje se v epitelových buňkách a některých neuronech, exprimován je hlavně v lidských játrech. U potkanů je rozšířen v játrech, ledvinách a tenkém střevě [20].

### 3.1.5. OST $\alpha/\beta$

OST $\alpha/\beta$  („Organic solute transporter  $\alpha/\beta$ “, SLC51) transportér přenáší žlučové kyseliny ze střevních enterocytů a renálních proximálních tubulů přes bazolaterální membránu zpět do plazmy [21]. Funkce těchto proteinů není závislá na Na<sup>+</sup>. Vzhledem

k tomu, že je mechanismem transportu facilitovaná difúze, může OST $\alpha/\beta$  zprostředkovat jak uptake, tak eflux svých substrátů v závislosti na příslušném elektrochemickém gradientu [22].

### 3.1.6. MRP1, MRP3-MRP6

Tyto transportéry patří do podskupiny ABCC transportérů s lokalizací na bazolaterální membráně. Jejich hlavní úlohou je eflux metabolitů a konjugátů z hepatocytů zpět do plazmy [23]. MRP1 („Multidrug resistance-associated protein 1“; ABCC1) protein exportuje žlučové kyseliny jako taurolithocholát a taurochenodeoxycholát. MRP3 („Multidrug resistance-associated protein 3“; ABCC3) a MRP4 („Multidrug resistance-associated protein 4“; ABCC4) zajišťují exkreci žlučových kyselin do plazmy při cholestáze, kdy je jejich exprese zvýšena [24]. MRP4 protein působí ve většině tkání jako apikální transportér, bazolaterálně je prokázán v hepatocytech, prostatě a mozku [23]. Transportér MRP5 („Multidrug resistance-associated protein 5“; ABCC5) zprostředkovává transport 3',5'-cyklických nukleotidů, cAMP a cGMP (cyklický guanosin-3', 5'-monofosfát) [25]. MRP6 („Multidrug resistance-associated protein 6“; Abcc6) protein je umístěn na bazolaterální a kanalikulární membráně hepatocytů u potkanů [26]. Tento transportér nezastává důležitou roli v jaterní exkreci v druhé fázi biotransformace produktů, jelikož netransportuje typické anionické substráty. U lidí je jeho role v transportu léčiv neobjasněna, ačkoliv byly objeveny vysoké hladiny MRP6 mRNA v játrech a ledvinách [16].

Bazolaterální protein	Symbol genu	Substráty
NCTP	<i>SLCO1A1</i>	Estron-3-sulfát, taurochenodeoxycholát, tauroursodeoxycholát, sulindak, rosuvastatin, žlučové kyseliny
OATP1A2	<i>SLCO1A2</i>	Žlučové kyseliny, BQ-123, estron-3-sulfát, T3,T4, ouabain, fexofenadin
OATP1B1	<i>SLCO1B1</i>	Žlučové kyseliny, BQ-123, estron-3-sulfát, ouabain, T3,T4, bilirubin, pravastatin, rifampicin
OATP1B3	<i>SLCO1B3</i>	Žlučové kyseliny, BQ-123, digoxin, ouabain, T3,T4, bilirubin, methotrexát, sartany
OATP2B1	<i>SLCO2B1</i>	Benzylpenicilin, estron-3sulfát, digoxin, fluvastatin, pravastatin
OAT2	<i>SLC22A7</i>	Prostaglandiny, salicyláty, tetracykliny, zidovudin, probenecid, diklofenak
OCT1	<i>SLC22A1</i>	Metformin, verapamil, acyklovir, ranitidin, ritonavir
OST $\alpha/\beta$	<i>OST <math>\alpha/\beta</math></i>	Žlučové kyseliny, estron-3-sulfát, prostaglandin, digoxin
MRP1	<i>ABCC1</i>	Daunorubicin, doxorubicin, etoposid, vinkristin,
MRP3	<i>ABCC3</i>	Methotrexát, monovalentní a sulfatované žlučové kyseliny,
MRP4	<i>ABCC4</i>	Methotrexát, cAMP, cGMP, azidothymidin
MRP5	<i>ABCC5</i>	cAMP, cGMP
MRP6	<i>ABCC6</i>	BQ-123

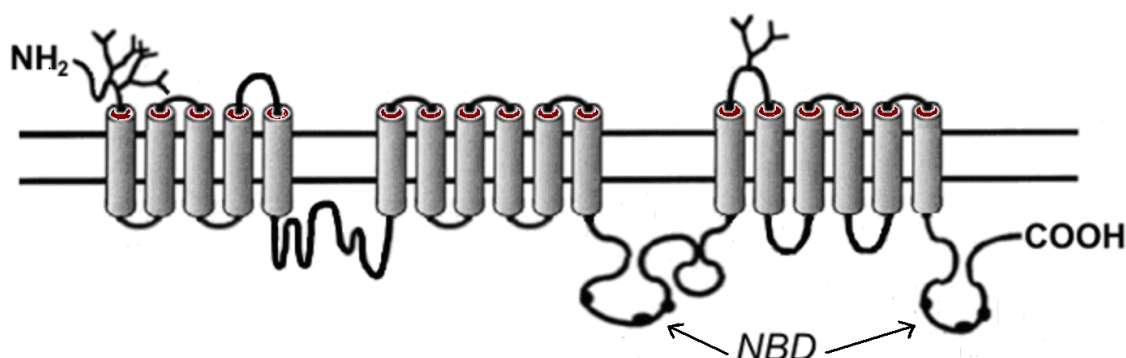
**Tab. 1.** Bazolaterální jaterní transportní proteiny a jejich substráty. BQ-123 – [cyklo {D-Trp-D-Asp-L-Pro-D-Val-L-Leu}], T3 – trijodthyronin, T4 – tyroxin, cAMP – cyklický adenosin-3',5'-monofosfát, cGMP – cyklický guanosin-3',5'-monofosfát. Převzato a upraveno z [16, 27].

### 3.2. Kanalikulární transportní proteiny

Pro eflux endogenních látek a xenobiotik z hepatocytů do žluče slouží transportní systémy lokalizované na kanalikulární membráně hepatocytů [6]. Tato exkrece je zajištěna skupinou ABC („ATP binding cassette“) transportérů [24]. Mezi efluxní proteiny patří MDR1 a MDR3 („Multidrug resistance protein 1 a 3“; ABCB1 a ABCB4), MRP2 („Multidrug resistance-associated protein 2“; ABCC2), BSEP („Bile salt export pump“; ABCB11) a BCRP („Breast cancer resistance protein“; ABCG2). Jejich funkcí je odstranění metabolitů a toxických produktů z buněk. Eflux hydrofobních, pozitivně nabitých molekul zajišťuje MDR1 a BCRP protein. Hydrofobní nenabité molekuly a ve vodě rozpustné anionické sloučeniny jsou přenášeny skupinou MRP transportérů [28]. Přehled kanalikulárních transportních proteinů, jejich symbolů genu a substrátů je zobrazen v Tab. 2.

### 3.2.1. MRP2

MRP2 („Multidrug resistance-associated protein 2“; ABCC2) protein je umístěn na kanalikulární membráně hepatocytů. Jedná se o fosfoglykoprotein, který se skládá z 1545 aminokyselin, tvořených z pěti strukturně podobných částí. Tři z nich představují transmembránové domény tvořené z šesti  $\alpha$ -helixů a další dvě intracelulární vazební domény pro nukleotidy (NBD – „Nucleotide binding domain“) (Obr. 4). Základní fyziologickou funkcí MRP2 proteinu je transmembránový přenos konjugovaných metabolitů endogenních a exogenních látek do žluči, moči a střevního lumina. MRP2 transportér představuje v játrech jeden z mechanismů tvorby žluče, která je nezávislá na sekreci osmoticky aktivních solí žlučových kyselin [13]. Mutace v jeho genu způsobuje Dubin- Johnsův syndrom, při kterém se snižuje biliární exkrece různých endogenních a exogenních sloučenin. Toto onemocnění se projevuje izolovanou hyperbilirubinémií [15].



**Obr. 4.** MRP2 transportér a jeho struktura a umístění v buněčné membráně. NBD („Nucleotide binding domain“) – vazební doména pro nukleotidy. Převzato a upraveno z [13].

