

**UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Dispozice železa reguluje jaterní homeostázu cholesterolu a žlučových
kyselin**

Alena Prašnická

**Autoreferát dizertační práce
Doktorský studijní program: Lékařská farmakologie**

**Hradec Králové
2019**

Dizertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Lékařská farmakologie na Ústavu Farmakologie, Lékařské fakulty UK, v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Alena Prašnická,
Ústav Farmakologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové
Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitel: prof. MUDr. Stanislav Mičuda Ph.D.
Ústav Farmakologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové
Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Oponenti: prof. MUDr. Rostislav Večeřa, Ph.D.
Ústav farmakologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

pplk. doc. MUDr. Jaroslav Pejchal, Ph.D. a Ph.D.
Katedra toxikologie a vojenské farmacie, Fakulta vojenského zdravotnictví,
Univerzita obrany v Brně,
Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR dne
..... v od hod.

(bude doplněno po vyhlášení termínu, místa a času)

Tato práce vznikla za podpory grantu: Progres Q40/05, SVV 260397/2017 a 260 4141, GAČR (17-068415), RVO-VFN64165/2016, GAUK 5562/18, ERDF-Project „PERSONMED“ No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_048/0007441.

S dizertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. MUDr. Stanislav Mičuda Ph.D.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská farmakologie
Garant studijního program

Obsah

Seznam použitých zkratk	3
1. Souhrn	4
2. Summary	4
3. Úvod	5
3.1. Žluč a její význam	5
3.2. Transport žlučových kyselin	6
3.3 Regulace syntézy a transportu ŽK	7
3.4 Železo (Fe)	8
3.5. Hepcidin (HAMP)	8
3.6 Regulace koncentrace železa v buňce	8
3.7 Železo a homeostáza žlučových kyselin	8
4. Cíl práce	9
5. Metody	9
5.1 Pokusná zvířata	9
5.2 <i>In vivo</i> studie	9
5.3 <i>In vivo</i> studie s aplikací ³ H-taurocholové kyseliny	10
5.4 Biochemické analýzy	10
5.5 LC-MS analýza	10
5.6 RT-PCR a Western blot analýza	11
5.7 Reportérový test - buněčné kultury a konstrukty DNA	11
5.8 Statistické vyhodnocení	11
6. Výsledky část 1. Homeostáza ŽK během deplece železa (ID)	11
6.1 ID dieta vedla k změnám hematologických a biochemických parametrů	11
6.2 Tok žluče, žlučových kyselin a glutathionu	12
6.3 Biliární sekrece fosfolipidů, cholesterolu	13
6.4 Obsah glutathionu v játrech	13
6.5 ID nepodmínilo vzestup biliární sekrece ³ H-taurocholové kyseliny	13
6.6 ID indukuje enzymy a transportéry zodpovědné za metabolismus ŽK v játrech	14
6.7 ID Změny genové exprese relevantních molekul v ileu	15
6.8 LC-MS detekce ŽK v plazmě a ve žluči	15
6.9 ID indukuje mRNA CYP7A1 v lidských HepaRG i HepG2 buňkách	16
6. Výsledky část 2. - Homeostáza ŽK během nadbytku železa (IO)	17
6.10 Jaterní homeostáza železa během IO	17
6.11 Biochemické vyšetření plazmy	18
6.12 Oxidační stres v játrech	18
6.13 Zvýšená exprese zánětlivých indikátorů	18
6.14 Tok žluče a koncentrace ŽK ve žluči u IO potkanů	19
6.15 Biliární sekrece hlavních složek žluče	19
6.16 Působení IO na jaterní expresi molekul odpovědných za obrat ŽK a cholesterolu	20
6.17 Western blot a PCR analýza Mrp2 a Bsep	20
6.18 IO mění střevní obrat ŽK	21
7. Diskuse	22
8. Závěr	26
9. Použitá literatura	27
10. Přehled publikační činnosti	30

