

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program

Chirurgie

**Modelové cholestatické poškození jater potkana a
možnosti jeho ovlivnění**

Cholestatic Liver Disease in a Rat Model and the Possibilities for its Control

MUDr. Lukáš Kohoutek

Školitel: doc. MUDr. RNDr. Milan Kaška, Ph.D.

Školitel konzultant: doc. MUDr. Halka Lotková, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

Obhajoba dne:

Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 30. 6. 2018

podpis autora

Poděkování

Své poděkování za cenné rady a připomínky v průběhu mého doktorského studia bych na tomto místě chtěl adresovat původnímu školiteli prof. MUDr. Alexandru Ferkovi, CSc. a novému stávajícímu školiteli a předsedovi oborové rady doc. MUDr. RNDr. Milanu Kaškovi, Ph.D. a v neposlední řadě bych připojil své poděkování doc. MUDr. Halce Lotkové, Ph.D. za její ochotu a vstřícnost při nesčetných konzultacích a odborných radách v průběhu celého studia.

Děkuji i doc. MUDr. Karlu Havlíčkovi, CSc. za jeho prvotní impulz, kterým mě dovedl k postgraduálnímu vzdělávání, a mé rodině, která mi po celou dobu studia vytvářela podmínky a prostor k jeho realizaci. Děkuji doc. MUDr. Jaroslavu Pilnému, Ph.D. za jeho odborné postřehy a spolupráci při tvorbě některých odpublikovaných článků.

Poděkování rovněž náleží i mým kolegům chirurgům, kteří ochotně během mého studia v době mé nepřítomnosti na pracovišti nahrazovali moji absenci.

Obsah

Úvod.....	12
1.1 Játra – morfologické a funkční základy.....	13
1.2 Žlučové cesty.....	19
1.2.1 Intrahepatální žlučové cesty.....	19
1.2.2 Extrahepatální žlučové cesty.....	20
1.3 Žluč.....	23
1.3.1 Složení žluči.....	23
1.3.2 Tvorba žluči.....	24
1.3.3 Regulace sekrece žluči.....	28
1.3.4 Funkční význam žluči.....	29
1.4 Cholestáza.....	29
1.4.1 Mechanizmy cholestatického poškození jater.....	30
1.4.2 Adaptační mechanizmy na cholestázu.....	34
1.5 Možnosti zmírnění rozvoje cholestatického poškození jater.....	36
1.6 Modely cholestázy v experimentu.....	41
1.6.1 Intrahepatální cholestáza.....	41
1.6.2 Extrahepatální cholestáza.....	43
2 Cíle práce.....	45
2.1 Hodnocení míry jaterního cholestatického poškození v závislosti na dávce a době podávání fluvastatinu.....	45
2.2 Hodnocení mechanismů účinků fluvastatinu na změny navozené cholestázou.....	45
3 Metodické postupy.....	47
3.1 Laboratorní zvířata.....	47
3.1.1 Hodnocení příjmu potravy u potkanů.....	47
3.1.2 Hodnocení změny tělesné hmotnosti potkanů.....	47

3.1.3	Operační zákroky	47
3.1.4	Aplikace léků.....	48
3.1.5	Ukončení pokusu.....	48
3.2	Biochemická vyšetření séra	48
3.2.1	Stanovení aktivity ALT a AST.....	48
3.2.2	Stanovení aktivity GGT	48
3.2.3	Stanovení aktivity ALP	49
3.2.4	Stanovení aktivity CK	49
3.2.5	Stanovení koncentrace bilirubinu.....	49
3.2.6	Stanovení koncentrace albuminu	49
3.2.7	Stanovení koncentrace malondialdehydu.....	49
3.3	Stanovení produkce cytokinů	50
3.3.1	Stanovení koncentrace cytokinů v séru.....	50
3.3.2	Stanovení koncentrace cytokinů v játrech.....	51
3.4	Měření celkového obsahu glutationu v játrech.....	53
3.5	Hodnocení respirační aktivity jaterních mitochondrií	53
3.6	Stanovení obsahu proteinů.....	54
3.7	Stanovení exprese genů v játrech	54
3.8	Jaterní histologie.....	54
3.9	Statistické metody.....	55
4	Výsledky	56
4.1	Hodnocení míry jaterního cholestatického poškození v závislosti na dávce a době podávání fluvastatinu.....	56
4.1.1	Vliv podávání fluvastatinu v dávce 1 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 1 týdne	

4.1.2	Vliv podávání fluvastatinu v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 1 týdne	62
4.1.3	Vliv podávání fluvastatinu v dávce 1 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 2 týdnů	66
4.2	Hodnocení účinků fluvastatinu na změny navozené cholestázou.....	70
4.2.1	Vliv fluvastatinu na oxidační stres provázející cholestázu	70
4.2.2	Vliv fluvastatinu na produkci prozánětlivých a profibrogenních cytokinů při cholestáze.....	75
4.2.3	Vliv fluvastatinu na funkci mitochondrií při cholestáze	78
4.2.4	Hodnocení exprese vybraných transportérů na sinusoidální a kanalikulární membráně.....	79
4.2.5	Histologické nálezy	81
4.3	Souhrn výsledků	83
5	Diskuze	85
	Závěr.....	92
	Použitá literatura	93

Použité zkratky

a.	Arterie
aa.	Arteriae
AE2	Anion exchanger 2
ALP	Alkalická fosfatáza
ALT	Alaninaminotransferáza
Apod.	A podobně
Aj.	A jiné
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter
ATP	Adenosintrifosfát
AQP 1	Aquaporin 1
AQP 4	Aquaporin 4
AQP 8	Aquaporin 8
BDL	Bile duct ligation (Potkani s podvazem choledochu bez fluvastatinu)
BDL + FLU	Potkani s podvazem choledochu léčeni fluvastatinem
BSEP	Bile salt export pump
CA	Kyselina cholová
Ca ²⁺	Kationt vápníku
CAR	Constitutive androstane receptor
CD	Cluster of differentiation
CDCA	Kyselina chenodeoxycholová
cDNA	Komplementární kyselina deoxyribonukleová
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane regulator

CH ₃ skupina	Metylová skupina
CK	Kreatinkináza
Cl ⁻	Aniont chlóru
CNS	Centrální nervová soustava
CYP	Cytochrom P450
DCA	Kyselina deoxycholová
EBM	Evidence based medicine
ECM	Extracelulární matrix
ERCP	Endoskopická retrográdní cholangiopankreatikografie
Fas	Protein ze skupiny TNF proteinů
FGF15	Fibroblast growth factor 15 (u myši)
FGF19	Fibroblast growth factor 19 (u lidí)
FGFR4	Fibroblast growth factoring receptor 4
FXR	Farnesoid X receptor
GCDCA	Kyselina glykochenodeoxycholová
GGT	Gamma-glutamyltransferáza
GSH	Glutation
GSSG	Glutation disulfid
HCO ₃ ⁻	Bikarbonát
HSC	Hepatic stellate cells
IL	Interleukin
LAP	Kontrolní potkani s laparotomií
LAP + FLU	Kontrolní potkani s laparotomií a s fluvastatinem
LCA	Kyselina lithocholová
LSP	Lipopolysacharid
MDA	Malondialdehyd

MDR3	Multidrug resistance protein 3
MPT	Mitochondrial permeability transition
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRP2	Multidrug-resistance-associated protein 2
Na ⁺	Sodíkový kationt
NTCP	Natrium-Taurocholate co-transporting polypeptide
OATP	Organic anion-transporting polypeptide
OST	Organic Solute Transporter
PBS	Primární biliární skleróza
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PPAR α	Peroxisome proliferator-activated receptor
PTC	Perkutánní transhepatická cholangiografie
PXR	Pregnane X receptor
ROS	Reactive oxygen species
SULT2A1	Dehydroepiandrosteron sulfotransferáza
TBA	Kyselina thiobarbiturová
TGF- β	Transforming growth factor beta
Tj.	To je
TLR	Toll like receptors
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRAIL	TNF-related apoptosis-including ligand
UDCA	Kyselina ursodeoxycholová
UDP	Uridindifosfát
UGT2B4	UDP-glukuronosyl-transferáza 2B4
UGT2B7	UDP-glukuronosyl transferáza 2B7

v.	Vena
vv.	Venae
VDR	Vitamin D receptor
VIP	Vasoactive intestinal peptide
ŽK	Žlučové kyseliny

Úvod

U pacientů s obstrukční žloutenkou podstupujících operační zákrok je riziko septických komplikací, které jsou také příčinou zvýšené morbidity a letality těchto nemocných. Extrahepatální biliární obstrukce indukuje řadu změn, které vyúsťují v jaterní poškození. Experimentálně bylo prokázáno, že jaterní poškození navozené cholestázou je provázené oxidačním stresem a poklesem obsahu glutationu v játrech, respektive poklesem antioxidační kapacity jater. Přerušení enterohepatálního oběhu žlučových kyselin navozuje zvýšení střevní propustnosti a podporuje portální *endotoxémii*. Experimentálně navozená cholestáza je provázena dysfunkcí mononukleárního fagocytárního systému, respektive Kupfferových buněk a hypersenzitivitou k endotoxinu. Vyvíjí se výrazná prozáněťová reakce se zvýšenou produkcí cytokinů a orgánovým poškozením. Endotoxémie a následná systémová záněťová reakce vedou k prohloubení cholestatického poškození jater.

Významný podíl na rozvoji cholestatického poškození jater má oxidační stres, který může mít podíl i na mitochondriální dysfunkci. Přerušení enterohepatálního oběhu žlučových kyselin navozuje zvýšení propustnosti a podporuje portální endotoxémii. Vyvíjí se výrazná prozáněťová reakce se zvýšenou produkcí cytokinů a orgánovým poškozením. Endotoxémie a následná systémová záněťová reakce vedou ke zhoršení cholestatického poškození jater. U pacientů podstupujících operační zákrok je za těchto podmínek zvýšené riziko septických komplikací.

Literárně dostupné experimentální studie z předchozích let zaměřené na možnost zmírnění rozvoje jaterního poškození navozeného cholestázou sledovaly zejména účinek látek s antioxidačním působením. Jejich výsledky však nebyly přesvědčivé. Studium protizáněťově a imunosupresivně působících látek přineslo slibnější závěry, avšak problémem pro využití v klinické praxi může být možnost jejich nežádoucích imunosupresivních účinků.

Z tohoto pohledu se určitým příslibem staly látky s potenciálním vlivem na aktivitu Kupfferových buněk, neutrofilů a následně produkci záněťových cytokinů. Statiny jsou v klinické praxi používány jako hypolipidemika, ale roste množství informací o jejich protizáněťových a antiproliferativních účincích, což by mohlo vést

k rozšíření spektra jejich využití. Cílem práce bylo ověřit, zda by mohly být i vhodnými léky bránícími rozvoji jaterního onemocnění, jehož mechanismus spočívá v oxidačním a zánětovém poškození, a do jaké míry se na tomto případném účinku může podílet doba podávání a dávka podávané látky. Vzhledem k závažnosti problematiky rozvoje komplikací u chirurgických pacientů s cholestázou se očekávané výsledky jevíly jako vhodný předpoklad pro další práce sledující etiopatogenezu těchto komplikací a postupy při jejich léčbě.

1.1 Játra – morfologické a funkční základy

Játra jsou u dospělého člověka uložena v pravém podbráničním prostoru a částečně svým levým lalokem přesahují střední čáru směrem doleva. Játra jsou anatomicky rozdělena na čtyři části, pravý a levý lalok, *lobus dexter et sinister* (tyto dva laloky jsou rozděleny průběhem vazy *ligamentum falciforme hepatis*), *lobus caudatus* a *lobus quadratus*. Dále je můžeme rozdělit na 8 segmentů dle Couinauda, který respektuje anatomické rozložení jaterních žil (Müller, 1997). Játra naléhají svými plochami na jedné straně k bránici, kde popisujeme tzv. *facies diaphragmatica*, a druhou stranou tzv. *facies visceralis* jsou přivrácena k orgánům dutiny břišní, se kterými jsou ve velmi úzkém vztahu. Viscerální stěna jater je rozdělena dvěma sagitálními čarami, pravou a levou a příčně ji dělí tzv. *porta hepatis*. Součástí *ligamentum hepatoduodenale* je *arteria hepatica propria*, *vena portae* a *ductus hepaticus communis*.

Povrch jater je téměř celý pokryt vrstvou peritonea – *tunica serosa*, existuje však místo přechodu *facies diaphragmatica* k *facies visceralis*, které vrstvou peritonea není kryto, nazývá se *area nuda*. Vrstva peritonea je k játrům samotným připojena pomocí *tela subserosa*, což je tenká vrstva vaziva, která spojuje *tunica serosa* a *tunica fibrosa*, neboli *capsula Glissoni*. Jedná se o pevný vazivový povrch jaterní tkáně, který prostupuje jako vazivová septa mezi jednotlivými hepatocyty (Čihák et al., 2002).

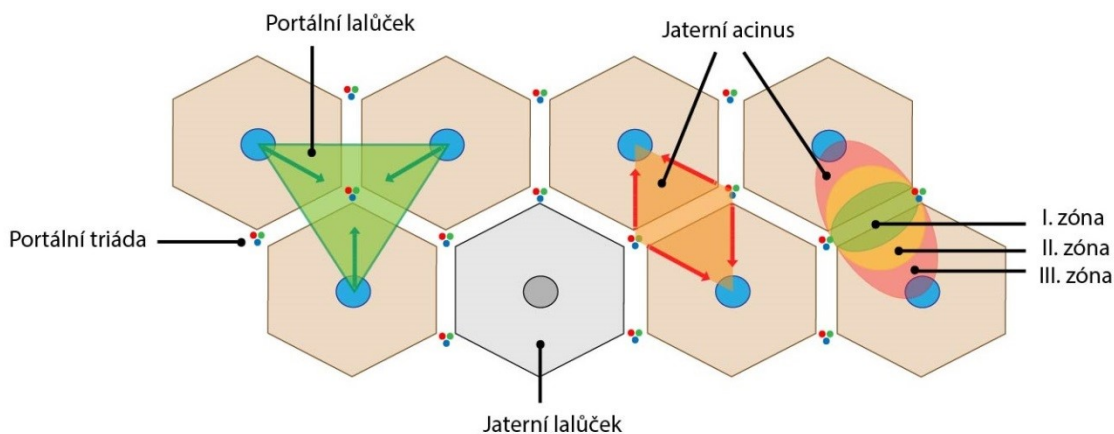
Společnými cestami od *ligamentum hepatoduodenale* až k jaternímu parenchymu prochází a větví se *arteria hepatica propria* a *vena portae*. Z prvních větveních těchto velkých kmenů vznikají *arteriae (aa.) et venae (vv.) interlobulares*, tyto struktury nalézáme v portobiliárních prostorech jako *trias hepatica* (Martini et al.,

2012). Dalším větvením se rozdělují tři příčné větve k sousedícím jaterním lobulům jako *aa. et vv. circumlobulares*. Z těchto cév již vycházejí arterioly a venuly do jednotlivých jaterních lobulů a vstupují do jaterních sinusoid. V centru každého lalůčku vstupují do *vena centralis lobuli*. Tímto se formuje odtokový žilní systém z jater, jednotlivé *vv. centrales* se spojují ve větší *vv. sublobulares* a dále ve *vv. hepaticae*. Ty poté opouštějí játra a vstupují většinou ve dvou žilách z pravého laloku a jedné žíle z levého laloku přímo do *vena cava inferior*.

Složení extracelulární matrix (ECM) v játrech není za fyziologických podmínek homogenní. Pouzdro, septa, prostory provázející cévy a žlučové kanálky jsou bohaté na kolagen typu I, III, V, fibronektin (Schuppan, 1990), zatímco Disseho prostor obsahuje především kolagen typu IV, VI, laminin a fibronektin. Za patologických podmínek, které indukují fibrotizaci jater, se tvoří depozita kolagenu III a I, a to i v Disseho prostoru, což narušuje výměnu látek mezi krví a hepatocyty (Poli, 2000).

Vzhledem ke komplexní struktuře jater je obtížné definovat základní jednotku jater odpovědnou za jaterní funkce (Ehrmann et al., 2010). Existují dva pohledy na definování základní jaterní struktury - morfologický a funkční. Z morfologického hlediska tvoří základ jaterní lalůček - *lobulus*. Je situován kolem jaterní žíly – *v. centralis* a je složený z trámců jaterních buněk uspořádaných odstředivě kolem centrální žíly (Obr. 1). Trámce obsahují dvě vrstvy hepatocytů, mezi nimiž jsou žlučové kanálky, které vyúsťují do terminálních žlučovodů uložených v septech mezi sousedními lalůčky. Krev je do jater přiváděna *v. portae* a *a. hepatica*, jejich terminální větve jsou rovněž v septech. Terminální žlučovody, terminální portální venuly a terminální jaterní arterioly tvoří v septech již zmiňovanou *portální triádu*. K jednotlivým hepatocytům rozvádějí krev jaterní sinusy, které jsou lemovány endotelovými buňkami a jaterními makrofágy – Kupfferovými buňkami. Prostor mezi sinusy a hepatocyty je označován jako Disseho prostor.

Při užití funkčního hlediska k určení základní jaterní jednotky se vychází z krevního zásobení hepatocytů *jaterní* krví a základní jednotku tvoří *portální acinus* (na Obr. 1 označeno jako jaterní acinus). Jedná se o útvar, jehož prostor je vymezen strukturami mezi dvěma centrálními žilami a mezi dvěma portálními triádami.



Obr. 1 Základní jednotka jaterní tkáně

Acinus je rozdělen do 3 zón:

- I - nejbliže přívodným cévám, proto jsou hepatocyty zásobeny krví s nejvyšším obsahem kyslíku a živin. Převažují zde oxidační procesy (β -oxidace mastných kyselin, glukoneogeneze, glykogenolýza, tvorba cholesterolu a tvorba žluče),
- II - přechod mezi zónou I a III,
- III - nejbliže centrální žíle, krev s nízkým obsahem kyslíku a živin. Probíhají zde procesy jako glykolýza, syntéza glykogenu, lipogeneze, biotransformační pochody a syntéza žlučových kyselin.

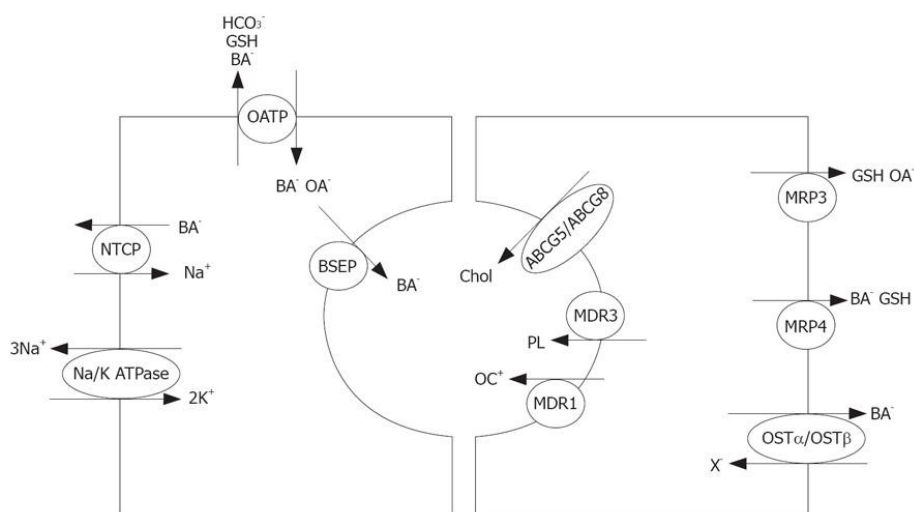
Metabolická aktivita hepatocytů se v jednotlivých zónách může lišit (zonální heterogenita). Příslušné enzymy mohou být přítomny ve všech zónách, avšak mezi periportálními a perivenózními hepatocyty se vytváří gradient enzymové aktivity, nebo je enzym přítomen pouze v některých hepatocytech a v hepatocytech jiné zóny ho nelze detekovat.

Vedle řady jiných funkcí se játra významně podílejí na eliminaci látek tělu vlastních nebo cizorodých (xenobiotika), i když zřídka jsou vylučovány v nezměněné

podobě. Většinou podstupují biotransformační změny, které vedou ke zvýšení jejich rozpustnosti ve vodě (polarity), což usnadňuje jejich vyloučení z organismu. To se děje ve dvou fázích:

- 1 - biotransformace: řada chemických reakcí (především hydroxylace), které zvyšují polaritu látky. Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy patřícími do systému cytochromu P450.
- 2 - biotransformace: dochází k vazbě na vysoce polární endogenní látku - konjugace a vzniká konjugát. Konjugována může být látka původní nebo po předchozí úpravě ve fázi 1. Konjugace je možná s kyselinou glukuronovou, sulfátem, acetátem, některými aminokyselinami (glycin, derivát cysteinu - taurin), *metylaci*.

Na membráně hepatocytů lze rozlišovat 2 základní domény – bazolaterální (obsahující sinusoidální a laterální oblast) a apikální (kanalikulární). Tyto domény se liší rozdílným zastoupením lipidů a proteinů a vykazují rozdílné funkce (strukturální a funkční polarita hepatocytů). Hepatocyty tak mohou transportovat látky z krve přes sinusoidální membránu a po intracelulární biotransformaci látky vylučovat zpět do krve nebo přes kanalikulární membránu do žluči (Obr. 2). Ztráta polarity hepatocytů má za následek poruchu sekrece žluči a jaterní poškození (Arias et al., 1993). Zásadní strukturou pro udržení polarity jsou *tight junctions* – spoje, které tvoří bariéru mezi bazolaterální a apikální doménou, tedy mezi lumen kanálku a krevním systémem jater, a kontrolují difúzi touto tzv. paracelulární cestou (Cereijido et al., 2008).



Obr. 2 Transport přes sinusoidální membránu a sekrece na kanikulární membráně. Vlevo: transport žlučových kyselin. Vpravo: transport organických molekul. Převzato z: A. Esteller: *Physiology of bile secretion, World J Gastroenterol 2008; 14: 5641 – 49.*

Pro zajištění všech jaterních funkcí jsou kromě hepatocytů nezbytné i další buňky. Kupfferovy buňky představují jaterní makrofágy, které jsou součástí mononukleárního fagocytárního systému. Fagocytují potenciálně škodlivé látky přiváděné portální krví a zabraňují tak jejich vstupu do systémového krevního řečiště.

Itovy buňky (hvězdicovité, *stelátní*, HSC) jsou za klidových podmínek známé jako buňky skladující vitamín A, jsou také zdrojem bílkovin extracelulární matrix. Představují asi 5 - 8 % z celkového počtu jaterních buněk. Jsou uloženy v Disseho prostoru mezi hepatocyty a endotelem jaterních sinusoid. Jejich původ není zcela jasný, bývají považovány za buňky mezenchymálního původu (Moreira, 2007). Tyto buňky však mohou být aktivovány celou řadou signálů doprovázejících jaterní poškození. Ztrácejí poté vitamín A, transformují se do buněk podobných myofibroblastům se schopností proliferace a fibrogenese (Gressner, 1996). Jakmile jsou HSC aktivovány, zvyšují genovou expresi pro komponenty extracelulární matrix, pro enzymy degradující matrix a jejich inhibitory, což vede k remodelaci matrix a její kumulaci v místě aktivovaných HSC (Bataller et Brenner, 2005).

Vedle HSC jsou potenciálním zdrojem pojivové tkáně portální fibroblasty. Tvoří malou populaci buněk obklopující portální žílu. Za normálních podmínek jsou podobné

ostatním fibroblastům, při chronickém poškození jater se transformují do myofibroblastů a produkují ECM (Dranoff et Wells, 2010).

Výstelku jaterních sinusoid tvoří endotelové buňky, které mají velké množství fenestrací a představují filtr mezi sinusoidální krví a Disseho prostorem.

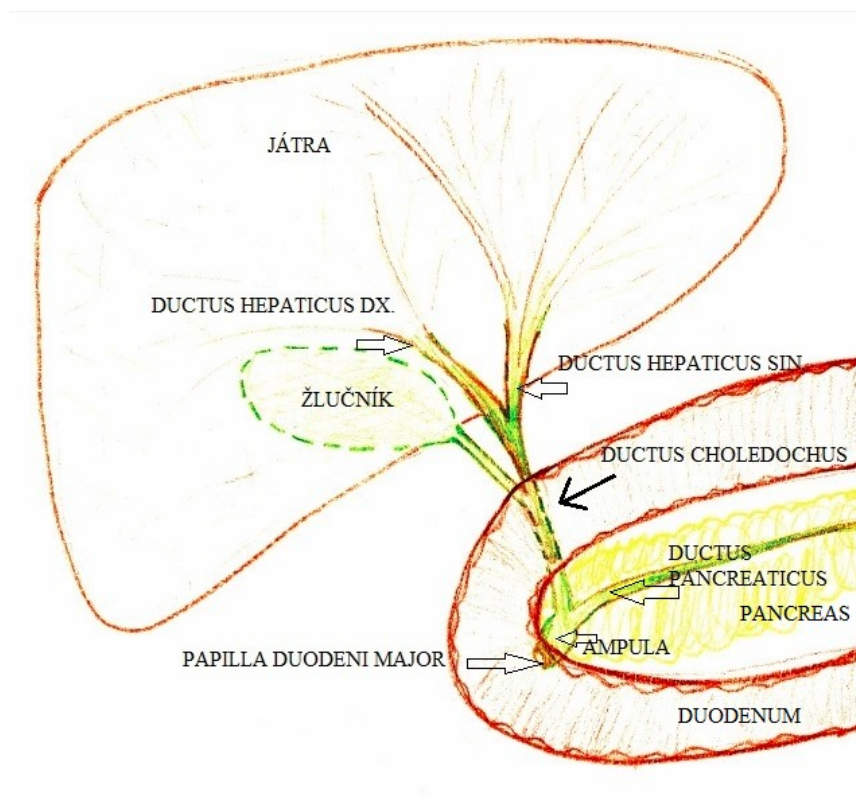
Cholangiocyty jsou epitelové buňky žlučových cest, které se podílejí na tvorbě žluči (Ehrmann et al., 2010). Jejich úloha je probrána v příslušné kapitole.

Oválné buňky představují progenitorové buňky, které jsou lokalizovány v Heringových kanálcích. Jsou aktivovány a prolifерují v momentě, kdy je regenerační kapacita hepatocytů vlivem poškození omezená a mohou se následně diferencovat do hepatocytů i cholangiocytů (Dabeva et Shafritz, 1993; Michalopoulos et al., 2005).

1.2 Žlučové cesty

Žlučové cesty jsou soustavou kanálků, které se postupně spojují do větších průměrů a vyúsťují společným vývodem *ductus choledochus* do duodena v oblasti Vaterovy papily. Celý tento vývodný komplex je nazýván žlučovým stromem (Grim et Druga, 2005).

Žlučové cesty lze rozdělit dle toho, kterými oblastmi procházejí, na intra- a extrahepatální cesty. Anatomie jednotlivých úseků žlučových cest (Obr. 3), především extrahepatálních, může být u každého člověka jiná a existuje několik možných variant průběhů a větvení žlučových cest.



Obr. 3 Schéma extrahepatálních žlučových cest (vlastní kresba)

1.2.1 Intrahepatální žlučové cesty

Počátečním místem vývodného systému k odtoku žluči je hranice dvou sousedních hepatocytů, které mezi sebou vytvářejí prostor tzv. žlučový kanálek neboli žlučovou kapiláru – *canaliculus bilifer*. Tyto kanálky mezi sebou vytvářejí síť, ze které

je odtok žluči směřován ze sběrných prostor opačným směrem než je tok krve v jednotlivých lalůčkách, žluč tedy odtéká centrifugálně – od centra směrem na periferii lalůčku. Mezi jednotlivými hepatocyty není kanálek tvořen epitelovou výstelkou. Intrahepatální žlučové cesty se na obvodu jednotlivých lalůček, které jsou tvořeny několika hepatocyty, spojují ve větší tzv. Heringovy kanálky neboli intralobulární žlučovody – *ductuli biliferi*. Ty jsou vystlány kubickým jednovrstevným epitelem – *cholangiocyty*, které se postupně se zvětšujícím se průměrem žlučových cest přeměňují v epitel cylindrický (Junguiera et al., 1999). V dalším průběhu játry se tyto žlučovody spojují ve žlučovody portálních triád. Tyto interlobulární portobiliární prostory jsou u člověka tvořeny z *vena interlobularis* (jednotlivá větvička *v. portae*), *a. interlobularis* (větev z *a. hepatica propria*) a interlobulárního žlučovodu – *d. bilifer interlobularis*. K tomuto systému portobiliární triády se přiřazují ještě příslušné lymfatické cévy (Junguiera et al., 1999). Celá tato triáda cév se nazývá Glissonovou triádou neboli *trias hepatica* (Čihák, 2002). Interlobulární žlučové cesty se spojují postupně do žlučovodů o větších průměrech, opouštějí interlobulární prostory a vytvářejí žlučovody segmentální na úrovni jednotlivých jaterních segmentů dle anatomického rozdělení jater. Tyto segmentální žlučovody se nakonec spojí ve dva hlavní vývody: z pravého jaterního laloku jako *ductus hepaticus dexter*, který vzniká spojením *ramus anterior et posterior* a z levého jaterního laloku jako *ductus hepaticus sinister* (z *ramus medialis et lateralis*), kdy v oblasti zvané *porta hepatis* opouštějí jaterní parenchym. Dále již hovoříme o cestách extrahepatálních (Čihák, 2002; Grim et Druga, 2005).

1.2.2 Extrahepatální žlučové cesty

Extrahepatální žlučové cesty jsou svou stavbou odlišné oproti intrahepatálním žlučovým cestám. Stěnu vývodu tvoří směrem od lumen k periferii sliznice, mukóza, svalová vrstva a jeho povrch je kryt vrstvou peritonea. Sliznice extrahepatálních žlučových cest je hladká, bez řas a vystlaná vysokým cylindrickým epitelem, součástí jsou i hlenové žlázy. Svalová vrstva není po celém obvodu a délce žlučových cest úplná, pouze v místech svěračů se množství svalových vláken výrazně množí a vytváří funkční svěrače (viz níže).

Extrahepatální žlučové cesty přímo navazují na cesty intrahepatální v oblasti již zmiňované *porta hepatis*. Tato v překladu jaterní brána je prostorem, který obsahuje tři hlavní struktury: *vena portae*, *arteria hepatica propria* a *ductus hepaticus communis*. Tento společný jaterní vývod vzniká buď přímo zde či distálněji spojením *ductus hepaticus dexter et sinister*. *Ductus hepaticus communis* je dlouhý cca 2 – 5 cm, variabilita je zde značná, a vstupuje do *ligamentum hepatoduodenale* společně s portální žilou vzadu, hepatickou artérií vpředu vlevo (Grim et Druga, 2005). Toto ligamentum je jedním z důležitých anatomických ohraničení vstupu do omentální burzy. V dalším průběhu *ductus hepaticus communis* se 2 – 4 cm od *porta hepatis* spojuje s *ductus cysticus* – vývodem žlučníku, a vytváří tak *ductus choledochus* – žlučovod. Ten vyúsťuje nejčastěji společně s pankreatickým vývodem na *papilla duodeni major Vateri* na descendentní části duodena. *Ductus choledochus* měří asi 6 – 9 cm, má v průměru asi 8 – 9 mm a je možné ho rozdělit vzhledem k jeho průběhu do několika částí: *pars supraduodenalis* – část nejproximálnější, kde prochází *ligamentum hepatoduodenale*, poté směřuje kaudálněji za duodenum – *pars retroduodenalis*, pokračuje mezi hlavu pankreatu a duodenem – *pars pancreatica* a nakonec se jako *pars intramuralis* vnořuje do stěny duodena a ústí do jeho lumen na Vaterově papile, která je umístěna ve stěně descendentní části duodena v místě pojmenovaném *plica longitudinalis duodeni*, kde svým průběhem žlučovod nadzvedává stěnu duodena a vytváří zmiňovanou řasu (Čihák, 2002; Grim et Druga, 2005). Vyústění žlučových cest je velmi variabilní záležitostí. Kraniálně nad Vaterovou papilou můžeme ještě ve stěně duodena najít jeden výstup, kde vyúsťuje na *papilla duodeni minor Santorini ductus pancreaticus accessorius*, či stav, kdy vyúsťují *ductus choledochus*, *ductus pancreaticus* a *ductus pancreaticus accessorius* zcela samostatně. Existuje mnoho alternativ, jakým způsobem společně *ductus choledochus* vyúsťuje na Vaterské papile s *ductus pancreaticus*. Nejčastější variantou je jejich společné vyústění. To se objevuje přibližně u 77 % případů. V těchto případech je *papilla duodeni major* rozšířena v dutinu jako znak společného ústí – *ampulla hepatopancreatica*, avšak každý vývod, žlučovod i pankreatický vývod, vyúsťující do tohoto rozšíření má svou vlastní cirkulární svalovinu, která je funkčně závislá na přítomnosti či nepřítomnosti obsahu potravy v žaludku či ve střevě. Výhodou tohoto odděleného systému svaloviny je fakt, že při průchodu potravy žaludkem a následně duodenem se uvolňuje svalovina žlučovodu *musculus sphincter ductus*

choledochi neboli tzv. *Oddiho svěrač*, aby byla zachována možnost dalšího štěpení a rozvolňování potravy, kdežto svalovina pankreatického vývodu, *musculus sphincter ductus pancreatici* zůstává stažena (Čihák, 2002). Tento mechanismus je pro danou oblast velice výhodný, protože zabraňuje poškození vlastní tkáně pankreatu eventuální přítomností žluče či střevního obsahu, který by mohl narušit vnitřní prostředí slinivky a způsobit tak závažné poškození tkáně pankreatu, které se projeví jako akutní zánět slinivky břišní neboli *pancreatitis acuta*.

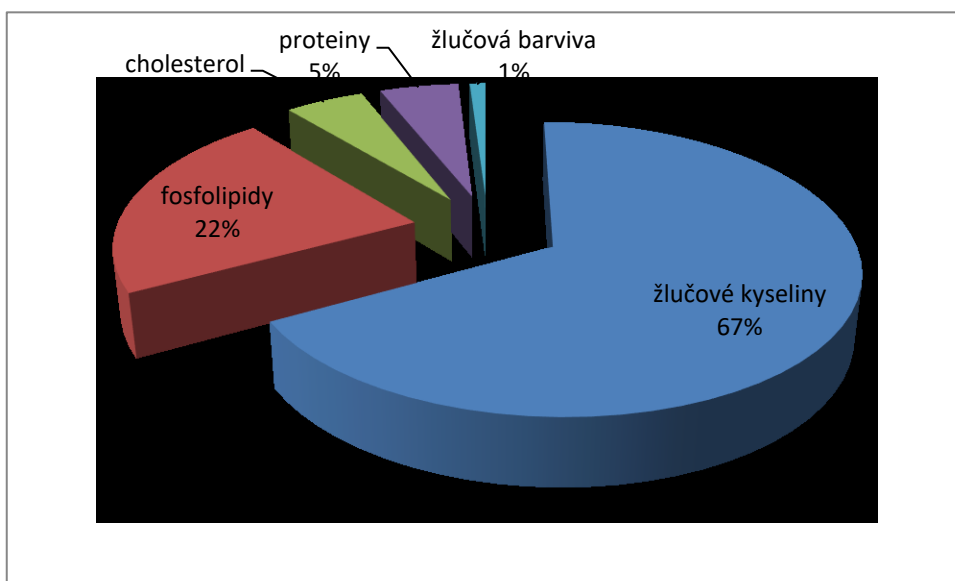
Součástí žlučových extrahepatálních cest a zároveň jediným rezervoárem žluči, kde dochází k dalšímu zahušťování žluči, je žlučník, *vesica fellea, billiaria*. Žlučník je vakovitý orgán, svým tvarem připomínajícím tvar hrušky a nacházející se v podjaterní krajině ve *fossa vesicae felleae hepatis*, o objemu mezi 30 – 80 ml za fyziologických podmínek, tedy bez jakýchkoliv prodělaných či probíhajících patologických stavů žlučových cest a v okolí žlučníku samotného (Čihák, 2002).