### 3.2.2. BSEP

BSEP („Bile salt export pump“; ABCB11) transportér je zodpovědný za tvorbu žluče, urychluje export konjugovaných a nekonjugovaných žlučových kyselin z hepatocytu do kanalikulární oblasti a pokud dojde k jeho inhibici, může poškodit tok žluči a navodit cholestázu [27]. Mutace v jeho genu způsobí progresivní familiární intrahepatální cholestázu typu 2 (PFIC2), při které je koncentrace žlučových kyselin ve žluči < 1 % oproti normálním hladinám [16].

### 3.2.3. BCRP

BCRP („Breast cancer resistance protein“; ABCG2) protein je přítomný v mnoha tkáních – hepatocytech, tenkém a tlustém střevě, placentě, mozku, prostatě, varlatech a v žilním a kapilárním endotelu. Díky široké substrátové specifitě a tkáňové distribuci je tento protein důležitý efluxní transportér pro řadu exogenních (cytotoxická léčiva, fluorescentní barviva) a endogenních látek (kyselina listová, sulfáty, žlučové kyseliny, porfyriny) [29].

### 3.2.4. MDR1

MDR1 („Multidrug resistance protein 1“; ABCB1, P-glykoprotein) je efluxní transportér lokalizovaný na apikální membráně, který má bariérovou a exkreční funkci v mnoha tkáních (střevo, játra, ledviny, nadledviny, mozek, oko, varlata). V těchto orgánech primárně zprostředkovává buněčný eflux strukturně a farmakologicky odlišných hydrofobních sloučenin jako jsou imunosupresiva, blokátory kalciových kanálů, inhibitory HIV protéázy, srdeční glykosidy a protinádorové látky [30].

### 3.2.5. MDR3

MDR3 („Multidrug resistance protein 3“; ABCB4) protein slouží jako primární aktivní fosfolipáza, která transportuje fosfatidylcholin z hepatocytů do žluče. V eliminaci léčiv má velmi malý význam [31]. Jeho homolog u potkanů představuje transportér Mdr2.

Kanalikulární protein	Symbol genu	Substráty
MRP2	<i>ABCC2</i>	Doxorubicin, cisplatina, vinkristin, etoposid, glibenklamid, indometacin, methotrexát, pravastatin, glutathion, LTC4 aj.
BSEP	<i>ABCB11</i>	Konjugované a nekonjugované žlučové kyseliny
BCRP	<i>ABCG2</i>	Daunorubicin doxorubicin, methotrexát
MDR1	<i>ABCB1</i>	Indinavir, ritonavir, aldosteron, dexamethason, digoxin, foxofenadin, vinblastin, takrolimus, etoposid, doxorubicin, cyklosporin A, methotrexát aj.
MDR3	<i>ABCB4</i>	Fosfolipidy

**Tab. 2.** Kanalikulární jaterní transportní proteiny a jejich substráty. LTC4 – leukotrien C4. Převzato a upraveno z [16].

## 4. Cholestáza

Cholestáza je porucha sekrece a toku žluče a následně neschopnost organismu dodat z jater do duodena dostatečné množství žluče. Tím dochází ke kumulaci potenciálně toxických látek v játrech a jejich následné systémové cirkulaci. Normální tvorba žluče závisí na funkci membránových transportních systémů v hepatocytech, cholangiocytech a enterocytech [32]. Poruchy tvorby žluče mohou být lokalizovány od jaterní buňky, přes primární žlučovody a vývodné žlučové cesty, až po Vaterovu papilu. Je-li překážka v játrech, poruchu označujeme jako intrahepatální (hepatocelulární nebo cholangiocelulární). Pokud je příčina mimo játra, jedná se o extrahepatální cholestázu [33]. Jednoznačně dominují cholestázy extrahepatální, přičemž největší část tvoří maligní onemocnění, na druhém místě je cholelithiáza (přítomnost žlučových kamenů ve žlučníku nebo žlučových cestách). Jednou z velmi častých příčin cholestázy jsou septické stavy (až 50 %), následují polékové cholestázy (přibližně 10 %), dále virové a autoimunitní hepatitidy (5–7 %) [3].

Cholestázu dělíme do čtyř velkých skupin:

- **nezánětlivé cholestázy** – intrahepatální cholestáza těhotných, cholestáza při parenterální výživě, paraneoplastická cholestáza nebo podání hormonů a léků
- **zánětlivé cholestázy** – cholestatická virová hepatitida, alkoholická cholestáza
- **cholestázy při poškození žlučvodů** – primární biliární cirhóza, primární sklerotizující cholangitida, syndrom mizejících žlučvodů
- **mechanické cholestázy** – vyvolány tumory, konkrementy [33].

### 4.1. Mechanismus cholestázy

Cholestáza je stav charakterizovaný částečnou nebo úplnou zástavou toku žluče v důsledku obstrukce žlučových cest. V závislosti na intenzitě a době jejího trvání může být vyvoláno vážné poškození organismu, způsobené jaterní a následně systémovou kumulací toxických látek typu žlučových kyselin a bilirubinu [33]. Jako kompenzace se aktivují spontánní anticholestatické obranné mechanismy, které zmírňují stav pomocí částečného přesměrování exkrece daných látek z jater do ledvin. Podstata tohoto procesu je ve změně exprese, funkce a lokalizace odpovědných transportních proteinů především v játrech a ledvinách [4].

## 4.2. Klinický a laboratorní obraz cholestázy

Mezi příznaky cholestázy patří ikterus, který má zelenožlutý až černý odstín způsobený zvýšenou hladinou konjugovaného bilirubinu. Nápadným klinickým projevem bývá pruritus, který je navozen zvýšenou plazmatickou koncentrací žlučových kyselin. Stolice je obvykle acholická, moč bývá tmavá díky přítomnosti urobilinogenu a bilirubinu, ale při úplné obstrukci žlučových cest se urobilinogen v zažívacím traktu nevytváří, proto je v moči negativní. V oblasti oční, ušní, palmární nebo na předloktích mohou být přítomny xantomy jako depozita cholesterolu.

V séru dochází ke zvýšení hladin konjugovaného a celkového bilirubinu a ke zvýšení aktivity cholestatických enzymů ALP (alkalická fosfatáza) a GGT (gama-glutamyltransferáza). Zvyšují se také jaterní enzymy ALT (alaninaminotransferáza) a AST (aspartátaminotransferáza), hladiny cholesterolu a žlučových kyselin [33].

## 4.3. Extrahepatální cholestáza

Během obstrukce žlučových cest, ve kterých dochází ke zvýšení tlaku a jejich dilataci, dochází k přestupu konjugované žluče do systémové cirkulace a k množství komplexních poruch, které jsou ve velké míře závislé na stupni a délce trvání cholestázy. Při dlouhodobějším trvání této poruchy dochází k porušení hepatocytů. Po zvýšení tlaku ve žlučovodech se žluč dostává do oběhu jak přes lymfatické řečiště, tak paracelulárním tokem mezi hepatocyty. Možný je i přenos vakuolami přes hepatocyty, ve kterých dochází k velké produkci oxidu dusného. Mění se také morfologie a funkce mitochondrií, tight junction a endoplazmatického retikula. Nejčastěji se extrahepatální cholestáza objevuje u tumorů pankreatu, cholelitiázy, cholangiogenních tumorů obturujících terminální část žlučovodu, stenóz a tumorů Vaterovy papily [34]. V experimentální části byla po dobu 28 dnů navozena obstrukce (sekundární biliární cirhóza), kdy se zaznamenal kompletní vývoj cholestázy a fibrózy a byly zjištěny biochemické změny [35]. Sekundární biliární cirhóza je důsledkem chronické extrahepatální cholestázy, kde dochází k poškození jater při procesech, které zhoršují průtok žluči žlučovody [36].

#### 4.4. Intrahepatální cholestáza

Intrahepatální cholestáza má několik příčin, především je to porucha metabolismu nebo transportu žlučových kyselin. Primární forma tohoto onemocnění se vyskytuje bez předešlého onemocnění jater např. u sepse, kdy lipopolysacharidy zvyšují cytokiny a oxid dusnatý. Sekundární forma poukazuje na prodělané nebo přítomné jaterní onemocnění [37].