Seznam použitých zkratek

Bsep	Bile Salt Export Pump
CDCA	Kys. chenodeoxycholová
CYP27A1/Cyp27a1	Sterol 27-hydroxylasa
CYP7A1/Cyp7a1	Cholesterol 7 α -hydroxylasa
CYP8B1/Cyp8b1	Sterol 12 α -hydroxylasa
DMT1	Divalent metal transporter 1
Fe	Železo
FPN	Ferroportin
Ftl	Ferritin
FXR	Farnesoid X receptor
GSH	Redukovaný glutathion
GSSH	Oxidovaný glutathion
HDCA	Kys. hyodeoxycholová
Hmg-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA
Hmox1/Ho1	Hem oxygenasa 1
ID	Deficit železa
IO	Kumulace železa
IRP1/2	Iron-regulatory proteins 1/2
Ldlr	Low density lipoprotein receptor
LXR α	Liver X receptor α
Mdr1/2	Multidrug resistance protein 1/2
Mrp2/3/4	Multidrug resistance-associated protein 2/3/4
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
Ntcp	Sodium-taurocholate cotransporting polypeptide
Oatp	Organic anion transporting polypeptides
Osta α/β	Organic solute transporter alpha a beta
PXR	Pregnane X receptor
Sr-b1	Scavenger receptor class B type 1
Tf	Transferrin
Trf 1/2	Transferrin receptor 1/2
ŽK	Žlučové kyseliny

1. Souhrn

Změny obsahu železa patří mezi nejčastější metabolická onemocnění s řadou možných patofyziologických důsledků na různé funkce organismu. Průvodním jevem těchto situací jsou změny v homeostáze cholesterolu s možným přesahem na žlučové kyseliny (ŽK), tj zásadních exekutivních a regulačních molekul v metabolismu endobiotik, což může sehrát důležitou roli v přidružených orgánových dysfunkcích. Jelikož existovalo pouze minimum informací o podstatě těchto jevů, cílem této práce se stalo zhodnocení vlivu nadbytku a nedostatku železa na procesy zahrnuté v obratu žlučových kyselin s identifikací zapojených molekulárních mechanismů.

První posuzovanou oblastí bylo hodnocení vlivu nedostatku železa (ID) za použití vhodného potkaního modelu, kdy byl ID navozen specifickou dietou. Prokázán byl výrazný indukční vliv deplece železa jak na klasickou, tak i v alternativní cestu syntézy žlučových kyselin z cholesterolu. Společně s indukcí biliární sekrece cholesterolu proto u ID skupiny docházelo k statisticky významnému poklesu plasmatických koncentrací cholesterolu. Následný choleretický efekt v důsledku zvýšené biliární sekrece žlučových kyselin byl zprostředkován jejich zvýšenou jaterní dispozicí, bez ovlivnění exprese odpovídajících transportérů, což bylo ověřeno kinetickou studií s ³H-taurocholátem. Klinická relevance tohoto zjištění byla poté potvrzena za použití HepaRG lidských jaterních buněk, kde byla detekována upregulace CYP7A1 za podmínek ID.

Druhou posuzovanou oblastí bylo hodnocení homeostázy žlučových kyselin a cholesterolu při přetížení železem. Opakovanou intraperitoneální aplikací železa se podařilo obejít absorpční bariéru GITu pro železo. Tím se dosáhla kumulace železa (IO) v játrech. IO významně snížil tok žluči v důsledku snížení biliární sekrece žlučových kyselin. Tento pokles byl spojen se sníženou expresí Cyp7a1 a sníženou expresí Bsep transportéru zodpovědného za sekreci žlučových kyselin do žluči. Navzdory významně snížené biliární sekreci však u IO zvířat nedošlo ke změně celkového obsahu žlučových kyselin ve stolici v důsledku jejich zvýšené střevní přeměny na špatně absorbovatelnou kyselinu hyodeoxycholovou. Navíc IO zvyšoval koncentrace cholesterolu v plazmě, což odpovídá snížené expresi Cyp7a1 a zvýšené expresi Hmgcr, enzymu určujícímu rychlost syntézy cholesterolu *de novo*.