Z anatomického hlediska lze žlučník rozdělit na *fundus, corpus* a *collum vesicae felleae*. *Fundus vesicae biliaris* – slepé dno žlučníku, je částí, která přesahuje okraj jater asi o 1 cm a v celém jeho rozsahu ho kryje viscerální část peritonea, naléhá na stěnu břišní a promítá se do oblasti průsečíku medioklavikulární čáry a 9. žebra vpravo, kde zpravidla při klinickém vyšetření člověka s bolestmi břicha pro biliární koliku či jinou patologii žlučníku bude mít vyšetřovaná osoba jedno z velmi palpačně citlivých míst – tzv. *Murphyho symptom* (Grim et Druga, 2005). *Fundus* žlučníku zcela volně přechází v *corpus vesicae biliaris* – tělo žlučníku, které je vazivově připojeno ve *fossa vesicae felleae* k povrchu jater, kde peritoneum kryje pouze jeho volný průběh. Dále se postupně tělo žlučníku zužuje do části krčku – *collum vesicae biliaris*. Místo přechodu těla žlučníku v jeho krček se klinicky popisuje jako *infundibulum vesicae biliaris*. Krček se postupně dorsálním směrem zužuje a přechází až do struktury zvané *ductus cysticus*. Délka tohoto duktu je velmi variabilní, asi 2 – 4 cm s průměrem asi 3 mm. Klinicky důležitým místem je tzv. Hartmannova výchlípka, která se nachází na hranici krčku žlučníku a začátku *ductus cysticus*. Tato výchlípka je predispozičním místem pro ukládání žlučových kamenů (van Eijck et al., 2007). *Ductus cysticus* se spojuje s *ductus hepaticus communis* a společně vytvářejí výše zmíněnou strukturu *ductus choledochus* (Čihák, 2002).

1.3 Žluč

1.3.1 Složení žluči

Žluč obsahuje vodu, ve které jsou organické a anorganické látky v rozpuštěné nebo suspenzní formě (Obr. 4). Ve vzorku žluči získaném z *ductus choledochus* byla zjištěna mírně vyšší koncentrace sodíku, draslíku, vápníku a bikarbonátu ve srovnání s plazmou, zatímco koncentrace chloridových aniontů byla mírně nižší. Koncentrace žlučových kyselin (ŽK) se pohybuje mezi 2 – 45 mmol/l, koncentrace žlučových barviv mezi 0,5 – 5 g/l. Žluč obsahuje rovněž proteiny, globuliny v ní převažují nad albuminy, a je bohatá na lipidy. Koncentrace fosfolipidů je přibližně 0,25 – 8 g/l, cholesterolu 0,6 – 2 g/l. Hlavním reprezentantem fosfolipidů je lecitin. Koncentrace volných mastných kyselin, monoglyceridů a diglyceridů je nízká, triglyceridy v podstatě nejsou přítomny. Poměr fosfolipidů ke ŽK představuje v průměru 0,3 a cholesterolu ke ŽK 0,07 (Esteller, 2008; Reshetnyak, 2013).



Obr. 4 Zastoupení jednotlivých složek žluči

1.3.2 Tvorba žluči

1.3.2.1 Kanalikulární tvorba žluči

Produkce žluči začíná na úrovni žlučového kanálku. Lumen žlučového kanálku je tvořený apikální částí cytoplazmatické membrány sousedících hepatocytů a strukturami *tight junction* lokalizovanými v místě kontaktu hepatocytů. Sekrece žluči je založená na aktivním transportu osmoticky aktivních látek z hepatocytů do žlučových kanálků přes kanalikulární membránu, který je následován pasivním pohybem vody (Arrese et Trauner, 2003). Voda může přestupovat paracelulárně (přes spoje mezi dvěma sousedními hepatocyty – *tight junction*) nebo transcelulárně přes buňku (Marinelli, 2004). V tomto případě je nezbytná přítomnost transportérů (aquaporinů 9 a 8). Kanalikulární membrána je v porovnání se sinusoidální méně propustná pro vodu, její propustnost se však zvyšuje cAMP regulovanou inzercí aquaporinu 8 (AQP 8) do kanalikulární domény. Tento proces může být stimulován glukagonem a sekretinem (Marinelli et al., 1997; Gradilone et al., 2003). Transcelulární cesta tak má pravděpodobně hlavní podíl na vylučování žluči. Hlavní osmotickou aktivitu vyvíjejí ŽK, nicméně produkce žluči může probíhat i nezávisle na ŽK zejména účinkem redukované či oxidované formy glutationu nebo bikarbonátu. Osmotickou aktivitu vyvíjejí i vylučované ionty a proteiny.

1.3.2.2 Úprava žluči v duktulech

Po sekreci žluči do žlučových kanálků se až ze 30 % na její další úpravě podílejí cholangiocyty (Bogert et LaRusso, 2007). Vylučování bikarbonátu za účasti transportéru AE2 (anion exchanger 2) je možné výměnou za Cl^- , který vstupuje do cholangiocyty po koncentračním gradientu. Gradient mezi žlučovodem a cholangiocyty je udržován vylučováním Cl^- přes kanalikulární membránu pomocí CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator). Vylučování bikarbonátu může být stimulováno sekretinem, VIP (vasoactive intestinal peptide) nebo bombesinem, jejich účinkem tedy vzniká žluč bohatá na HCO_3^- . Z krve se voda dostává přes cholangiocyty díky přítomnosti aquaporinu 4 (AQP 4) v sinusoidální a aquaporinu 1 (AQP 1) v kanalikulární membráně. AQP 1 může být stimulován sekretinem. Některé ŽK, ale i další osmoticky aktivní látky mohou být ze žluči v kanálku rezorbovány. Absorpce

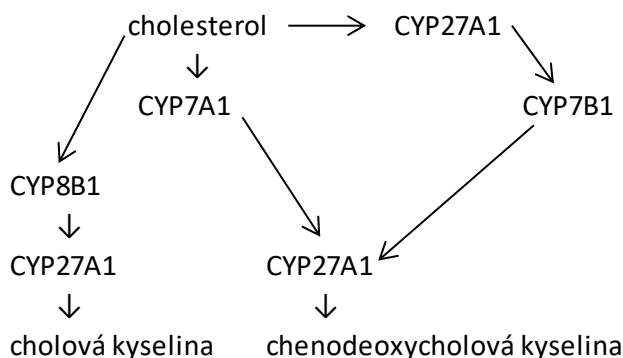
vody a elektrolytů ze žlučovodu závisí na osmotických poměrech vznikajících těmito přesuny mezi žlučí a krví.

1.3.2.3 Úprava žluči ve žlučníku

Hepatocyty produkují žluč kontinuálně, většina je skladována ve žlučníku, ve kterém probíhá stále rezorpce vody a většiny elektrolytů. Transport sodíku má aktivní charakter přes epitelovou výstelku žlučníku a je následován chloridovými ionty, vodou a dalšími rozpustnými složkami. Běžně se žluč koncentruje pětinasobně, možné maximum je dvacetinasobné.

1.3.2.4 Syntéza žlučových kyselin, konjugace a sekrece do žluči

Žlučové kyseliny mohou být *de novo* syntetizovány v hepatocytech oxidací cholesterolu nebo mohou do hepatocytů vstupovat z krve přiváděné ze střeva v. *portae* při enterohepatálním oběhu. ŽK jsou syntetizovány z cholesterolu kaskádou 16 reakcí (Chiang, 1998). Lidské hepatocyty produkují ŽK především tzv. klasickou cestou za vzniku primárních ŽK – cholové (CA) a chenodeoxycholové (CDCA). Prvním a limitujícím krokem v syntéze je 7 α -hydroxylace cholesterolu enzymem patřícím k cytochromu P450 – CYP7A1, který se vyskytuje pouze v játrech. Vznikají primární ŽK cholová a chenodeoxycholová v ekvivalentním množství. Aktivita tohoto enzymu závisí na množství vstřebaných ŽK. Hydroxylasa CYP8B1 reguluje podíl cholové kyseliny ku chenodeoxycholové. Alternativní cesta syntézy je zahajována oxidací cholesterolu hydroxylasou CYP27A1, následuje konverze na 7 α , 27-dihydroxycholesterol hydroxylasou CYP7B1 a cílovým produktem je kyselina chenodeoxycholová (Obr. 5). Enzymy CYP27A1 a CYP7B1 jsou exprimovány v různých tkáních, avšak pouze játra obsahují všechny enzymy nezbytné pro syntézu ŽK (Murray et al., 1998; Monte et al., 2009). Produkty v jiných tkáních oxidovaného cholesterolu však mohou být následně transportovány do jater a zde konvertovány na ŽK. Alternativní cesta se podílí u lidí na syntéze ŽK pouze z 10 %, avšak její podíl narůstá u pacientů s jaterními onemocněními (Axelson et Sjövall, 1990), produkována je takto především chenodeoxycholová kyselina.



Obr. 5 Syntéza žlučových kyselin

ŽK jsou před vstupem do žluče konjugovány s glycinem a taurinem. Reakci katalyzují transferázy SULT2A1 (dehydroepiandrosteron sulfotransferáza) a UGT2B4 a UGT2B7 (UDP-glukuronosyl transferáza). Za fyziologických okolností jsou volné ŽK přítomny ve žluči jen zřídka. S ohledem na významné množství sodíku a draslíku ve žluči a alkalické pH žluči se žlučové kyseliny a jejich konjugáty vyskytují ve formě solí (Murray et al., 1998). U lidí převažují konjugáty s glycinem. Tak se zvyšuje polarita, a tím i rozpustnost těchto molekul. Polarita je ovlivněna i počtem hydroxylových skupin v molekule a orientací hydroxylových a metylových skupin. α orientace OH skupiny činí molekulu hydrofilnější, zatímco CH_3 skupina v β poloze zvyšuje hydrofobitu. ŽK mohou podstupovat i glukuronidaci nebo sulfonaci, zvýšená rozpustnost přispívá k jejich vylučování močí a do střev.

Z hepatocytů jsou ŽK do žlučového kanálku vylučovány transportérem BSEP (bile salt export pump). Jedná se o transportér specifický pro játra (Arrese et Ananthanarayanan, 2004). Takto jsou vylučovány konjugované monovalentní ŽK, divalentní konjugované kyseliny jsou transportovány pomocí MRP2 (multidrug-resistance-associated protein 2). MRP2 transportér se podílí na vylučování dalších organických aniontů – glutationových konjugátů, oxidovaného a méně i redukováného glutationu, glukuronidových konjugátů bilirubinu apod. Játra jsou hlavním místem produkce glutationu, hlavního buněčného antioxidantu. Předpokládá se existence transportéru s vysokou afinitou pro glutation, výše zmíněný MRP2 vykazuje nízkou afinitu. Bikarbonát je vedle ŽK a glutationu, další významná látka pro sekreci žluči. Je vylučován do žlučového kanálku výměnou za Cl^- prostřednictvím transportéru AE2

lokalizovaným v kanalikulární membráně. Skupina *MDR přenašečů* funguje pro vylučování řady hydrofobních látek. MDR3 je významný transportér pro fosfolipidy.

1.3.2.5 Enterohepatální oběh žlučových kyselin

Většina ŽK vyloučených do žluči je opět rezorbována v ileu nebo distálněji. Jedná se převážně o aktivní proces, na kterém se podílí transportér ASBT (apical sodium-dependent bile acid transporter). Obdobně jako jaterní transportér NTCP přenáší ŽK v kotransportu se sodíkem. Tento systém ve střevě funguje především pro resorpci konjugovaných ŽK, vykazuje vyšší afinitu pro dihydroxylové ŽK (CDCA a DCA – kyselinu deoxycholovou) než pro trihydroxylové (CA). Do krve jsou ŽK z enterocytu přenášeny transportérem OST (organic solute transporter). Pouze 5 % z celkového množství ŽK se dostává do tlustého střeva, odkud je ještě možná rezorpce nekonjugovaných ŽK pasivní cestou. Převážná část ŽK vyloučených do žluči se tak vrací k játrům a může být znovu do žluči vyloučena. Účinkem střevních bakterií podstupují ŽK strukturální a funkční změny – dekonjugaci účinkem hydroláz, oxidace, dehydroxylace. Dehydroxylací primárních žlučových kyselin vznikají sekundární ŽK – z kyseliny cholové (obsahuje 3 OH skupiny) vzniká kyselina deoxycholová s 2 OH skupinami a z chenodeoxycholové kyseliny s 2 OH skupinami vzniká lithocholová kyselina, která vykazuje velmi nízkou solubilitu. Vzhledem k tomu, že je v játrech konjugována, pasivní rezorpce v tlustém střevě je velmi nízká, a proto je zastoupení této kyseliny ve žluči malé. Bakteriální oxidací CDCA vzniká kyselina 7-ketolithocholová, z ní se v játrech syntetizuje ursodeoxycholová kyselina (terciární ŽK).

Vstup ŽK z krve do hepatocytů přes bazolaterální membránu je závislý nebo nezávislý na Na^+ NTCP (Na^+ -taurocholate co-transporting polypeptide) přenáší do buňky Na^+ v *symportu* se žlučovými kyselinami, které jsou především v konjugované formě. Nekonjugované kyseliny jsou tímto transportérem přenášeny málo. Méně specifickým transportérem ŽK je na Na^+ nezávislý OATP (organic anion-transporting polypeptide). Přenáší nejen ŽK, především nekonjugované, ale také endogenní organické anionty (např. nekonjugovaný i konjugovaný bilirubin), xenobiotika.

1.3.2.6 Regulace syntézy žlučových kyselin

ŽK působí negativní zpětnou vazbou na svou vlastní syntézu. Tato kontrola je nezbytná vzhledem k tomu, že ŽK jsou ve vysokých koncentracích toxické. Regulace probíhá přes aktivaci jaderných receptorů (transkripčních faktorů), které mají význam pro transkripční kontrolu kroků významných nejen pro syntézu ŽK a tvorbu žluči, ale také pro biotransformační procesy a metabolismus glukózy a tuků. Význam těchto změn spočívá především v omezení vstupu ŽK do hepatocytů, syntézy ŽK *de novo*, podpoře procesů vedoucích k jejich vyloučení (Trauner et al., 2011). FXR (farnesoid X receptor) je hlavním intracelulárním receptorem žlučových kyselin. Fyziologickými ligandy FXR jsou kyseliny chenodeoxycholová, deoxycholová, lithocholová a cholová (Parks et al. 1999). FXR plní především regulační úlohu v syntéze ŽK, jeho aktivací dochází k omezení genové transkripce CYP7A1 (Chiang et al., 2001). FXR je vysoce exprimován i v ileu, jeho aktivace ŽK následně vede k indukci FGF19 (fibroblast growth factor) u lidí, resp. FGF15 u myši (Inagaki et al., 2005). FGF19, 15 je portální krví transportován do jater, kde aktivuje membránový receptor FGFR4. Tím se spouští kaskáda signálních dějů, jejichž výsledkem je mj. inhibice genové transkripce CYP7A1 (Inagaki et al., 2005, Song et al. 2009, Yu et al. 2005). Zatímco FXR negativně působí na syntézu ŽK, aktivitou tohoto transkripčního faktoru jsou indukovány transportéry v kanalikulární membráně, které se podílejí na sekreci žluči – BSEP (bile salt export pump) a OST (Ananthanarayanan et al., 2001; Landrier et al., 2006), MRP2 (Kast et al., 2002) a MDR3 (Huang et al., 2003). Aktivita FXR sehrává i významnou úlohu v regulaci transportéru NTCP, který přenáší ŽK přes bazolaterální membránu (Zollner et al., 2005).

1.3.3 Regulace sekrece žluči

Jak bylo zmíněno výše, významnou silou podporující tvorbu žluči představují žlučové kyseliny a jejich osmotický účinek. K tomu se přidává stimulační účinek sekretinu, který může sekreci více než zdvojnásobit (Guyton a Hall, 2011). Sekretin je produkován S buňkami lokalizovanými ve sliznici duodena (Polak et al., 1971). Sekretinová mRNA byla prokázána i v centrálním nervovém systému (mozečku, mozkovém kmeni, hypofýze, hypotalamu), (Samson et al., 1984). Sekretin podporuje vylučování bikarbonátu epiteliálními buňkami žlučových kanálek, nepůsobí však na

produkcí žluči na úrovni hepatocytů. Na sekreci žluči regulované sekretinem se podílejí cholangiocyty, které lemují větší žlučovody (Alpini et al., 1997). Exprimují sekretinový receptor a transportér k výměně Cl^- a HCO_3^- , který je lokalizovaný v apikální části membrány (Martínez-Ansó, 1994). Epitel menších žlučovodů se na sekreci regulované sekretinem nepodílí. Zvýšení exprese a sekrece sekretinu velkými cholangiocyty a S buňkami bylo zaznamenáno u modelově navozené cholestázy. Stimulace vylučování HCO_3^- sekretinem by mohlo být zásadní pro ochranu biliárního epitelu před poškozením hydrofobními žlučovými kyselinami (Beuers et al., 2010; Hohenester et al., 2012).

1.3.4 Funkční význam žluči

Žluč umožňuje vylučování řady látek (bilirubin, cholesterol, produkty jaterních biotransformačních procesů). Významnou součástí žluči jsou žlučové kyseliny, nejen s ohledem na jejich úlohu již při samotné sekreci žluči. Jak bylo zmíněno výše, žlučové kyseliny fungují v játrech jako ligandy jaderných receptorů (zejména výše zmíněného FXR) a ovlivňují tak transkripci řady přenašečů sinusoidální a kanalikulární membrány nebo biotransformačních enzymů. Žlučové kyseliny navíc zvyšují rozpustnost lipofilních látek a vážou kationty těžkých kovů vylučovaných biliární cestou.

V tenkém střevě žluč, resp. žlučové kyseliny sehrávají dvojí úlohu. Působí detergenčně na lipidové částice v potravě snížením jejich povrchového napětí, a tak se částice rozpadají na menší, pro lipázy z pankreatické šťávy přístupnější. Druhá, ještě významnější úloha, spočívá v podpoře absorpce mastných kyselin, monoglyceridů, cholesterolu a dalších lipidů ze střeva tvorbou micel, které usnadňují transport tukových látek k enterocytům. Bez nich by se až 40 % natrávených tuků nevstřebalo.

Ve střevě fungují žlučové kyseliny jako ochrana před přemnožením bakteriální flóry (Pande et al., 2009). Mechanismus není zcela jasný, ale určitý význam je přisuzován FXR, který je přítomen nejen v játrech, kde se podílí na regulaci syntézy žlučových kyselin, ale i ve střevě (Inagaki et al., 2006).

1.4 Cholestáza

Tvorba žluči je podmíněna správnou funkcí řady transportérů v membráně hepatocytů a cholangiocyty a strukturální i funkční integritou systému žlučových cest.

Cholestáza vzniká na základě poruchy sekrece a toku žluči (Zollner et Trauner, 2008) s následným nedostatkem žluči ve střevě a kumulací potenciálně toxických látek v játrech a systémové cirkulaci (Trauner et al., 1998).

Je-li příčina v játrech, jedná se o **intrahepatální cholestázu**, při mimojaterní příčině je cholestáza označována jako **extrahepatální** (Ehrmann et Hůlek, 2014).

Z klinického hlediska s ohledem na etiopatogenezi je možno cholestázu dělit na:

nezánětlivé – navozené hormonálně, léky, sepsí; vrozené poruchy sekrece,

zánětlivé – cholestatické virové hepatitidy, alkoholová cholestáza,

při poškození žlučvodů – primární biliární cirhóza, primární sklerózující cholangitida, syndrom mizejících žlučvodů,

mechanické cholestázy - navozené tumory, konkrementy, strikturami, stenózami, extraluminální kompresí.

U lidí se nejčastěji vyskytují extrahepatální cholestázy, z 50 % jsou navozeny maligními onemocněními, poté *cholelithiázou*. Jako častá příčina cholestázy také figurují septické stavy, polékové cholestázy (5 – 10 %), virové a autoimunitní hepatitidy (5 – 7 %), (Ehrmann a Hůlek, 2014).

Cholestáza je provázena řadou klinických a biochemických změn. Ke klinickým nálezům patří různý stupeň žloutenky a *pruritus*, k biochemickým, vedle zvýšené koncentrace především konjugovaného bilirubinu, v séru zvýšené aktivity ALP (alkalické fosfatázy) a GGT (gamma-glutamyltransferázy), zvýšená koncentrace žlučových kyselin a cholesterolu.

1.4.1 Mechanizmy cholestatického poškození jater

Cholestatické poruchy mohou být **vrozené** na základě genetických defektů transportérů významných pro sekreci žluči, podstatně častější je však výskyt cholestatických poruch **získaných** vlivem zánětu, hormonů nebo léků. Tyto příčiny navozují změny exprese, popř. aktivity hepatobiliárních transportérů na transkripční,

posttranskripční, popř. posttranslační úrovni během dnů, hodin či minut (Roma et al., 2008).

Pro cholestatické poškození jater je charakteristická kumulace hydrofobních žlučových kyselin v hepatocytech, které mohou vykazovat cytotoxický účinek. Pro studium cytotoxicity žlučových kyselin jsou především využívány *in vitro* modely, které umožňují sledovat účinky širokého spektra koncentrací žlučových kyselin a porovnat účinky mezi jednotlivými žlučovými kyselinami. Cytotoxicita žlučových kyselin se zvyšuje s jejich hydrofobicitou a vykazuje časovou a koncentrační závislost (Rolo et al., 2002). V *in vitro* podmínkách byla žlučovými kyselinami navozena apoptóza nebo nekróza hepatocytů v závislosti na použité dávce (Rolo et al., 2003). Kyselina glykochenodeoxycholová (GCDCA) je v séru a žluči cholestatických pacientů zastoupena nejvíce a vykazuje vyšší toxicitu ve srovnání s ostatními žlučovými kyselinami. Hydrofobní žlučové kyseliny mohou ve vysokých koncentracích přímo poškozovat buněčné membrány. Je však nepravděpodobné, že by koncentrace žlučových kyselin dosahovaly při cholestáze tak vysokých hodnot, aby detergentní účinek vedl k masivnímu poškození buněčných membrán a tento mechanismus byl pro poškození hepatocytů klíčový (Attili et al., 1986; Rolo et al., 2003; Utanohara et al., 2005).

Jako významný mechanismus poškození hepatocytů žlučovými kyselinami je uváděna mitochondriální dysfunkce (Krähenbühl et al., 1995; Gores et al., 1998; Rolo et al., 2001; Rolo et al., 2002). V literatuře byly popsány změny jako „bobtnání“ mitochondrií, zvýšení permeability vnitřní mitochondriální membrány (MPT – mitochondrial permeability transition je charakterizováno otevřením póru, který umožní zvýšení permeability vnitřní mitochondriální membrány pro látky s molekulární hmotností do 1,5 kDa) a kolaps membránového potenciálu mitochondrií. Žlučové kyseliny mohou rovněž snižovat respiraci v mitochondriích izolovaných z cholestatických jater, resp. inhibovat aktivitu respiračních komplexů (Younes et al., 2007). Poškození mitochondrií je dáváno do souvislosti s rozvojem oxidačního stresu. Na modelu cholestázy podvazem žlučovodu byla prokázána zvýšená lipoperoxidace, tvorba ROS (reaktivních kyslíkových radikálů) a pokles antioxidantů v mitochondriích (Krähenbühl et al., 1995; Huang et al., 2003; Wang et al., 2007).

Mitochondriální změny sehrávají významnou úlohu v apoptotické odpovědi na cholestázu (Arduini et al., 2012). Bylo však prokázáno, že žlučové kyseliny mohou indukovat apoptózu i vnější cestou, tedy přes aktivaci tzv. *death receptor* (*Fas* – protein ze skupiny TNF proteinů, *TRAIL* – TNF-related apoptosis-including ligand, *TNFR* – tumor necrosis factor receptor).

Otázkou vůbec je, do jaké míry se na cytotoxicitě navozené cholestázou v *in vivo* podmínkách podílí apoptóza a nekróza. Data z posledních let totiž poukazují především na nekrotickou smrt (Mitchell et al., 2011; Zhang et al., 2012; Woolbright et al., 2013) zprostředkovanou zánětovou reakcí. Infiltrace jaterní tkáně neutrofilů je považována za klíčovou příčinu jaterního poškození během akutní biliární obstrukce (Allen et al., 2011). Dochází k systémové aktivaci neutrofilů, jejich akumulaci v jaterních sinusoidech a portálních venulách a migraci do parenchymu (Gujral et al., 2003). Akumulaci neutrofilů podporuje celá řada cytokinů (např. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$ a β). Infiltrace jater neutrofilů byla pozorována během tří, resp. 6 hodin po modelovém podvazu choledochu (Saito, 2000; Woolbright et al., 2013). Neutrofilů navozují výrazný oxidační stres vedoucí ke smrti hepatocytů především prostřednictvím tvorby ROS (Jaeschke et Hasegawa, 2006). ROS produkované neutrofilů difunduje do hepatocytů (Jaeschke et al., 1999), kde mohou navodit nekrózu mechanismy, které zahrnují otevření MPT póru, pokles membránového potenciálu mitochondrií a depleci ATP (adenosintrifostát), (Nieminen et al., 1997). ROS produkovaný neutrofilů však nenavozuje v hepatocytech MPT přímo, ale působí oxidační stress, při kterém se zvyšuje jinak velmi nízké množství vápníku v jejich cytosolu, tvoří se ROS v mitochondriích, které indukují MPT (Nieminen et al., 1997; Jaeschke, 2011). Jeden týden po podvazu žlučovodu byla také dokumentována akumulace makrofágů.

Jaterní onemocnění je časně provázeno zvýšenou permeabilitou střevní stěny (Parks et al., 1996; Parks et al., 2000; Fouts et al., 2012). To umožňuje přestup živých bakterií a jejich produktů ze střev do mezenterických uzlin, systémové cirkulace a dalších orgánů (Berg et Garlington, 1979; Clements et al., 1998). U cholestázy dochází k bakteriální translokaci současně se zmnožením bakteriální flóry. U jiných typů jaterního poškození bakteriální translokace předchází změnu ve složení a zmnožení bakteriální flóry (Fouts et al., 2012). Bakteriální translokace se uplatňuje v rozvoji

infekčních komplikací a sepe. Významnou úlohu při tom sehrávají Kupfferovy buňky, které jsou zdrojem prozáněťových cytokinů (zejména TNF- α , IL-1, IL-6) a přispívají k rozvoji záněťové odpovědi na endotoxin (Jones et al., 2013). Po experimentálně navozeném podvazu žlučovodu byla prokázána zvýšená senzitivita na endotoxin (Lázár et al., 2002; Miyaso et al., 2005; Lv et al., 2011; Jones et al., 2012) zprostředkovaná změnami v Kupfferových buňkách. Endotoxémie a následná systémová záněťová reakce vedou ke zhoršení cholestatického poškození jater (Liu et al., 2001; Brown et al., 2003).

Perzistující jaterní poškození může být provázeno fibrotizací. Dochází k nadměrné tvorbě pojivové tkáně a jejímu nedostatečnému odbourávání. V porovnání s normálním stavem narůstá především množství kolagenu (Gressner, 2006). Běžně je extracelulární matrix odbourávána metaloproteinázami, jejichž aktivita je však při jaterních poškozeních snižena. Postupně se vyvíjí cirhóza s úbytkem funkční jaterní tkáně, tvorbou sept a uzlovitou přestavbou tkáně. V patogenezi fibrózy mají svou úlohu výše zmiňované hvězdicovité buňky. Dochází k jejich aktivaci, resp. transdiferenciaci do myofibroblastů podobných buněk s novými vlastnostmi – zvýšenou schopností migrace a adheze, proliferace a především získáním profibrogenní kapacity (Marra, 1999; Moreira, 2007). V aktivaci HSC se uplatňují produkty oxidačního stresu, který provází jaterní poškození a různé další mediátory uvolňované hepatocyty, Kupfferovými buňkami, endotelovými buňkami, neutrofilly. Významným profibrogenním cytokinem je TGF- β , který je produkován především Kupfferovými buňkami a PDGF. Profibrotické účinky u cholestatického poškození jater má i cytokin TNF- α . Pokud u knokautovaných myší nebyl přítomen TNF- α nebo receptor pro TNF- α , došlo ke zmírnění jaterního poškození i fibrózy (Gabele et al., 2009; Tarrats et al., 2011) nebo alespoň fibrózy, i když bez zlepšení jaterního poškození. TNF- α však pravděpodobně nepřispívá k aktivaci HSC a tvorbě kolagenu (Osawa et al., 2013), ale spíše se podílí na inhibici degradace extracelulární matrix (Arthur, 2000) tím, že podporuje produkci inhibitoru metaloproteináz (Osawa, 2013), které odbourávají extracelulární matrix. Depozita ECM v Disseho prostoru narušují strukturu jaterních sinusoid s normálně přítomnými fenestracemi (kapilarizace sinusoid).

Ztrátou otvorů v sinusoidách dochází k narušení obousměrné výměny obsahu mezi portální krví a hepatocyty a tak se látky, které by měly být v hepatocytech

metabolizovány nebo degradovány, dostávají rovnou do systémové cirkulace (portosystémový zkrat), (Moreira, 2007). Je třeba zmínit, že HSC nejsou jedinými buňkami, které se uplatňují v rozvoji fibrózy. Portální fibroblasty mohou být rovněž aktivovány a diferencovat se na myofibroblasty produkující ECM. Záleží pravděpodobně na příčině poškození (Dranoff et Wells, 2010). Portální fibroblasty byly 5 dní po BDL (potkání s podvazem choledochu bez podání fluvastatinu) zdrojem myofibroblastů z více jak 70 %. S progresí poškození klesal podíl portálních fibroblastů na populaci myofibroblastů a 14. a 20. den po BDL se na jejich populaci podílely především HSC (Iwaisako et al., 2014).

Biliární fibróza začíná v periportální oblasti, což odpovídá místu výskytu aktivních HSC a zánětlivých změn (Bataller et Brenner, 2005). Později progreduje za vzniku porto-portálních fibrotických sept ohraničujících uzle jaterní tkáně. Tento typ fibrózy se vyvíjí při zachování spojení mezi centrální žilou a portálním traktem a je spojený s intenzivní proliferací žlučových kanálků a periduktulárních myofibroblastů.

1.4.2 Adaptační mechanismy na cholestázu

Řadou mechanismů zmíněných výše se během cholestázy rozvíjí poškození jater vyúsťující do cirhózy. Během cholestázy jsou nicméně aktivovány změny, které mohou do určité míry působit hepatoprotektivně. Hlavním principem je omezení vstupu žlučových kyselin z krve do hepatocytů a tvorby žlučových kyselin *de novo*. Na modelu cholestázy byla na bazolaterální membráně prokázána nižší exprese *Ntcp a Oatp* transportujících ŽK a další látky z krve do hepatocytu a zvýšená exprese *Mrp a Ost transportérů* přenášejících ŽK ven z buňky (Slitt et al., 2007). Význam změn exprese jednotlivých transportérů v adaptační odpovědi se však liší. Indukcí fází I a II biotransformačních procesů je při cholestáze zajišťována vyšší hydrofilita kumulovaných žlučových kyselin. Produkty biotransformace jsou vylučovány alternativní cestou přes bazolaterální membránu do systémové cirkulace a eliminovány ledvinami (Li et al., 2000). Pasivní glomerulární filtrace, aktivní renální tubulární sekrece a omezení rezorpce žlučových kyselin z tubulů podporují eliminaci žlučových kyselin ledvinami při cholestáze (Brandoni et al., 2006). Při obstrukční cholestáze dochází sekundárně k nižší expresi transportérů na kanalikulární membráně hepatocytů,

což může napomáhat v ochraně žlučovodů před mechanickým poškozením zvýšeným tlakem žluči, popř. před poškozením cholangiocyty toxickým působením ŽK (Lamireau et al., 2003; Marschall et al., 2006; Wagner et al., 2003). ŽK jsou navíc při obstrukční cholestáze z biliárního prostoru zvýšeně rezorbovány přes cholangiocyty. Přítom enterohepatální cirkulace ŽK je snížena, množství ŽK rezorbovaných ze střeva a následně vstupujících do jater se tak snižuje (Sauer et al., 2000). Molekulární změny pozorované na experimentálních modelech odpovídají řadě změn provázejících chronická cholestatická onemocnění lidí, avšak více než na transkripční úrovni, pozorované často na zvířecích modelech, je to spíše na posttranskripční a posttranslační úrovni. Inhibice transportérů zajišťujících transport látek z krve do hepatocytu přes bazolaterální membránu byla dokumentována u alkoholové cholestatické hepatitidy (Zollner et al., 2001), v pozdním stádiu primární biliární cirhózy (Zollner et al., 2003), u primární sklerózující hepatitidy (Oswald et al., 2001), či extrahepatální biliární atrezie (Shneider et al., 1997). Adaptace transportérů exportujících látky z hepatocytu přes bazolaterální membránu byla popsána v pozdním stádiu primární biliární cirhózy (Ros et al., 2003; Barnes et al., 2007), u biliární atrezie a biliární obstrukce následkem karcinomu žlučových cest nebo pankreatu (Scheffer et al., 2002; Shoda et al., 2001). Na kanalikulární membráně se vyvíjejí obdobné změny jako po modelovém podvazu žlučovodu, avšak většinou až v pozdních stádiích cholestázy (Kullack-Ublick et al., 2002).

V regulaci adaptačních změn sehrávají svou roli jaderné receptory. Jedná se o ligandem aktivované transkripční faktory, které se podílejí nejen na řízení tvorby a vylučování žluči, ale také na metabolismu glukózy, lipidů, zánětových, fibrotických a regeneračních procesech v játrech. Řada současných poznatků o transkripčních faktorech ale vychází z modelových cholestatických změn navozených na zvířeti a nebyla doposud potvrzena u lidí (Roma et al., 2008). Jak bylo zmíněno výše, na zvířecích modelech jsou adaptivní změny pozorovány ve velké míře právě na transkripční úrovni, avšak u lidí nemusejí mít tak velký podíl. Za regulaci tvorby a sekrece žluči jsou zodpovědné především jaderné receptory aktivované ŽK – FXR, PXR, VDR. Jako ligandy mohou působit i jiné součásti žluči, např. bilirubin pro CAR

(constitutive androstane receptor) nebo PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) je aktivován mastnými kyselinami.

Tato adaptační reakce však není schopna zcela zabránit rozvoji jaterního poškození. Z toho vyplývá nutnost hledat další terapeutické možnosti pro zmírnění cholestatického poškození jater.

1.5 Možnosti zmírnění rozvoje cholestatického poškození jater

V rozvoji cholestatického jaterního poškození hrají roli kumulující se ŽK, které působí cytotoxicky. Léčba jaterního poškození navozeného cholestázou je proto cílena především na snížení množství cytotoxických ŽK v hepatocytech a ochranu hepatocytů před dalšími potenciálně toxickými látkami, které se v hepatocytech a popř. ve žlučovodech při cholestáze hromadí. Léčba by proto měla především podpořit vylučování ŽK a dalších potenciálně toxických látek z hepatocytů do krve, stimulovat biotransformační procesy v hepatocytech podporující vznik více hydrofilních látek, což snižuje jejich případný toxický účinek, ochraňovat cholangiocyty před působením ŽK, inhibovat rozvoj fibrózy.