Mezi nejčastěji se vyskytující cholestázy patří PBC (Primární biliární cirhóza) a PSC (Primární sklerózující cholangitida). PBC je nepurulentní destruktivní zánětlivé onemocnění interlobulárních a septálních intrahepatálních žlučovodů [38]. Jedná se o autoimunitní onemocnění neznámé etiologie. U řady pacientů lze prokázat antigeny HLA-B8 („Human leukocyte antigen“), HLA-DR3 nebo HLA-DR4, které jsou typické pro jiné autoimunitní onemocnění. Ve více než 90 % jsou postiženy ženy mladšího a středního věku. Příznaky intrahepatální cholestázy progredující k jaterní cirhóze zahrnují úporné svědění, kožní xantomy, sekundární hypercholesterolemii, portální hypertenzi, osteopénii a malabsorpci tuků, liposolubních vitaminů a kalcia. Již v časném stádiu onemocnění dochází ke zvýšení alkalické fosfatázy a gamaglutamyltransferázy, aktivita aminotransferáz je relativně nižší. Koncentrace bilirubinu v séru je dlouhou dobu v normě, později stoupá konjugovaný bilirubin. Charakteristickým nálezem je přítomnost AMA („Antimitochondrial antibodies“), které se zaměřují proti dehydrogenázám 2-oxokyselin [39].

PSC je chronické onemocnění jater charakterizované zánětem a fibrózou žlučových cest, které vedou k nepravdělné obliteraci žlučových cest. Tato progresivní porucha se vyvíjí k následné cirhóze jater a jaternímu selhávání. Mezi symptomy PSC patří pruritus, únava, ztráta hmotnosti, střídání tělesných teplot a bolest v abdominální oblasti [40]. Hodnoty ALT a AST se pohybují v normě, bilirubin, ALP a GGT se zvyšují [41]. U tohoto onemocnění jsou detekovány ANA („Antinuclear antibodies“), pANCA („Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies“) a SMA („Smooth muscle antibodies“) protilátky.

V mnoha případech dojde k cholestáze následkem inhibice transportních proteinů samotnými léčivy nebo jejich metabolity [32]. Mezi léčiva, která způsobují cholestázu, patří ACE inhibitory,  $\beta$ -blokátory, benzodiazepiny, cyklosporin A, erytromycin, ketokonazol, sulfonamidy, warfarin aj. K cholestatickému působení léčiv dochází pomocí tří mechanismů:

- hypersenzitivní reakcí spouštějící neadekvátní odpověď proti jaterní tkáni a spojenou s přítomností sérových autoprotilátek vyvolávající imunoalergickou hepatitidu (např. neuroleptika, některá antibiotika)
- přímým poškozením žlučových (např. 5-floxuridin, sporidesmin)
- selektivní interferencí léku s transportními proteiny sinusoidální a apikální membrány hepatocytu (např. cyklosporin A, rifampicin) [33].

Sepse vzniká působením endotoxinu na kanalikulární membránové transportéry. Nejčastěji ji doprovází pneumonie, endokarditidy, pyelonefritidy, a intraabdominální infekce. Je způsobena bakteriálními toxiny gramnegativních bakterií, které indukují prozánětlivé cytokiny IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$ . Bakteriální toxiny a indukované prozánětlivé působky snižují expresi jaterních transportérů zejména MRP2, NTCP a BSEP. Endotoxin zvyšuje expresi adhezivních molekul na bazolaterální straně hepatocytu, přičemž dochází k infiltraci portálních polí zánětlivými buňkami. Zároveň se zvyšuje produkce vazodilatačně působícího oxidu dusnatého a indukuje se NO-syntáza [33].

Alkohol je nejfrekventovanější příčinou vyvolání cholestázy, kde se vyskytuje v několika případech žloutenka, značící těžkou formu nemoci [37]. Nadměrné užívání alkoholu s poškozením jater je doprovázeno endotoxémií v portálním i systémovém řečišti, přičemž s přímým působením alkoholu dochází k aktivaci Kupfferových buněk. Ta vede k produkci prozánětlivých cytokinů. Alkohol též přímo inhibuje transportéry pro žlučové kyseliny na bazolaterální membráně hepatocytů.

Incidence těhotenské intrahepatální cholestázy (ICP) není příliš vysoká. Její příčina je komplexní nebo dědičná. Dochází k poškození plodu díky hromadění žlučových kyselin v systémové cirkulaci matky, ty jsou transportovány přes placentární bariéru a kumulovány v plodové vodě. Následně dochází k negativně chronotropnímu působení, srdeční arytmii či srdeční zástavě plodu a zvýšení citlivosti myometria na oxytocin [33].

#### 4.5. Terapie cholestázy

Jediná účinná léčba cholestázy spočívá v podání **ursodeoxycholové kyseliny (UDCA)** [3]. Jedná se o hydrofilní látku, která ochraňuje buněčné membrány před detergentním účinkem toxických, hydrofobních žlučových kyselin. Zlepšuje klinické projevy, laboratorní parametry, používá se u cholestatických jaterních chorob, jako jsou poléková poškození, primární sklerozující cholangitida, alkoholické nebo virové onemocnění s cholestatickým průběhem a těhotenská cholestáza [42]. Prostřednictvím

základního terapeutického účinku UDCA se mění složení žluče, dochází ke zvýšení obsahu hydrofilních žlučových kyselin, což vede k poklesu toxického poškození epitelu žlučových cest, poklesu retence žlučových kyselin v hepatocytech a k inhibici apoptózy. Významně také působí na složení smíšených micel bohatých na fosfolipidy, čímž zabraňuje přímému kontaktu žluče s cholangiocyty. Dochází ke stimulaci exprese transportérů BSEP, MDR3, MRP2, fosforylaci proteinových nosičů a proteinových kináz a fosfatáz. UDCA je silným agonistou nukleárních receptorů PXR („Pregnane X receptor“) a FXR („Farnesoid X receptor“) [3].

Mezi další možnosti používané v terapii cholestázy patří **fenobarbital**, který je silný aktivátor jaderného receptoru CAR („Constitutive androstane receptor“). Stimuluje translokaci CAR z cytoplazmy do jádra, kde působí na jadernou transkripci. Jeho vedlejší účinky jako je sedace a tvorba neaktivních metabolitů vitamínu D, omezuje jeho dlouhodobé klinické použití.

V léčbě cholestatických onemocnění především intrahepatální cholestázy u těhotných bývá podáván **S-adenosyl-L-methionin (SAME)**. Jeho účinky jsou antioxidantní, zlepšuje membránovou fluiditu a facilitaci sulfatace  $17\beta$ -estradiolu, čímž se brání cholestatickému působení [34].

**Bezafibrát** je agonistou PPAR- $\alpha$  („Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ “) receptoru, čímž dochází ke zvýšení exprese MDR3 proteinu na kanalikulární membráně a exkreci fosfolipidů do žluče. Bezafibrát zvyšuje tvorbu micel s hydrofobními žlučovými kyselinami a snižuje plazmatické koncentrace ALP, GGT a žlučových kyselin [43].