Z výsledků této dizertační práce vyplývá, že snížený i zvýšený obsah železa v játrech má komplexní účinek na tvorbu žluče a homeostázu žlučových kyselin a cholesterolu. Klíčovou roli v těchto účincích hraje modulace Cyp7a1, hlavního enzymu v procesu syntézy žlučových kyselin. Důležité jsou však i paralelní změny v jaterním vychytávání, syntéze a biliární sekreci cholesterolu. Tato zjištění přispívají k poznání patofyziologie klinicky často se vyskytujících situací se změněným obsahem železa v organismu, jakými jsou např. nedostatek železa vznikající zejména během jeho zvýšených ztrát nebo nadměrné potřeby během těhotenství a nadměrná jaterní kumulace provázející ztukovatění jater během obezity.

2. Summary

Changes in the iron content are among the most common metabolic diseases with a number of possible pathophysiological consequences for various body functions. The phenomenon accompanying these situations is the change in cholesterol homeostasis with possible extension to bile acids (BA), ie major executive and regulatory molecules in the metabolism of endobiotics, what can play an important role in associated organ dysfunctions. Since there was only a minimal amount of information in this area, the aim of this work was to evaluate the effect of iron overload and deficiency on the processes involved in BA turnover with the identification of involved molecular mechanisms.

The first assessed field was the evaluation of iron deficiency (ID) using a suitable rat model, where ID was induced by a specific diet. This has demonstrated a significant inducing

effect on both classical and alternative pathways for BA synthesis from cholesterol. Together with the induction of cholesterol biliary secretion in ID group it led to statistically significant decrease of plasma cholesterol concentrations. The subsequent BA-dependent choleric effect was induced by their increased liver disposition, without affecting the expression of corresponding transporters, as verified by the kinetic study with ^3H -taurocholate. The clinical relevance of this finding was then confirmed using human hepatic HepaRG cells, which showed the upregulation of CYP7A1 in the ID conditions.

The second assessed area was the evaluation of BA and cholesterol homeostasis during iron overload. Repeated intraperitoneal administration of iron successfully evaded absorption barrier for iron in GIT. This led to the accumulation of iron (IO) in the liver. IO significantly decreased bile flow as a consequence of decreased biliary BA secretion. This decrease was associated with reduced expression of Cyp7a1 and decreased expression of Bsep transporter responsible for BA efflux into bile. However, IO did not change net BA content in faeces in response to increased conversion of BA into poorly absorbable hyodeoxycholic acid. In addition, IO increased plasma cholesterol concentrations, which corresponded with reduced Cyp7a1 expression and increased expression of Hmgcr, the rate limiting enzyme for cholesterol *de novo* synthesis.

The results of this dissertation suggest that reduced or increased iron content in the liver has a complex effect on bile formation and bile acid and cholesterol homeostasis. A key role in these effects plays the modulation of Cyp7a1, a major enzyme in the bile acid synthesis process. However, parallel changes in hepatic uptake, synthesis and biliary cholesterol secretion are also important. These findings contribute to the understanding of the pathophysiology of clinically frequently occurring iron-altered situations, such as iron deficiency, especially during its increased loss or excessive need during pregnancy, and excessive liver accumulation associated with fatty liver during obesity.

3. Úvod

3.1 Žluč a její význam

Játra jsou jedním z nejdůležitějších orgánů, který je odpovědný za látkovou výměnu, endokrinní funkce a exkreci endogenních i exogenních látek z organismu. Základní a životně důležitou funkcí jater je i tvorba a sekrece žluče. Denně je do střeva dodáno asi 0,75 litru žluče. Sekrece žluče z hepatocytů do žlučových kanálků má dvě složky: a) na žlučových kyselinách závislý tok žluče (BADF - bile acids dependent flow), kde hlavní osmoticky aktivní složkou jsou žlučové kyseliny a jejich konjugáty a b) na žlučových kyselinách nezávislý tok žluče (BAIF – bile acids independent flow), kde hlavní sekretovanou složkou je glutathion, bikarbonát a konjugovaný bilirubin (Esteller, 2008; Kuntz and Kuntz, 2008). Kromě těchto komponent se do žluči dostává řada dalších látek, jakými jsou např. cholesterol, fosfolipidy (především fosfatidylcholin), aminokyseliny, steroidní látky, vitamíny aj. (Kuntz and Kuntz, 2008).