V případě obstrukční cholestázy je jednou z možností, jak omezit kumulaci ŽK, drenáž žlučových cest. Vliv drenáže žlučových cest u pacientů s obstrukčním ikterem se zkoumá již několik desítek let. Biliární obstrukce je častým problémem u malignit pankreatu. Prvním, kdo popsal a využil možných výhod drenáže žlučových cest, byl americký chirurg Allen Whipple. V roce 1935 Whipple popsal a provedl na kolumbijské univerzitě první operaci slinivky břišní ve dvou dobách. Principem první operace bylo vytvořit komunikaci mezi gastrointestinálním traktem a žlučovými cestami při obstrukci v extrahepatálních žlučových cestách. Byla tedy vytvořena gastroenteroanastomóza, spojka mezi žaludkem a kličkou tenkého střeva, dále podvázán žlučovod a žlučové cesty vydrénovány cestou samotného žlučníku, tzv. cystikogastroanastomóza. Ve druhé době byla provedena pankreatoduodenektomie, tj. k odstranění hlavy pankreatu a přilehlého dvanáctníku (Whipple et al., 1935). Důvodem operace prováděné právě ve dvou dobách bylo přesvědčení Whippleho o výhodách drenáže žlučových cest, mezi kterými zmiňuje hlavně změnu patofyziologického stavu cholestázy v intra- i extrahepatálních žlučových cestách na fyziologické poměry nebo na stav fyziologický.

Od této doby proběhlo mnoho studií o výhodách a možnostech drenáže žlučových cest jako prevence komplikací u cholestatických pacientů. Na zvířecích modelech prováděná drenáž žlučových cest s následným uvolněním tlaku v nich zlepšuje jaterní funkce, výživové parametry, aktivuje složky imunitního systému k redukci endotoxémie a zmírňuje cytokinové reakce (Van der Gaag et al., 2009).

Drenáž žlučových cest lze v dnešní době rozdělit na dvě metody: vnitřní a zevní. Obě patří k poměrně dobře dostupným metodám. Vnitřní drenáž žlučových cest je prováděna metodou endoskopické retrográdní cholangiopankreatikografie (ERCP). Představuje metodu neinvazivní, méně zatěžující a s nižším počtem možných závažných komplikací spojených se zákrokem než drenáž zevní. Vedle této metody stojí metoda invazivní – zevní drenáž žlučových cest. Provádí se pomocí tzv. perkutánní transhepatické cholangiografie (PTC) zavedením katétru po punkci jater do intrahepatálních žlučovodů. Obě tyto metody umožňují vložit do lumina žlučových cest stent, který zajistí jejich průchodnost. Mezi komplikacemi drenáže žlučových cest se objevuje pankreatitida, cholangioitida nebo cholecystitida, perforace žlučových cest, krvácení, okluze stentu, nebo potřeba jeho výměny (Van der Gaag, 2010).

V dnešní době se názory na drenáž žlučových cest mění a zdaleka nejsou jednotné. Zatímco dříve se lékaři spíše přikláněli k předoperační drenáži žlučových cest, postupem času vznikly další studie a v rámci *evidence based medicine (EBM)* byly publikovány články studií, které jsou svými výsledky velmi kontroverzní. Důležitým mezníkem ve změně přístupu k drenáži žlučových cest se stala randomizovaná studie DROP-trial (DRainage vs. Direct OPeration - drenáž vs. operace), která srovnává drenáž žlučových cest (zevní i vnitřní) s následnou pankreatoduodenektomií a časnou pankreatoduodenektomií bez drenáže žlučových cest. Jsou zde pozorováni pacienti s obstrukčním ikterem s malignitou pankreatu. V této randomizované studii s 210 pacienty jsou srovnávány dvě právě jmenované skupiny pacientů. Výsledkem je sdělení, ze kterého vyplývá nižší pooperační morbidita u pacientů, kteří předoperačně drenáž žlučových cest nepostoupili (Van der Gaag, 2007). Další studie nepřinesly jasné výsledky, které by ukázaly jednoznačnou cestu, kam by se měla terapie obstrukčního ikteru u těchto pacientů vyvíjet (Lai, 2014). V hodnocení těchto studií se také objevují názory, že rizika předoperační drenáže žlučových cest u pacientů s maligní obstrukcí

žlučových cest převažují nad možnými benefity řešení žloutenky (Van Hooft, 2011). Ve všech zkoumaných případech se však setkáváme s hodnocením pacientů s primárním onemocněním slinivky břišní, v drtivé většině případů karcinomu slinivky břišní. Je proto třeba vzít v úvahu, že karcinom slinivky díky svému velmi vysokému procentu letality může výsledky významně ovlivnit.

V současné době je farmakologická léčba cholestatických onemocnění zúžená pouze na ursodeoxycholovou kyselinu (UDCA), která vykazuje choleretický účinek a podporuje sekreci žluči kanalikulárními transportéry na transkripční a posttranskripční úrovni. *In vitro* byly prokázány i imunomodulační účinky UDCA. Léčba primární biliární cirhózy či intrahepatální cholestázy těhotných podáváním UDCA přináší příznivé klinické výsledky. Naproti tomu použití UDCA u cholestázy obstrukčního typu se jeví jako nevhodné. Experimentálně bylo prokázáno, že použití UDCA na modelu cholestázy navozeném BDL (*bile duct ligation* – potkání s podvazem choledochu bez podání fluvastatinu) působí rupturu Herringových kanálků a následný únik žluči do okolního jaterního parenchymu vede ke smrti hepatocytů (Fickert et al., 2013). Účinkem UDCA tak dochází ke zhoršení cholestatického poškození.

V průběhu minulých let se objevovaly práce, které vycházely především z mechanismů popisovaných jako významné v rozvoji cholestatického poškození jater. S ohledem na prokázaný rozvoj oxidačního stresu během cholestázy a pokles antioxidační kapacity jater některé studie tak sledovaly účinek látek s antioxidačním účinkem. Jejich výsledky nejsou zcela jednoznačné. Když po 28 denní aplikaci došlo ke zlepšení antioxidační kapacity jater, parametry svědčící pro jaterní poškození a cholestázu se nezmírnily (Soylu, 2006; Tahan, 2007), popř. nebylo průkazné ani zlepšení antioxidačního stavu jater (Hagymási, 2002). Co se týče antifibrotického účinku těchto látek, hodnoceného měřením obsahem kolagenu v játrech, nálezy byly po jejich 28 denním podávání protichůdné (Tahan, 2007; Soyly, 2006).

Další trend s přesvědčivějšími výsledky přineslo studium protizáněťově a imunosupresivně působících látek. Již po 7 denním, resp. 14 denním podávání těchto látek byl zaznaenán signifikantní pokles markerů jaterního poškození, cholestázy, zlepšila se antioxidační kapacita jater i histologický nález jaterního poškození

(Karaman, 2006; Eken, 2006). Problémem pro využití v klinické praxi však může být možnost nežádoucích imunosupresivních účinků.

V posledních letech přibývá množství informací o jaderných receptorech jako cíle terapie cholestázy vzhledem k jejich úloze v regulaci pochodů významných pro rozvoj cholestatického poškození. FXR (farnesoid X receptor) je aktivován přirozeně se vyskytující CDCA, ale také (semi)syntetickými ligandy. Aktivací FXR dochází k ovlivnění transkripce řady genů, které mají význam pro snížení transportu ŽK z krve do hepatocytů, snížení syntézy ŽK, stimulaci detoxikace a sekrece ŽK. Zvyšuje se rovněž podíl fosfolipidů a bikarbonátu ve žluči a tím se snižuje její toxicita (Halilbasic et al., 2013). Zmírnění jaterního poškození účinkem obeticholové kyseliny a GW4060 bylo prokázáno na modelu cholestázy navozeném estrogeny (Fiorucci et al., 2005). Podáváním kyseliny obeticholové došlo i ke zmírnění jaterní fibrózy indukované BDL (Fiorucci et al., 2004; Liu et al., 2003). Ke zmírnění biochemických markerů jaterního poškození došlo i u lidí s PBS (primární biliární skleróza) po 12 týdenním podávání kyseliny obeticholové (Kowdley et al., 2012).

Pregnane X receptor (PXR) a constitutive androstane receptor (CAR) regulují geny významné pro detoxikaci a eliminaci potenciálně toxických exogenních a endogenních látek (Kliever et al., 2002). Cílovými jsou geny pro enzymy v biotransformačních procesech i řada transportérů umožňující vyloučení látek. Jejich aktivací dochází navíc i k útlumu syntézy ŽK. Jako aktivátor působí celá řada strukturálně odlišných látek včetně ŽK a bilirubinu. Klasickým aktivátorem PXR je rifampicin, který působil efektivně při léčbě pruritu provázejícím PBS (Yerushalmi et al., 1999). U obstrukční cholestázy navozené experimentálně podvazem choledochu vedlo podávání aktivátorů PXR a CAR ke snížení sérových markerů cholestázy (Wagner et al., 2005). Vedle toho může mít PXR i antifibrotické a protizánětlivé účinky. Stimulací PXR byl inhibován přechod hvězdicovitých buněk do myofibroblastů a došlo ke snížení exprese profibrogenního cytokinu TGF β (Haughton et al., 2006).

Vitamin D receptor (VDR) je aktivován kalcitriolem a má význam pro regulaci hladiny Ca²⁺. Ve střevě ho aktivovuje i sekundární ŽK – kyselina lithocholová (LCA), (Makishima et al., 2002). Stimulace VDR ve střevě myši vedla ke zvýšené expresi transportéru ASBT na apikální membráně a MRP3, fungující jako pumpa na

bazolaterální membráně pro transport ven z buňky. Zatímco v hepatocytech není exprimován, neparenchymové buňky v játrech (Kupfferovy, biliární, endoteliální, HSC) ho exprimují na vysoké úrovni (Gascon-Barré et al., 2003). Pokud byly izolované HSC aktivovány, exprese VDR se snížila, ale bylo ji možné opět zvýšit účinkem vitamínu D. Zvýšená exprese VDR pak byla provázena snížením proliferace HSC a antifibrotickým účinkem (Abramovitch et al., 2011). Antifibrotický potenciál VDR byl dokumentován i v podmínkách *in vivo*.

PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor) je vysoce exprimován ve tkáních, které využívají tuky – játra, srdce, ledviny, svaly, tenké a tlusté střevo (Braissant et al., 1996) a stimuluje β -oxidaci mastných kyselin. Aktivátory PPAR α jsou fibráty, které indukují expresi konjugačních enzymů II. fáze biotransformačních procesů a rovněž transportéru ASBT ve střevě a cholangiocytech (Barbier et al., 2003; Bariber et al., 2009; Fang et al., 2005; Jung et al., 2002). Ligandy PPAR α jsou schopny i tlumit syntézu ŽK (Marrapodi et al., 2000). Útlum syntézy ŽK a podpora jejich biotransformace při podávání fibrátů byla zaznamenána také u pacientů v časně fázi PBC (Honda et al., 2013).

V době vzniku této práce začal narůstat zájem o statiny nejen jako o hypolipidemika, ale také pro jejich protizánětlivé a antiproliferační účinky, což by mohlo vést k rozšíření spektra jejich využití. V rozvoji cholestatického poškození se uplatňují výrazné zánětlivé změny spojené s oxidačním stresem, proto by zásah do dějů spojených s aktivitou Kupfferových buněk, neutrofilů a následně produkcí zánětlivých cytokinů mohl přinést zmírnění jaterního poškození (Adam a Laufs, 2008). Experimentální podávání statinů po dobu 7 – 14 dnů vedlo k prokazatelnému zmírnění jaterního poškození, soudě dle změn aktivity jaterních transamináz, ukazatelů cholestázy a histopatologického nálezu (Demirbilek 2007). Tyto sporadické výsledky nás vedly k hlubšímu zkoumání vlivu účinků statinů na cholestatické poškození jater, které je součástí této práce.

1.6 Modely cholestázy v experimentu

Pro studium cholestázy je možno využívat experimentální zvířata nebo *in vitro* modely, především izolovaná perfundovaná játra, jaterní homogenáty nebo kultury hepatocytů.

In vitro metodiky jsou používány zejména pro farmakologické studie zaměřené na hodnocení metabolismu a biliární exkrece testovaných látek v podmínkách cholestázy.

Studie prováděné *in vivo* umožňují získávání informací o změnách navozených cholestázou jak v séru, tak v jaterní tkáni, včetně změn jaterní morfologie. Velmi často jsou používány i v experimentech hodnotících účinky látek s potenciálním anticholestatickým efektem. Vzhledem k tomu, že cholestáza může navodit i rozvoj cirhózy, existují také modely cirhózy navozené cholestázou na zvířeti. Nejčastěji jsou k indukci cholestázy používány potkani a myši.

1.6.1 Intrahepatální cholestáza

1.6.1.1 Lipopolysacharidem indukovaná cholestáza

Lipopolysacharidy jsou glykolipidy přítomné ve vnější membráně všech gramnegativních bakterií, jež mají schopnost navodit zánětlivou reakci. Hlavní úlohu v odstranění lipopolysacharidu (LPS) z organismu mají játra (Nakao et al., 1994). Fyziologicky gramnegativní bakterie kolonizují tlusté střevo, odkud se mohou samy nebo jejich produkty dostat portální krví do jater. Zde sehrávají významnou imunitní úlohu Kupfferovy buňky, ke které přispívá i jejich lokalizace v jaterních sinusoidách drénujících krev z gastrointestinálního traktu. I při experimentálním intravenózním podání LPS zvířeti došlo k jeho distribuci do jater (Mathison a Ulevitch, 1979).

LPS v játrech indukuje tvorbu prozánětlivých cytokinů TNF α , IL-1 β , IL-6, jejichž zdrojem jsou zejména aktivované Kupfferovy buňky, ale také endotelové buňky, hepatocyty a cholangiocyty (Kovalovich et al., 2000; Luster et al., 1994). LPS aktivuje Kupfferovy buňky cestou CD 14 receptoru, který je za normálních podmínek sice málo exprimován, avšak dostatečně pro zmíněnou aktivaci (Antal-Szalmás, 2000). Zvýšená exprese CD 14 byla dokumentována u různých jaterních poškození včetně

cholestatického (Su et al., 2002). Význam změn exprese CD 14 sice není objasněn, ale jeho přítomnost přispívá ke zvýšení citlivosti na LPS (Su, 2002). CD 14 je receptorem na povrchu buněk bez transmembránové komponenty, k přenosu signálu do buňky slouží *toll like receptory* (TLR). TLR4 je specifický pro LPS gramnegativních bakterií.

Podáním LPS zvířeti (intraperitoneálně a nejčastěji hlodavcům), lze navodit cholestázu inhibicí tvorby žluče. Experimentálně bylo prokázáno, že LPS přímo nebo prostřednictvím stimulace tvorby prozáněťových cytokinů snižuje expresi klíčových transportérů žlučových kyselin na bazolaterální a kanalikulární membráně. Snížení exprese NTCP na bazolaterální membráně bylo možné na transkripční i posttranskripční úrovni (Trauner et al., 1998). Jak bylo zmíněno výše, Ntcp u zvířat resp. NTCP u lidí slouží k transportu žlučových kyselin z krve do hepatocytů. Snížení exprese tohoto transportéru po endotoxinu může být součástí adaptační reakce na kumulaci žlučových kyselin v hepatocytech při cholestáze. Obdobně byla prokázána snížená exprese dalšího transportéru na bazolaterální membráně pro přenos žlučových kyselin a organických aniontů – OATP (Geier et al., 2005). Faktorem, který je rozhodující pro rozvoj cholestázy po podání LPS, je poškození transportu těchto látek z hepatocytu přes kanalikulární membránu. Po podání LPS byla prokázána *down-regulace* kanalikulárního transportéru Mrp2 i jeho redistribuce z membrány do intracelulárního kompartmentu (Saeki et al., 2011). Tím dochází ke kumulaci žlučových kyselin a jiných potenciálně toxických látek v hepatocytech. Určitý stupeň exkrece žlučových kyselin bude ale pravděpodobně po LPS zachován vzhledem k tomu, že kanalikulární transportér Bsep nevykazuje tak výrazné změny exprese jako Mrp2.

1.6.1.2 Estrogeny indukovaná cholestáza

Podáním syntetického estrogenu ethinyl estradiolu lze navodit poškození transportních mechanismů na bazolaterální a kanalikulární membráně a následně snížení produkce žluči (Simon et al. 1996). Obdobně jako po LPS bylo popsáno snížení exprese a funkce Ntcp a *down-regulace* Oatp, zatímco exprese Bsep zůstala částečně zachována (Takikawa et al., 1998; Geier et al., 2003).

Hlavní účinek je přisuzován konjugovanému metabolitu ethinyl estradiolu estradiol-17 β -D-glukuronidu, u kterého bylo v závislosti na použité dávce prokázáno snížení sekrece žlučových kyselin a produkce žluči u potkanů (Meyers et al., 1980). Jeho účinkem došlo i ke snížení transporní aktivity kanalikulárního transportéru Mrp2 (Mottino et al., 2002). Ethinyl estradiol a estradiol-17 β -D-glukuronid zvýšily také permeabilitu spojení *tight junction*, které normálně omezuje průchod látek mezi krví a žlučí, a přispěly tak ke zpětnému návratu látek tvořících součást žluče do krve.

1.6.2 Extrahepatální cholestáza

1.6.2.1 Cholestáza navozená podvazem žlučovodu

Tento model simuluje obstrukční typ cholestázy a je frekventovaně používán pro studium cholestázy. Provádí se úplným uzávěrem *ductus choledochus*. Řada nálezů provázejících cholestatické změny byla popsána právě na tomto modelu.

Vlivem porušení odtoku žluči se vyvíjejí časné ultrastrukturální změny (Baumgartner et al., 1995). Podvazem žlučovodu se v biliárním prostoru zvyšuje tlak a dochází k významnému narušení funkční integrity spojů *tight junctions* (Rahner et al., 1996). Běžně jsou cholangiocyty mitoticky inaktivní. Během 24 hod. dochází k proliferaci biliárního epitelu. Je pravděpodobné, že cholangiocyty vykazují určitou heterogenitu a oblast, kde proliferace probíhá, se liší podle příčiny poškození. Po BDL je představována buňkami vystylajícími žlučovody od 15 μ m více v průměru (Alpini et al., 1996), zatímco např. parciální hepatektomie nebo akutní poškození jater tetrachlórmetanem navodily proliferační odpověď menších cholangiocyty (Alpini et al., 1998). Na modelu podvazu žlučovodu myši bylo pozorováno první maximum proliferace 2. a 3. den ve velkých žlučovodech a 5. den v malých (Georgiev et al., 2006). Proliferace tedy směřuje od extrahepatálních žlučovodů směrem k intrahepatálním. Kolem 14. dne je již proliferace cholangiocyty ve všech žlučovodech nízká. Alternativním zdrojem cholangiocyty mohou být nejspíše i hepatocyty zejména z periportální oblasti nebo oválné buňky v Heringových kanálcích (Michalopoulos et al., 2005). Proliferace hepatocyty kulminovala 5. den po BDL, což je asi za 48 hodin po maximálním hepatocelulárním poškození (Georgiev et al., 2006). Záhy po BDL se zvyšuje exprese kolagenu I, avšak u potkanů je na rozdíl od myši progresse fibrózy

výrazná, takže se může vyvinout během 2 týdnů (Kountouras et al., 1984) a od 3. týdne jsou patrné známky cirhózy ve formě uzlů a sept. Cholestatické poškození jater tak může v pokročilejším stádiu sloužit také pro studium fibrózy jater.

2 Cíle práce

V době vzniku projektu rostl zájem o statiny nejen jako o hypolipidemika, ale i pro jejich protizáněťové a antioxidační účinky, což bylo příslibem k rozšíření spektra jejich využití. Tato práce měla dát alespoň částečně odpověď, zda by statiny byly vhodnými léky k omezení rozvoje cholestatického poškození jater, jehož mechanismus spočívá v oxidačním a záněťovém poškození, a do jaké míry se na tomto případném účinku může podílet dávka a doba podávání této látky. To by mohlo být dobrým předpokladem pro další studium a prevenci komplikací u chirurgických pacientů s cholestázou.

2.1 Hodnocení míry jaterního cholestatického poškození v závislosti na dávce a době podávání fluvastatinu

Prvním cílem bylo na modelu extrabiliární cholestázy navozené podvazem žlučového sledovat účinek vybraného statinu – fluvastatinu na rozvoj jaterního poškození, resp. zda může rozvoj tohoto poškození omezit podávání fluvastatinu. Z tohoto důvodu byla prováděna vyšetření séra, která sloužila k hodnocení poškození jater – ALT, AST, k určení stupně cholestázy – GGT, ALP, celkový a konjugovaný bilirubin a k hodnocení proteosyntetické funkce jater – albumin.

V chirurgii převažují cholestázy z extrahepatálních příčin. Model podvazu žlučového na zvířeti, použitý i v naší studii, simuluje změny navozené extrahepatální cholestázou, ke studiu cholestázy je frekventovaně používán a umožňuje až 28 denní trvání cholestázy.

Hodnocení účinku fluvastatinu v naší studii má dva aspekty – vliv jeho různé dávky (1 a 5 mg/kg tělesné hmotnosti) a dobu jeho podávání (původně plánovány 1, 2 a 3 týdny).

2.2 Hodnocení mechanismů účinků fluvastatinu na změny navozené cholestázou

Vzhledem k tomu, že oxidační stres, záněťové, fibrotické změny a funkce mitochondrií jsou nejčastěji zmiňovány v souvislosti s cholestatickým poškozením, byl sledován účinek fluvastatinu na parametry hodnotící jejich intenzitu. Rovněž tak byli vybráni zástupci transportérů, jejichž exprese se mění vlivem cholestázy v rámci adaptační reakce. Byl hodnocen dopad podávání fluvastatinu na jejich expresi.

Naším druhým cílem bylo tedy studium mechanismů účinků fluvastatinu na změny navozené cholestázou:

- vliv fluvastatinu na oxidační stres provázející cholestázu,
- vliv fluvastatinu na produkci prozáněťových a profibrogenních cytokinů při cholestáze,
- vliv fluvastatinu na funkci mitochondrií při cholestáze,
- hodnocení exprese vybraných transportérů na sinusoidální a kanalikulární membráně.

3 Metodické postupy

3.1 Laboratorní zvířata

K pokusům byli použiti potkani – samci kmene Wistar (Bio Test, Konárovice) o počáteční hmotnosti 310 – 380 g. Potkani byli umístěni ve viváriu, v místnosti o teplotě 23 ± 1 °C, relativní vlhkosti 55 ± 10 %, s výměnou vzduchu 12 – 14 x / hod. a střídáním světla a tmy po 12 hod. (6.00 – 18.00). Potkani měli volný přístup k vodě a standardní laboratorní dietě (DOS 2B, Velaz, Praha). Pokusy byly schváleny Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání při Univerzitě Karlově v Praze, Lékařské fakultě v Hradci Králové (povolení č. j. 11 829/2007 - 30 ze dne 20. 4. 2007), nyní označovanou jako Odborná komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat.

3.1.1 Hodnocení příjmu potravy u potkanů

Potkani byli chováni ve viváriu po 6 – 10 a každý den bylo měřeno množství spotřebované diety připadající na tento počet zvířat. Výsledek je vyjádřen jako průměrná spotřeba diety na 1 zvíře. Vzhledem k tomu, že nebyla měřena skutečná spotřeba diety připadající na 1 zvíře, nejsou výsledky uvedeny se směrodatnými odchylkami a nemohlo zde být provedeno statistické hodnocení.

3.1.2 Hodnocení změny tělesné hmotnosti potkanů

Potkani byli každý den v 7.00 – 7.30 hodin váženi. K určení rozdílu hmotnosti byla použita hmotnost na počátku pokusu (tj. v den operace před jejím provedením), která byla odečtena od hmotnosti měřené den před ukončením pokusu. V případě přibývání hmotnosti jsou tedy rozdíly pozitivní, v případě hubnutí zvířat negativní.

3.1.3 Operační zákroky

Operační zákroky byly prováděny v éterové anestézii. Po provedení horní střední laparotomie byl v pravém *subchondriu* v podjaterní krajině identifikován *ductus cysticus* a následně *ductus choledochus*. Šetrnou *disekcí* byla provedena jeho izolace, naloženy dvě ligatury, jedna centrálně, druhá periferně a mezi těmito dvěma ligaturami byl *ductus choledochus* přerušen. Následovala sutura stěny břišní pokračovacím stehem v jedné vrstvě silonovým vláknem a sešití kůže, následně provedena dezinfekce sutury rány. Poté byla anestézie ukončena a potkan byl po zaschnutí dezinfekčního prostředku uložen do observačního prostoru vivária. Kontrolní skupině potkanů byla obdobně provedena laparotomie s uvolněním žlučovodu od okolní tkáně.

3.1.4 Aplikace léků

Potkanům byl podáván fluvastatin (Lescol, Novartis) v dávce 1 nebo 5 mg/kg tělesné hmotnosti. Fluvastatin (80 mg) byl rozpuštěn ve 160 ml, resp. 50 ml *aqua pro injectione* a aplikován v objemu 0,2 ml/100 mg, resp. 0,3 ml/100 g hmotnosti. Testovaná látka – fluvastatin nebo u kontrol *aqua pro injectione* byla v odpovídajícím objemu aplikována 1x denně sondou do žaludku v dopoledních hodinách. První dávka byla podána ihned po provedení operace, poslední dávka den před ukončením pokusu.

3.1.5 Ukončení pokusu

Potkani byli usmrceni vykrvácením z břišní aorty. V éterové inhalační anestezii byla provedena laparotomie a z bifurkace břišní aorty byla odebrána krev do sterilních stříkaček bez protisrážlivého činidla. Jaterní tkáň byla uvolněna od okolí a po vyjmutí opláchnuta ve fyziologickém roztoku. Tkáň byla ihned zpracována pro následná měření.

3.2 Biochemická vyšetření séra

Enzymové aktivity byly vyšetřovány automatickými přístroji Ústavem klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové. Analyty byly měřeny na přístroji MODULAR (Roche, Basel, Švýcarsko) s využitím příslušných setů.

3.2.1 Stanovení aktivity ALT a AST

Pro aktivaci ALT je nezbytně nutná přítomnost kofaktoru pyridoxalfosfátu. ALT katalyzuje přenos aminoskupiny z alaninu na 2-oxoglutarát za vzniku glutamátu a pyruvátu. V následujícím kroku je pyruvát redukován na laktát za současné oxidace NADH na NAD⁺. Rychlost fotometricky měřeného úbytku NADH je přímo úměrná aktivitě ALT.

Pro aktivaci AST je nezbytná přítomnost kofaktoru pyridoxalfosfátu. AST katalyzuje přenos aminoskupiny z aspartátu na 2-oxoglutarát za vzniku glutamátu a oxalacetátu. Oxalacetát je v další fázi redukován na malát za současné oxidace NADH na NAD⁺. Tuto reakci katalyzuje enzym malátdehydrogenáza. Rychlost fotometricky měřeného úbytku NADH je přímo úměrná aktivitě AST.

3.2.2 Stanovení aktivity GGT

GGT katalyzuje přenos γ -glutamylového zbytku na akceptor za vzniku barevné sloučeniny, jejíž přírůstek je přímo úměrný aktivitě GGT.

3.2.3 Stanovení aktivity ALP

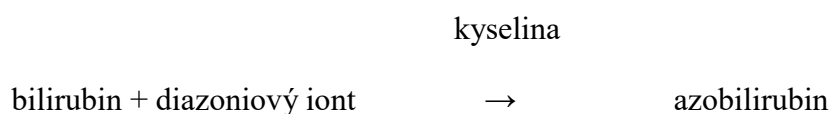
Celková ALP byla stanovována spektrofotometricky na základě principu štěpení 4-nitrofenylfosfátu na 4-nitrofenol a fosforečnan. Nárůst 4-nitrofenolu je úměrný aktivitě ALP.

3.2.4 Stanovení aktivity CK

Celková kreatinkináza (CK) byla stanovována na principu 3 reakcí. V první vzniká kreatin a ATP účinkem kreatinkinázy, v další dochází k fosforylaci D-glukózy na D-glukózo-6-fosfát za přítomnosti ATP a v poslední reakci se oxiduje D-glukózo-6-fosfát na 6-fosfoglukonát působením glukózo-6-fosfátdehydrogenázy. Během této reakce je redukován NADP^+ na NADPH a fotometricky je měřen přírůstek NADPH, který odpovídá aktivitě kreatinkinázy.

3.2.5 Stanovení koncentrace bilirubinu

Koncentrace celkového bilirubinu v séru byla stanovována v laboratořích Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové. Stanovení probíhalo diazo metodou, při které se celkový bilirubin v přítomnosti vhodného solubilizačního činidla spojuje s diazoniovými ionty v silně kyselém prostředí (pH 1 - 2) a vytváří azobilirubin.



Intenzita zbarvení vytvářeného azobilirubinu je přímo úměrná koncentraci celkového bilirubinu a byla změřena fotometricky na přístroji MODULAR (Roche, Basel; Švýcarsko).

3.2.6 Stanovení koncentrace albuminu

Koncentrace albuminu byla stanovována fotometricky s „end-point“ metodou. Principem je, že při pH 4,1 má albumin povahu kationtu, je schopen se vázat na bromkrezolovou zeleň (BCG) – aniontové barvivo a vytvářet modrozelený komplex. Intenzita modrozelené barvy je přímo úměrná koncentraci albuminu.

3.2.7 Stanovení koncentrace malondialdehydu

Malondialdehyd (MDA) je jedním ze sekundárních produktů peroxidace lipidů. Za zvýšené teploty se tvoří v kyselém prostředí červený komplex s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Pro zvýšení specifčnosti reakce se měří absorbance vzniklého barevného komplexu

MDA-TBA při třech vlnových délkách. Korekce absorbance se vypočítává dle Allenova vzorce:

$$A_{\text{KOR}} = A_{532} - [(A_{560} - A_{485}) \times 0,63 + A_{485}]$$

3.3 Stanovení produkce cytokinů

Produkce cytokinů byla měřena za použití komerční soupravy Bender MedSystems metodou sandwichové ELISA, kdy se na specifickou protilátku proti měřenému analytu navázanou na stěně jamky váže cytokin. Do jamek mikrotitrační destičky se přidá druhá specifická protilátka proti cytokinu konjugovaná s biotinem (*Biotin-conjugate*). Po inkubaci a promytí mikrotitrační destičky se do reakce přidá streptavidin konjugovaný s enzymem – křenovou peroxidasou (*Streptavidin-HRP*), který se během další inkubace naváže na biotin a vytvoří tzv. *sandwich* nebo se přidá rovnou protilátka značená křenovou peroxidasou *HRP conjugate*. Reakce se vizualizuje tehdy, když po promytí se do jamek přidá roztok *Substrate solution*, který obsahuje chromogenní látku tetrametylbenzidín (TMB), což vede ke změně barvy. Reakce je zastavena po přidání 1 M kyseliny fosforečné a výsledný produkt je následně při odpovídající vlnové délce fotometricky kvantifikován. Míra absorbance je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku.

3.3.1 Stanovení koncentrace cytokinů v séru

3.3.1.1 Stanovení TNF α

Součástí soupravy je mikrotitrační destička s monoklonálními protilátkami proti potkanímu TNF α .

- jamky mikrotitrační destičky byly 2x promyty 300 μ l promývacího pufru,
- do jamek pro standard a pro blank bylo napipetováno 100 μ l *Sample diluent*,
- do jamek pro vzorky bylo napipetováno 50 μ l *Sample diluent* a 50 μ l vzorku,
- do všech jamek bylo přidáno 50 μ l *biotin-conjugate*,
- destička byla inkubována 2 hod. při pokojové teplotě na rotátoru při 200 otáčkách/min.,
- jamky mikrotitrační destičky byly 4x promyty 300 μ l promývacího pufru,
- do všech jamek bylo napipetováno 100 μ l Streptavidin-HRP,
- destička byla inkubována 1 hod. při pokojové teplotě na rotátoru při 200 otáčkách/min.,
- jamky mikrotitrační destičky byly 4x promyty 300 μ l promývacího pufru,

- do všech jamek bylo napipetováno 100 μ l *Substrate solution*,
- destička byla inkubována 10 min. ve tmě při pokojové teplotě,
- enzymová reakce byla zastavena přidáním 100 μ l *Stop solution* do všech jamek,
- byla měřena absorbance při 450 nm (Tecan).

3.3.1.2 Stanovení IL-6

Cytokin byl měřen za použití komerční soupravy Bender MedSystems metodou sandwichové ELISA. Součástí kitu je mikrotitrační destička s monoklonálními protilátkami proti potkanímu IL-6. Sérum bylo ředěno s použitím aqua pro injectione v poměru 1:1.

- jamky mikrotitrační destičky byly 2x promyty 300 μ l promývacího pufru,
- do jamek pro standard a pro blank bylo napipetováno 100 μ l *Assay buffer*,
- do jamek pro vzorky bylo napipetováno 50 μ l *Assay buffer* a 50 μ l vzorku,
- do všech jamek bylo přidáno 50 μ l *biotin-conjugate*,
- destička byla inkubována 2 hod. při pokojové teplotě na rotátoru při 200 otáčkách/min.,
- jamky mikrotitrační destičky byly 2x promyty 300 μ l promývacího pufru,
- do všech jamek bylo napipetováno 100 μ l Streptavidin-HRP,
- destička byla inkubována 1 hod. při pokojové teplotě na rotátoru při 200 otáčkách/min.,
- jamky mikrotitrační destičky byly 3x promyty 300 μ l promývacího pufru,
- do všech jamek bylo napipetováno 100 μ l *Substrate solution*,
- destička byla inkubována 10 min. ve tmě při pokojové teplotě,
- enzymová reakce byla zastavena přidáním 100 μ l *Stop solution* do všech jamek,
- byla měřena absorbance při 450 nm (Tecan).

3.3.2 Stanovení koncentrace cytokinů v játrech

Z jater bylo odebráno 0,6 g tkáně a vzorek ihned zamražen v tekutém dusíku. Vzorky byly skladovány při teplotě - 80 °C. Vzorek jater byl homogenizován v Ripa pufru pístovým homogenizátorem ve 12 ml zkumavkách s kulatým dnem. Vzorek byl inkubován 2 hod. na ledu a každých 15 min. byl protřepán. Poté byla provedena jeho centrifugace při 2 500 otáčkách/min., po dobu 10 min. při teplotě 4 °C. Byl odebrán *supernatant* (1,7 ml) do mikrozkuavky a vzorek byl centrifugován při 10 000 g, 10 min. při 4 °C. Supernatant byl odebrán a zamražen pro pozdější měření koncentrace cytokinů.

3.3.2.1 Stanovení IL-6

Cytokin byl měřen za použití komerční soupravy Bender MedSystems metodou *sandwichové* ELISA. Součástí soupravy je mikrotitrační destička s monoklonálními protilátkami proti potkanímu IL-6. Připravené vzorky z homogenátu jater byly ředěny ve 2 krocích 114x.

Postup řešení:

- jamky mikrotitrační destičky byly 2x promyty 300 μ l promývacího pufru,
- do jamek pro standard a pro blank bylo napipetováno 100 μ l *Assay buffer*,
- do jamek pro vzorky bylo napipetováno 50 μ l *Assay buffer* a 50 μ l vzorku,
- do všech jamek bylo přidáno 50 μ l *biotin-conjugate*,
- destička byla inkubována 2 hod. při pokojové teplotě na rotátoru při 200 otáčkách/min.,
- jamky mikrotitrační destičky byly 2x promyty 300 μ l promývacího pufru,
- do všech jamek bylo napipetováno 100 μ l Streptavidin-HRP,
- destička byla inkubována 1 hod. při pokojové teplotě na rotátoru při 200 otáčkách/min.,
- jamky mikrotitrační destičky byly 3x promyty 300 μ l promývacího pufru,
- do všech jamek bylo napipetováno 100 μ l *Substrate solution*,
- destička byla inkubována 10 min. ve tmě při pokojové teplotě,
- enzymová reakce byla zastavena přidáním 100 μ l *Stop solution* do všech jamek,
- byla měřena absorpce při 450 nm (Tecan).