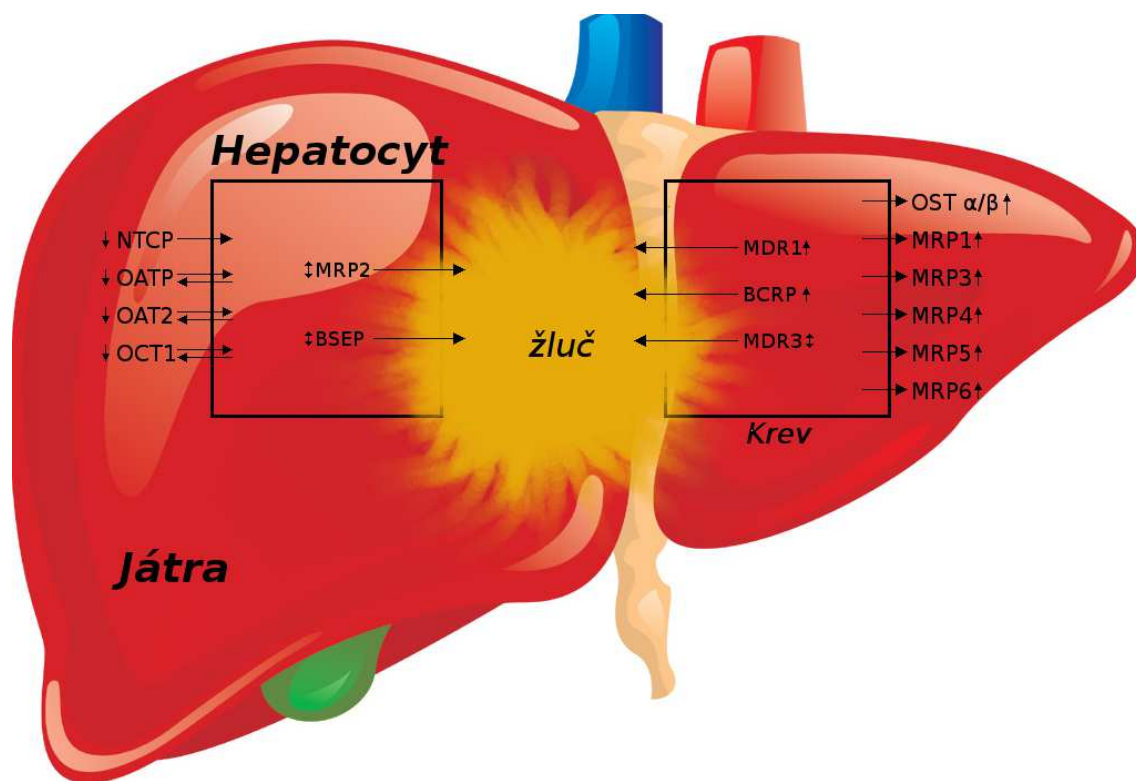
Silný inhibitor lidského CYP7A **rifampicin** blokuje syntézu žlučových kyselin a zvyšuje exkreci konjugátů žlučových kyselin s glukuronidy do moče. Indukcí CYP3A4 rovněž stimuluje  $6\alpha$ -hydroxylaci žlučových kyselin. Po jeho podávání se zvyšuje exprese CYP3A4 a MRP2 mRNA, která je regulována nukleárním receptorem PXR. Rifampicin se úspěšně používá při pruritu u dětí i dospělých. Dlouhodobá léčba je omezena jeho nežádoucími účinky – hepatotoxicitou, zvýšeným rizikem tvorby žlučových konkrementů, snížením hladiny 25-OH-cholekalCIFerolu a rizikem vzniku rezistentních bakteriálních infekcí [3].

## 5. Jaterní transportní systémy a cholestáza

Některé zvířecí modely experimentální cholestázy a některé cholestatické onemocnění jater u lidí mají společné schéma adaptivních odpovědí zahrnující změny exprese transportních proteinů. Tato odpověď chrání hepatocyty před retencí toxických biliárních látek především bilirubinu a žlučových kyselin. Adaptivní změny zahrnují down-regulaci bazolaterálních transportních proteinů pro import látek doprovázený up-regulací bazolaterálních efluxních systémů. Snížená exprese bazolaterálních transportérů byla prokázána u lidí s chronickým cholestatickým onemocněním (Obr. 5) [44].

Hladiny MDR1 a MDR3 transportérů jsou zvýšené u pacientů s obstrukční cholestázou, přičemž současně dochází ke zvýšení koncentrace sérového bilirubinu a alkalické fosfatázy [45]. Exprese BSEP a MDR3 proteinů je vysoce regulována nukleárním receptorem FXR, čímž dochází k jejímu zachování [46]. U PBC (Primární biliární cirhóza) je exprese MDR3 proteinu zachována [45]. Snížená exprese proteinu MRP2 se vyskytuje jen u některých pacientů ve čtvrtém stádiu PBC, u ostatních stádií této nemoci je zachována [44]. Exprese BCRP je zvýšena u pacientů s PBC.

Expese NTCP a OATP1B1 transportních proteinů je snížena u pacientů s extrahepatální biliární atrezií [45], pozdních stádií PBC, PFCI2 (Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 2) a PFCI3 (Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 3), PSC (Primární sklerotizující cholangitida) a ikterické cholestázy vyvolané zánětem. Toto platí rovněž pro transportér OATP1B1. Snížená exprese OATP1B3 proteinu se vyskytuje u PFIC1 (Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 1) a PFIC2 [46]. Expese transportérů NTCP, OATP2B1, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 a OAT2 je snížena díky TNF- $\alpha$  a IL-6 na primárních lidských hepatocytech. U některých proteinů jako NTCP a OATP1B1 dochází k down-regulaci na úrovni proteinu, zatímco u NTCP, OAT2, OCT1 je současně redukována jejich transportní aktivita [47]. Expese bazolaterálních efluxních transportních proteinů MRP1, MRP3, MRP4, MRP5 je zvýšena v posledním stádiu PBC. Podobně se i exprese MRP3 a MRP4 proteinů zvyšuje při PFIC3. Expese MRP3 transportéru se zvyšuje i u biliární atrezie a biliární obstrukce, sekundárně u karcinomu žlučových cest a pankreatu [44]. OST $\alpha/\beta$  protein je up-regulován u cholestatických onemocnění, především u PBC. Tento transportér je regulován nukleárním proteinem FXR a jeho eflux je řízen vzestupem koncentrace žlučových kyselin v játrech. [46].



Obr. 5. Anticholestatická obranná reakce. Převzato a upraveno z [15].

## **6. Zadání diplomové práce – cíle práce**

Cílem této diplomové práce bylo ověření cholestatického poškození jater navozené podvazem žlučovodu v trvání 28 dní u potkanů pomocí analýzy exprese efluxních jaterních transportních proteinů (Bsep, Bcrp, Mrp2, Mdr1, Mdr2, Mrp3, Mrp4) na úrovni mRNA a proteinu.

## 7. Experimentální část

### 7.1. Chemikálie

Primární myší polyklonální protilátky C219, M2III5 a BXP-21 zaměřeny na detekci Mdr1 (180 – 190 kDa), Mrp2 (170 – 180 kDa) a Bcrp (70 kDa) byly získány od Signet Laboratories, Inc. (Dedham, MA, USA). Primární králičí polyklonální protilátky anti-Mrp4 a anti-Mdr2 pro detekci Mrp4 (150 kDa) a Mdr2 (170 kDa) byly zakoupeny od Abcam plc (Cambridge, UK). Primární myší polyklonální protilátka M<sub>3</sub>II-21 pro detekci Mrp3 (180 – 190 kDa) byla zajištěna od Alexis Corporation (Lausen, Switzerland) a protilátka anti-Bsep pro zjištění Bsep (160 kDa) byla získána od Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA). Králičí polyklonální protilátka anti- $\beta$ -actin (42 – 45 kDa) byla zakoupena od Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO) jako kontrola pro Western blot. Sekundární protilátka značená křenovou peroxidázou (ovčí protilátka proti myším IgG) byla získána od GE Healthcare (Praha, ČR). Králičí protilátka značená sekundární křenovou peroxidázou proti kozímu IgG byla pořízena z Pierce Biotechnology (Rockford, USA). Všechny ostatní reagens a chemikálie byly zakoupeny od firem Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a Bio-Rad Laboratories (Herkules, CA, USA).

### 7.2. Pokusná zvířata

V experimentální části byli použiti laboratorní potkani kmene Wistar o výchozí hmotnosti 280 – 320 g (SPF („Specific pathogen free“), Anlab, Praha, Česká republika). Podstatou *in vivo* studie bylo navození cholestatického poškození jater – obstrukční cholestázy (resp. biliární cirhózy) po dobu trvání 28 dnů u potkanů obstrukcí ductus choledochus implantovanou zaslepenou sondou, která byla vyvedena do podkoží břišní stěny.

Laboratorní zvířata byla rozdělena do dvou skupin po šesti jedincích v každé skupině:

- a) Sham – kontrolní skupina sham operovaných potkanů za stejných podmínek bez obstrukce
- b) BDO – potkani s obstrukcí ductus choledochus.

Během operace byl zvířatům jednorázově podán pentobarbital, celkové anestetikum v dávce 50 mg/kg i.p. Laboratorní potkani byli umístěni za daných podmínek (světelný režim 12 hod tma + 12 hod světlo, teplota vzduchu  $22 \pm 2$  °C) v Centrálním viváriu

Lékařské fakulty, kde měli volný přístup ke krmivu a vodě. Etická komise Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové schválila všechny potřebné experimenty, které se uskutečnily v souladu s pokyny uvedenými ve vyhlášce č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Po skončení experimentu byla zvířata usmrcena exsanguinací a ihned byla jejich játra vyjmuta. Poté došlo k jejich zchlazení tekutým dusíkem a uložení při -80 °C.