Základní složkou žluče určující většinu jejích funkcí jsou ŽK. Tyto látky jsou přítomny v organismu v celkovém množství (bile acid pool) asi 3g s distribucí převážně v enterohepatální cirkulaci. Z množství vyloučeného do žluče a následně dopraveného do tenkého střeva se v terminálním ileu reabsorbuje asi 90-95 % ŽK, které jsou z portální krve vychytávány do hepatocytů s podobnou účinností a opětovně použity pro sekreci do žluče. Asi 0,2-0,6 g žlučových kyselin je vyloučených stolicí a přibližně 0,5 mg močí. Pro zachování celkového obsahu žlučových kyselin je tato ztráta doplněna *de novo* syntézou z cholesterolu v hepatocytech (Chiang, 2013).

Žlučové kyseliny se skládají z pevné steroidní struktury s jednou až třemi hydroxylovými skupinami a z krátkých alkylových vedlejších řetězců, které se konjugují s aminokyselinami (taurin a glycin). Jedná se tedy o amfifilní látky, což je důležité při tvorbě

žluče. Po sekreci do žlučového kanálku vytváří ŽK primární nebo sekundární micely. Primární micely se tvoří natočením steroidní/hydrofobní části k sobě, zatímco hydrofilní části směřují do vodní části žluče. Při zvyšující se koncentraci dochází k jejich agregaci a tvorbě sekundárních micel. Sekundární micely se spojují navzájem hydrofilními částmi řetězce primárních micel. (Matsuoka and Yamamoto, 2017).

ŽK mají na biliární epitel silné detergentní účinky. Tato vlastnost je využita pro extrakci fosfatidylcholinu ze zevní lamely kanalikulární membrány a jeho inkorporaci do micel, které jsou tím stabilizovány a následně mohou akceptovat cholesterol a další ve vodě nerozpustné látky, vznikají „smíšené micely“ (Morita and Terada, 2014). Tvorba smíšených micel je hlavní formou ŽK-zprostředkované „solubilizace“ lipidových složek ve žluči (Reshetnyak, 2013).

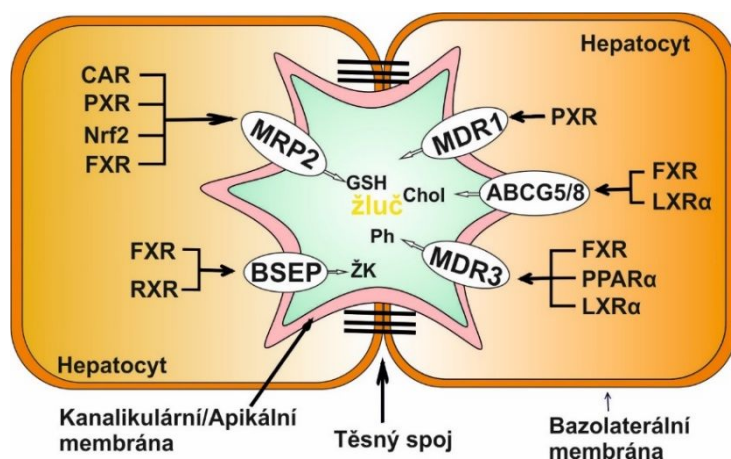
Žlučové kyseliny jsou specializované degradační produkty cholesterolu, které vznikají činností komplexu mikrozomálních, peroxyzomálních a mitochondriálních enzymů (Kuntz and Kuntz, 2008). Existují dvě hlavní cesty syntézy primárních ŽK, klasická neboli neutrální a alternativní neboli kyselá. Hlavní primární ŽK klasické cesty je kyselina cholová, u alternativní je to kyselina chenodeoxycholová (CDCA) (Chiang, 2017).

3.2 Transport žlučových kyselin

ŽK ve formě konjugátů nejsou schopny prostupovat membránami pasivní difuzí a musí být přenášeny přes tyto bariéry za účasti transportních proteinů. K zajištění přítomnosti ŽK ve žluči a jejich následnou recyklaci ze střeva proto existuje komplexní systém transportních proteinů na apikálních a basolaterálních membránách hepatocytů a enterocytů (Boyer, 2013).