3.3.2.2 Stanovení TGF β 1

Součástí kitu je mikrotitrační destička s monoklonálními protilátkami proti potkanímu TGF β 1.

Postup řešení:

- ke 200 μ l vzorku bylo přidáno 20 μ l 1 N HCl a inkubováno 1 hod. při pokojové teplotě,
- vzorky byly neutralizovány 20 μ l 1 N NaOH,
- jamky mikrotitrační destičky byly 3x promyty 300 μ l promývacího pufru,
- do jamek pro standard a pro blank bylo napipetováno 100 μ l *Assay buffer*,

- do jamek pro vzorky bylo napipetováno 100 μ l naředěných vzorků (150 μ l *Assay buffer* a 50 μ l vzorku),
- do všech jamek bylo přidáno 50 μ l *HRP-conjugate*,
- destička byla inkubována 4 hod. při pokojové teplotě na rotátoru při 100 otáčkách/min.,
- jamky mikrotitrační destičky byly 3x promyty 300 μ l promývacího pufru,
- do všech jamek bylo napipetováno 100 μ l *Substrate solution*,
- destička byla inkubována 10 min. ve tmě při pokojové teplotě,
- enzymová reakce byla zastavena přidáním 100 μ l *Stop solution* do všech jamek,
- byla měřena absorpce při 420 nm.

3.4 Měření celkového obsahu glutationu v játrech

1,5 g čerstvě extirpovaných jater bylo homogenizováno v 10 ml fyziologického roztoku (4 °C). Homogenát byl centrifugován při 3 000 otáčkách/min., po dobu 5 min., 0,5 ml supernatantu bylo přidáno do 1 ml 10 % kyseliny fosforečné. Takto připravený vzorek byl protřepán a centrifugován při 13 000 otáčkách/min., po dobu 10 min. Supernatant byl zamražen na teplotu -80 °C. K měření byla použita *metoda HPLC* (Hissin et Hilf 1976) v mírně modifikované formě (Kand'ár et al. 2006). K separaci byla použita kolona s reverzní fází Discovery C18, 15 cm x 4 mm, 5 μ m (Supelco). Po postkolonové derivatizaci o-ftalaldehydem byla měřena fluorescence při excitaci 350 nm a emisi 420 nm. Kvantifikace glutationu byla provedena programem CSW32 (DataApex) z odpovídající oblasti vrcholu záznamu. Výsledky jsou vyjádřeny jako množství glutationu ve vlhké jaterní tkáni v μ mol/g jater.

3.5 Hodnocení respirační aktivity jaterních mitochondrií

Mitochondrie byly izolovány z homogenátů jater metodou diferenční centrifugace (Hogeboom et Schneider, 1951; Bustamante et al., 1977). Spotřeba kyslíku mitochondriemi byla měřena použitím High Resolution Oxygraph 2K (Oroboros; Rakousko). K hodnocení dat o spotřebě kyslíku byl použit program Oroboros (DatLab 4.2).

Byla hodnocena aktivita respiračního komplexu I po přidání glutamátu a malátu (substrátů závislých na NADH) a ADP a následně byl komplex I inhibován rotenonem. Poté byla měřena aktivita komplexu II po přidání sukcinátu (flavoprotein dependentního

substrátu). Výsledky jsou vyjádřeny jako relativní četnost vzhledem ke kontrolní skupině (100 % odpovídá aktivitě komplexu I, resp. II z mitochondrií intaktních jater).

3.6 Stanovení obsahu proteinů

Měření bylo provedeno kolorimetrickou metodou podle Bradforda, kdy v kyselém prostředí vzniká stabilní komplex. Bradfordovo činidlo bylo připraveno ze směsi:

50 mg Brilliant Blue,

25 ml etanolu (95 %),

50 ml H₃ PO₄,

a doplněno do 500 ml destilované vody.

K 10 µl vzorku (standardu) bylo přidáváno 300 µl Bradfordova činidla. Směs byla protřepána a inkubována 10 min. ve tmě. Absorbance byla měřena při 595 nm (Tecan; Švýcarsko). V případě měření proteinů v homogenátu jater byl vzorek homogenátu nejprve 100 x naředěn.

3.7 Stanovení exprese genů v játrech

Expese genů Mdr1b, Mrp3 a Ugt1a1 byla stanovována užitím qRT-PCT analýzy (Brčáková et al. 2009) na 7500HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems; USA). Celková RNA byla izolována z jater použitím Qiagen RNeasy Mini Kit (Bio-Consult Laboratories; Česká republika) a konvertována na komplementární DNA (cDNA) pomocí High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems; USA). Reakční směs obsahovala 30 ng analyzované cDNA. Amplifikace vzorků byla prováděna v tripletech s použitím TaqMan Fast Universal PCR Master Mix a Taq Man Gene Expression Assay for Mdr1b (Abcb1b, Rn00561753_m1), Mrp3 (Abcc3, Rn00589786_m1) a Ugt1a1 (Rn00754947_m1) z Applied Biosystems (USA). Časově teplotní profil byl 95 °C po dobu 3 min., 40 cyklů 95 °C po dobu 7 s, 60 °C po dobu 25 s. K normalizaci hodnot byly použity dva referenční geny GAPDH (4352338E, Applied Biosystems; USA) a Ywhaz (GENERI BIOTECH s.r.o.; Česká republika).

3.8 Jaterní histologie

Vzorek jaterní tkáně byl fixován ve 4 % paraformaldehydu. Po standardním zpracování na Ústavu patologické anatomie ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové byly

vzorky barvené hematoxylin – eosinem hodnoceny patologem. Sledovány byly známky cholestázy: edematózní změny, zánětová infiltrace, duktulární proliferace, fibrotizace.

3.9 Statistické metody

Ke statistickému zhodnocení výsledků byl použit program GraphPad Instant 3.06 for Windows (GraphPad Software; USA). Hodnocení statistické významnosti bylo provedeno jednofaktorovým ANOVA testem. K vícečetnému porovnání mezi skupinami sloužil Tukey-Kramerův *post hoc test*. V případě nenormálního rozložení hodnot byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test s Dunnovým *post hoc testem*. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka průměru. Statistická významnost je vyjádřena pomocí hodnot * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4 Výsledky

4.1 Hodnocení míry jaterního cholestatického poškození v závislosti na dávce a době podávání fluvastatinu

Původním plánem bylo hodnocení účinku podávání fluvastatinu (Lescol XL, Novartis) podávaného intragastrickou sondou (rozpuštěný v *aqua pro injectione*) ihned po provedení podvazu žlučovodu (BDL) a následně každý den v dávce 1 nebo 5 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 1, 2 a 3 týdnů.

Potkani byli rozděleni do čtyř skupin:

Skupina 1: *kontrolní potkani s laparotomií – LAP*

Skupina 2: *kontrolní potkani s laparotomií a fluvastatinem – LAP + FLU*

Skupina 3: *potkani s podvazem choledochu bez fluvastatinu – BDL*

Skupina 4: *potkani s podvazem choledochu léčení fluvastatinem – BDL + FLU*

Ve skupinách 1 a 2 bylo po 6 zvířatech, jedná se o minimální počet zvířat, který je v experimentu akceptován ke statistickému zpracování. Skupiny 3 a 4, ve kterých byl prováděn podvaz choledochu k navození cholestázy, obsahovaly po 10 zvířatech, protože zákrok BDL zvyšuje riziko úmrtí zvířete. Kontrolním potkanům byla aplikována *aqua pro injectione* v adekvátním objemu.

Zde je nutné předeslat, že 14 dnů trvající experimenty byly provázeny úmrtími zvířat ve skupině BDL + FLU, což u dávky 5 mg/kg začalo omezovat možnost statistického hodnocení. Ve 21 dnů trvajících experimentech narostla úmrtnost ve skupině BDL + FLU natolik (a to v případě obou použitých dávek fluvastatinu – 1 a 5 mg/kg), že nebylo možné provést statistické hodnocení výsledků v tomto časovém intervalu. Z tohoto důvodu tato práce hodnotí:

- a) **vliv podávání fluvastatinu v dávce 1 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 1 týdne**
- b) **vliv podávání fluvastatinu v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 1 týdne**
- c) **vliv podávání fluvastatinu v dávce 1 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 2 týdnů**

Míra jaterního poškození, cholestázy a ikteru byla posuzována ze sérové aktivity ALT, AST, GGT, ALP, koncentrace celkového a konjugovaného bilirubinu a sérové koncentrace albuminu. Sledována byla i aktivita sérové CK jako jednoho z ukazatelů myopatie, která může být v klinické praxi nežádoucím vedlejším efektem při podávání fluvastatinu.

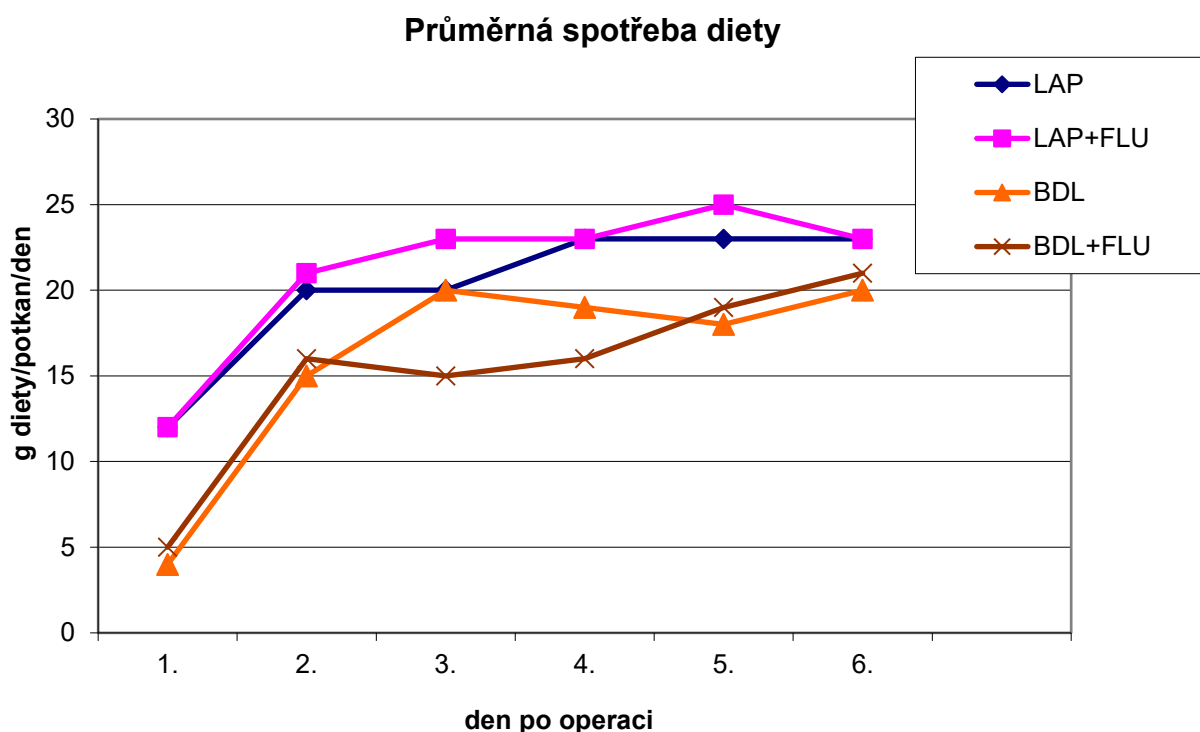
Každý den byla kontrolována hmotnost potkanů a průměrný příjem potravy na 1 potkana.

4.1.1 Vliv podávání fluvastatinu v dávce 1 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 1 týdne

4.1.1.1 Průměrný příjem standardní laboratorní diety

1. pooperační den (po laparotomii nebo podvazu žlučového) došlo k poklesu příjmu potravy, v následujících dnech dochází k jeho postupnému zvyšování (Graf 1). Pozvolněji se příjem upravoval v případě provedení podvazu, zejména pokud byl současně podáván fluvastatin. Nicméně nelze provést statistické zhodnocení, protože se jedná o průměrnou hodnotu (viz Metodické postupy). Hodnoty jsou uvedeny pro 6 dní, protože 7. den byl pokus v dopoledních hodinách ukončen.

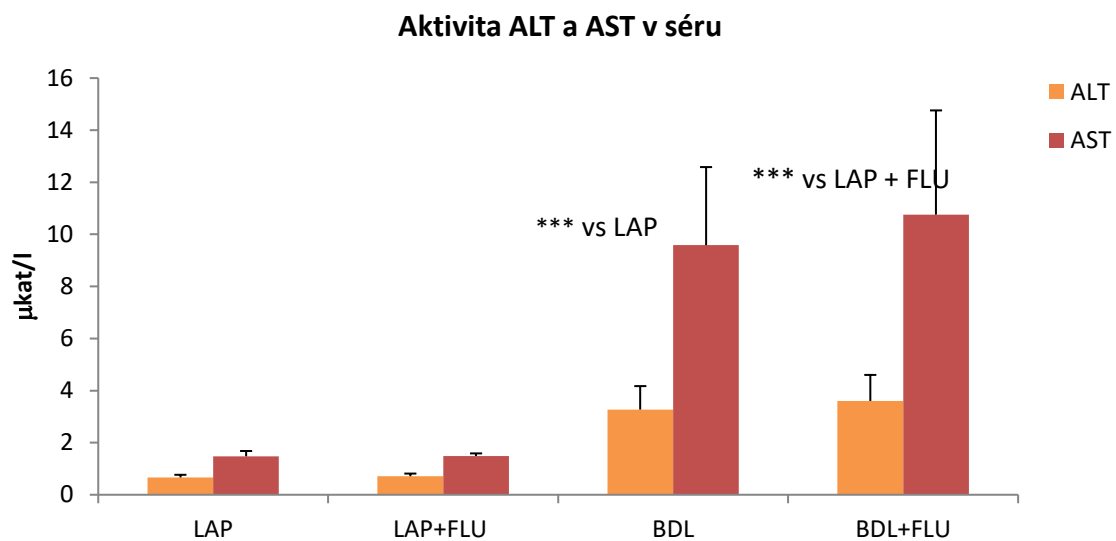
Graf 1



4.1.1.2 Aktivita ALT a AST v séru

Podvaz žlučovodu (BDL) vedl ke statisticky významnému zvýšení ALT a AST ($p < 0,001$) ve srovnání s kontrolní skupinou LAP. Podávání fluvastatinu kontrolní skupině nepůsobilo žádné změny koncentrací ALT a AST. Po BDL a následném podávání fluvastatinu (BDL + FLU) došlo ke statisticky významnému nárůstu sérových koncentrací ALT a AST ve srovnání se skupinou LAP + FLU ($p < 0,001$), avšak nedošlo k jejich další změně ve srovnání se skupinou po samotném podvazu (Graf 2).

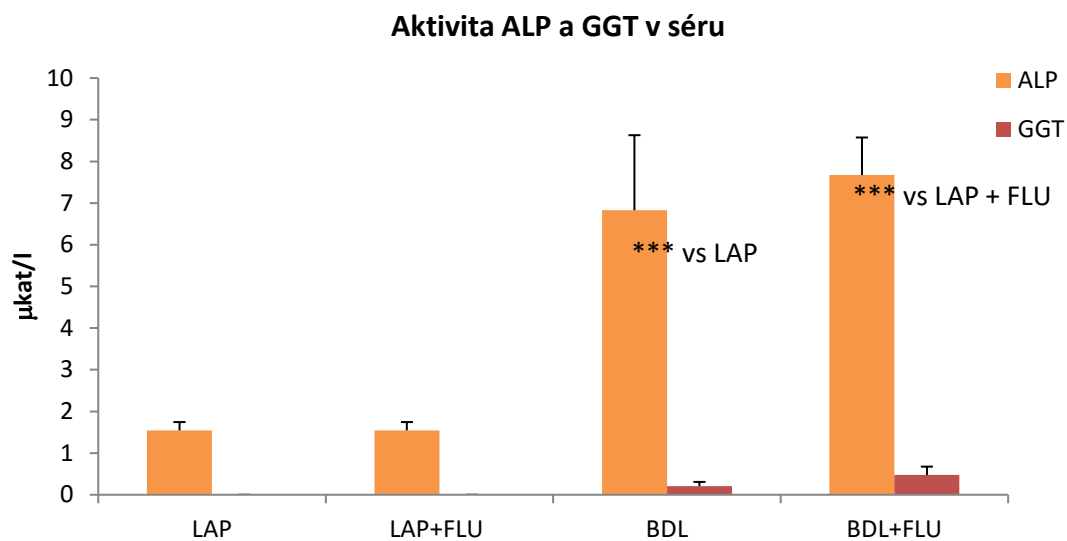
Graf 2



4.1.1.3 Aktivita ALP a GGT v séru

Obdobně jako v předchozím případě došlo vlivem BDL k významnému nárůstu aktivit obou enzymů ALP i GGT ($p < 0,001$) ve srovnání s kontrolní laparotomovanou skupinou. Pokud byl proveden podvaz a následně podáván fluvastatin, hodnoty ALP a GGT byly signifikantně vyšší než v případě, kdy místo BDL byla provedena pouze laparotomie – skupina LAP + FLU ($p < 0,001$). Mezi skupinou po provedení BDL a skupinou po BDL a následném podávání fluvastatinu nebyl žádný rozdíl (Graf 3).

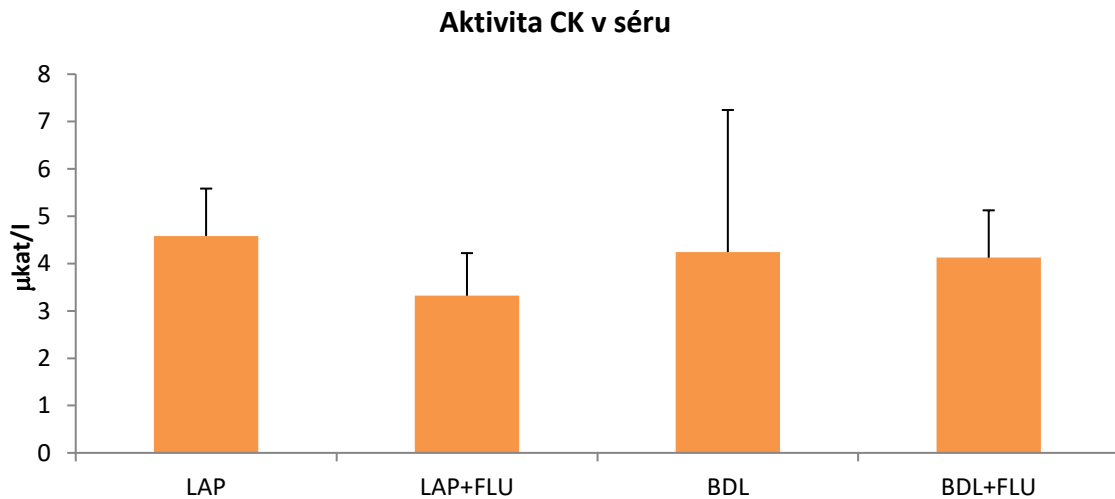
Graf 3



4.1.1.4 Aktivita CK v séru

Mezi skupinami nebyly shledány statisticky významné rozdíly v aktivitě sérové CK (Graf 4).

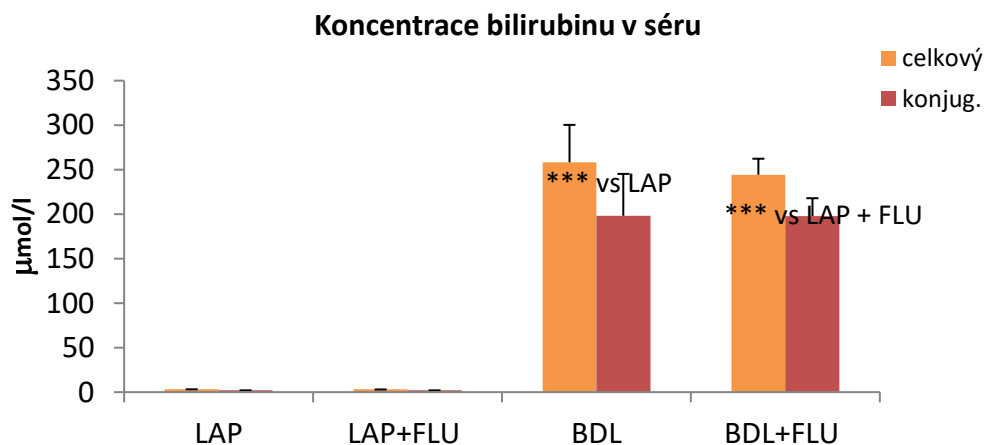
Graf 4



4.1.1.5 Koncentrace celkového a konjugovaného bilirubinu v séru

Po provedení BDL prudce narostla sérová koncentrace celkového a konjugovaného bilirubinu v séru ($p < 0,001$) ve srovnání s kontrolní laparotomovanou kontrolou. Tento nárůst ($p < 0,001$) byl patrný i ve skupině po BDL, ve které byl podáván fluvastatin, při porovnání se skupinou po laparotomii a příjmu fluvastatinu (LAP + FLU). Mezi skupinou s BDL a skupinou s BDL, kdy byl podáván fluvastatin, nebyl zjištěn rozdíl v hodnotách koncentrace bilirubinu (Graf 5).

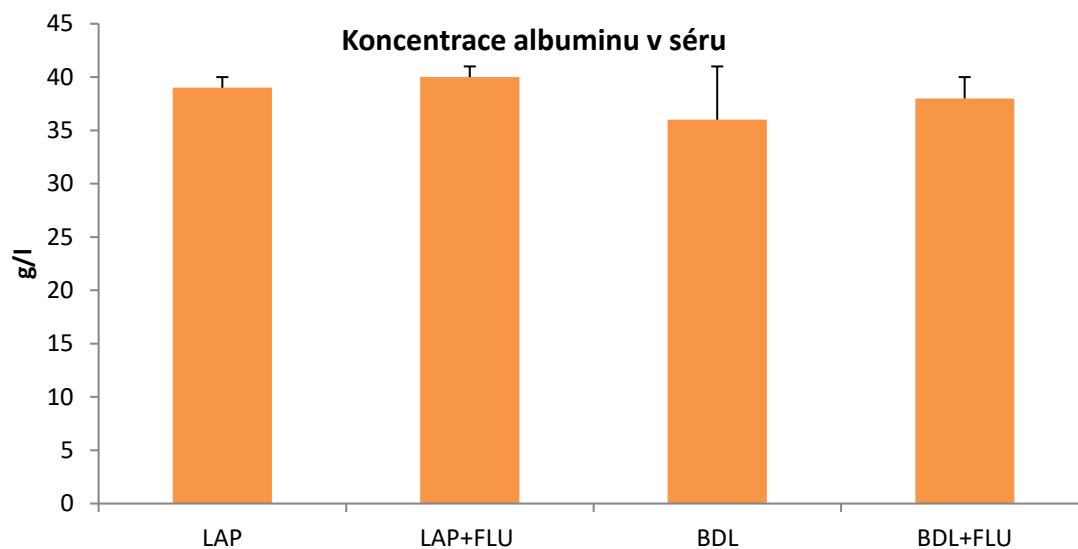
Graf 5



4.1.1.6 Koncentrace albuminu v séru

Mezi skupinami nedošlo k žádným rozdílům v koncentraci albuminu měřeného v séru při podávání fluvastatinu v dávce 1 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 1 týdne (Graf 6).

Graf 6

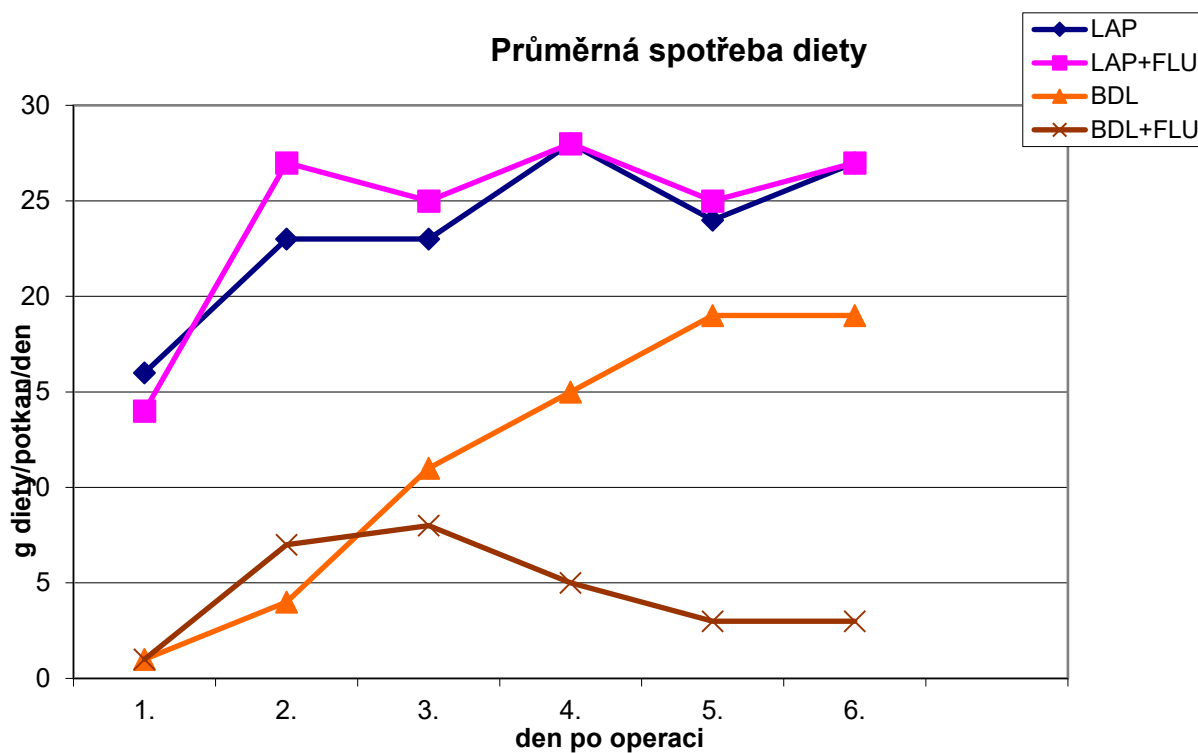


4.1.2 Vliv podávání fluvastatinu v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 1 týdne

4.1.2.1 Průměrný příjem standardní laboratorní diety

Průměrný příjem diety byl první den po provedení podvazu nižší ve srovnání s pouze laparotomovanými zvířaty (Graf 7). Druhý den spotřeba diety vzrostla ve všech skupinách, nicméně po BDL se stále držela na nízké úrovni. Od třetího dne byl příjem potravy po laparotomii vyrovnaný, bez ohledu na příjem fluvastatinu. Po BDL byl v dalších dnech pozorován kontinuální vzestup spotřebované diety, avšak pokud byl po BDL podáván fluvastatin, příjem diety se držel stále na velmi nízké úrovni.

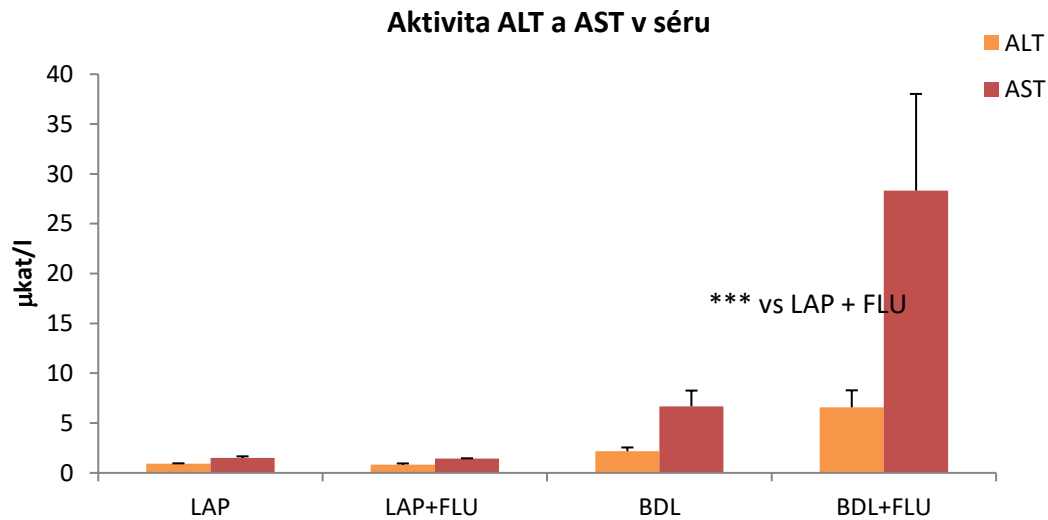
Graf 7



4.1.2.2 Aktivita ALT a AST v séru

Po podvazu žlučovodu je patrný nárůst koncentrací ALT a AST v séru, avšak není statisticky významný (Graf 8).

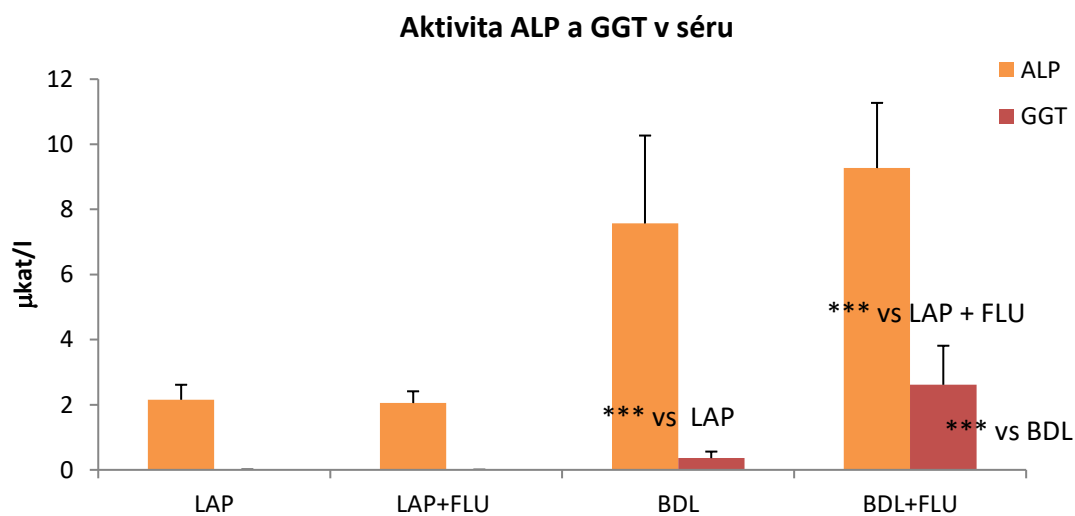
Graf 8



4.1.2.3 Aktivita ALP a GGT v séru

Aktivita ALP i GGT vzrostla statisticky významně po BDL v porovnání s kontrolou LAP ($p < 0,001$) – Graf 9. Při aplikaci fluvastatinu po BDL byly hodnoty ALP i GGT významně zvýšené v porovnání se skupinou, která přijímala fluvastatin po laparotomii – LAP + FLU ($p < 0,001$). GGT byla významně zvýšená po fluvastatinu podávaném po BDL – BDL + FLU ($p < 0,001$).

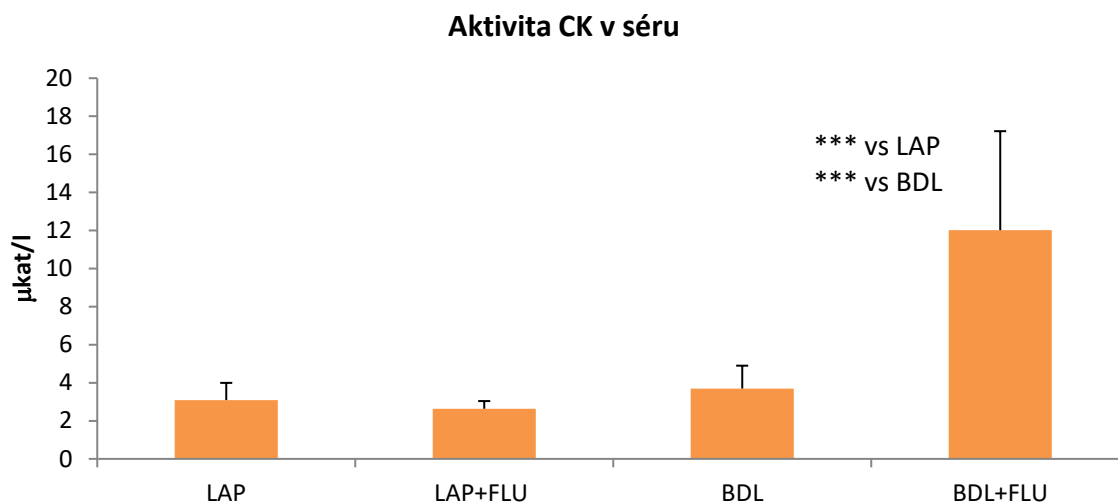
Graf 9



4.1.2.4 Aktivita kreatinkinázy v séru

Aktivita CK signifikantně vzrostla po BDL a následném podávání fluvastatinu ve srovnání s kontrolní skupinou i skupinou po provedení BDL ($p < 0,001$), (Graf 10).

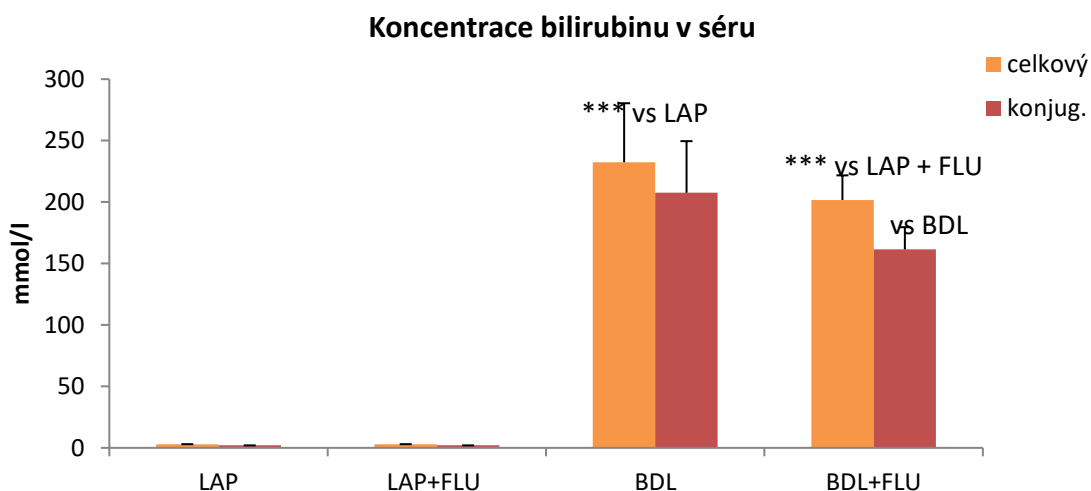
Graf 10



4.1.2.5 Koncentrace celkového a konjugovaného bilirubinu v séru

Po BDL celkový i konjugovaný bilirubin signifikantně vzrostl ve srovnání s laparotomovanou kontrolou ($p < 0,001$). Podávání fluvastatinu po BDL bylo provázeno zvýšenými hodnotami celkového a konjugovaného bilirubinu v porovnání s kontrolami ($p < 0,001$), konjugovaný bilirubin signifikantně klesl ve srovnání s BDL skupinou ($p < 0,01$), (Graf 11).