### 7.3. qRT-PCR

Analýza genové exprese Bsep, Mrp2, Mdr1a, Mdr1b, Bcrp, Mdr2, Mrp3 a Mrp4 byla provedena metodou qRT-PCR s použitím Applied Biosystems 7500 HT Fast Real-Time PCR systému (Foster City, USA). RNA byla získána ze vzorků potkaních jater za použití TRI reagentu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) pomocí přístroje QIAcube (QIAGEN, USA). Použitím spektrofometru NanoDrop ND-1000 (BioTech a.s., ČR) byla stanovena koncentrace RNA měřením absorbance při 260 nm a její čistota poměrem absorbance při 260 a 280 nm. Následně byla RNA přepsána do cDNA za použití High Capacity cDNA Reverse Transcription KITu (Applied Biosystems, Foster City, USA). Do reakce bylo napipetováno 50 ng analyzované DNA. Cílená amplifikace každého vzorku byla stanovena v triplicátech použitím TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mixu a Taq-Man<sup>®</sup> Gene Expression Assay mixu pro Bsep (Abcb11, Rn00582179\_ml), Mrp2 (Abcc2, Rn00563231\_ml), Mdr1a/b (Abcb1a/b, Rn00591394\_ml/Rn00561753\_ml), Bcrp (Abcg2, Rn00710585\_m1), Mdr2 (Abcb4, Rn00562185\_ml), Mrp3 (Abcc3, Rn00589786\_ml) a Mrp4 (Abcc4, Rn01465702\_ml), které byly zakoupeny od Applied Biosystems (Foster City, USA). Teplotně časový profil byl: 95 °C po dobu 180 s; 40 cyklů: 95 °C po dobu 7 s, 60 °C po dobu 25 s. Za použití dvou referenčních genů GAPDH (Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) (4352338E, Applied Biosystems, Foster City, USA) a Ywhaz (Tyrosin 3-monooxygenáza/ tryptofan 5-monooxygenáza aktivující protein, zeta polypeptid) (GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, ČR) byla provedena normalizace pomocí geNorm podle [48]. Exprese každého vzorku byla získána podle již dříve popsaného postupu [49]. Data byla stanovena geometrickým průměrem exprese GAPDH a Ywhaz a následným porovnáním normalizovaných dat byla určena relativní exprese mezi kontrolní a cholestatickou skupinou.

## 7.4. Western blot

Plazmatická membrána z jaterních homogenátů byla připravena podle již dříve publikovaného postupu [50]. Játra byla homogenizována ve vychlazeném pufriu (1 ml) tvořeného z 10 mmol/l Tris-HCl a 250 mmol/l sukrozy, pH 7,6, který obsahoval inhibitory proteáz: 2 mg/ml aprotininu, 0,5 mg/ml leupeptinu a 0,5 mg/ml pepstatinu za použití homogenizátoru MagNA Lyser (Roche Diagnostics GmbH, Německo) po dobu  $2 \times 15$  s při 6500 rpm. Poté proběhla centrifugace homogenátů (3000 g, 4 °C, 10 min), přičemž byl získán supernatant, ve kterém byla zjištěna koncentrace celkového proteinu metodou BCA (BCA Protein Assay kit, Pierce, Rockford, IL, USA) a vzorky byly uchovány při -80 °C.

Homogenáty (100 µg proteinu na jamku) byly inkubovány se vzorkovým pufrem (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) při pokojové teplotě po dobu 30 min a byly odděleny na SDS-PAGE polyakrylamidovém gelu o koncentraci 7,50 % pro Bcrp a pro ostatní proteiny o koncentraci 6,25 %. Proteiny byly přeneseny na polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu (GE Healthcare, Praha, ČR), kde na zbylé vazebné kapacity membrány byla blokována laktoglobuliny po dobu jedné hodiny v 5 % roztoku odtučněného mléka v TRIS pufriu (0,05 % Tween 20) (TBS-T). Membrány byly inkubovány s primární protilátkou po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě v těchto koncentracích: C219, M2III5, M<sub>3</sub>II-21, anti-Mdr2 a BXP-21 1:500; anti-Mrp4 1:1000 a anti-Bsep 1:500. Po promytí membrány 3x v roztoku TBS-T následovala inkubace se sekundární protilátkou při pokojové teplotě po dobu jedné hodiny v následujících koncentracích: ovčí protilátka značená sekundární křenovou peroxidázou proti myššímu IgG 1:1000 pro C219, M2III5 a M<sub>3</sub>II-21, 1:500 pro BXP-21, pro anti-Bsep 1:2000 a králičí protilátka proti kozímu IgG 1:5000 pro anti-Mrp4 a 1:500 pro anti-Mdr2. Po opětovném promytí v roztoku TBS-T byla provedena detekce pomocí chemiluminiscenčního činidla (ECL kit, Amerham-Pharmacia, Buckinghamshire, Velká Británie). Obraz získaný vyvoláním filmu (Hyperfilm, Amerham-Pharmacia, Buckinghamshire, Velká Británie) byl naskenován kalibrovaným denzitometrem ScanMaker i900 (UMAX, Praha, ČR) s následnou kvantifikací softwarem QuantityOne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Jako endogenní kontrola bylo stanovení β-actinu (koncentrace 1 : 5000, koncentrace sekundární ovčí protilátky proti myššímu IgG 1 : 8000).

## 7.5. Statistická analýza

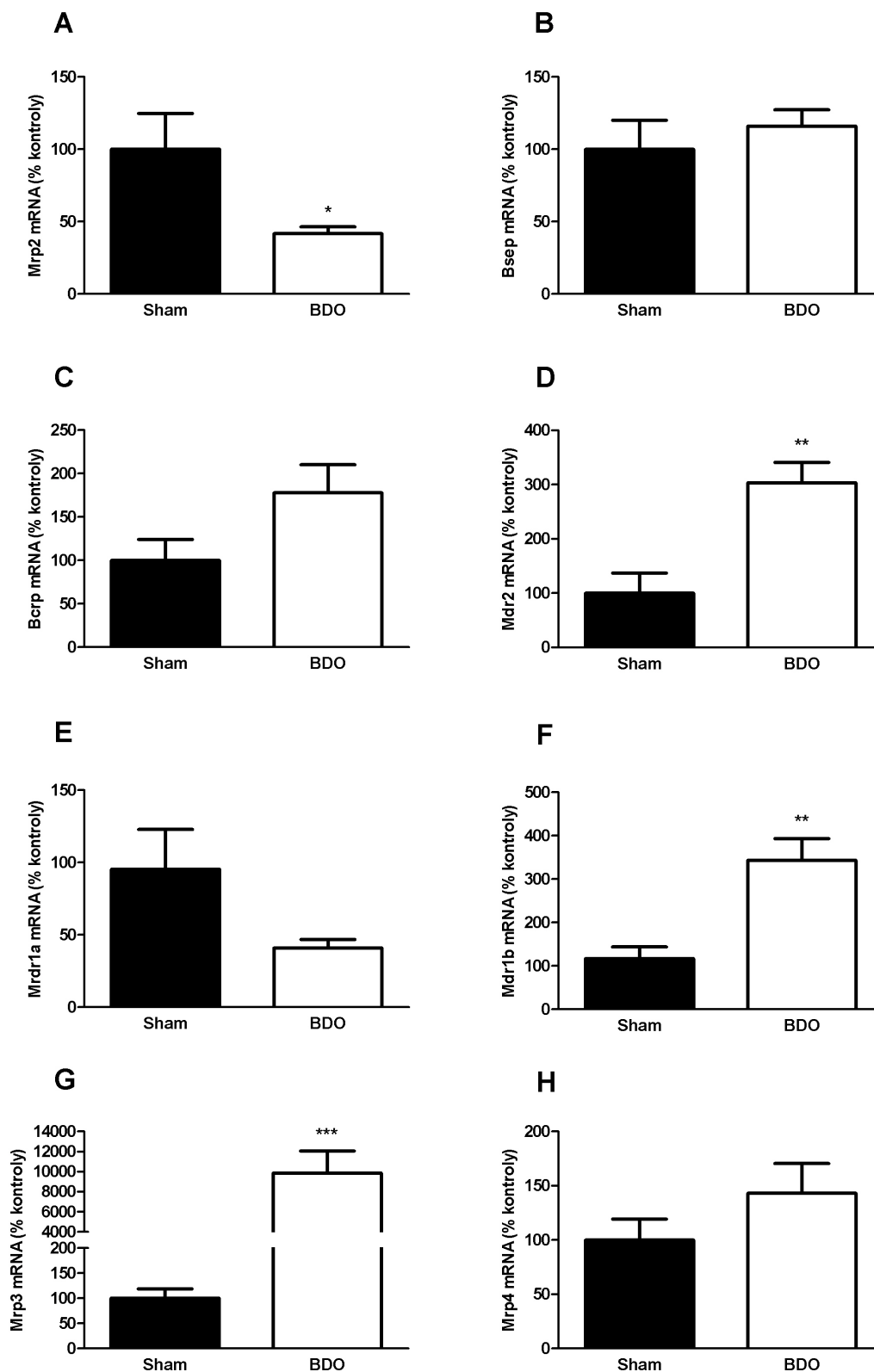
Vyjádření výsledků odpovídá průměru  $\pm$  SEM (střední chyba průměru), přičemž v každé skupině bylo 6 zvířat. Statistické hodnocení bylo provedeno nepárovým t-testem za použití GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, Kalifornie). Hodnota  $p < 0,05$  je považována za statisticky signifikantní.