Apikální transportéry hepatocytů

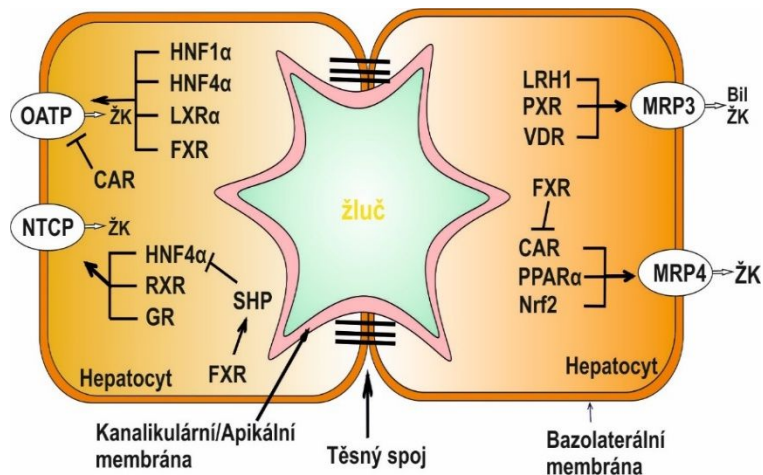
Společnou vlastností těchto transportních proteinů je schopnost přenášet jejich substráty proti významnému koncentračnímu gradientu. To je umožněno využitím energie z ATP. Tyto transportní proteiny se proto řadí do rodiny tzv. ABC (ATP-binding cassette). Pro samotnou tvorbu žluče a sekreci jejích hlavních komponent včetně eliminace xenobiotik je důležitých několik z nich. (Boyer, 2013). Obr. 1 znázorňuje umístění transportérů jejich regulaci a hlavní sekretované složky žluče.



Obr. 1: Grafické znázornění kanalikulárních/apikálních transportérů žluče a nukleárních receptorů, které ovlivňují jejich regulaci. Zkratky: MRP2, Multidrug resistance-associated protein 2; BSEP, Bile Salt Export Pump; MDR3, Multidrug resistance protein 3; MDR1 Multidrug resistance protein 1; Nrf2, Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2; CAR, Constitutive androstane receptor; PXR, Pregnane X receptor; FXR, Farnesoid X receptor; PPAR α , Peroxisome proliferator-activated receptor α ; LXR α , Liver X receptor α ; RXR, Retinoid X receptor; ŽK, žlučové kyseliny; Ph, fosfolipidy; GSH, glutathion.

Bazolaterální transportéry hepatocytů

Jsou to transportéry lokalizované na membráně komunikující s jaterními sinusoidy a mezibuněčným prostorem. Pohyb látek zde probíhá oběma směry a dle jednotlivých podmínek ho buď zprostředkovávají ABC transportéry (Mrp3 a Mrp4) nebo transportéry z SLC (soluble carrier) rodiny, které pro transport nevyužívají energii ATP, ale hnací silou je buď koncentrační gradient substrátů, nebo symport/antiport látek s významným koncentračním gradientem mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem (např. Na^+) (Boyer, 2013). Obr. 2 znázorňuje umístění transportérů, jejich regulaci a hlavní secerované složky žluče.



Obr. 2: Grafické znázornění bazolaterálních transportérů žluče a nukleárních receptorů, které ovlivňují jejich regulaci. Zkratky: MRP3/4, Multidrug resistance-associated protein 3/4; OATP, Organic anion transporting polypeptides; NTCP, Sodium-taurocholate cotransporting polypeptide; Nrf2, Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2; CAR, Constitutive androstane receptor; PXR, Pregnane X receptor; FXR, Farnesoid X receptor; PPAR α , Peroxisome proliferator-activated receptor α ; LRH1 α , Liver receptor homolog-1 α ; HNF4 α , Hepatocyte nuclear factor 4 α ; SHP, Small heterodimer partner; GR, glucocortikoid receptor; ŽK, žlučové kyseliny; Bil., bilirubin.