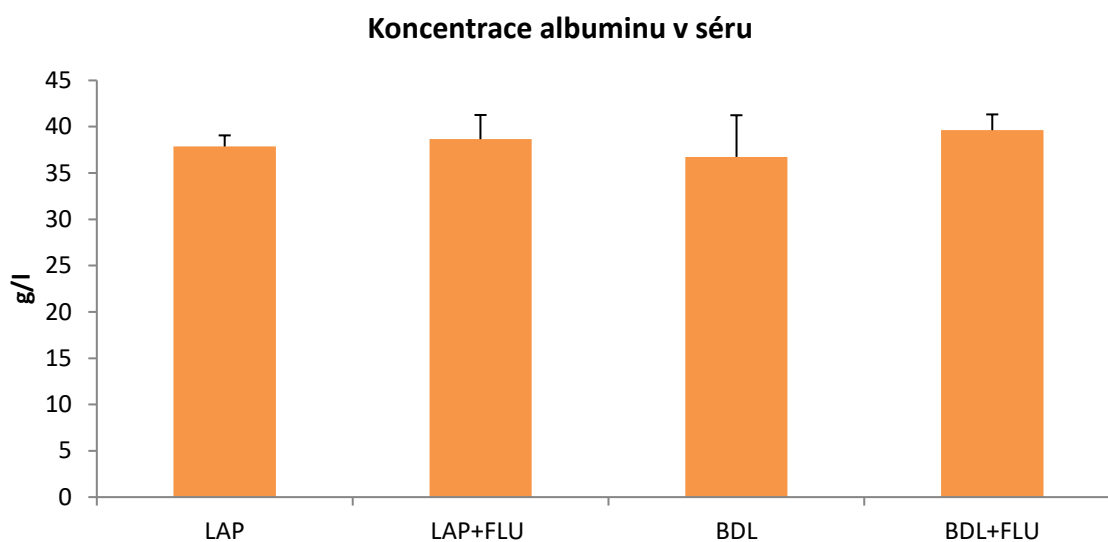
Graf 11



4.1.2.6 Koncentrace albuminu v séru

Mezi skupinami nebyly shledány signifikantní rozdíly v koncentraci albuminu měřeného v séru při podání fluvastatinu v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 1 týdne (Graf 12).

Graf 12

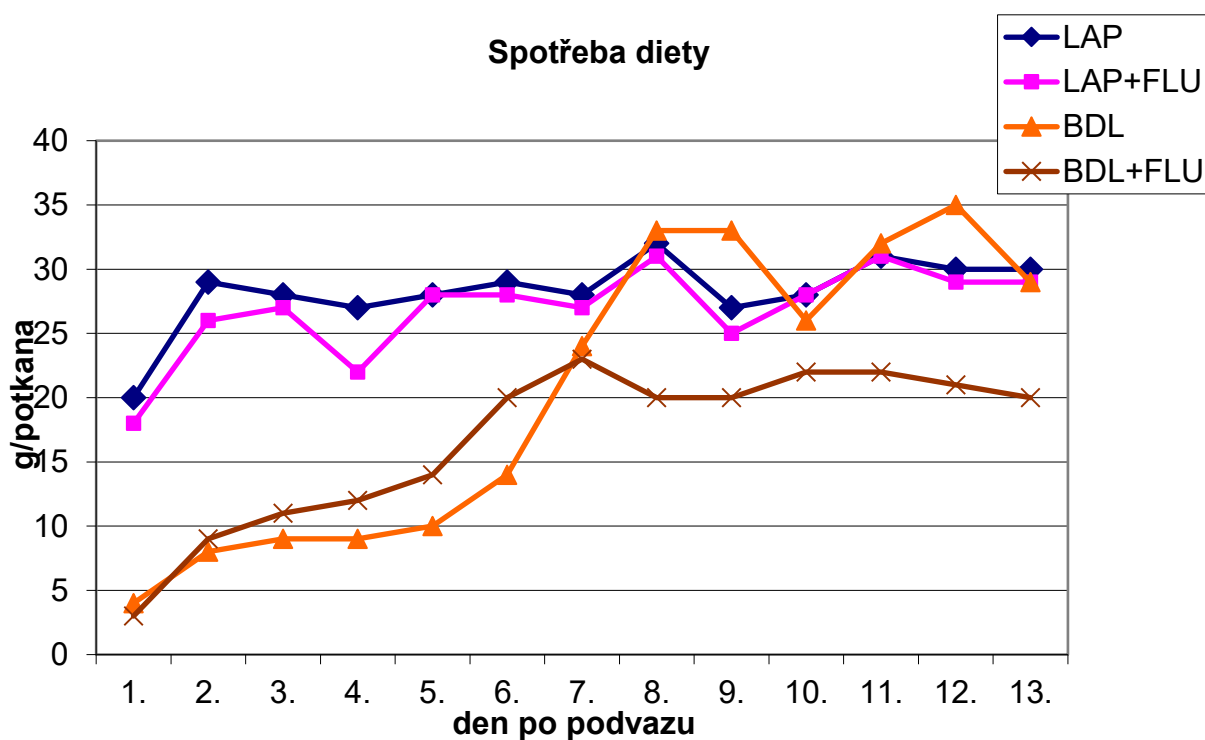


4.1.3 Vliv podávání fluvastatinu v dávce 1 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 2 týdnů

4.1.3.1 Průměrný příjem standardní laboratorní diety

Po podvazu byl příjem diety nižší než po laparotomii. Zatímco od 8. dne se příjem diety BDL skupiny vyrovnává s laparotomovanými skupinami, podávání fluvastatinu po BDL je provázeno nižším příjmem diety (Graf 13).

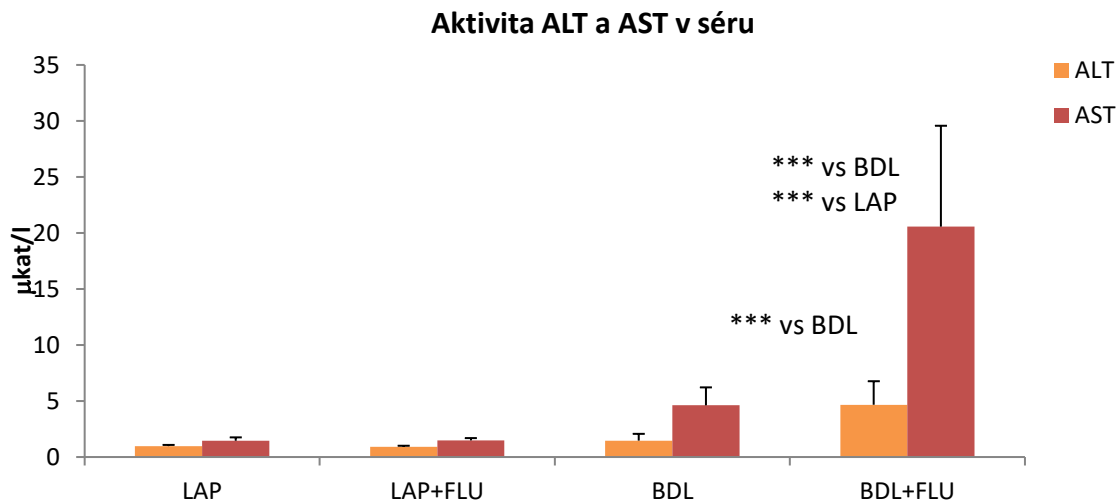
Graf 13



4.1.3.2 Aktivita ALT a AST v séru

Samotný podvaz – BDL byl sice provázen zvýšením aktivity ALT a AST, avšak nebyl statisticky významný. Pokud byl po BDL podáván fluvastatin, došlo k signifikantnímu nárůstu ALT a AST ($p < 0,001$) v porovnání s BDL skupinou (Graf 14).

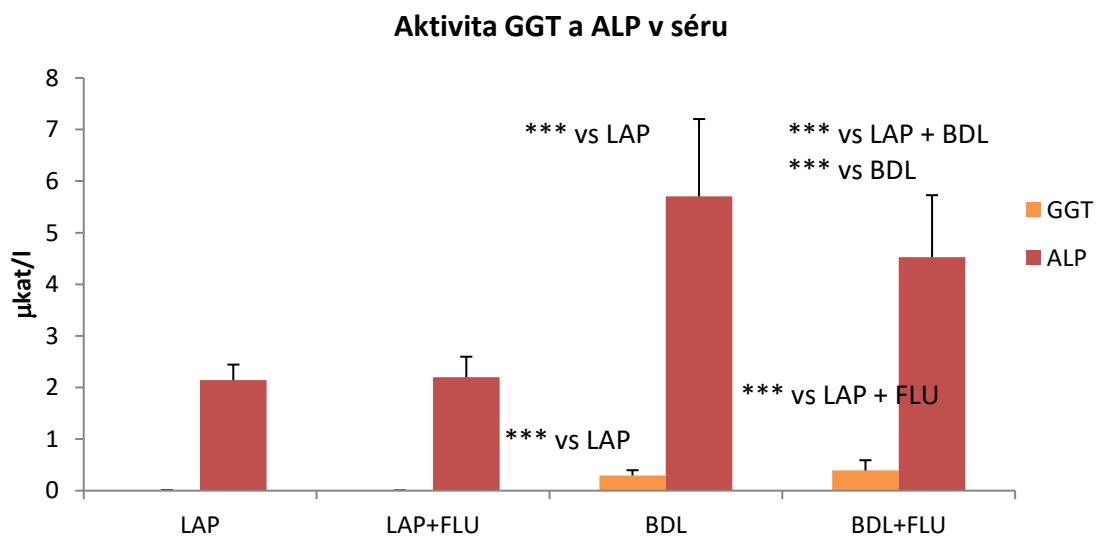
Graf 14



4.1.3.3 Aktivita ALP a GGT v séru

Podvaz – BDL navodil statisticky významné zvýšení GGT a ALP ($p < 0,001$) v porovnání s LAP kontrolou (Graf 15). K dalšímu signifikantnímu navýšení došlo při podávání fluvastatinu po BDL v porovnání s BDL skupinou ($p < 0,001$).

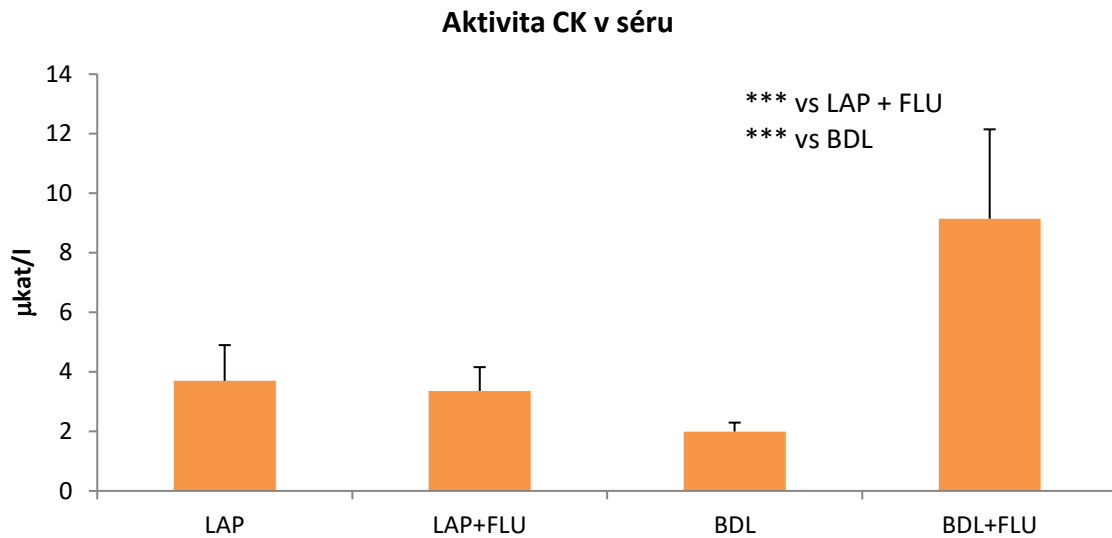
Graf 15



4.1.3.4 Aktivita CK v séru

Aktivita CK v séru byla signifikantně zvýšená po BDL při podávání fluvastatinu (BDL + FLU) v porovnání s kontrolními i hodnotami po samotném BDL ($p < 0,001$), (Graf 16).

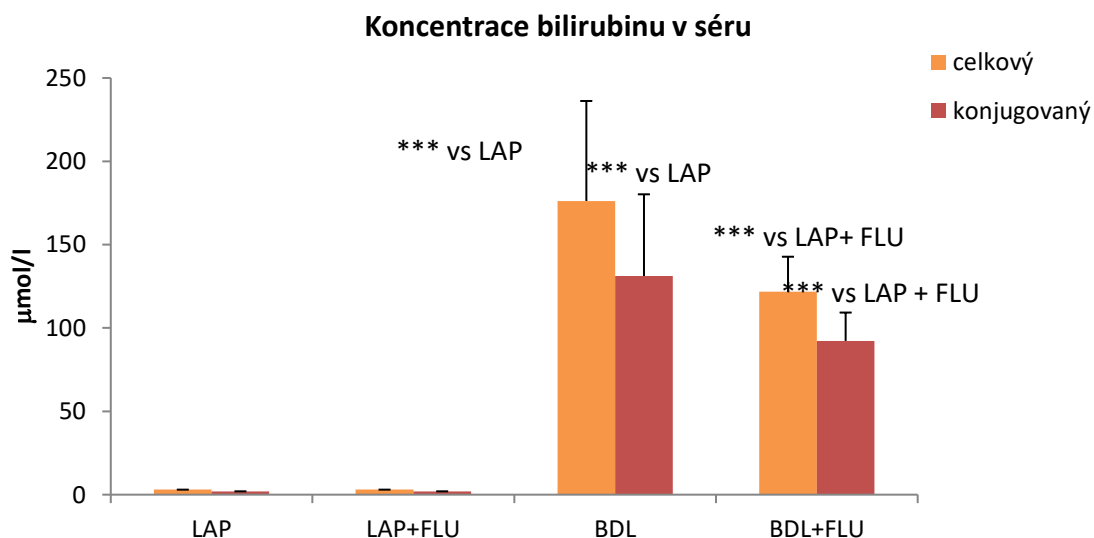
Graf 16



4.1.3.5 Koncentrace celkového a konjugovaného bilirubinu v séru

Obě formy bilirubinu stouply po BDL v porovnání s kontrolou ($p < 0,001$). Hodnoty oproti BDL skupině klesly, pokud byl po BDL podáván fluvastatin, ale nejedná se o signifikantní změnu v porovnání s BDL skupinou (Graf 17). Hodnoty byly oproti kontrolám stále zvýšené ($p < 0,001$).

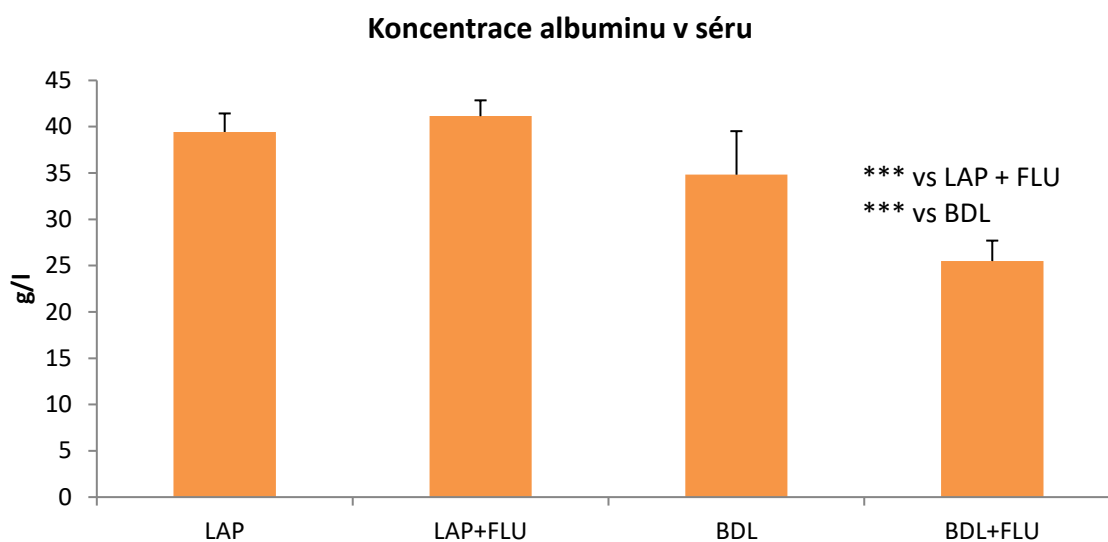
Graf 17



4.1.3.6 Koncentrace albuminu v séru

Samotný podvaz nevedl k významné změně v koncentraci albuminu (Graf 18). Albumin v séru klesl při podávání fluvastatinu po BDL v porovnání s kontrolní i BDL skupinou ($p < 0,001$).

Graf 18



4.2 Hodnocení účinků fluvastatinu na změny navozené cholestázou

Předchozí výsledky nás dovedly k překvapivému nálezu progresu jaterního cholestatického poškození při podávání fluvastatinu. V následující fázi bylo cílem dokumentovat, jaký účinek má podávání fluvastatinu na oxidační změny navozené cholestázou.

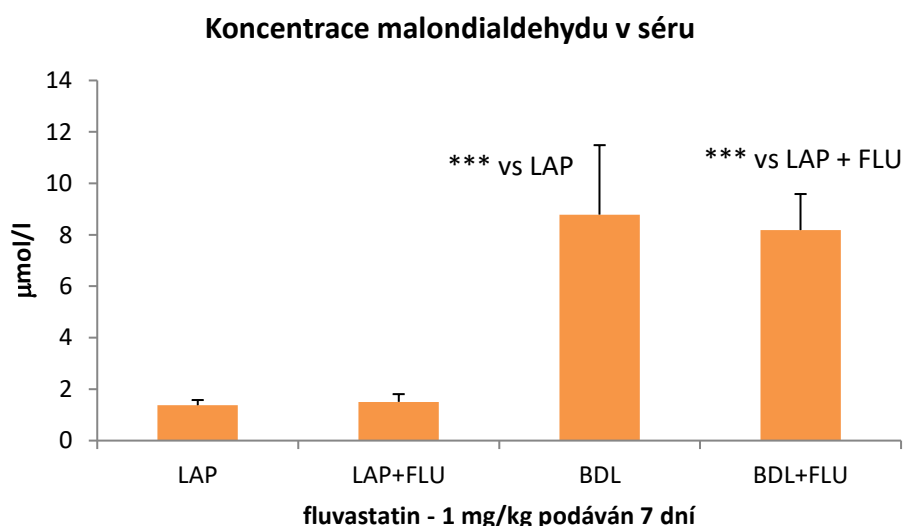
4.2.1 Vliv fluvastatinu na oxidační stres provázející cholestázu

Míra systémového oxidačního stresu byla hodnocena na základě měření koncentrace malondialdehydu (MDA) v séru (produkt lipoperoxidace). V játrech byl měřen celkový obsah glutationu, který poskytuje komplexnější informaci o antioxidačním stavu jater. Byla hodnocena jeho redukovaná (GSH) i oxidovaná forma (GSSG). K dokumentaci vývoje oxidačních změn v játrech, resp. změny antioxidačního stavu jater je uveden obsah redukované formy glutationu v játrech a poměr redukované a oxidované formy glutationu.

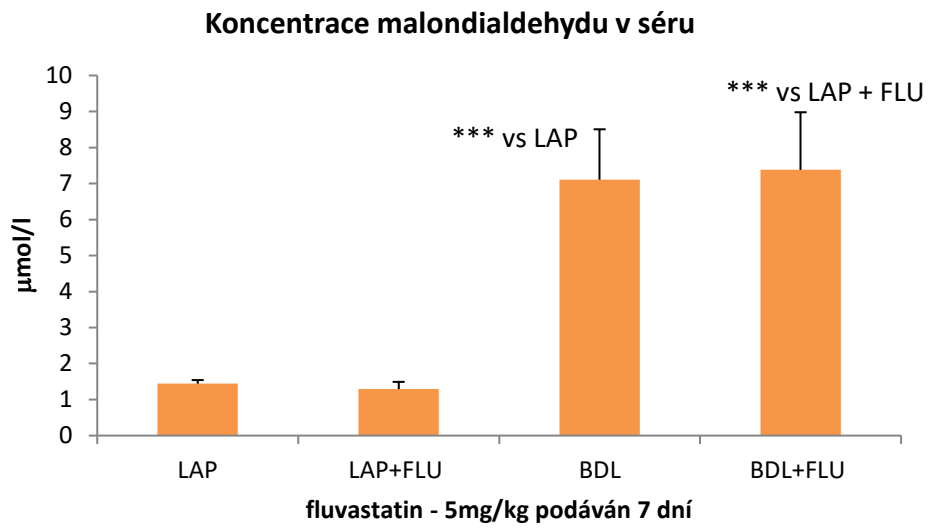
Koncentrace malondialdehydu v séru

Koncentrace MDA v séru se zvýšila po podvazu žlučovodu ve srovnání s kontrolní - laparotomovanou skupinou ($p < 0,001$) – Grafy 19a, b, c, její hodnoty přetrvávaly zvýšené v 7 i ve 14 denním intervalu. Podávání fluvastatinu nevedlo ke zvýšení MDA u kontrolní laparotomované skupiny (LAP + FLU), ani nevyvolalo progresi v produkci MDA po BDL (BDL + FLU) – Grafy 19a, b, c.

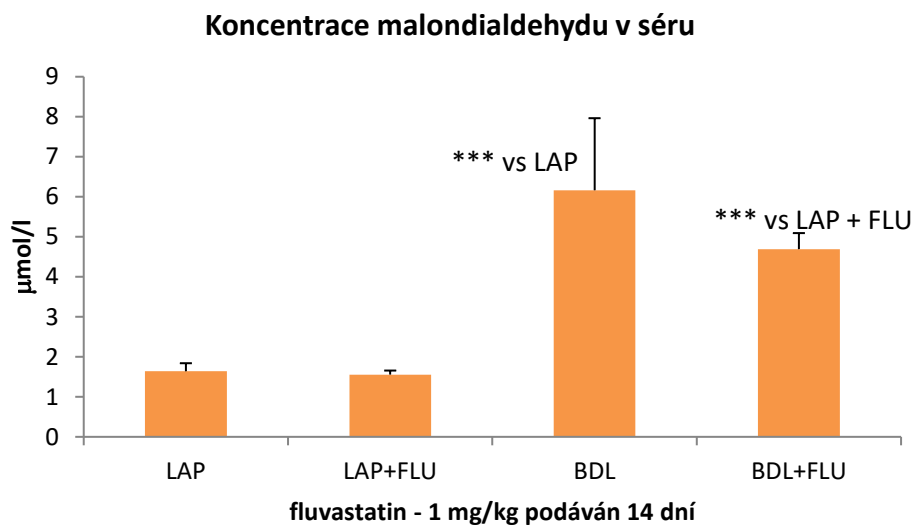
Graf 19a



Graf 19b



Graf 19c

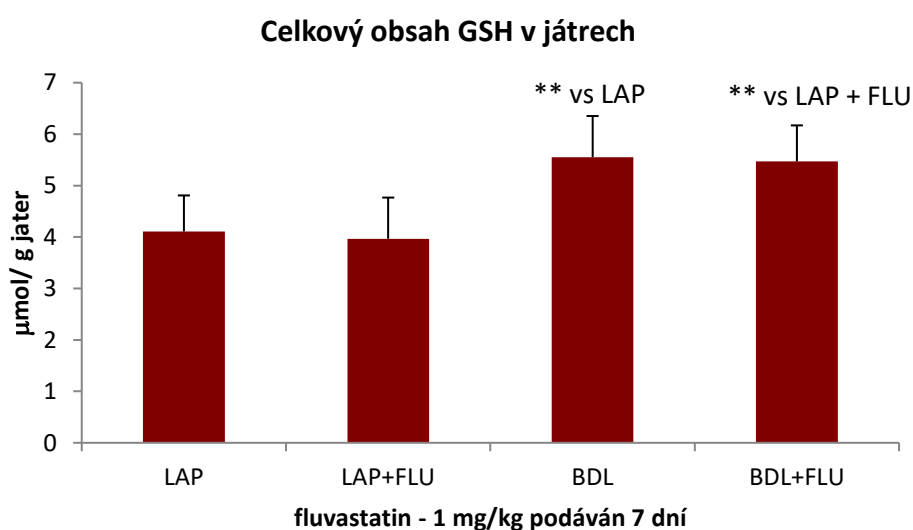


4.2.1.1 Celkový obsah glutationu v játrech

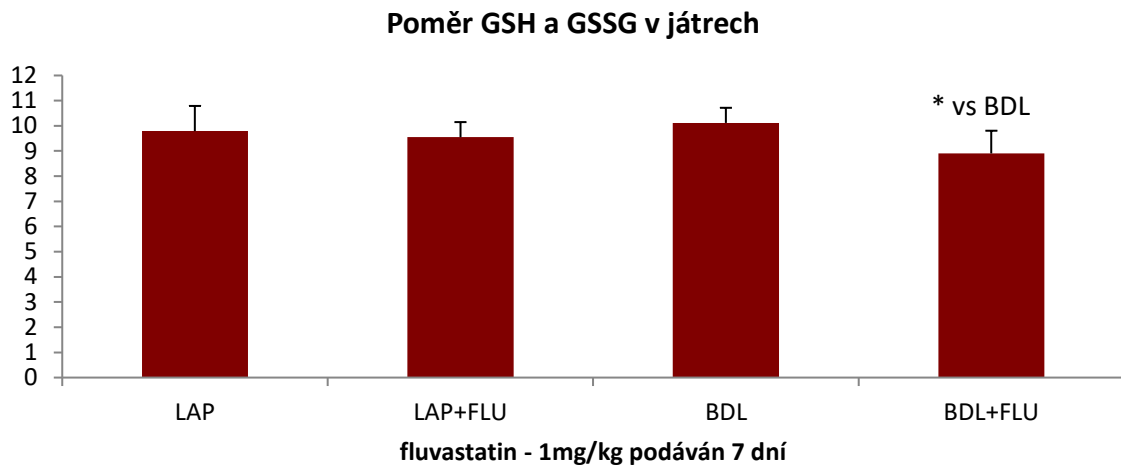
7 dní po BDL by zaznamenán signifikantní vzestup GSH v játrech v porovnání s kontrolní skupinou LAP ($p < 0,01$). 14 dní po BDL bylo jeho množství již na úrovni kontrolní skupiny (Graf 22a). Při podávání 1 mg/kg fluvastatinu 7 dní po BDL byl obsah GSH obdobný jako po samotném BDL (Graf 20a) a převyšoval signifikantně kontrolní skupinu ($p < 0,01$). 14 denní podávání 1 mg dávky fluvastatinu nebylo provázeno zvýšením obsahu GSH – Graf 22a, hodnoty byly srovnatelné s kontrolní skupinou i skupinou po BDL. Podávání fluvastatinu v dávce 5 mg/kg po BDL po dobu 7 dnů vedlo k poklesu obsahu GSH ($p < 0,01$) oproti skupině, které byl proveden pouze podvaz (BDL) – Graf 21a. Tyto hodnoty však neklesly pod úroveň kontrol.

Poměr GSH/GSSG může během 7 dní vlivem BDL signifikantně stoupnout (Graf 21b) ve srovnání s kontrolní skupinou po laparotomii ($p < 0,001$), avšak nebyl to pravidelný nález. V jiné sérii pokusů k tomuto nárůstu nedošlo (Graf 21b) a hodnoty byly obdobné jako u kontrol. I 14 dnů po BDL byl poměr GSH/GSSG srovnatelný s kontrolní skupinou (Graf 22b). Podávání fluvastatinu v obou dávkách po dobu 7 dnů po BDL bylo provázeno poklesem poměru GSH/GSSG ve srovnání se skupinou po BDL ($p < 0,05$; $p < 0,001$) – Graf 20b, resp. Graf 21b. 14 denní podávání nižší dávky sice také vedlo k poklesu poměru GSH/GSSG oproti skupině BDL, avšak nebyl statisticky významný. Hodnoty neklesly pod úroveň kontrolních skupin (Graf 22b).

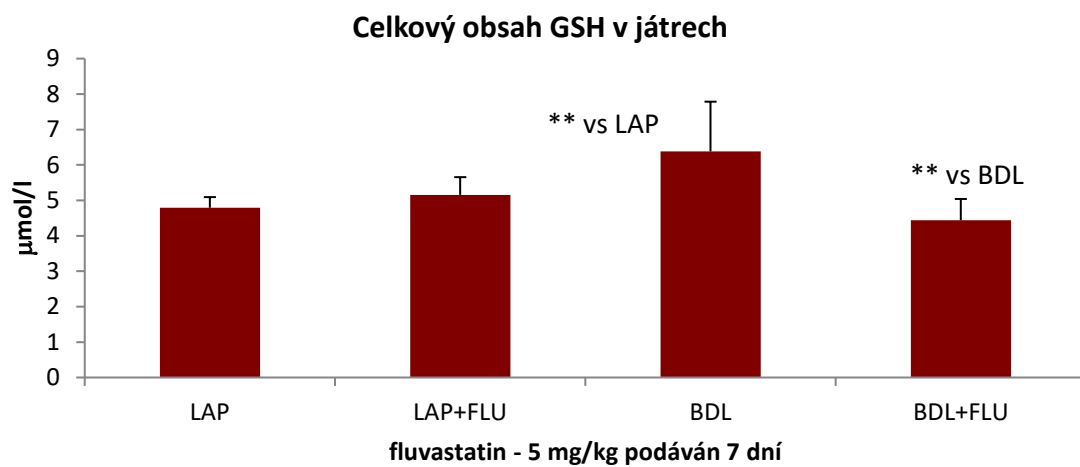
Graf 20a



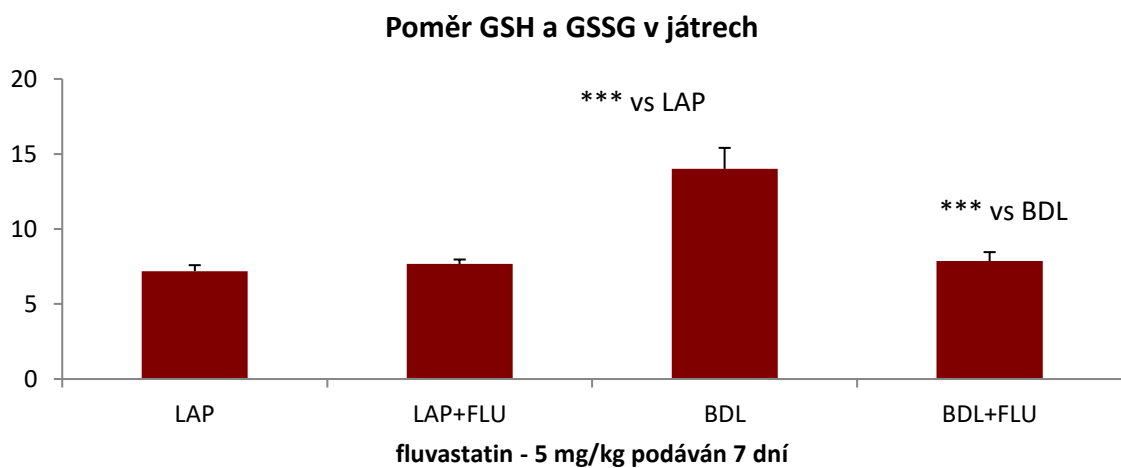
Graf 20b



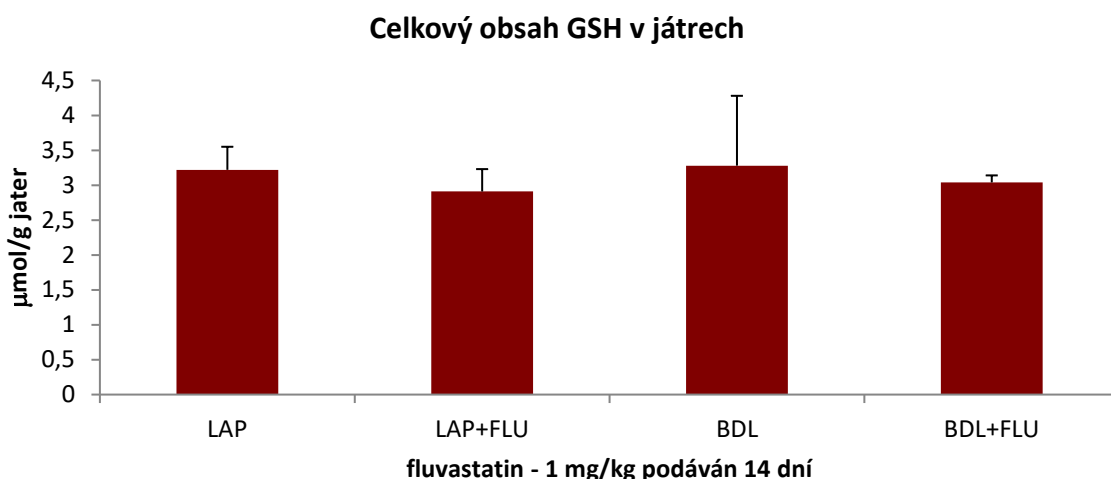
Graf 21a



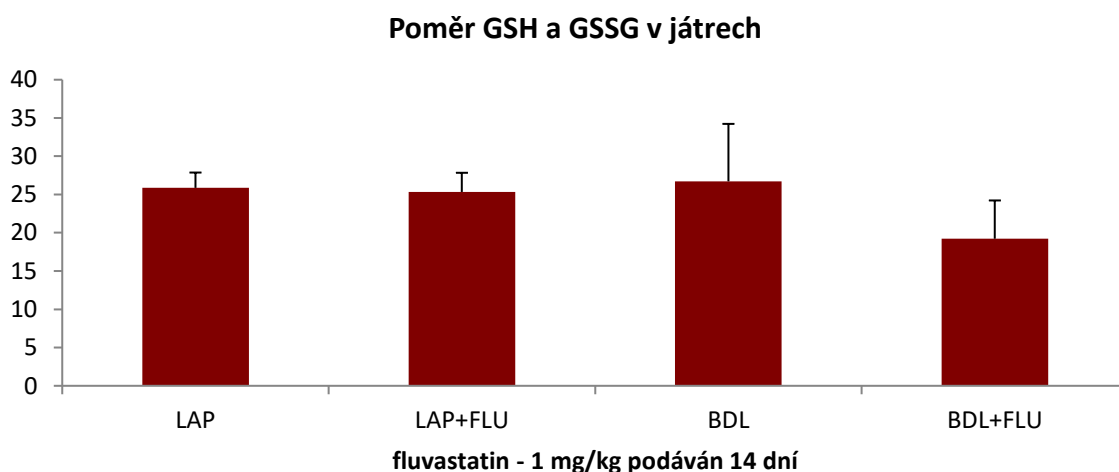
Graf 21b



Graf 22a



Graf 22b



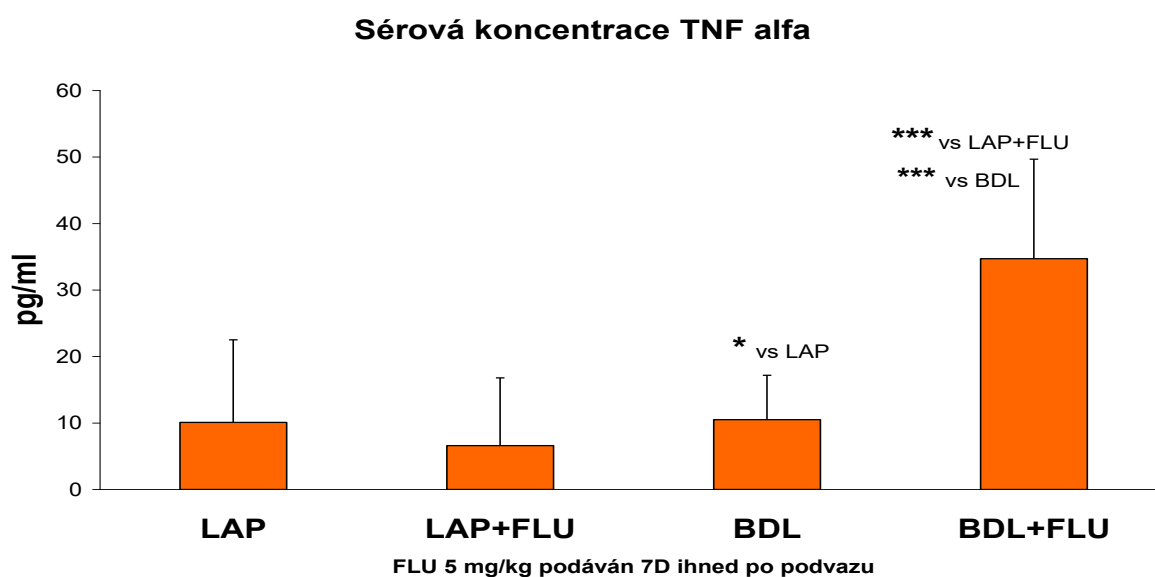
Výsledky dokumentující poškození jaterních buněk a rozvoj oxidačního stresu při podávání fluvastatinu po podvazu žlučovodu svědčily pro rozvoj těchto změn v závislosti na dávce a době aplikace. Parametry plánované pro hodnocení dalších mechanismů účinku fluvastatinu (hodnocení zánětlivých a fibrotických změn, změn mitochondriální funkce, změn exprese vybraných transportérů) byly sledovány ve vybraných vzorcích reprezentujících významnou progresi cholestatického poškození jater vlivem fluvastatinu. Vyšetření byla provedena po 7 dní trvajícím podvazu s dávkou fluvastatinu 5mg/kg, tedy v podmínkách, kdy lze v našem experimentu nejdříve detekovat jaterní poškození navozené cholestázou a podáváním fluvastatinu.