## 8. Výsledky

Hodnoty exprese transportních proteinů Mrp2, Bsep, Bcrp, Mdr1, Mdr2, Mrp3 a Mrp4 u Sham-operovaných zvířat a zvířat BDO s podvazem žlučovodu byly stanoveny metodami qRT-PCR a Western blot a jejich výsledky byly zaznamenány (Obr. 6 a 7).

### 8.1. qRT-PCR

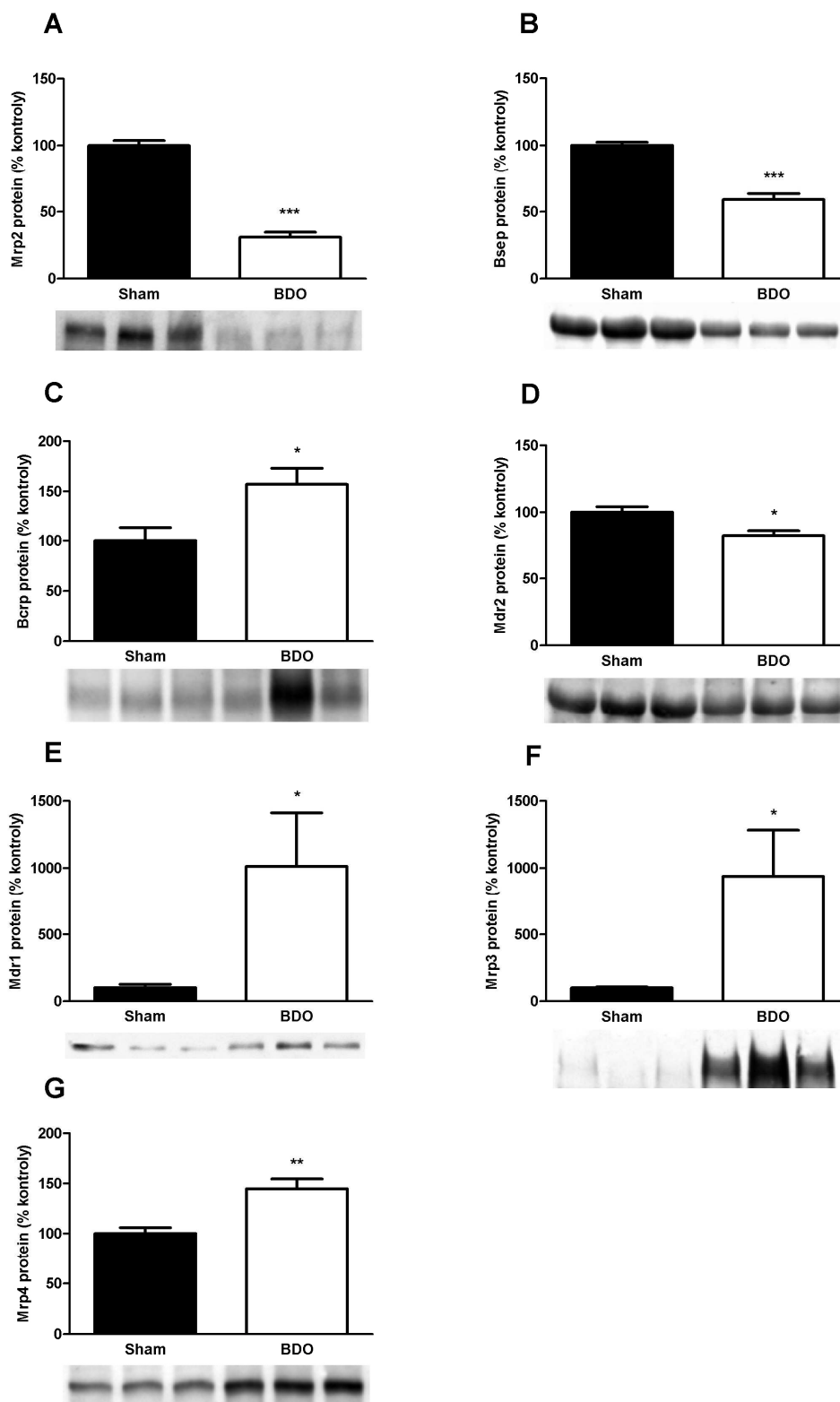
Změny exprese transportních proteinů na úrovni mRNA stanovené metodou qRT-PCR zobrazuje (Obr. 6). Ke statisticky významnému zvýšení exprese na úrovni mRNA došlo ve skupině BDO u Mdr2 na 303 %, Mdr1b na 340 % a Mrp3 na 9900 % v porovnání s kontrolní skupinou. Naopak ke snížení exprese mRNA došlo u Mrp2 transportéru na 42 %. Změny hladiny Bsep, Bcrp, Mdr1a a Mrp4 mRNA nebyly statisticky významné.



**Obr. 6. Expres transportních proteinů na úrovni mRNA stanovena metodou qRT-PCR.** Hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako % kontroly (průměr ± SEM, n = 6). Sham, kontrolní skupina sham operovaných zvířat bez obstrukce; BDO, zvířata s obstrukcí ductus choledochus. Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 8.2. Western blot

Výsledky exprese vybraných efluxních transportních proteinů stanovených metodou Western blotu zobrazuje (Obr. 7). Ve skupině BDO došlo k významnému snížení exprese proteinu u Mrp2 na 31 %, Bsep na 59 % a Mdr2 na 82 % v porovnání se Sham skupinou. Naopak byla exprese významně zvýšena u proteinů Bcrp na 160 %, Mdr1 na 1010 %, Mrp3 na 940 % a Mrp4 na 140 % v porovnání s kontrolní skupinou.



**Obr. 7. Expres transportních proteinů stanovena na úrovni proteinu metodou Western blot.** Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly (průměr ± SEM, n = 6). Sham, kontrolní skupina sham operovaných zvířat bez obstrukce; BDO, zvířata s obstrukcí žlučového. Reprezentativní obrázek Western blotu umístěný pod každým grafem obsahuje 6 bandů – první 3 (zleva) představují náhodně 3 vybraná zvířata ze Sham skupiny, druhé 3 bandy jsou 3 zvířata náhodně vybraná ze skupiny BDO. Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 9. Diskuze

Cholestáza je porucha tvorby a vylučování žluči, která vede k neschopnosti organismu dodat do duodena dostačující množství žluče. Cholestatických onemocnění v posledních letech významně přibývá. Vzdůstá počet hormonálně podmíněných cholestáz v klimakteriu a dochází i k nárůstu polékových poškození i cholestáz provázejících zánětlivá onemocnění. Rovněž přibývají chronická cholestatická onemocnění PBC (Primární biliární cirhóza) a PSC (Primární sklerózuující cholangitida). Na počátku je řada cholestatických změn reverzibilní, při dlouhodobém trvání cholestázy dochází k rozsáhlému poškození funkce hepatocytů. Poté onemocnění progreduje a může končit ireverzibilním poškozením jater až jaterním selháním.