4.2.2 Vliv fluvastatinu na produkci prozánětlivých a profibrogenních cytokinů při cholestáze

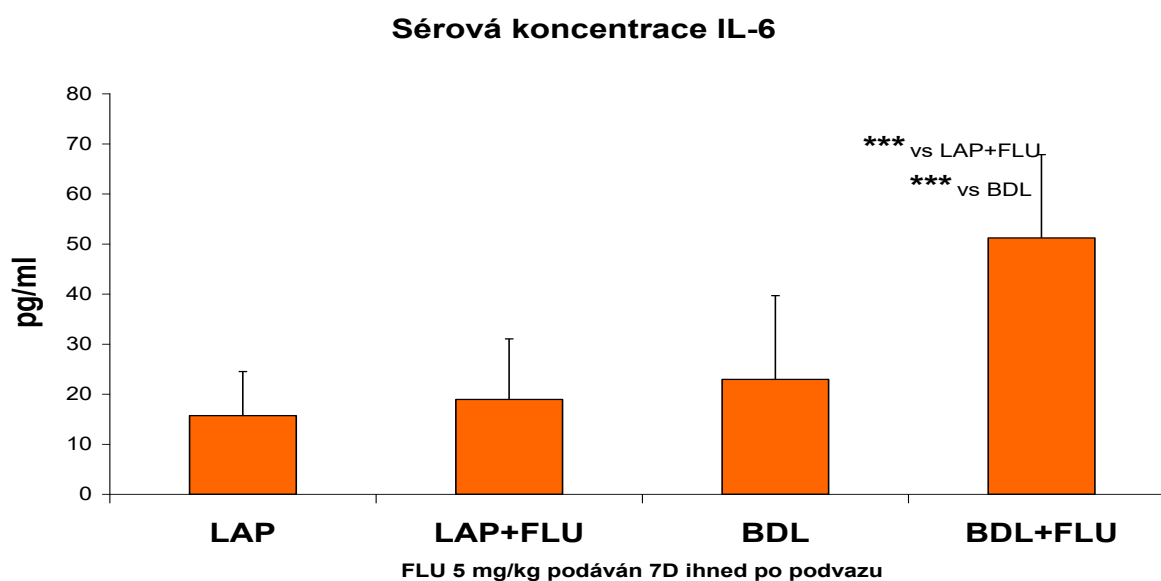
4.2.2.1 Koncentrace prozánětlivých cytokinů v séru

V séru bylo pozorováno, že vlivem samotného BDL pouze ojediněle dochází k signifikantnímu zvýšení koncentrace TNF α a IL6 ve sledovaných časových intervalech (Graf 23 a 24). Podáváním fluvastatinu (5 mg/kg) po BDL však dochází ke zvýšení koncentrací obou cytokinů v séru, a to již po 7 dnech od provedení podvazu.

Graf 23



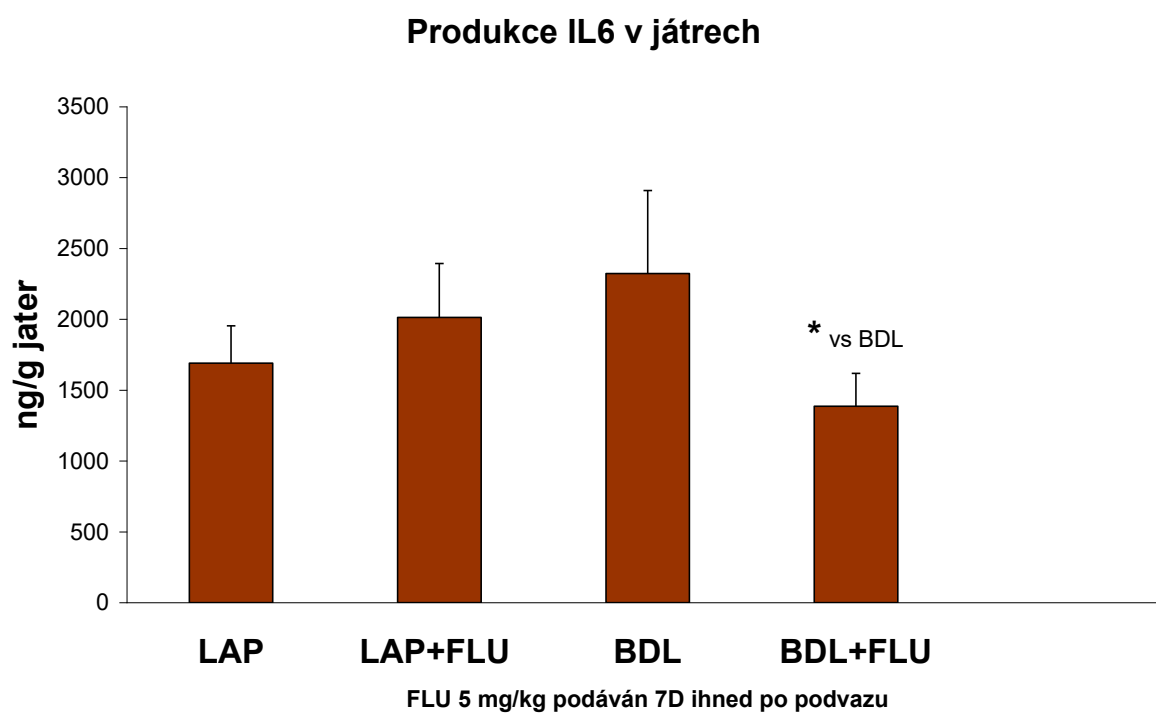
Graf 24



4.2.2.2 Koncentrace IL 6 v játrech

V případě obsahu IL-6 v játrech byl pozorován statisticky významný pokles při příjmu fluvastatinu po BDL ve srovnání se skupinou po samotném BDL ($p < 0,05$). Hodnota neklesla pod úroveň kontrol (Graf 25).

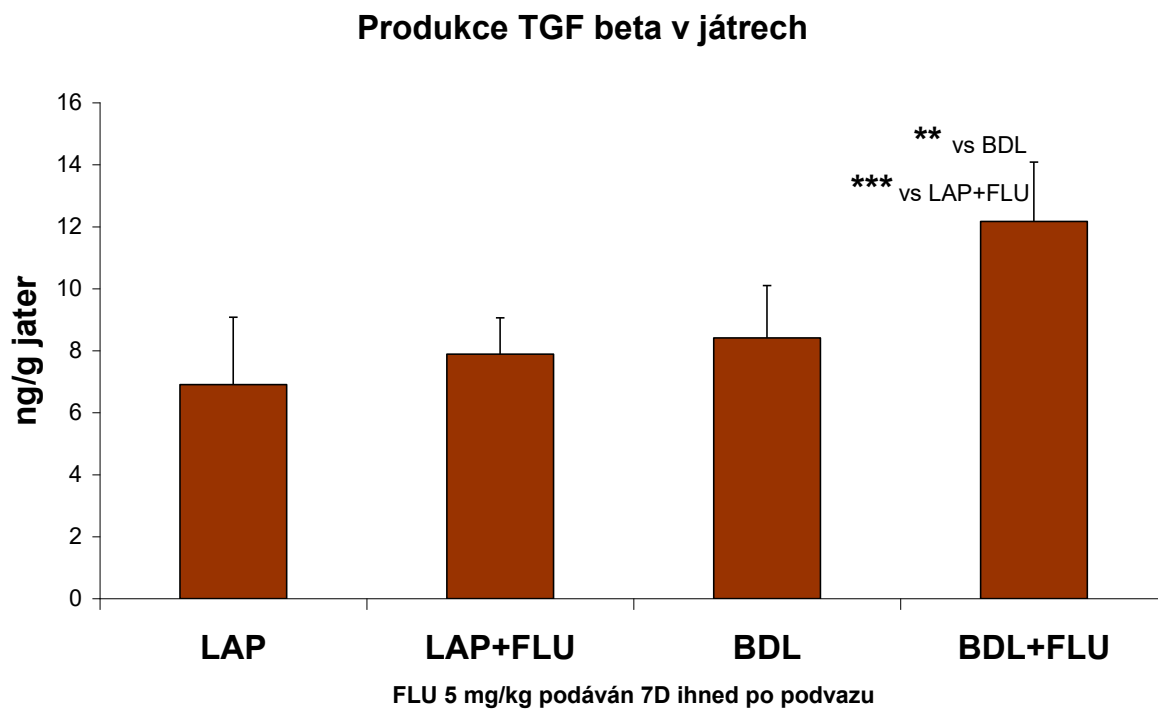
Graf 25



4.2.2.3 Koncentrace TGF β v játrech

Zvýšení produkce TGF β bylo zaznamenáno v játrech potkanů (Graf 26), kterým byl po BDL podáván fluvastatin, a to ve srovnání s kontrolami i skupinou po BDL ($p < 0,001$, $p < 0,01$).

Graf 26

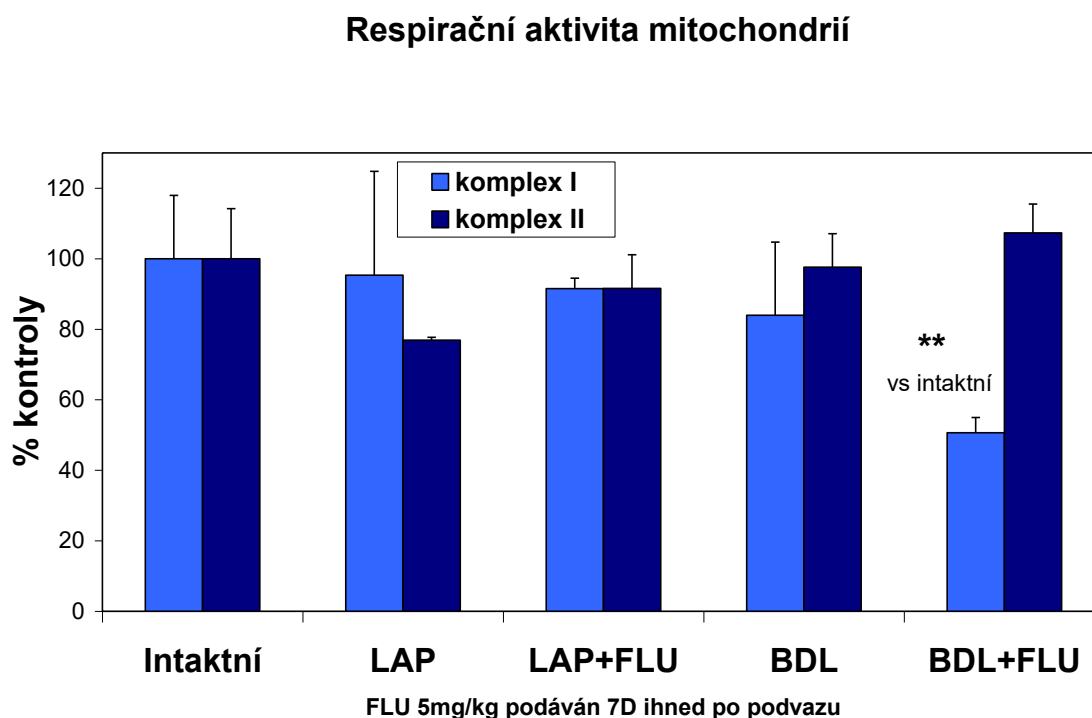


4.2.3 Vliv fluvastatinu na funkci mitochondrií při cholestáze

Měření respirační aktivity mitochondrií umožňuje cílené sledování aktivity vybraných respiračních komplexů, je tedy možno blíže specifikovat mitochondriální dysfunkci. Zvolili jsme metodiku měření respirace mitochondrií, neboť v literatuře se objevují údaje o vlivu statinů i cholestázy na jejich aktivitu.

Respirace byla hodnocena u dvou vstupních respiračních komplexů I a II. Samotný podvaz (skupina BDL) nevedl po 7 dnech trvání ke změnám respirační aktivity (Graf 27). Pokud byl po podvazu aplikován fluvastatin, byl pozorován selektivní pokles aktivity komplexu I, signifikantní byl ve srovnání s intaktními mitochondriemi ($p < 0,01$). Pokles komplexu II nebyl ovlivněn.

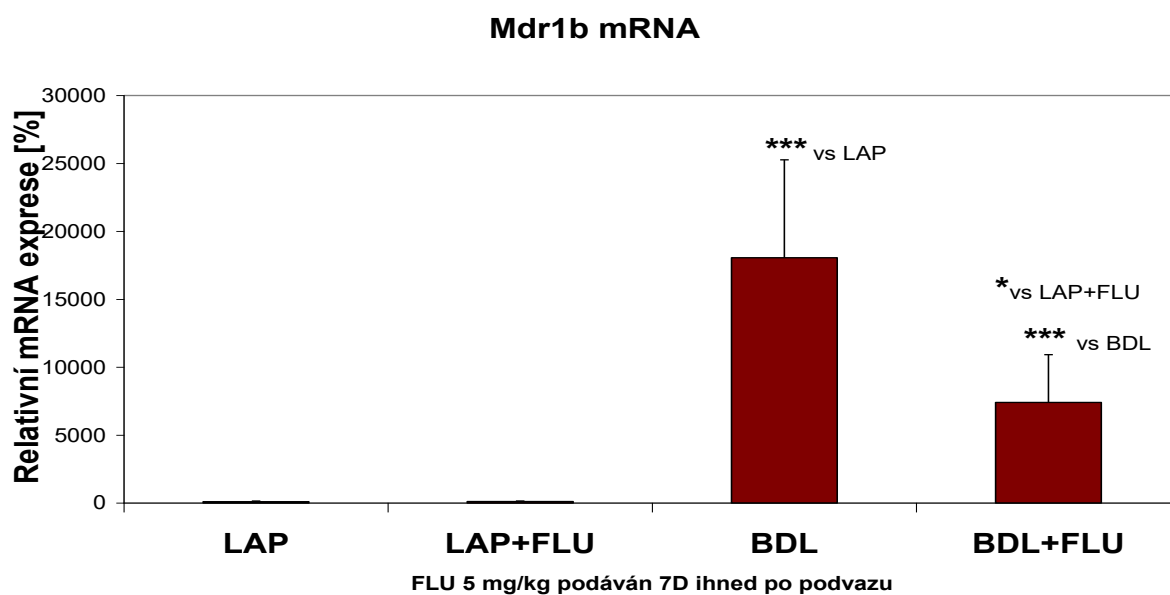
Graf 27



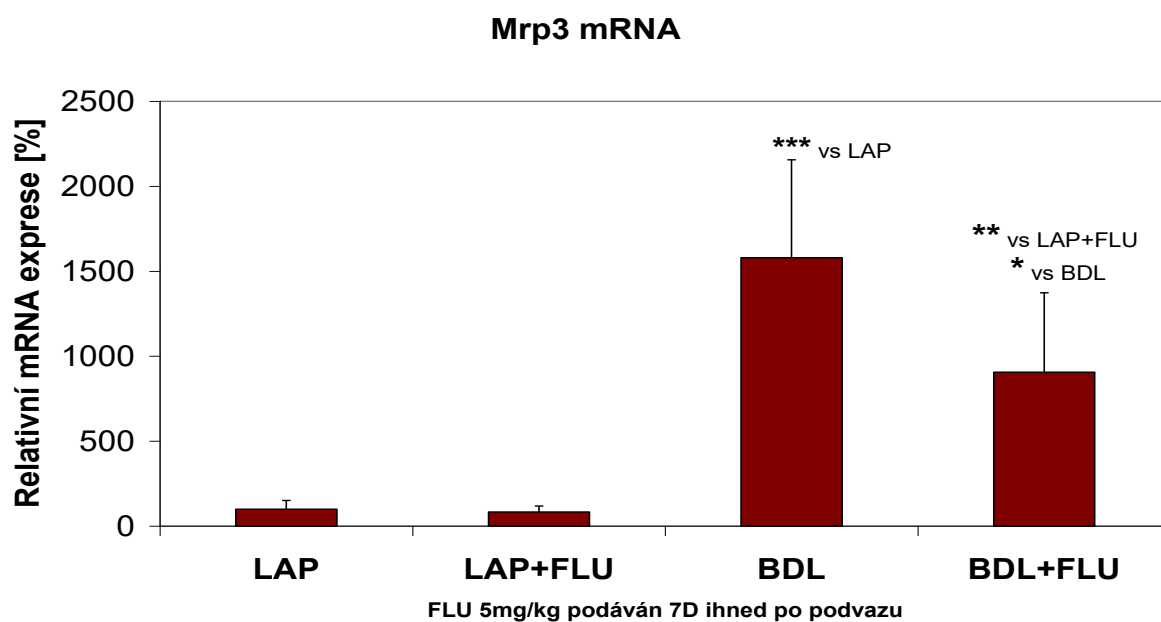
4.2.4 Hodnocení exprese vybraných transportérů na sinusoidální a kanalikulární membráně

Zatímco po samotném podvazu došlo ke zvýšení exprese kanalikulárního Mdr1 a bazolaterálního Mrp3, podávání fluvastatinu bylo provázeno expresí sice vyšší než v případě kontrol ($p < 0,05$), avšak nižší než po samotném BDL ($p < 0,001$). Vše je znázorněno v grafech 28 a 29.

Graf 28

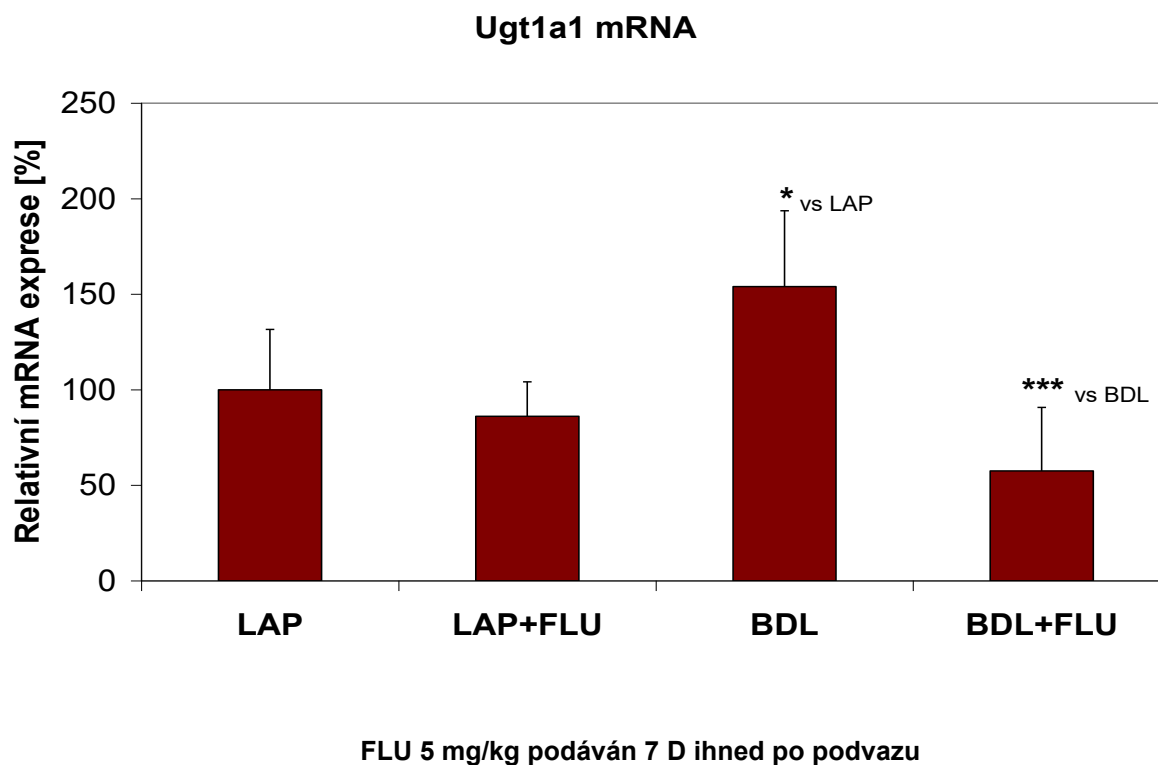


Graf 29



S ohledem na nález poklesu koncentrace konjugovaného bilirubinu v námi zvolených podmínkách jsme rovněž hodnotili úroveň exprese konjugačního enzymu Ugt (Graf 30). Exprese se oproti kontrole zvýšila po BDL ($p < 0,05$), při podávání fluvastatinu po BDL klesla exprese na úroveň kontrolních hodnot ($p < 0,001$ vs. BDL).

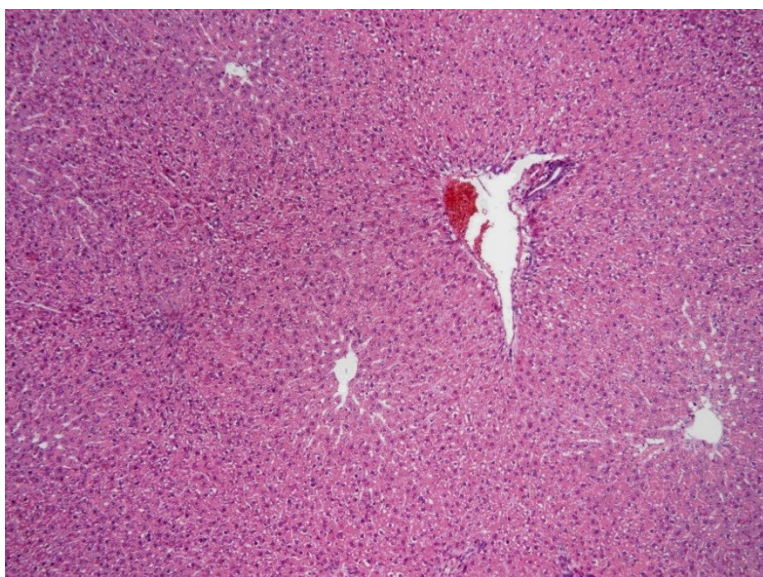
Graf 30



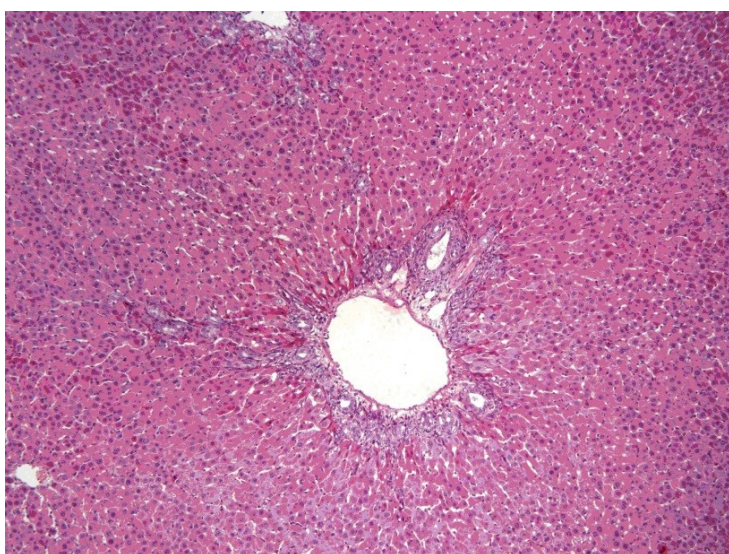
4.2.5 Histologické nálezy

Podvaz žlučovéhoodu byl provázen cholestázou, proliferací duktulů, zánětem a nekrotickými změnami (Obr. 1B). Aplikace fluvastatinu po podvazu žlučovéhoodu nevedla ke zlepšení morfologického nálezu (Obr. 1C), dokonce byly patrné sporadické fibrotické změny.

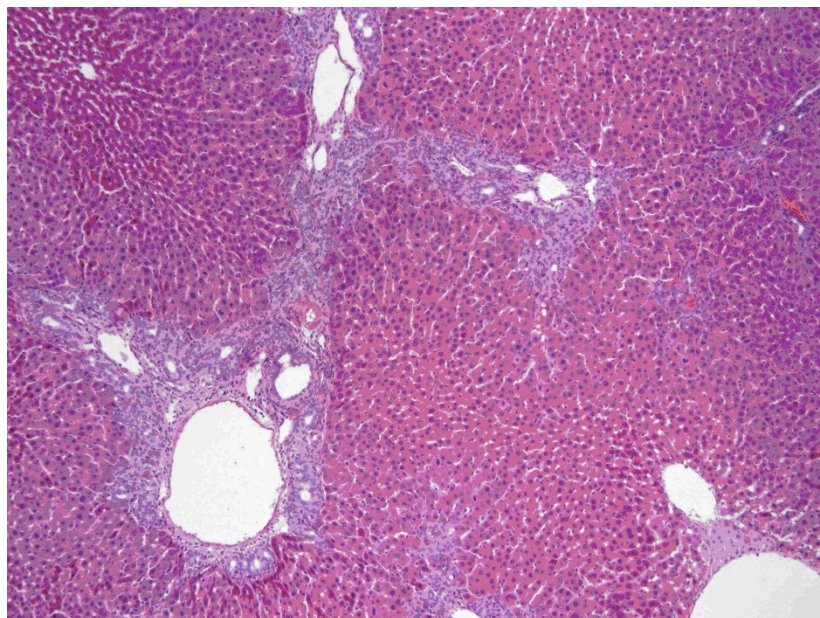
Obr. 1A - Histologický obraz kontrolních jater: jaterní parenchym lalůčkovité stavby, portální pole nerozšířená, sinusoidy a žlučovody jsou přiměřené stavby. Hepatocyty jsou uniformní bez patologických změn.



Obr. 1B - Histologický obraz jater po 7 dní trvajícím podvazu žlučovéhoodu: jaterní parenchym lalůčkovité stavby s cípovitě rozšířenými portálními poli s obnaženými proliferujícími duktuly a floridním zánětlivým infiltrátem. V oblasti překrvené limitující ploténky zastížena extracelulární i intracelulární cholestáza.



Obr. 1C - Histologický obraz jater po 7 dní trvajícím podvazu žlučového a aplikaci fluvastatinu v dávce 5 mg/kg: jaterní parenchym s počínající uzlovitou přestavbou s vazivově rozšířenými portálními poli a tvorbou portoportálních můstků, ve kterých jsou zastiženy četné proliferující duktuly.



4.3 Souhrn výsledků

Míra jaterního poškození, cholestázy a ikteru byla posuzována ze sérové aktivity ALT, AST, GGT, ALP, koncentrace celkového a konjugovaného bilirubinu a sérové koncentrace albuminu. Sledována byla i aktivita sérové CK jako jednoho z ukazatelů myopatie, která může být v klinické praxi nežádoucím vedlejším efektem při podávání fluvastatinu.

Při aplikaci dávky 1 mg/kg po dobu 7 dní nebyly nalezeny změny parametrů hodnotících úrovně jaterního poškození. Po 14 denní aplikaci začal být patrný nárůst aktivity enzymů svědčících pro progresi jaterního poškození ve skupině BDL+FLU.

Při aplikaci fluvastatinu v dávce 5 mg/kg došlo již během 7 dnů podávání k výrazné progresi jaterního poškození (soudě ze změn ALT, AST) navozeného podvazem žlučového.

Spolu s jaterním poškozením byl zaznamenán i signifikantní nárůst CK, u dávky 5 mg/kg již po 7 dnech podávání fluvastatinu ($p < 0,001$), u 1 mg/kg po 14 dnech ($p < 0,001$).

Progrese hepatocelulárního poškození jater ve skupině s podvazem žlučového a aplikací fluvastatinu (1 a 5 mg/kg) byla doprovázena i poklesem sérové koncentrace albuminu.

Při podávání fluvastatinu v intervalu 14 dnů byla pozorována i zvýšená letalita zvířat ve skupině po podvazu a aplikaci fluvastatinu, zatímco po samotném podvazu zvířata přežívala bez komplikací.

Vlivem rozvoje cholestázy po podvazu žlučového velmi rychle narůstala koncentrace celkového a konjugovaného bilirubinu v séru. 7 dní po podvazu byly hodnoty signifikantně zvýšené ($p < 0,001$). V souvislosti s dávkou a délkou podávání fluvastatinu cholestatickým potkanům jsme zaznamenali pokles konjugované formy bilirubinu. Pokles byl pozorován již po 7 dnech trvajících podvazu, pokud byl fluvastatin aplikován ve vyšší dávce - 5 mg/kg ($p < 0,01$).

Oxidační stres byl posuzován na základě koncentrace *malondialdehydu* – MDA v séru a obsahu glutationu v játrech. Zvýšení koncentrace MDA v séru bylo zaznamenáno v souvislosti s podvazem žlučového, podávání fluvastatinu po podvazu nevedlo k jeho další změně ($p < 0,001$).

Podvaz žlučového mohl navodit přechodné zvýšení obsahu GSH. Podávání fluvastatinu po podvazu nevedlo sice ke snížení GSH pod kontrolní hodnoty, avšak s použitím vyšší dávky byl jeho obsah nižší než po samotném BDL. Poměr GSH/GSSG neklesl vlivem

BDL pod hodnoty kontrol. Podávání fluvastatinu bylo provázeno poklesem poměru GSH/GSSG.

Další vyšetření, která se měla zaměřit na možný mechanismus účinku fluvastatinu, byla provedena po 7 dní trvajícím podvazu s dávkou fluvastatinu 5mg/kg, tedy v podmínkách, kdy lze v našem experimentu nejdříve detekovat jaterní poškození navozené cholestázou a podáváním fluvastatinu.

K hodnocení systémových zánětlivých změn byly měřeny sérové koncentrace prozáněťových cytokinů TNF α a IL6. Samotný podvaz nevedl k jejich zvýšení v séru, podáváním fluvastatinu po podvazu došlo k signifikantnímu nárůstu obou cytokinů. Literární údaje svědčí o vlivu statinů na IL6 v hepatocytech, z tohoto důvodu byla jeho produkce hodnocena i v játrech. Při podávání fluvastatinu byl pozorován signifikantní pokles IL6 v játrech. TGF β v játrech byl stanovován jako ukazatel fibrogenních změn. Po podávání fluvastatinu cholestatickým potkanům byla zaznamenána zvýšená produkce TGF β . Progrese fibrotických změn byly potvrzeny i histologicky.

Měření respirační aktivity mitochondrií umožňuje cílené sledování aktivity vybraných respiračních komplexů, je tedy možno blíže specifikovat mitochondriální dysfunkci. Respirace byla hodnocena u dvou vstupních respiračních komplexů I a II. Samotný podvaz nevedl po 7 dnech trvání ke změnám respirační aktivity. Pokud byl po podvazu aplikován fluvastatin, byl pozorován selektivní pokles aktivity komplexu I, a to již po 7 dnech trvání podvazu při dávce 5 mg/kg fluvastatinu. Komplex II nebyl ovlivněn.

Zatímco po samotném podvazu došlo ke zvýšení exprese kanalikulárního Mdr1 a bazolaterálního Mrp3, podávání fluvastatinu bylo provázeno expresí sice vyšší než v případě kontrol, avšak nižší než po samotném BDL. Exprese konjugačního enzymu Ugt se zvýšila po BDL, při podávání fluvastatinu po BDL klesla jeho exprese na úroveň kontrol.

5 Diskuze

V úvodu bylo zmíněno, že nejčastějším typem cholestázy u lidí je extrahepatální cholestáza, velmi často způsobená malignitou nebo cholelitiázou. Extrahepatální biliární obstrukce indukuje řadu změn, které vyúsťují v jaterní poškození. Experimentálně bylo prokázáno, že jaterní poškození navozené cholestázou je provázené oxidačním stresem a poklesem antioxidační kapacity jater. Prerušeni enterohepatálního oběhu žlučových kyselin navozuje zvýšení střevní propustnosti a podporuje portální endotoxémii. Experimentálně navozená cholestáza je provázena dysfunkcí mononukleárního fagocytárního systému, respektive Kupfferových buněk (Minter et al., 2005) a hypersenzitivitou na endotoxin (Lázár et al., 2002). Vyvíjí se výrazná prozáněťová reakce se zvýšenou produkcí cytokinů a orgánovým poškozením. Endotoxémie a následná systémová záněťová reakce vedou k prohloubení cholestatického poškození jater (Brown et al., 2003; Liu et al., 2001). Operační zákrok u pacientů s obstrukční žloutenkou je v těchto podmínkách spojen se zvýšeným rizikem septických komplikací, které jsou také příčinou zvýšené morbidity a mortality. Zmírnění jaterního poškození by mohlo být předpokladem pro omezení komplikací provázejících cholestatické stavy.

Léčba jaterního poškození navozeného cholestázou je cílena především na snížení množství cytotoxických ŽK v hepatocytech a ochranu hepatocytů před dalšími potenciálně toxickými látkami, které se v hepatocytech a popř. ve žlučovodech při cholestáze hromadí. V případě obstrukční cholestázy je jednou z možností, jak omezit kumulaci ŽK, drenáž žlučových cest. Názory na její použití nejsou jednotné, rizika předoperační drenáže žlučových cest u pacientů s maligní obstrukcí žlučových cest převažují nad možnými benefity řešení žloutenky (Van Hooft, 2011), což ale může souviset s primárním onemocněním. Farmakologická léčba především směřuje k posílení vylučování ŽK a dalších potenciálně toxických látek z hepatocytů do krve a ke stimulaci biotransformačních procesů v hepatocytech. Použití ursodeoxycholové kyseliny má v řadě cholestatických onemocnění příznivé účinky, avšak u cholestázy obstrukčního typu se jeví jako nevhodné vzhledem k možnému zhoršení cholestatického poškození jater (Fickert et al., 2013). V průběhu minulých let se objevovaly experimentální práce, které s ohledem na prokázaný rozvoj oxidačního stresu a pokles antioxidační kapacity jater během cholestázy sledovaly účinek látek s antioxidačním účinkem. Jejich výsledky však nebyly jednoznačné (Hagymási et al., 2002; Soyly et al., 2006; Tahan et al., 2007). Dalším příslibem bylo studium protizáněťové a

imunosupresivně působících látek, které prokázaly zlepšení jaterního poškození (Karaman et al., 2006; Eken et al., 2006), avšak problémem pro jejich využití v klinické praxi mohou být na počátku třetího tisíciletí nežádoucí imunosupresivní účinky.

V době vzniku projektu začal narůstat zájem o statiny nejen jako o hypolipidemika, ale také pro jejich protizáněťové a antiproliferační účinky. V rozvoji cholestatického poškození se uplatňují výrazné zánětlivé změny spojené s oxidačním stresem. Zásah do dějů spojených s aktivitou Kupfferových buněk, neutrofilů a následně produkcí záněťových cytokinů by mohl přinést zmírnění jaterního poškození (Arnaud et al., 2005; Adam et Laufs, 2008). Úkolem naší práce bylo ověřit, zda by statiny mohly být i vhodnými léky bránícími rozvoji cholestatického onemocnění jater. Vzhledem k závažnosti problematiky rozvoje komplikací u chirurgických pacientů s cholestázou se očekávané výsledky jeví jako vhodný příspěvek pro výzkum a klinickou praxi studující etiopatogenezu těchto komplikací a nové postupy při jejich léčbě.

Prvním cílem naší studie bylo na modelu extrabiliární cholestázy navozené podvazem žlučovodu (BDL) sledovat účinek vybraného statinu – fluvastatinu na rozvoj jaterního poškození, resp. zda může dojít k omezení rozvoje tohoto poškození při jeho podávání. Z tohoto důvodu byla prováděna vyšetření sérových ukazatelů, která sloužila k hodnocení míry poškození jater – ALT, AST, k určení stupně cholestázy – GGT, ALP, celkový a konjugovaný bilirubin a k hodnocení proteosystetické funkce jater – albumin. Model podvazu žlučovodu na zvířeti použitý v naší studii simuluje změny navozené extrahepatální cholestázou, ke studiu cholestázy je všeobecně používáný a umožňuje až její 28 denní trvání. Hodnocení účinku fluvastatinu v naší studii má dva aspekty – vliv použité dávky (1 a 5 mg/kg tělesné hmotnosti) a dobu podávání fluvastatinu (původně plánováno 1, 2 a 3 týdny).

Druhým cílem bylo studium mechanismů účinků fluvastatinu na změny navozené cholestázou. Vzhledem k tomu, že oxidační stres, zánětlivé a fibrotické změny a funkce mitochondrií jsou nejčastěji zmiňovány v souvislosti s cholestatickým poškozením, byl sledován účinek fluvastatinu na parametry hodnotící jejich intenzitu. Rovněž byly vybrány transportéry, jejichž exprese se mění vlivem cholestázy v rámci adaptační reakce na ni a byl hodnocen dopad podávání fluvastatinu na jejich expresi.

Výsledky po podávání fluvastatinu však svědčí pro progresi jaterního cholestatického poškození navozeného podvazem žlučovodu. Je třeba zmínit, že 14 dnů trvající experimenty byly provázeny úhynem ve skupině zvířat, kterým byl po BDL podáván fluvastatin, což

u dávky 5 mg/kg začalo omezovat možnost statistického hodnocení. V experimentech trvajících 21 dnů narostla letalita v této skupině natolik (a to v případě obou použitých dávek fluvastatinu – 1 a 5 mg/kg), že nebylo možné provést statistické hodnocení výsledků v tomto časovém intervalu. Z tohoto důvodu nebyly výsledky zařazeny do této práce. Po provedení samotného podvazu docházelo přechodně ke snížení tělesné hmotnosti zvířat a k poklesu spontánního příjmu potravy. Nicméně hmotnost potkanů se postupně vracela k normě a v následujících dnech potkani dobře prospívali. V případě podávání fluvastatinu po BDL přetrvával nižší příjem potravy a úbytek hmotnosti progredoval v závislosti na aplikované dávce fluvastatinu.

V naší studii byl tedy nakonec hodnocen vliv 7 a 14 denního podávání fluvastatinu na rozvoj cholestatického poškození jater navozeného podvazem žlučového. Změny enzymové aktivity ALT, AST, GGT, ALP a hladiny celkového a konjugovaného bilirubinu v séru svědčily o přítomnosti cholestatického poškození jater a progresi hepatocelulárního poškození vlivem podávání fluvastatinu v závislosti na dávce a délce aplikace. Zatímco dávka fluvastatinu 1 mg/kg podávaná 1 týden nevedla k žádným změnám na úrovni hepatocelulárního poškození, dávka 5 mg/kg dále zhoršovala ukazatele jaterního poškození. Při podávání dávky 1 mg/kg po dobu 14 dnů došlo rovněž k progresi jaterního poškození.

Cholestáza je provázena intenzivní zánětovou odpovědí s produkcí cytokinů. Výrazné zvýšení prozánětových cytokinů v séru potkanů po podvazu žlučového bylo spojeno s expresí transkripčního faktoru NF- κ B (Liu et al., 2001). U pacientů s chronickým jaterním onemocněním byly v séru zjištěny zvýšené koncentrace zánětových mediátorů včetně TNF α , IL-6, IL-1 a IFN γ (Tilg et al., 1992). Genová exprese prozánětových cytokinů byla popsána i v játrech. Bohužel, korelace mezi prozánětovými cytokiny v plazmě a rozsah jaterního poškození není jasná (Lacour et al., 2005). Nálezy změn plazmatických a jaterních cytokinů navozených experimentálně podvazem žlučového jsou kontroverzní. 28 dnů po BDL byly sérové koncentrace plazmatického a jaterního TNF α výrazně zvýšené. Současně byl zvýšen plazmatický IL-6, zatímco IL-6 v játrech byl beze změny (Fernández-Martínez et al., 2006). Plebani et al. (1999) nepozorovali žádné změny sérového TNF α a IL-6 během 28 denního trvání BDL u potkanů. Naše výsledky měření sérové koncentrace TNF α a IL-6 7 dní po BDL svědčí pro růst obou cytokinů, signifikantně však pouze v případě TNF α . Přímý protizánětový účinek statinů zprostředkovaný modulací aktivity IL-6 byl prokázán v kultuře hepatocytů (Arnaud et al., 2005). Naše měření svědčila pro stabilní hladinu IL-6 v játrech po BDL.

Podáním fluvastatinu po BDL sice došlo k útlumu produkce IL-6 v játrech, avšak jaterní poškození navozené cholestázou se prohloubilo. Cytokin TGF β je jedním z fibrogenních faktorů užívaných pro analýzu fibrotické odpovědi (Czaja et al., 1989). BDL trvajících 7 dní nevedl ke změně produkce TGF β v játrech, ale ke zvýšení jeho produkce došlo u potkanů po BDL léčených fluvastatinem. Provedená histologická vyšetření přinesla sporadické nálezy progresu fibrózy v cholestatických játrech po podávání fluvastatinu.

Cholestatické jaterní poškození je provázené oxidačním stresem. Antioxidační stav jater byl v naší studii hodnocen měřením obsahu redukované (GSH) a oxidované formy (GSSG) glutationu v játrech. Literární údaje sledující hladiny GSH v játrech zvířat s experimentálně navozenou cholestázou jsou protichůdné (Yang et al., 2009; Lu, 2009). Naše výsledky poukazují na možné zvýšení obsahu GSH vlivem cholestázy. To je ve shodě s nálezem Puruckera et al. (1998), kteří dokumentovali dynamické změny v jaterním glutationovém systému – zvýšení redukované formy do 23 dnů po podvazu žlučovodu, a poté pokles GSH. Tyto změny by mohly být vysvětleny přechodným zvýšením sérové koncentrace enzymů syntetizujících GSH časně po BDL a jejím následným poklesem na asi 50 % běžných hodnot (Yang et al., 2009). V naší studii bylo provázeno podávání fluvastatinu po BDL deplecí redukovaného glutationu a poklesem poměru jeho redukované a oxidované formy v játrech, což by svědčilo pro vyšší oxidaci glutationu. Glutation hraje významnou antioxidační úlohu v buňkách včetně suprese reaktivních metabolitů produkovaných během metabolismu statinů v hepatocytech. Toxický účinek statinů provázený zvýšenou tvorbou ROS, poklesem redukované formy a vzestupem oxidované formy glutationu byl prokázán na kultuře hepatocytů v závislosti na jejich dávce (Abdoli et al., 2013). Obsah GSH klesá při experimentálně navozené fibróze i fibrotických onemocnění u lidí (Vendemiale et al., 2001). Bohužel mechanismus a biologický význam poklesu GSH pro rozvoj jaterní fibrózy není jasný (Liu et al., 2010). Jak bylo zmíněno, fibrogenní TGF β v naší studii vzrostl po podávání fluvastatinu cholestatickým potkanům. Experimentální výsledky svědčí pro úlohu TGF β v poklesu GSH, který je způsoben inhibicí syntézy GSH (Espinosa-Diez et al., 2015). Žlučové kyseliny, které jsou kumulovány v hepatocytech při cholestáze, mohou indukovat jaterní poškození mechanismem závislým na mitochondriích (Krahenbuhl et al., 1995; Gores et al., 1998; Rolo et al., 2001; Rolo et al., 2002). Zvýšení permeability vnitřní mitochondriální membrány, tzv. „bobtnání“ mitochondrií a kolaps mitochondriálního membránového potenciálu byly popsány v souvislosti s působením vysokých koncentrací žlučových kyselin. Žlučové kyseliny mohou snižovat respiraci izolovaných mitochondrií a inhibovat aktivitu

respiračních komplexů I, III a IV. Na nežádoucím hepatotoxickém účinku statinů se může podílet, jak bylo zmíněno výše, oxidační stres a může být zprostředkovaný navozením mitochondriální dysfunkce (Velho et al., 2006; Nadanaciva et al., 2007; Hattori et al., 2009; Lee et al., 2010). Hodnotili jsme, jaký účinek má fluvastatin na mitochondrie izolované z cholestatických jater se zaměřením na aktivitu vstupních komplexů respiračního řetězce – komplexu I a II. Podávání fluvastatinu bylo provázeno inhibicí komplexu I, zatímco aktivita komplexu II nebyla ovlivněna. Tento náález je ve shodě s literárními zdroji potvrzujícími inhibici respiračních komplexů statiny (Nadanaciva et al., 2007; Schirris et al., 2015). Ve studii Nadanaciva et al. (2007) fluvastatin inkubovaný s izolovanými hepatocyty inhiboval komplex V, ale aktivita komplexu I nebyla změněna. Fluvastatin podávaný v naší práci kontrolním potkanům také nenavodil poškození komplexu I. Je však možné, že podáváním fluvastatinu při cholestáze došlo ke snížení jeho aktivity. Lze spekulovat, že inhibice respiračního komplexu I v mitochondriích se alespoň částečně podílí na progresi cholestatického poškození po podávání fluvastatinu. V úvodu byla také zmíněna adaptivní odpověď hepatocytů na cholestázu, na které se podílejí změny exprese proteinů významných pro transport potenciálně toxických látek (Zollner et Trauner, 2006). P-glykoprotein Mdr1 lokalizovaný v kanalikulární membráně hepatocytů hraje hlavní úlohu v exkreci mnoha hydrofobních sloučenin a metabolitů žluči. Zatímco při cholestáze se exprese Mdr1 zvyšuje, podávání fluvastatinu po podvazu vedlo k poklesu exprese Mdr1. Sukhai et. al. dokumentovali vliv IL-6 na pokles Mdr1 (Sukhai et al., 2001). Bohužel není jasné, zda pokles produkce IL-6 u cholestatických potkanů léčených fluvastatinem může vyústit v pokles exprese Mdr1. K ochraně jater před kumulací potenciálně toxických látek při cholestáze také přispívá „*up-regulace*“ proteinu Mrp3 v bazolaterální membráně (Ogawa et al., 2000). Naše výsledky u neléčených cholestatických potkanů jsou obdobné. Podávání fluvastatinu vedlo k mírnému poklesu mRNA exprese Mrp3 transportéru. Před transportem z hepatocytů je řada xenobiotik metabolizována enzymy cytochromu P450 a poté konjugována, takže vznikají látky o vyšší hydrofilite a snadněji vylučované z hepatocytů (Paumgartner, 2006). Konjugační enzym uridin 5'-difosfát-glukuronosyltransferasa (Ugt) katalyzuje glukuronidační reakci významnou pro vyloučení bilirubinu a léčiv z hepatocytu do žluči. Ve shodě s literárními údaji jsme pozorovali zvýšení exprese Ugt1a1 po BDL. Podávání fluvastatinu cholestatickým potkanům bylo provázeno poklesem exprese Ugt1a1. Zhoršení konjugační funkce jater v naší práci tak může stát za poklesem konjugovaného bilirubinu v séru cholestatických potkanů léčených fluvastatinem. U pacientů s obstrukční cholestázou navozenou cholelitiázou by

mohla být výrazně omezena detoxikační schopnost jater vzhledem k prokázanému snížení exprese většiny detoxikačních enzymů (Chai et al., 2015). Nelze vyloučit, že při podávání fluvastatinu v cholestatických podmínkách může docházet ke změnám v metabolismu a eliminaci látek se zvýšením cytotoxického účinku na hepatocyty. Je jistě třeba pomýšlet i na poruchu eliminace samotného fluvastatinu z jaterních buněk.

K nežádoucím vedlejším účinkům, které mohou statiny navodit, patří myopatie. Dopad podávání statinů na svaly byl v této práci posuzován na základě měření aktivity CK v séru. Podávání fluvastatinu po indukci cholestázy bylo provázeno zvýšením aktivity CK. Statiny mohou navodit mitochondriální dysfunkci ve svalech snížením tvorby koenzymu Q, který je významný pro přenos elektronů v dýchacím řetězci. Experimentálně bylo prokázáno, že statiny působí jako silné inhibitory respiračního komplexu III (Schirris et al., 2015). Statiny také mohou indukovat v mitochondriích kosterních svalů oxidační stres a aktivovat tak apoptózu (Bouitbir et al., 2016). Je třeba zdůraznit, že v případě podávání fluvastatinu u laparotomovaných kontrol v naší studii ke zvýšení aktivity CK nedošlo. U pacientů s těžkým jaterním poškozením došlo při perorálním podávání statinu rosuvastatinu ke zvýšené systémové expozici tomuto léku, na které se může podílet snížené vychytávání rosuvastatinu játry nebo snížení biotransformační kapacity jater (Simonson et al., 2003). Zda to může být příčina myopatie navozené v naší studii, lze pouze spekulovat.

Náš náález pozorované progresse cholestatického poškození jater provázený myopatií po podávání fluvastatinu není ve shodě s nálezy jiných autorů, kteří naopak potvrdili protektivní účinek fluvastatinu (Demirbilek et al., 2007) a dalších statinů – simvastatinu (Dold et al., 2009) a rosuvastatinu (Awad et Kamel, 2010). Účinek simvastatinu však byl studován na myších s podvazem trvajícím pouhých 12 hodin, rosuvastatin a fluvastatin byly podávány potkanům jiného kmene (Sprague-Dawley) než tomu bylo v naší studii. Nikoli ihned po podvazu, ale až od třetího dne po jeho provedení. Na rozdílných výsledcích citovaných prací se tedy může podílet jiné časové uspořádání experimentů a použití jiných druhů zvířat. Po publikaci našich výsledků obsažených v této práci (Lotková et al., 2011) se objevila studie autorů Olteanu et al. (2012), která se se svým uspořádáním i použitým kmenem potkanů (Wistar) velmi blíží našemu projektu. Podobně jako v naší práci fluvastatin, i rosuvastatin vedl k progresi oxidačního stresu navozeného podvazem žlučovodu a k poškození hepatocytů.

S rozvojem poznatků v posledních letech přibývá množství informací o jaderných receptorech jako cíle terapie cholestázy vzhledem k jejich úloze v regulaci pochodů

významných pro rozvoj cholestatického poškození. FXR (farnesoid X receptor) je aktivován přirozeně se vyskytující CDCA, ale také (semi)syntetickými ligandy. Aktivací FXR dochází k ovlivnění transkripce řady genů, které mají význam pro snížení transportu ŽK z krve do hepatocytů, snížení syntézy ŽK, stimulaci detoxikace a sekrece ŽK. PXR (pregnane X receptor) a CAR (constitutive androstane receptor) regulují geny významné pro detoxikaci a eliminaci potenciálně toxických exogenních a endogenních látek (Kliwer et al., 2002). Jako aktivátor působí celá řada strukturálně odlišných látek včetně ŽK a bilirubinu. VDR (vitamin D receptor) je aktivován kalcitriolem a má význam pro regulaci hladiny Ca^{2+} . V hepatocytech není exprimován, avšak neparenchymové buňky v játrech (Kupfferovy, biliární, endoteliální, HSC) ho exprimují na vysoké úrovni (Gascon-Barré et al., 2003). Zvýšená exprese VDR je spojena s antifibrotickým účinkem (Abramovitch et al., 2011). PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor) je vysoce exprimován ve tkáních, které využívají tuky – játra, srdce, ledviny, svaly, tenké a tlusté střevo (Braissant et al., 1996) a stimuluje β -oxidaci mastných kyselin. Aktivátory PPAR α jsou fibráty, které indukují expresi konjugačních enzymů II. fáze biotransformačních procesů a rovněž transportéru ASBT ve střevě a cholangiocytech (Barbier et al., 2003; Barbier et al., 2009; Fang et al., 2005; Jung et al., 2002). Ligandy PPAR α jsou schopny i tlumit syntézu ŽK (Marrapodi et al., 2000). Řada experimentálních výsledků i studií na pacientech přináší slibné výsledky dokumentující, že aktivátory těchto transkripčních faktorů mohou při cholestáze tlumit syntézu žlučových kyselin, podporovat jejich biotransformaci, snižovat hladinu sérových markerů cholestázy nebo vykazovat antifibrotické účinky (Abramovitch et al., 2011; Haughton et al., 2006; Honda et al., 2013; Wagner et al., 2005).

Naše výsledky nepotvrdily účinnost terapie cholestatického poškození jater při extrahepatální obstrukci statiny, ale naopak poukázaly na možnost progresu jaterního poškození při jejich podávání. Na rozvoji tohoto poškození by se mohl podílet pokles antioxidační kapacity jater a mitochondriální dysfunkce. Navíc změny metabolismu a vylučování endogenních a exogenních látek mohou vést ke kumulaci potenciálně toxických látek v hepatocytech a prohloubit jejich poškození. Literární i naše výsledky podporují potřebu ověření případného cytotoxického účinku statinů v podmínkách již navozeného jaterního poškození.

Závěr

Podávání fluvastatinu v dávce 1 a 5 mg/kg potkanům s cholestázou navozenou podvazem žlučovodu nevedlo ke zmírnění rozvoje cholestatického poškození jater, ale naopak k jeho progresi. Fluvastatin samotný však u kontrolních potkanů nevedl k poškození jater. Rychlost rozvoje poškození jater závisela na podávané dávce a délce podávání fluvastatinu. Dávka 1 mg/kg v našem experimentu odpovídá maximální dávce užívané klinicky. Zatímco po 7 dnech aplikace 1 mg/kg nedošlo ke změnám markerů hepatocelulárního poškození, po 14 dnech už bylo patrné hepatocelulární poškození. V případě dávky 5 mg/kg se poškození jater u cholestatických potkanů prohloubilo již po 7 dnech aplikace fluvastatinu. Hepatocelulární poškození bylo provázeno poklesem produkce albuminu. S délkou časového intervalu, po který byl fluvastatin aplikován cholestatickým potkanům, navíc narůstala letalita zvířat.

V mechanismu poškození jater může sehrávat úlohu pokles antioxidační kapacity jater a mitochondriální dysfunkce. S progresí jaterního poškození bylo detekováno i zvýšení produkce profibrogenního cytokinu TGF β . V histologickém obrazu byly zaznamenány sporadické fibrotické změny. Naše výsledky svědčí i pro omezení zvýšené exprese vybraných proteinů kanalikulární a bazolaterální membrány hepatocytů významných pro vylučování řady látek a metabolitů, ke kterému jinak vlivem cholestázy dochází v rámci adaptační reakce. Obdobně došlo ke snížení exprese sledovaného konjugačního enzymu. Sledovaný oxidační stres a mitochondriální dysfunkce by se tak mohly rozvíjet jako následek poruchy metabolismu a transportu potenciálně toxických látek. Při podávání látek v období rozvoje cholestázy je proto třeba dodržovat vysokou opatrnost s ohledem na možné změny metabolismu a transportu potenciálně toxických látek.

Použitá literatura

1. Abdoli, N., Heidari, R., Azarmi, Y., Eghbal, M. A., *Mechanisms of the Statins Cytotoxicity in Freshly Isolated Rat Hepatocytes*. J BiochemMol Toxicol. 27:287-294. DOI 10.1002/jbt.21485.
2. Abramovitch, S., Dahan-Bachar, L., Sharvit, E., Weisman, Y., Ben Tov, A., Brazowski, E., & Reif, S., 2011. *Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats*. Gut, **60**(12), 1728-1737. DOI: 10.1136/gut.2010.234666.
3. Adam, O., Laufs, U., 2008. *Antioxidative effects of statins*. Arch Toxicol 82:885-92; DOI: 10.1007/s00204-008-0344-4.
4. Allen, K., Jaeschke, H., & Copple, B. L., 2011. *Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis*. Am J Pathol, **178**(1), 175-186. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.11.026.
5. Alpini, G., Glaser, S., Robertson, W., Rodgers, R. E., Phinizy, J. L., Lasater, J., & LeSage, G. D., 1997. *Large but not small intrahepatic bile ducts are involved in secretin-regulated ductal bile secretion*. Am J Physiol, **272**(5 Pt 1), G1064-1074.
6. Alpini, G., Glaser, S. S., Ueno, Y., Pham, L., Podila, P. V., Caligiuri, A., ... LaRusso, N. F., 1998. *Heterogeneity of the proliferative capacity of rat cholangiocytes after bile duct ligation*. Am J Physiol, **274**(4 Pt 1), G767-775.
7. Alpini, G., Ulrich, C., Roberts, S., Phillips, J. O., Ueno, Y., Podila, P. V., ... LaRusso, N. F., 1997. *Molecular and functional heterogeneity of cholangiocytes from rat liver after bile duct ligation*. Am J Physiol, **272**(2 Pt 1), G289-297.
8. Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D. J., & Suchy, F. J., 2001. *Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor*. J Biol Chem, **276**(31), 28857-28865. DOI: 10.1074/jbc.M011610200.
9. Arduini, A., Serviddio, G., Tormos, A. M., Monsalve, M., Sastre, J., 2012. *Mitochondrial dysfunction in cholestatic liver diseases*. Front Biosci 1;4:2233-52.
10. Arias I. M., Che M., Gatmaitan, Z., Leveille, C., Nishida, T., St Pierre, M., 1993. *The biology of the bile canaliculus*. Hepatology **17**(2):318-29.
11. Arnaud, C., Burger, F., Steffens, S., Veillard, N. R., Nguyen, T. H., Trono, D., Mach, F., 2005. *Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new*

- evidence for direct antiinflammatory effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **25**(6):1231-6. DOI: 10.1161/01.ATV.0000163840.63685.0c.
12. Arrese, M., & Ananthanarayanan, M., 2004. *The bile salt export pump: molecular properties, function and regulation.* *Pflugers Arch*, **449**(2), 123-131. doi: 10.1007/s00424-004-1311-4.
 13. Arrese, M., & Trauner, M., 2003. *Molecular aspects of bile formation and cholestasis.* *Trends Mol Med*, **9**(12), 558-564.
 14. Arthur, M. J. P., 2000. *Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis.* *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **279**(2), G245-G249. ISSN 1522-1547.
 15. Attili, A. F., Angelico, M., Cantafora, A., Alvaro, D., & Capocaccia, L., 1986. *Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids.* *Med Hypotheses*, **19**(1), 57-69.
 16. Awad, A. S., Kamel, R., 2010. *Effect of rosuvastatin on cholestasis-induced hepatic injury in rat livers.* *J Biochem Mol Toxicol.* **24**(2):89-94. DOI: 10.1002/jbt.20315.
 17. Axelson, M., & Sjovall, J., 1990. *Potential bile acid precursors in plasma--possible indicators of biosynthetic pathways to cholic and chenodeoxycholic acids in man.* *J Steroid Biochem*, **36**(6), 631-640.
 18. Barbier, O., Duran-Sandoval, D., Pineda-Torra, I., Kosykh, V., Fruchart, J. C., & Staels, B., 2003. *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces hepatic expression of the human bile acid glucuronidating UDP-glucuronosyltransferase 2B4 enzyme.* *J Biol Chem*, **278**(35), 32852-32860. DOI: 10.1074/jbc.M305361200.
 19. Barbier, O., Trottier, J., Kaeding, J., Caron, P., & Verreault, M., 2009. *Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation.* *Mol Cell Biochem*, **326**(1-2), 3-8. DOI: 10.1007/s11010-008-0001-5.
 20. Barnes, S. N., Aleksunes, L. M., Augustine, L., Scheffer, G. L., Goedken, M. J., Jakowski, A. B., ... Manautou, J. E., 2007. *Induction of hepatobiliary efflux transporters in acetaminophen-induced acute liver failure cases.* *Drug Metab Dispos*, **35**(10), 1963-1969. DOI: 10.1124/dmd.107.016170.
 21. Bataller, R., & Brenner, D. A., 2005. *Liver fibrosis.* *J Clin Invest*, **115**(2), 209-218. DOI: 10.1172/jci24282.
 22. Baumgartner, U., Schölmerich, J., Weitzel, Ch., Ihling, Ch., Sellinger, M., Löhle, E., Ruf, G., Gerok, W., Farthmann, E-H., 1995. *Pattern of bile acid regurgitation and metabolism*

- during perfusion of the bile duct obstructed rat liver. *J Hepatol.* 22(2):208-18. DOI: 10.1016/0168-8278(95)80431-5.
23. Berg, R. D., Garlington, A. W., 1979. *Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model.* *Infect Immun.* 23(2):403-411.
 24. Beuers, U., Hohenester, S., de Buy Wenniger, L. J., Kremer, A. E., Jansen, P. L., & Elferink, R. P., 2010. *The biliary HCO₃(-)-umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies.* *Hepatology*, 52(4), 1489-1496. DOI: 10.1002/hep.23810.
 25. Bogert, P. T., & LaRusso, N. F., 2007. *Cholangiocyte biology.* *Curr Opin Gastroenterol*, 23(3), 299-305. DOI: 10.1097/MOG.0b013e3280b079fb.
 26. Bouitbir, J., Singh, F., Charles, A. L., Schlagowski, A. I., Bonifacio, A., Echaniz-Laguna A., Geny, B., Krähenbühl, S., Zoll, J., 2016. *Statins Trigger Mitochondrial Reactive Oxygen Species-Induced Apoptosis in Glycolytic Skeletal Muscle.* *Antioxid Redox Signal.* 10;24(2):84-98. DOI: 10.1089/ars.2014.6190.
 27. Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M., & Wahli, W., 1996. *Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat.* *Endocrinology*, 137(1), 354-366. DOI: 10.1210/endo.137.1.8536636.
 28. Brandoni, A., Villar, S. R., Picena, J. C., Anzai, N., Endou, H., & Torres, A. M., 2006. *Expression of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to acute biliary obstruction.* *Hepatology*, 43(5), 1092-1100. DOI: 10.1002/hep.21142.
 29. Brcakova, E., Fuksa, L., Cermanova, J., Kolouchova, G., Hroch, M., Hirsova, P., Martinkova, J., Staud, F., Micuda, S., 2009. *Alteration of methotrexate biliary and renal elimination during extrahepatic and intrahepatic cholestasis in rats.* *Biol. Pharm. Bull.* 32(12) 1978-85.
 30. Brown, K. M., Brems, J. J., Moazzam, F. N., Hartman, G. G., Gamelli, R. L., & Ding, J. W., 2003. *The nitric oxide donor molsidomine improves survival and reduces hepatocyte apoptosis in cholestasis and endotoxemia.* *J Am Coll Surg*, 197(2), 261-269. DOI: 10.1016/s1072-7515(03)00386-7.
 31. Bustamante, E., Soper, J. W., Pedersen, P. L., 1977. *A high-yield preparative method for isolation of rat liver mitochondria.* *Anal. Biochem.* 80:401-408.

32. Cerejido, M., Contreras, R. G., Shoshani, L., Flores-Benitez, D., & Larre, I., 2008. *Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype*. *Biochim Biophys Acta*, **1778**(3), 770-793. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.09.001.
33. Clements, W. D., Erwin, P., McCaigue, M.D., Halliday, I., Barclay, G.R. and Rowlands, B.J., 1998. *Conclusive evidence of endotoxaemia in biliary obstruction*. *Gut* 42, 293–299.
34. Czaja, M. J., Weiner, F. R., Flanders, K. C., Giambone, M. A., Wind, R., Biempica, L., Zem, M. A., 1989. *J Cell Biol.*108(6):2477-82. DOI: 0021-9525/89/06/2477/6.
35. Čihák, R., 2002. *Anatomie 2. 2. upravené vydání*. Praha: Grada. ISBN: 978-80-247-4788-0.
36. Dabeva, M. D., & Shafritz, D. A., 1993. *Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration*. *Am J Pathol*, **143**(6), 1606-1620.
37. Dabeva, M. D., & Shafritz, D. A., 2003. *Hepatic stem cells and liver repopulation*. *Semin Liver Dis*, **23**(4), 349-362. DOI: 10.1055/s-2004-815562.
38. Demirbilek, S., Tas, E., Gurunluoglu, K., Akin, M., Aksoy, R. T., Emre, M. H., Aydin, N. E., Ay, S., Ozatay, N., 2007. *Fluvastatin reduced liver injury in rat model of extrahepatic cholestasis*. *Pediatr Surg Int* 23:155-62. DOI: 10.1007/s00383-006-1829-y.
39. Dold, S., Laschkel, M. W., Lavasanil, S., Menger, M. D., Jeppsson, B., Thorlacius, H., 2009. *Simvastatin protects against cholestasis-induced liver injury*. *British Journal of Pharmacology* 156, 466–474. DOI:10.1111/j.1476-5381.2008.00043.x.
40. Donner, M. G., Schumacher, S., Warskulat, U., Heinemann, J., & Haussinger, D., 2007. *Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **293**(6), G1134-1146. DOI: 10.1152/ajpgi.00079.2007.
41. Dranoff, J. A., & Wells, R. G., 2010. *Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis*. *Hepatology*, **51**(4), 1438-1444. DOI: 10.1002/hep.23405.
42. Dranoff, J. A., & Wells, R. G., 2010. *Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis*. *Hepatology*, **51**(4), 1438-1444. DOI: 10.1002/hep.23405.
43. Ehrmann, J., Hůlek, P., 2014. 2. vydání. Praha: Grada, s. 658, ISBN: 859-404-924-027-2.
44. Eken, H., Ozturk, H., Ozturk H., Buyukbayram, H., 2006. *Dose-related effects of dexamethasone on liver damage due to bile duct ligation in rats*. *WJG*. 12(33):5379-5383. DOI:10.3748/wjg.v12.i33.5379.

45. Espinosa-Diez, C., Fierro-Fernández, M., Sánchez-Gómez, F., Rodríguez-Pascual, F., Alique, M., Ruiz-Ortega, M., Beraza, N., Martínez-Chantar, M. L., Fernández-Hernando, C., Lamas S., 2015. *Antioxidants & Redox Signaling*. 23(14):1092-1105. DOI:10.1089/ars.2014.6025.
46. Esteller, A., 2008. *Physiology of bile secretion*. World J Gastroenterol, **14**(37), 5641-5649.
47. Fang, H. L., Strom, S. C., Cai, H., Falany, C. N., Kocarek, T. A., & Runge-Morris, M., 2005. *Regulation of human hepatic hydroxysteroid sulfotransferase gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha transcription factor*. Mol Pharmacol, **67**(4), 1257-1267. DOI: 10.1124/mol.104.005389.
48. Fernández-Martínez, E., Pérez-Alvarez, V., Tsutsumi, V., Shibayama, M., Muriel, P., 2006. *Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat*. Experimental and Toxicologic Pathology 58;49-58. DOI: 10.1016/j.etp.2006.03.002.
49. Fickert, P., Krones, E., Pollheimer, M. J., Thueringer, A., Moustafa, T., Silbert, D., Halilbasic, E., Yang, M., Jaeschke, H., Stokman, G., Wells, R. G., Eller, K., Rosenkranz, A. R., Eggertsen, G., Wagner, C. A., Langner, C., Denk, H. and Trauner, M., 2013. *Bile acids trigger cholemic nephropathy in common bile-duct–ligated mice*. Hepatology, 58: 2056–2069. DOI:10.1002/hep.26599.
50. Fiorucci, S., Antonelli, E., Rizzo, G., Renga, B., Mencarelli, A., Riccardi, L., ... Morelli, A., 2004. *The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis*. Gastroenterology, **127**(5), 1497-1512.
51. Fiorucci, S., Clerici, C., Antonelli, E., Orlandi, S., Goodwin, B., Sadeghpour, B. M., ... Morelli, A., 2005. *Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis*. J Pharmacol Exp Ther, **313**(2), 604-612. DOI: 10.1124/jpet.104.079665.
52. Fouts, D. E., Torralba, M., Nelson, K. E., Brenner, D. A., & Schnabl, B., 2012. *Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease*. J Hepatol, **56**(6), 1283-1292. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.01.019.
53. Gabele, E., Froh, M., Arteel, G. E., Uesugi, T., Hellerbrand, C., Scholmerich, J., ... Rippe, R. A., 2009. *TNFalpha is required for cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse*. Biochem Biophys Res Commun, **378**(3), 348-353. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.10.155.

54. Gascon-Barre, M., Demers, C., Mirshahi, A., Neron, S., Zalzal, S., & Nanci, A., 2003. *The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells*. *Hepatology*, **37**(5), 1034-1042. DOI: 10.1053/jhep.2003.50176.
55. Geier, A., Dietrich, C. G., Gerloff, T., Haendly, J., Kullak-Ublick, G. A., Stieger, B., ... Gartung, C., 2003. *Regulation of basolateral organic anion transporters in ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat*. *Biochim Biophys Acta*, **1609**(1), 87-94.
56. Geier, A., Zollner, G., Dietrich, C. G., Wagner, M., Fickert, P., Denk, H., ... Trauner, M., 2005. *Cytokine-independent repression of rodent Ntcp in obstructive cholestasis*. *Hepatology*, **41**(3), 470-477. doi: 10.1002/hep.20594.
57. Georgiev, P., Jochum, W., Heinrich, S., Jang, J. H., Nocito, A., Dahm, F., et al., 2008. *Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation*. *Br J Surg*, **95**:646–656. DOI:10.1002/bjs.6050.
58. Gores, G. J., Miyoshi, H., Botla, R., Aguilar, H. I., Bronk, S. F., 1998. *Induction of the mitochondrial permeability transition as a mechanism of liver injury during cholestasis: a potential role for mitochondrial proteases*. *Biochim Biophys Acta*. **10**;1366(1-2):167-75.
59. Gradilone, S. A., Garcia, F., Huebert, R. C., Tietz, P. S., Larocca, M. C., Kierbel, A., ... Marinelli, R. A., 2003. *Glucagon induces the plasma membrane insertion of functional aquaporin-8 water channels in isolated rat hepatocytes*. *Hepatology*, **37**(6), 1435-1441. DOI: 10.1053/jhep.2003.50241.
60. Gressner, A. M., 1996. *Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis*. *Kidney Int Suppl*, **54**, S39-45.
61. Gressner, A. M., & Weiskirchen, R., 2006. *Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets*. *J Cell Mol Med*, **10**(1), 76-99.
62. Grim, M., Druga, R., et al., 2005. *Základy anatomie: 3. Trávicí, dýchací, močopohlavní a endokrinní systém*. Praha: Galén. ISBN: 80-246-0989-4.
63. Gujral, J. S., Farhood, A., Bajt, M. L., & Jaeschke, H., 2003. *Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice*. *Hepatology*, **38**(2), 355-363. DOI: 10.1053/jhep.2003.50341.
64. Guyton, A., C., Hall, J. E., 2011. *Textbook of medical physiology*. 12th edition. Philadelphia: Saunders/Elsevier. ISBN: 978-1416045748.