Příčina extrahepatální cholestázy leží mimo játra a je klinickým syndromem doprovázející četná onemocnění jater [33]. Obstrukční cholestáza představuje přibližně 70 % všech cholestatických onemocnění, z nichž největší část tvoří malignity, na druhém místě je cholelithiáza. Léčba spočívá v chirurgickém odstranění příčiny obstrukce, která ale nezabrání rozvíjející se sepsi a poškození jaterní tkáně.

Během obstrukční cholestázy dochází ke kumulaci jednotlivých složek žluče, především žlučových kyselin a bilirubinu. Zvýšená hladina těchto látek poškozuje jaterní tkáň, což vede k tvorbě reaktivních kyslíkových sloučenin. Naproti tomu, zvýšená plazmatická hladina bilirubinu působí protektivně proti vzniklému oxidačnímu stresu v játrech. Reakcí na hromadění látek je redukce kanalikulární exkrece, naopak dochází ke zvýšení exprese bazolaterálních efluxních transportérů. V této diplomové práci byl sledován vliv obstrukční cholestázy navozené podvazem žlučovodu v trvání 28 dnů a jeho vliv na jednotlivé transportní proteiny.

V této práci byla pozorována snížená hladina Mrp2 na úrovni mRNA i proteinu, což je způsobeno endocytózou proteinu z kanalikulární membrány a eventuálně proteolýzou v lysozomech a/nebo inhibicí přepisu samotného genu snížením aktivity transkripčních faktorů. Zároveň dochází k obranné reakci s cílem zamezit možnosti transportu žluče přes kanalikulární membránu a její následné vyloučení do duodena [13]. Exprese kanalikulárního Mdr2 proteinu je regulována žlučovými kyselinami, které ovlivňují sekreci fosfolipidů do žluče [51]. Exprese Mdr2 proteinu je během cholestázy zvýšena díky přenosu fosfatidylcholinu, který podporuje tvorbu smíšených micel s následnou ochranou před škodlivým detergentním působením žlučových kyselin na okolní tkáň [31]. V této práci pozorována snížená exprese Mdr2 proteinu by mohla být

vysvětlena sníženou biliární exkrecí fosfolipidu, která vede k nízkofosfolipidové cholestáze [52]. Zvýšená exprese bazolaterálních transportních proteinů Mrp3 a Mrp4 představuje alternativní cestu pro vylučování bilirubinu a žlučových kyselin z jater a její následnou eliminaci ledvinami.

Změny exprese hepatobiliárních transportních systémů na úrovni proteinu mohou být primární příčinou cholestázy, nebo sekundárním důsledkem adaptivních změn exprese transportérů [44]. Jako primární příčinu cholestázy lze změny exprese transportérů popisovat u dědičných forem onemocnění (např. progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 2 - mutace BSEP transportéru, Dubin-Johnson syndrom – mutace MRP2). V této studii byly prokázány změny exprese transportérů jako odpověď na retenci toxických biliárních látek bilirubinu a žlučových kyselin. Aktivuje se spontánní anticholestatická odpověď hepatocytů zahrnující snížení exprese kanalikulárních transportních efluxních transportérů Mrp2, Mdr2 a Bsep společně s adaptačním zvýšením exprese transportních proteinů Bcrp, Mdr1, Mrp3 a Mrp4. Následně dochází ke zvýšené expresi renálních transportérů pro vychytávání a exkreci látek v primárních proximálních tubulech [44][53]. Všechny tyto změny na úrovni jater a ledvin jsou navozené kompenzačním mechanismem, který je alternativní cestou exkrece pro kumulující se žlučové kyseliny a bilirubin v organismu. Ke kompenzaci dochází aktivací spontánní anticholestatické obranné reakce, která zmírňuje stav pomocí částečného přesměrování exkrece daných látek z jater do ledvin [4].

Mezi základní molekuly, které regulují transkripci genů kódujících proteiny zapojené v hepatobiliárních transportních procesech, syntéze a detoxikaci žlučových kyselin, patří transkripční faktory FXR („Farnesoid X receptor“), PXR („Pregnane X receptor“), CAR („Constitutive androstane receptor“) a PPAR- $\alpha$  („Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ “), na které se během cholestázy vážou zadržované biliární látky (žlučové kyseliny, bilirubin). Důležitým receptorem spontánní anticholestatické obranné reakce je FXR, který zodpovídá za transkripční regulaci všech transportních proteinů zapojených do homeostázy žlučových kyselin a bilirubinu. Jejich kumulace v těle vede prostřednictvím FXR ke snížení jejich syntézy a urychlení močové exkrece [54][55]. FXR aktivovaný žlučovými kyselinami reguluje expresi kanalikulárních transportních proteinů Bsep a Mrp2. Exprese Mrp3 a Mrp4 je regulována transkripčním receptorem CAR. PXR reguluje transportér Mdr1 a Mdr2 transportní protein je ovlivněn transkripčním faktorem PPAR- $\alpha$  [16].

## 10. Závěr

Cílem předložené diplomové práce bylo ověřit navozené cholestatické poškození jater u potkanů analýzou exprese transportních jaterních proteinů (Bsep, Bcrp, Mrp2, Mdr1, Mdr2, Mrp3, Mrp4) pro eflux látek na úrovni mRNA a proteinu.

Pro kompletní představu o změnách exprese transportérů u obstrukční cholestázy na úrovni mRNA a proteinu byly použity metody qRT-PCR a Western blot.

Výsledky prokazují obraz charakteristický pro obstrukční cholestázu. Byla potvrzena snížená exprese kanalikulárních proteinů – Mrp2 a Bsep. Dále byla prokázána zvýšená exprese proteinů Mrp3 a Mrp4 na bazolaterální membráně hepatocytu a Mdr1b a Bcrp proteinů lokalizovaných na kanalikulární membráně. mRNA exprese kanalikulárního Mdr2 transportéru byla zvýšená, nicméně na úrovni proteinu bylo pozorováno snížení exprese.

Závěrem lze konstatovat, že při obstrukční cholestáze navozené podvazem žlučovodu došlo ke snížení exprese transportních proteinů na kanalikulární membráně hepatocytů, kde dochází k efluxu endogenních látek a xenobiotik z hepatocytů do žluče. Naopak exprese bazolaterálních transportérů, kterých hlavní úlohou je eflux metabolitů a konjugátů z hepatocytů zpět do plazmy, byla zvýšená, což vede ke kompenzaci eliminace kumulujících se bilárních látek jako jsou žlučové kyseliny nebo bilirubin.

## 11. Použitá literatura

1. EHRMANN J a HŮLEK P. Funkce jater. *Hepatology*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2010a, s. 25-35.
2. WILHELM Z a HEGYI P. Fyziologie jater. *Praktické lékařství*. 2007, **3**: 242-245.
3. MAREČEK Z. Farmakoterapie jaterní cholestázy. *Remedia*. 2007, **17**: 316-322.
4. LEE J a BOYER JL. Molecular alterations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders. *Semin Liver Dis*. 2000, **20**: 373-384.
5. BRANDONI A, HAZELHOFF MH, BULACIO RP a TORRES AM. Expression and function of renal and hepatic organic anion transporters in extrahepatic cholestasis. *World J Gastroenterol*. 2012, **18**: 6387–6397.
6. MAEDA K a SUGIYAMA Y. Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2008, **23**: 223-235.
7. KUNTZ E a KUNTZ HD. Morphology of the liver. *Hepatology*. 3. vyd. Wurzburg : Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008a, s. 16-33.
8. ŠVÍGLEROVÁ J a SLAVÍKOVÁ J. Játra. *Fyziologie gastrointestinálního traktu*. 1: vyd. Praha: Karolinum, 2008, s. 51-65.
9. GULEC SA, SZTEJNBERG ML, SIEGEL JA, JEVREMOVIC T a STABIN M. Hepatic structural dosimetry in (90) Y microsphere treatment: A Monte Carlo modeling approach based on lobular microanatomy. *J Nucl Med*. 2010, **51**: 301-310.
10. IJZER J. General introduction, scope and aids. *Liver fibrosis and regeneration in dogs and cats: An immunohistochemical approach*. Houten: Atalanta Drukwerkbemiddeling, 2008, s. 7-31.
11. KUNTZ E a KUNTZ HD. Biochemistry and functions of the liver. *Hepatology*. 3. vyd. Wurzburg : Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008b, s. 36-76.
12. RADDATZ D a RAMADORI G. Carbohydrate metabolism and the liver: Actual aspects from physiology and disease. *Z Gastroenterol*. 2007, **45**: 51-62.
13. FUKSA L, MIČUDA S, CERMANOVÁ J, BRČÁKOVÁ E a ŠTAUD F. Fyziologická funkce MRP2. *Československá fyziologie*. 2006, **55**: 57-65.
14. SHITARA Y, HORIE T a SUGIYAMA Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci*. 2006, **27**: 425-446.