65. Hagymási, K., Kocsis, I., Lugasi, A., Fehér, J., Blázovics, A., 2002. *Extrahepatic biliary obstruction: can silymarin protect liver function?* *Phytother Res.* 16 Suppl 1:S78-80.
66. Halilbasic, E., Baghdasaryan, A., & Trauner, M., 2013. *Nuclear receptors as drug targets in cholestatic liver diseases.* *Clin Liver Dis,* 17(2), 161-189. DOI: 10.1016/j.cld.2012.12.001.
67. Haughton, E. L., Tucker, S. J., Marek, C. J., Durward, E., Leel, V., Bascal, Z., et al., 2006. *Pregnane X receptor activators inhibit human hepatic stellate cell transdifferentiation in vitro.* *Gastroenterology.* 131:194–209. DOI:10.1053/j.gastro.2006.04.012.
68. Hissin, P. J., Hilf, R., 1976. *A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues.* *Anal Biochem* 74: 214-26. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90326-2.
69. Hogeboom, G. H., Schneider, W. C., 1951. Proteins of liver and hepatoma mitochondria. *Science* 113(2935):355-8.
70. Hohenester, S., Wenniger, L. M., Paulusma, C. C., van Vliet, S. J., Jefferson, D. M., Elferink, R. P., & Beuers, U., 2012. *A biliary HCO₃⁻ umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes.* *Hepatology,* 55(1), 173-183. DOI: 10.1002/hep.24691.
71. Honda, A., Ikegami, T., Nakamuta, M., Miyazaki, T., Iwamoto, J., Hirayama, T., ... Matsuzaki, Y., 2013. *Anticholestatic effects of bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis treated with ursodeoxycholic acid.* *Hepatology,* 57(5), 1931-1941. DOI: 10.1002/hep.26018.
72. Huang, L., Zhao, A., Lew, J. L., Zhang, T., Hrywna, Y., Thompson, J. R., ... Cui, J. 2003. *Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3.* *J Biol Chem,* 278(51), 51085-51090. doi: 10.1074/jbc.M308321200.
73. Huang, Y. T., Hsu, Y. C., Chen, C. J., Liu, C. T., & Wei, Y. H., 2003. *Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats.* *J Biomed Sci,* 10(2), 170-178. DOI: 68715.
74. Chai, J., Feng, X., Zhang, L., Chen, S., Cheng, Y., He, X., et al., 2015. *Hepatic Expression of Detoxification Enzymes Is Decreased in Human Obstructive Cholestasis Due to Gallstone Biliary Obstruction.* *PLoS ONE* 10(3): e0120055. DOI:10.1371/journal.pone.0120055.
75. Chiang, J. Y., 1998. *Regulation of bile acid synthesis.* *Front Biosci,* 3, d176-193.

76. Chiang, J. Y., Kimmel, R., & Stroup, D., 2001. *Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha)*. *Gene*, **262**(1-2), 257-265.
77. Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C. L., McDonald, J. G., ... Kliewer, S. A., 2005. *Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis*. *Cell Metab*, **2**(4), 217-225. DOI: 10.1016/j.cmet.2005.09.001.
78. Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y. K., Peng, L., Zhao, G., Downes, M., ... Kliewer, S. A., 2006. *Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(10), 3920-3925. DOI: 10.1073/pnas.0509592103.
79. Iwaisako, K., Jiang, C., Zhang, M., Cong, M., Moore-Morris, T. J., Park, T. J., ... Kisseleva, T., 2014. *Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **111**(32), E3297-3305. DOI: 10.1073/pnas.1400062111.
80. Jaeschke, H., 2011. *Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts*. *J Gastroenterol Hepatol*, 26 Suppl 1, 173-179. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06592.x.
81. Jaeschke, H., & Hasegawa, T., 2006. *Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury*. *Liver Int*, **26**(8), 912-919. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2006.01327.x.
82. Jaeschke, H., Ho, Y. S., Fisher, M. A., Lawson, J. A., & Farhood, A., 1999. *Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress*. *Hepatology*, **29**(2), 443-450. DOI: 10.1002/hep.510290222.
83. Jones, C., Badger, S. A., Black, J. M., McFerran, N. V., Hoper, M., Diamond, T., ... Taylor, M. A., 2012. *The use of antiendotoxin peptides in obstructive jaundice endotoxemia*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **24**(3), 248-254. DOI: 10.1097/MEG.0b013e32834dfb8c.
84. Jones, C., Badger, S. A., Hoper, M., Parks, R. W., Diamond, T., & Taylor, M. A., 2013. *Hepatic cytokine response can be modulated using the Kupffer cell blocker gadolinium chloride in obstructive jaundice*. *Int J Surg*, **11**(1), 46-51. DOI: 10.1016/j.ijsu.2012.11.008.

85. Jung, D., Fried, M., Kullak-Ublick, G. A., 2002. *Human apical sodium-dependent bile salt transporter gene (SLC10A2) is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. J Biol Chem. 277(34):30559-66. DOI: 10.1074/jbc.M203511200.
86. Junquiera, C. L., Carneiro, J., Kelley, R. O., 2002. *Základy histologie*. Praha: H+H, ISBN: 80-85787-37-7.
87. Kand'ár, R., Štranová, X., Drábková, P., Brandtnerová, M., 2015. *Determination of Total Glutathione in Dried Blood Spot Samples Using a High-Performance Liquid Chromatography*. J Chromatogr Sci. 53(6):879-85. DOI: 10.1093/chromsci/bmu135.
88. Karaman, A., Iraz, M., Kirimlioglu, H., Karadag, N., Tas, E., Fadillioglu, E., 2006. *Hepatic damage in biliary-obstructed rats is ameliorated by leflunomide treatment*. Pediatr Surg Int. 22(9):701-8.
89. Kast, H. R., Goodwin, B., Tarr, P. T., Jones, S. A., Anisfeld, A. M., Stoltz, C. M., ... Edwards, P. A., 2002. *Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor*. J Biol Chem, 277(4), 2908-2915. DOI: 10.1074/jbc.M109326200.
90. Kliewer, S. A., Goodwin, B., Willson T. M., 2002. *The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism*. Endocrine Reviews 23:5, 687-702.
91. Kountouras, J., Billing, B. H., Scheuer, P. J., 1984. *Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat*. British journal of experimental pathology. 65(3):305-311.
92. Kovalovich, K., DeAngelis, R. A., Li, W., Furth, E. E., Ciliberto, G., & Taub, R., 2000. *Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice*. Hepatology, 31(1), 149-159. DOI: 10.1002/hep.510310123.
93. Kowdley, K., Jones, D., Luketic, V., Chapman, R., Burroughs, A., Hirschfield, G., et al., 2011. *An international study evaluating the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid as monotherapy in PBC [abstract]*. J Hepatol 54 (Suppl.): S13.
94. Krahenbuhl, S., Talos, C., Fischer, S., & Reichen, J., 1994. *Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria*. Hepatology, 19(2), 471-479.
95. Krahenbuhl, S., Talos, C., Lauterburg, B. H., & Reichen, J., 1995. *Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats*. Hepatology, 22(2), 607-612.
96. Lacour, S., Gautier, J. C., Pallardy, M., Roberts, R., 2005. *Cytokines as potential biomarkers of liver toxicity*. Cancer Biomark. 1(1):29-39.

97. Lai, E. C. H., Lau, S. H. Y., Lau, W. Y., 2014. *The current status of preoperative biliary drainage for patients who receive pancreaticoduodenectomy for periampullary carcinoma: A comprehensive review*. *Surgeon*, **12**(5), G290-6. DOI: 10.1016/j.surge.2014.02.004.
98. Lamireau, T., Zoltowska, M., Levy, E., Yousef, I., Rosenbaum, J., Tuchweber, B., & Desmouliere, A., 2003. *Effects of bile acids on biliary epithelial cells: proliferation, cytotoxicity, and cytokine secretion*. *Life Sci*, **72**(12), 1401-1411.
99. Landrier, J. F., Eloranta, J. J., Vavricka, S. R., & Kullak-Ublick, G. A., 2006. *The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **290**(3), G476-485. DOI: 10.1152/ajpgi.00430.2005.
100. Landrier, J. F., Thomas, C., Grober, J., Duez, H., Percevault, F., Souidi, M., ... Besnard, P., 2004. *Statin induction of liver fatty acid-binding protein (L-FABP) gene expression is peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent*. *J Biol Chem*, **279**(44), 45512-45518. DOI: 10.1074/jbc.M407461200.
101. Lazar, G., Jr., Paszt, A., Kaszaki, J., Duda, E., Szakacs, J., Tiszlavicz, L., ... Lazar, G. 2002. *Kupffer cell phagocytosis blockade decreases morbidity in endotoxemic rats with obstructive jaundice*. *Inflamm Res*, **51**(10), 511-518.
102. Li, L., Meier, P. J., & Ballatori, N., 2000. *Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione*. *Mol Pharmacol*, **58**(2), 335-340.
103. Liu, T. Z., Lee, K. T., Chern, C. L., Cheng, J. T., Stern, A., & Tsai, L. Y., 2001. *Free radical-triggered hepatic injury of experimental obstructive jaundice of rats involves overproduction of proinflammatory cytokines and enhanced activation of nuclear factor kappaB*. *Ann Clin Lab Sci*, **31**(4), 383-390.
104. Liu, Y., Binz, J., Numerick, M. J., Dennis, S., Luo, G., Desai, B., ... Jones, S. A., 2003. *Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis*. *J Clin Invest*, **112**(11), 1678-1687. DOI: 10.1172/jci18945.
105. Lotková, H., Staňková, P., Roušar, T., Kučera, O., Kohoutek, L., Mičuda, S., Brčáková, E., Kolouchová, G., Červinková, Z., 2011. *Deteriorating effect of fluvastatin on the cholestatic liver injury induced by bile duct ligation in rats*. *Gen Physiol Biophys*. **30**(1):66-74. DOI: 10.4149/gpb.2011.01.66.
106. Lu, S. C., 2009. *Regulation of glutathione synthesis*. *Mol Aspects Med*. **30**(1-2):42-59. DOI: 10.1016/j.mam.2008.05.005.

- ¹⁰⁷. Luster, M. I., Germolec, D. R., Yoshida, T., Kayama, F., & Thompson, M., 1994. *Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver*. *Hepatology*, **19**(2), 480-488.
- ¹⁰⁸. Lv, X., Song, J. G., Li, H. H., Ao, J. P., Zhang, P., Li, Y. S., ... Wang, X. R., 2011. *Decreased hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to increased sensitivity to endotoxin in obstructive jaundice*. *World J Gastroenterol*, **17**(48), 5267-5273. DOI: 10.3748/wjg.v17.i48.5267.
- ¹⁰⁹. Makishima, M., Lu, T. T., Xie, W., Whitfield, G. K., Domoto, H., Evans, R. M., ... Mangelsdorf, D. J., 2002. *Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor*. *Science*, **296**(5571), 1313-1316. DOI: 10.1126/science.1070477.
- ¹¹⁰. Marinelli, R. A., Pham, L., Agre, P., & LaRusso, N. F., 1997. *Secretin promotes osmotic water transport in rat cholangiocytes by increasing aquaporin-1 water channels in plasma membrane. Evidence for a secretin-induced vesicular translocation of aquaporin-1*. *J Biol Chem*, **272**(20), 12984-12988.
- ¹¹¹. Marra, F., Romanelli, R. G., Giannini, C., Failli, P., Pastacaldi, S., Arrighi, M. C., ... Gentilini, P., 1999. *Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells*. *Hepatology*, **29**(1), 140-148. DOI: 10.1002/hep.510290107.
- ¹¹². Marrapodi, M., & Chiang, J. Y., 2000. *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and agonist inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription*. *J Lipid Res*, **41**(4), 514-520.
- ¹¹³. Marschall, H. U., Wagner, M., Bodin, K., Zollner, G., Fickert, P., Gumhold, J., ... Trauner, M., 2006. *Fxr(-/-) mice adapt to biliary obstruction by enhanced phase I detoxification and renal elimination of bile acids*. *J Lipid Res*, **47**(3), 582-592. DOI: 10.1194/jlr.M500427-JLR200.
- ¹¹⁴. Martinez-Anso, E., Castillo, J. E., Diez, J., Medina, J. F., & Prieto, J., 1994. *Immunohistochemical detection of chloride/bicarbonate anion exchangers in human liver*. *Hepatology*, **19**(6), 1400-1406.
- ¹¹⁵. Martini, F. H., Timmons, M. J., Tallitsch, R. B., 2012. *Human Anatomy*. 7. vydání. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings. ISBN: 978-0321688156.
- ¹¹⁶. Mathison, J. C., & Ulevitch, R. J., 1979. *The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits*. *J Immunol*, **123**(5), 2133-2143.

- ¹¹⁷. Meyers, M., Slikker, W., Pascoe, G., & Vore, M., 1980. *Characterization of cholestasis induced by estradiol-17 beta-D-glucuronide in the rat*. J Pharmacol Exp Ther, **214**(1), 87-93.
- ¹¹⁸. Michalopoulos, G. K., Barua, L., & Bowen, W. C., 2005. *Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury*. Hepatology, **41**(3), 535-544. DOI: 10.1002/hep.20600.
- ¹¹⁹. Minter, R. M., Fan, M. H., Sun, J., Niederbichler, A., Ipaktchi, K., Arbabi, S., ... Su, G. L., 2005. *Altered Kupffer cell function in biliary obstruction*. Surgery. **138**(2), 236-245. DOI: 10.1016/j.surg.2005.04.001.
- ¹²⁰. Mitchell, C., Mahrouf-Yorgov, M., Mayeuf, A., Robin, M. A., Mansouri, A., Fromenty, B., & Gilgenkrantz, H., 2011. *Overexpression of Bcl-2 in hepatocytes protects against injury but does not attenuate fibrosis in a mouse model of chronic cholestatic liver disease*. Lab Invest, **91**(2), 273-282. DOI: 10.1038/labinvest.2010.163.
- ¹²¹. Miyaso, H., Morimoto, Y., Ozaki, M., Haga, S., Shinoura, S., Choda, Y., ... Tanaka, N., 2005. *Obstructive jaundice increases sensitivity to lipopolysaccharide via TLR4 upregulation: possible involvement in gut-derived hepatocyte growth factor-protection of hepatocytes*. J Gastroenterol Hepatol, **20**(12), 1859-1866. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2005.03953.x
- ¹²². Monte, M. J., Marin, J. J., Antelo, A., & Vazquez-Tato, J., 2009. *Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology*. World J Gastroenterol, **15**(7), 804-816.
- ¹²³. Moreira, R. K., 2007. *Hepatic stellate cells and liver fibrosis*. Arch Pathol Lab Med, **131**(11), 1728-1734. DOI: 10.1043/1543-2165(2007)131[1728:hscalf]2.0.co;2.
- ¹²⁴. Mottino, A. D., Cao, J., Veggi, L. M., Crocenzi, F., Roma, M. G., & Vore, M., 2002. *Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol-17beta-D-glucuronide-induced cholestasis*. Hepatology, **35**(6), 1409-1419. DOI: 10.1053/jhep.2002.33327
- ¹²⁵. Müller, M., 1997. Chirurgie pro studium a praxi. Praha: Goldstein&Goldstein, Transl. Zámečník, J. K. s. 441, ISBN 80-860-94-10-3.
- ¹²⁶. Murray, R. K., Bender D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell V. W., Weil, P. A., 1998. *Harper's biochemistry*. 24th edition. Singapore: Prentice Hall International. ISBN: 9780838536117.
- ¹²⁷. Mutoh, H., Fung, B. P., Naya, F. J., Tsai, M. J., Nishitani, J., & Leiter, A. B., 1997. *The basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/NeuroD is expressed in mammalian*

- enteroendocrine cells and activates secretin gene expression.* Proc Natl Acad Sci USA, **94**(8), 3560-3564.
- ^{128.} Nadanaciva, S., Dykens, J. A., Bernal, A., Capaldi, R. A., Will, Y., 2007. *Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration.* Toxicol Appl Pharmacol **223**, 277–87. DOI: 10.1016/j.taap.2007.06.003.
- ^{129.} Nakao, A., Taki, S., Yasui, M., Kimura, Y., Nonami, T., Harada, A., & Takagi, H., 1994. *The fate of intravenously injected endotoxin in normal rats and in rats with liver failure.* Hepatology, **19**(5), 1251-1256.
- ^{130.} Nieminen, A. L., Byrne, A. M., Herman, B., & Lemasters, J. J., 1997. *Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species.* Am J Physiol, **272**(4 Pt 1), C1286-1294.
- ^{131.} Ogawa, K., Suzuki, H., Hirohashi, T., Ishikawa, T., Meier, P. J., Hirose, K., Akizawa, T., Yoshioka, M., Sugiyama, Y., 2000. *Characterization of inducible nature of MRP3 in rat liver.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. **278**:G438–G446.
- ^{132.} Okazaki, I., Ninomiya, Y., Kyuichi, T., Friedman, S., I., 2003. *Extracellular Matrix and the Liver: Approach to Gene Therapy.* Academic Press, s. 512, ISBN: 978 0080531502.
- ^{133.} Osawa, Y., Hoshi, M., Yasuda, I., Saibara, T., Moriwaki, H., Kozawa, O., 2013. *Tumor Necrosis Factor- α Promotes Cholestasis-Induced Liver Fibrosis in the Mouse through Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Production in Hepatic Stellate Cells.* PLoS ONE **8**(6): e65251. DOI:10.1371/journal.pone.0065251.
- ^{134.} Oswald, M., Kullak-Ublick, G. A., Paumgartner, G., & Beuers, U., 2001. *Expression of hepatic transporters OATP-C and MRP2 in primary sclerosing cholangitis.* Liver, **21**(4), 247-253.
- ^{135.} Oya, S., Yokoyama, Y., Kokuryo, T., Uno, M., Yamauchi, K., & Nagino, M., 2014. *Inhibition of Toll-like receptor 4 suppresses liver injury induced by biliary obstruction and subsequent intraportal lipopolysaccharide injection.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, **306**(3), G244-252. DOI: 10.1152/ajpgi.00366.2013.
- ^{136.} Pande, C., Kumar, A., & Sarin, S. K., 2009. *Small-intestinal bacterial overgrowth in cirrhosis is related to the severity of liver disease.* Aliment Pharmacol Ther, **29**(12), 1273-1281. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2009.03994.x.

- ¹³⁷. Parks, D. J., Blanchard, S. G., Bledsoe, R. K., Chandra, G., Consler, T. G., Kliewer, S. A., ... Lehmann, J. M., 1999. *Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor*. Science, **284**(5418), 1365-1368.
- ¹³⁸. Parks, R. W., Clements, W. D., Smye, M. G., Pope, C., Rowlands, B. J., & Diamond, T., 1996. *Intestinal barrier dysfunction in clinical and experimental obstructive jaundice and its reversal by internal biliary drainage*. Br J Surg, **83**(10), 1345-1349.
- ¹³⁹. Parks, R. W., Halliday, M. I., McCrory, D. C., Erwin, P., Smye, M., Diamond, T., & Rowlands, B. J., 2003. *Host immune responses and intestinal permeability in patients with jaundice*. Br J Surg, **90**(2), 239-245. DOI: 10.1002/bjs.4029.
- ¹⁴⁰. Paumgartner, G., 2006. *Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets*. World J Gastroenterol **12**(28): 4445-4451.
- ¹⁴¹. Plebani, M., Panozzo, M. P., Basso, D., De Paoli, M., Biasin, R., Infantolino, D., 1999. *Cytokines and the progression of liver damage in experimental bile duct ligation*. Clin Exp Pharmacol Physiol. **26**(4):358-63. DOI: 10.1046/j.1440-1681.1999.03042.x.
- ¹⁴². Polak, J. M., Coulling, I., Bloom, S., & Pearse, A. G., 1971. *Immunofluorescent localization of secretin and enteroglucagon in human intestinal mucosa*. Scand J Gastroenterol, **6**(8), 739-744.
- ¹⁴³. Purucker, E., Winograd, R., Roeb, E., Matern, S., 1998. *Glutathione status in liver and plasma during development of biliary cirrhosis after bile duct ligation*. Res Exp Med (Berl). **198**(4):167-74.
- ¹⁴⁴. Rahner, C., Stieger, B., & Landmann, L., 1996. *Structure-function correlation of tight junctional impairment after intrahepatic and extrahepatic cholestasis in rat liver*. Gastroenterology, **110**(5), 1564-1578.
- ¹⁴⁵. Reshetnyak, V. I., 2013. *Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation*. World J Gastroenterol, **19**(42), 7341-7360. DOI: 10.3748/wjg.v19.i42.7341.
- ¹⁴⁶. Rolo, A. P., Oliveira, P. J., Moreno, A. J., & Palmeira, C. M., 2001. *Chenodeoxycholate is a potent inducer of the permeability transition pore in rat liver mitochondria*. Biosci Rep, **21**(1), 73-80.
- ¹⁴⁷. Rolo, A. P., Palmeira, C. M., & Wallace, K. B., 2002. *Interactions of combined bile acids on hepatocyte viability: cytoprotection or synergism*. Toxicol Lett, **126**(3), 197-203.
- ¹⁴⁸. Rolo, A. P., Palmeira, C. M., & Wallace, K. B., 2003. *Mitochondrially mediated synergistic cell killing by bile acids*. Biochim Biophys Acta, **1637**(1), 127-132.

- ¹⁴⁹. Roma, M. G., Crocenzi, F. A., & Mottino, A. D., 2008. *Dynamic localization of hepatocellular transporters in health and disease*. World J Gastroenterol, **14**(44), 6786-6801.
- ¹⁵⁰. Roma, M. G., Crocenzi, F. A., & Sanchez Pozzi, E. A., 2008. *Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects*. Clin Sci (Lond), **114**(9), 567-588. DOI: 10.1042/cs20070227.
- ¹⁵¹. Ros, J. E., Libbrecht, L., Geuken, M., Jansen, P. L., & Roskams, T. A., 2003. *High expression of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease*. J Pathol, **200**(5), 553-560. DOI: 10.1002/path.1379.
- ¹⁵². Saeki, J., Sekine, S., & Horie, T., 2011. *LPS-induced dissociation of multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) and radixin is associated with Mrp2 selective internalization in rats*. Biochem Pharmacol, **81**(1), 178-184. DOI: 10.1016/j.bcp.2010.09.016.
- ¹⁵³. Saito, J. M., & Maher, J. J., 2000. *Bile duct ligation in rats induces biliary expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant*. Gastroenterology, **118**(6), 1157-1168.
- ¹⁵⁴. Samson, W. K., Lumpkin, M. D., & McCann, S. M., 1984. *Presence and possible site of action of secretin in the rat pituitary and hypothalamus*. Life Sci, **34**(2), 155-163.
- ¹⁵⁵. Sauer, P., Stiehl, A., Fitscher, B. A., Riedel, H. D., Benz, C., Kloters-Plachky, P., ... Kramer, W., 2000. *Downregulation of ileal bile acid absorption in bile-duct-ligated rats*. J Hepatol, **33**(1), 2-8.
- ¹⁵⁶. Shneider, B. L., Fox, V. L., Schwarz, K. B., Watson, C. L., Ananthanarayanan, M., Thevananther, S., ... Mowat, A. P., 1997. *Hepatic basolateral sodium-dependent-bile acid transporter expression in two unusual cases of hypercholanemia and in extrahepatic biliary atresia*. Hepatology, **25**(5), 1176-1183. DOI: 10.1002/hep.510250521.
- ¹⁵⁷. Shoda, J., Kano, M., Oda, K., Kamiya, J., Nimura, Y., Suzuki, H., ... Tanaka, N., 2001. *The expression levels of plasma membrane transporters in the cholestatic liver of patients undergoing biliary drainage and their association with the impairment of biliary secretory function*. Am J Gastroenterol, **96**(12), 3368-3378. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2001.05339.x.
- ¹⁵⁸. Scheffer, G. L., Kool, M., de Haas, M., de Vree, J. M., Pijnenborg, A. C., Bosman, D. K., ... Scheper, R. J., 2002. *Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3*. Lab Invest, **82**(2), 193-201.

- ¹⁵⁹. Schirris, T. J., Renkema, G. H., Ritschel, T., Voermans, N. C., Bilos, A., van Engelen, B. G., Brandt, U., Koopman, W., J., Beyrath, J. D., Rodenburg, R. J., Willems, P. H., Smeitink, J., A., Russel F., G., 2015. *Statin-Induced Myopathy Is Associated with Mitochondrial Complex III Inhibition*. Cell Metab. 1;22(3):399-407. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.08.002.
- ¹⁶⁰. Simon, F. R., Fortune, J., Iwahashi, M., Gartung, C., Wolkoff, A., & Sutherland, E., 1996. *Ethinyl estradiol cholestasis involves alterations in expression of liver sinusoidal transporters*. Am J Physiol, **271**(6 Pt 1), G1043-1052.
- ¹⁶¹. Simonson, S. G., Martin, P. D., Mitchell, P., Schneck, D. W., Lasseter, K. C., Warwick, M. J., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rosuvastatin in subjects with hepatic impairment*. Eur J Clin Pharmacol. 58(10):669-75. DOI: 10.1007/s00228-002-0541-7.
- ¹⁶². Slitt, A. L., Allen, K., Morrone, J., Aleksunes, L. M., Chen, C., Maher, J. M., ... Klaassen, C. D., 2007. *Regulation of transporter expression in mouse liver, kidney, and intestine during extrahepatic cholestasis*. Biochim Biophys Acta, **1768**(3), 637-647. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.10.008.
- ¹⁶³. Song, K., Li, T., Owsley, E., Strom, S., Chiang, J. Y. L., 2009. *Bile acid activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene expresion*. Hepatology Jan; 49(1): 297-305. DOI: 10.1002/hep.22627.
- ¹⁶⁴. Soylu, A. R., Aydogdu, N., Basaran, U. N., et al., 2006. *Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats*. World Journal of Gastroenterology: WJG. 12(42):6835-6841. DOI:10.3748/wjg.v12.i42.6835.
- ¹⁶⁵. Stieger, B., Fattinger, K., Madon, J., Kullak-Ublick, G. A., & Meier, P. J., 2000. *Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver*. Gastroenterology, **118**(2), 422-430.
- ¹⁶⁶. Su, G. L., 2002. *Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, **283**(2), G256-265. DOI: 10.1152/ajpgi.00550.2001.
- ¹⁶⁷. Su, G. L., Goyert, S. M., Fan, M. H., Aminlari, A., Gong, K. Q., Klein, R. D., ... Wang, S. C., 2002. *Activation of human and mouse Kupffer cells by lipopolysaccharide is mediated by CD14*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, **283**(3), G640-645. DOI: 10.1152/ajpgi.00253.2001.

- ¹⁶⁸. Sukhai, M., Yong, A., Pak, A., Piquette-Miller, M., *Decreased expression of P-glycoprotein in interleukin-1beta and interleukin-6 treated rat hepatocytes*. *Inflamm Res.*, 2001. 50(7):362-70. DOI: 10.1007/PL00000257.
- ¹⁶⁹. Tahan, G., Tarcin, O., Tahan, V., Eren, F., Gedik, N., Sahan, E., Biberoglu, N., Guzel, S., Bozbas, A., et. al., 2007. *The Effects of N-Acetylcysteine on Bile Duct Ligation-Induced Liver Fibrosis in Rats*. *Digestive Diseases and Science*. 52(12), pp 3348-3354. DOI: 10.1007/s10620-006-9717-9.
- ¹⁷⁰. Takikawa, H., Takamori, Y., Sano, N., Kuyama, Y., & Yamanaka, M., 1998. *Changes in biliary excretory mechanisms in rats with ethinyloestradiol-induced cholestasis*. *J Gastroenterol Hepatol*, **13**(2), 186-191.
- ¹⁷¹. Tarrats, N., Moles, A., Morales, A., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J. C., & Mari, M., 2011. *Critical role of tumor necrosis factor receptor 1, but not 2, in hepatic stellate cell proliferation, extracellular matrix remodeling, and liver fibrogenesis*. *Hepatology*, **54**(1), 319-327. DOI: 10.1002/hep.24388.
- ¹⁷². Trauner, M., Arrese, M., Lee, H., Boyer, J. L., & Karpen, S. J., 1998. *Endotoxin downregulates rat hepatic ntcp gene expression via decreased activity of critical transcription factors*. *J Clin Invest*, **101**(10), 2092-2100. DOI: 10.1172/jci1680.
- ¹⁷³. Trauner, M., Baghdasaryan, A., Claudel, T., Fickert, P., Halilbasic, E., Moustafa, T., & Zollner, G., 2011. *Targeting nuclear bile acid receptors for liver disease*. *Dig Dis*, **29**(1), 98-102. DOI: 10.1159/000324141.
- ¹⁷⁴. Trauner, M., Meier, P. J., & Boyer, J. L., 1998. *Molecular pathogenesis of cholestasis*. *N Engl J Med*, **339**(17), 1217-1227. DOI: 10.1056/nejm199810223391707.
- ¹⁷⁵. Utanohara, S., Tsuji, M., Momma, S., Morio, Y., & Oguchi, K., 2005. *The effect of ursodeoxycholic acid on glycochenodeoxycholic acid-induced apoptosis in rat hepatocytes*. *Toxicology*, **214**(1-2), 77-86. DOI: 10.1016/j.tox.2005.05.025.
- ¹⁷⁶. Van der Gaag N. A., de Castro S. M. M., Rauws E. A. J., Bruno M. J., Van Eijck C. H. J. et al., 2007. *Preoperative biliary drainage for periampullary tumors causing obstructive jaundice; DRainage vs. (direct) OPeration (DROP-trial)*. *BMC Surg*;**7**: 3. DOI: 10.1186/1471-2482-7-3.
- ¹⁷⁷. Van der Gaag, N. A., Kloek, J. J., De Castro, S. M. M, Busch, O. R. C., Van Gulik, T. M., Gouma, D. J., 2009. *Preoperative Biliary Drainage in Patients with Obstructive Jaundice: History and Current Status*. *J Gastrointest Surg*. Apr;**13**(4):814-20. DOI: 10.1007/s11605-008-0618-4. Epub 2008 Aug 23.

- ^{178.} Van der Gaag, N. A., Rauws, E. A. J., Van Eijck, C. H. J., Bruno, M. J., Van der Harst, E. et al., 2010. *Preoperative Biliary Drainage for Cancer of the Head of the Pancreas*. *N Eng J Med*, Jan 14;362(2):129-37. DOI: 10.1056/NEJMoa0903230.
- ^{179.} Van Eijck, F. C., Van Veen, R. N., Kleinrensink, G. J., Lange, J. F., 2007. *Hartmann's gallbladder pouch revisited 60 years later*. *Surg Endosc*, Jul;21(7):1122-5.
- ^{180.} Van Hooft, J., 2011. *Pre-operative biliary drainage is always indicated in malignant CBD strictures (CON)*. [Online] 2011 [cit. 2015-05-26]. Dostupné z: http://www.quality-in-endoscopy.org/assets/download/pdf/reports/qine10/19_session_5_van_hooft.pdf.
- ^{181.} Velho, J. A., Okanobo, H., Degaspero, G. R., Matsumoto, M. Y., Alberici, L. C., Cosso, R. G., et al., 2006. *Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition*. *Toxicology* 219, 124–132 DOI:10.1016/j.tox.2005.11.007.
- ^{182.} Vendemiale, G., Grattagliano, I., Caraceni, G. C., Domenicali, M., Agata, M. D., Trevisani, F., Guerrieri, F., Bernardi, M., Al Tomare, E., 2001. *Mitochondrial Oxidative Injury and Energy Metabolism Alteration in Rat Fatty Liver: Effect of the Nutritional Status*. *Hepatology*. 33(4), 808-15. DOI: 10.1053/jhep.2001.23060.
- ^{183.} Wagner, M., Fickert, P., Zollner, G., Fuchsichler, A., Silbert, D., Tsybrovskyy, O., ... Trauner, M., 2003. *Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice*. *Gastroenterology*, **125**(3), 825-838.
- ^{184.} Wagner, M., Halilbasic, E., Marschall, H. U., Zollner, G., Fickert, P., Langner, C., Zatloukal, K., Denk, H., Trauner, M., 2005. *CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice*. *Hepatology* 42:420–430.
- ^{185.} Wang, G., Shen, H., Rajaraman, G., Roberts, M. S., Gong, Y., Jiang, P., & Burczynski, F., 2007. *Expression and antioxidant function of liver fatty acid binding protein in normal and bile-duct ligated rats*. *Eur J Pharmacol*, **560**(1), 61-68. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.01.015.
- ^{186.} Whipple A. O., Parsons B. W., Mullins C. R., 1935. *Treatment of carcinoma of the ampulla of Vater*. *Ann Surg*. 1935 Oct; 102(4): 763–779. PMID: PMC1391173.
- ^{187.} Woolbright, B. L., Antoine, D. J., Jenkins, R. E., Bajt, M. L., Park, B. K., & Jaeschke, H., 2013. *Plasma biomarkers of liver injury and inflammation demonstrate a lack of apoptosis during obstructive cholestasis in mice*. *Toxicol Appl Pharmacol*, **273**(3), 524-531. DOI: 10.1016/j.taap.2013.09.023.

- ^{188.} Yang, H., Ramani, K., Xia, M., Ko, K. S., Li, T. W. H., Oh, P., Li, J. and Lu, S. C., 2009. *Dysregulation of glutathione synthesis during cholestasis in mice: Molecular mechanisms and therapeutic implications*. *Hepatology*. 49: 1982–1991. DOI:10.1002/hep.22908.
- ^{189.} Yerushalmi, B., Sokol, R. J., Narkewicz, M. R., Smith D., Karrer, F. M., 1999. *Use of rifampin for severe pruritus in children with chronic cholestasis*. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 29:442–447.
- ^{190.} Younes, R. N., Poggetti, R. S., Fontes, B., Itinoshe, M. M., Yoshida, V. M., Carvalho, M. E., & Birolini, D., 2007. *Obstructive jaundice induces early depression of mitochondrial respiration in rat hepatocytes*. *Acta Cir Bras*, **22**(4), 251-254.
- ^{191.} Yu, C., Wang, F., Jin, C., Huang, X., McKeehan, W. L., 2005. Independent repression of bile acid synthesis and activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by activated hepatocyte fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) and bile acids. *J Biol Chem.* 6;280(18):17707-14.
- ^{192.} Zhang, Y., Hong, J. Y., Rockwell, C. E., Coppole, B. L., Jaeschke, H., & Klaassen, C. D., 2012. *Effect of bile duct ligation on bile acid composition in mouse serum and liver*. *Liver Int*, **32**(1), 58-69. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02662.x.
- ^{193.} Zollner, G., Fickert, P., Silbert, D., Fuchsbichler, A., Marschall, H. U., Zatloukal, K., ... Trauner, M., 2003. *Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis*. *J Hepatol*, 38(6), 717-727.
- ^{194.} Zollner, G., Fickert, P., Zenz, R., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Kenner, L., ... Trauner, M., 2001. *Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases*. *Hepatology*, **33**(3), 633-646. DOI: 10.1053/jhep.2001.22646.
- ^{195.} Zollner, G., & Trauner, M., 2008. *Mechanisms of cholestasis*. *Clin Liver Dis*, **12**(1), 1-26, vii. DOI: 10.1016/j.cld.2007.11.010.
- ^{196.} Zollner, G., Wagner, M., Fickert, P., Geier, A., Fuchsbichler, A., Silbert, D., ... Trauner, M., 2005. *Role of nuclear receptors and hepatocyte-enriched transcription factors for Ntcp repression in biliary obstruction in mouse liver*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **289**(5), G798-805. DOI: 10.1152/ajpgi.00319.2004.