15. ZOLLNER G a TRAUNER M. Molecular mechanisms of cholestasis. *Wien Med Wochenschr.* 2006, **156**: 380-385.
16. CHANDRA P a BROUWER KLR. The complexities of hepatic drug transport: Current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res.* 2004, **21**: 719-735.
17. HAGENBUCH B a MEIER PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.* 2004, **447**: 653-665.
18. HAGENBUCH B. Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007, **21**: 209-221.
19. SEKINE T, MIYAZAKI H a ENDOU H. Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008, **290**: 251–261.
20. KOEPESEL H, LIPS K a VOLK C. Polyspecific organic cation transporters: Structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res.* 2007; **24**: 1227-1251.
21. RAO A, HAYWOOD J, CRADDOCK AL, BELINSKY MG, KRUEH GD a DAWSON PA. The organic solute transporter  $\alpha$ - $\beta$ , Ost $\alpha$ -Ost $\beta$ , is essential for intestinal bile acid transport and homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA A.* 2008, **105**: 3891–3896.
22. KOSTERS A a KARPEN SJ. Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica.* 2008, **38**: 1043-1071.
23. ABLA N, CHINN LW, NAKAMURA T, LIU L, HUANG CC, JOHNS SJ, KAWAMOTO M, STRYKE D, TAYLOR TR, FERRIN TE, GIACOMINI KM a KROETZ DL. The human multidrug resistance protein 4 (MRP4, ABCC4): Functional analysis of a highly polymorphic gene. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008, **325**: 859-868.
24. ALREFAI WA a GILL RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res.* 2007, **24**: 1803-1823.
25. MEYER ZU SCHWABEDISSEN HEU, GRUBE M, HEYDRICH B, LINNEMANN K, FUSCH CH, KROEMER HK a JEDLITSCHKY G. Expression, localization, and function of MRP5 (ABCC5), a transporter for cyclic nucleotides, in human placenta and cultured human trophoblasts. *Am J Pathol.* 2005, **166**: 39-48.

26. SCHEFFER GL, HU X, PIJNENBORG ACLM, WIJNHOLDS J, BERGEN AAB a SCHEPER RJ. MRP6 (ABCC6) detection in normal human tissues and tumors. *Lab Invest.* 2002, **82**: 515-518.
27. FUNK C. The role of hepatic transporters in drug elimination. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008, **4**: 363-379.
28. LU H a KLAASSEN C. Gender differences in mRNA expression of ATP-binding cassette efflux and bile acid transporters in kidney, liver, and intestine of 5/6 nephrectomized rats. *Drug Metab Dispos.* 2008, **36**: 16-23.
29. STAUD F a PAVEK P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol.* 2005, **37**: 720-725.
30. MICUDA S, BRČAKOVA E, FUKSA L, CERMANOVA J, OSTERREICHER J, HROCH M, MOKRY J, PEJCHAL J, MARTINKOVA J a STAUD F. P-glycoprotein function and expression during obstructive cholestasis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008, **20**: 404-412.
31. MEIER Y, PAULI-MAGNUS CH, ZANGER UM, KLEIN K, SCHAEFFELER E, NUSSLER AK, NUSSLER N, EICHELBAUM M, MEIER PJ a STIEGER B. Interindividual variability of canalicular ATP-Binding-Cassette (ABC) – transporter expression in human liver. *Hepatology.* 2006, **44**: 62-74.
32. WAGNER M, ZOLLNER G a TRAUNER M. New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *J Hepatol.* 2009, **51**: 565-580.
33. EHRMANN J a HŮLEK P. Jaterní symptomy. *Hepatologie.* 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2010b, s. 139-230.
34. EHRMANN J a HŮLEK P. Choroby žlučníku a žlučových cest. *Hepatologie.* 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2010c, s. 533-569.
35. VIEIRA EK, BONA S, DI NASO FC, PORAWSKI M, TIEPPO J a MARRONI NP. Quercetin treatment ameliorates systemic oxidative stress in cirrhotic rats. *ISRN Gastroenterol.* 2011, **2011**: 1-6.
36. DÍTĚ P a kol. *Vnitřní lékařství.* 2. vyd. Praha: Galen, 2007, s. 586.
37. KUNTZ E a KUNTZ HD. Cholestasis. *Hepatology.* 3. vyd. Wurzburg : Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008c, s. 235-250.
38. LATA J. Primární biliární cirhóza. *Interní Med.* 2006, **1**: 6-8.
39. HORÁK J a VAŇÁSEK T. PBC (primární biliární cirhóza) PSC (primární sklerozující cholangitida). *Doporučený postup České hepatologické společnosti ČLS JEP.* 2010, **1**: 4-12.

40. EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL clinical practice guidelines: Management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol.* 2009, **51**: 237-267.
41. EHRMANN J a HŮLEK P. Autoimunitní postižení jater. *Hepatologie.* 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2010d, s. 533-569.
42. BRŮHA R. Hepatoprotektiva. *Klin Farmakol Farm.* 2006, **20**: 154-157.
43. NAKAMUTA M, FUJINO T, YADA R, YASUTAKE K, YOSHIMOTO T, HARADA N, YADA M, HIGUCHI N, KATO M, KOHJIMA M, TAKETOMI, A.; MAEHARA Y, NISHINAKAGAWA T, MACHIDA K, MATSUNAGA K, NAKASHIMA M, KOTOH K a ENJOJI M. Therapeutic effect of bezafibrate against biliary damage: A study of phospholipid secretion via the PPARalpha-MDR3 pathway. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2010, **48**: 22-28.
44. ROMA MG, CROCENZI FA a SÁNCHEZ POZZI EA. Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clin Sci (Lond).* 2008, **114**: 567-588.
45. TRAUNER M, MEIER PJ a BOYER JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl Med.* 1998, **339**: 1217-1227.
46. BOYER JL. New perspectives for the treatment of cholestasis (Lessons from basic science applied clinically). *J Hepatol.* 2007, **46**: 365-371.
47. VEE ML, LECUREUR V, STIEGER B a FARDEL O. Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  or interleukin-6. *Drug Metab Dispos.* 2009, **37**: 685-693.
48. VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE a SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002, **3**: 1-11.
49. RADILOVA H, LIBRA A, HOLASOVA S, SAFAROVA M, VISKOVA A, KUNC F a BUNCEK M. COX-1 is coupled with mPGES-1 and ABCC4 in human cervix cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 2009, **330**: 131-40.
50. BRČAKOVA E, FUKSA L, CERMANOVA J, KOLOUCHOVA G, HROCH M, HIRSOVA P, MARTINKOVA J, STAUD F a MICUDA S. Alteration of methotrexate biliary and renal elimination during extrahepatic and intrahepatic cholestasis in rats. *Biol Pharm Bull.* 2009, **32**: 1978-85.

51. FRIJTERS CHMG, OTTENHOFF R, VAN WIJLAND MJA, VAN NIEUWKERK CMJ, GROEN AK a ELFERINK PJO. Regulation of mdr2 P-glycoprotein expression by bile salts. *Biochem J.* 1997, **321**: 389-395.
52. ROSMORDUC O a POUPON R. Low phospholipid associated cholelithiasis: association with mutation in the MDR3/ABCB4 gene. *Orphanet J Rare Dis.* 2007, **2**: 29.
53. TANAKA Y, KOBAYASHI Y, GABAZZA EC, HIGUCHI K, KAMISAKO T, KURODA M, TAKEUCHI K, IWASA M, KAITO M a ADACHI Y. Increased renal expression of bilirubin glucuronide transporters in a rat model of obstructive jaundice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002, **282**: 656-662.
54. FIORUCCI S, RIZZO G, DONINI A, DISTRUTTI E a SANTUCCI L. Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends Mol Med.* 2007, **13**: 298-309.
55. ZOLLNER G a TRAUNER M. Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *Br J Pharmacol.* 2009, **156**: 7-27.