3.3 Regulace syntézy a transportu ŽK

Žlučové kyseliny mají v organismu řadu důležitých funkcí. Změna jejich homeostázy spojená s jejich kumulací nebo nedostatkem může mít závažné patofyziologické důsledky. Proto jsou jejich syntéza a transport složitě regulovány, aby byly schopny adekvátně reagovat na různé situace. Regulační děje probíhají zejména na úrovni transkripce prostřednictvím specifických nukleárních receptorů nebo intracelulárních signálů. Popsány byly však i důležité posttranskripční mechanismy (Boyer, 2013)

Cholesterol 7 α -hydroxylasa – CYP7A1/Cyp7a1

Enzym lokalizovaný na vnitřní straně membrány endoplazmatického retikula. CYP7A1/Cyp7a1 patří do velké rodiny cytochromů P450 (CYP) a v klasické cestě syntézy ŽK udává rychlost jejich tvorby z cholesterolu (Tempel et al., 2014)

CYP7a1/Cyp7a1 je regulován hlavně na úrovni transkripce. Transkripční faktory, které se váží na promotorovou sekvenci, navzájem interagují a synergicky ovlivňují regulaci transkripce CYP7A1 (Chiang, 2004). Přehled regulace CYP7A1 poskytuje Tabulka 1.

Tabulka 1. Přehled regulace CYP7A1

	Transkripční regulace	Posttranskripční regulace
downregulace	FXR, SHP, PXR, VDR, Nrf2, FGF19/15, ERK1/2, JNK1/2	ZFP36L1, miR-422a, miR-122a
upregulace	LXR α *, LRH1, HNF4 α	

*platí jen pro hlodavce, Zkratky: Nrf2, Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2; PXR, Pregnane X receptor; FXR, Farnesoid X receptor; LRH1, Liver receptor homolog 1; HNF4 α , Hepatocyte nuclear factor 4 α ; SHP, Small heterodimer partner; VDR, Vitamin D receptor; FGF19/15 fibroblast growth faktoru 19/15.

3.4 Železo (Fe)

Železo patří mezi tzv. živototvorné neboli biogenní prvky a sehrává důležitou roli v buněčném dýchání, v regulaci genové exprese, proliferaci buněk a v imunitě. Z potravy, která obsahuje asi 15-20 mg železa/den se v tenkém střevě denně vstřebá cca 1-2 mg, což umožňuje doplnit ztráty železa v důsledku jeho obratu (vylučování močí, potem, rozpadem červených krvinek) v organismu. U lidí a obecně u savců neexistuje mechanismus pro exkreci železa z organismu, proto je vysoce vyvinuta regulace absorpce Fe ze střeva (Munoz et al., 2009; Anderson et al., 2012). Železo má redoxní vlastnosti a tato jeho vlastnost je zodpovědná za vznik volných hydroxylových radikálů, které zprostředkují spočívá jeho toxicita (Lawen and Lane, 2013).

Cirkulace železa v krvi

Transferrin (Tf) je glykoprotein, který na sebe váže dvě molekuly Fe³⁺ (Tf-Fe). Touto vazbou se stává železo rozpustným v plazmě a také se snižuje riziko potenciálního vzniku volných radikálů (Ludwig et al., 2015). Tf-Fe je z plazmy vychytáván pomocí speciálních receptorů na membránách buněk, tzv. transferrinové receptory (Tfr) (Lawen and Lane, 2013) (Hofer et al., 2008).

3.5. Hepcidin (HAMP)

Hepcidin reguluje koncentraci železa v organismu prostřednictvím efluxu železa z buněk. Tato regulace probíhá na třech úrovních: absorpce v duodenu, recyklace z makrofágů sleziny a jater, a uvolňováním železa ze zásob v hepatocytech. Hepcidin se váže na jediný efluxní transportér pro železo FPN, a touto vazbou dochází k ubiquitinaci a mění se konformace FPN. Komplex ferroportin-hepcidin je endocytózou přenášen do lysozomů, kde je degradován a tím se zabrání exportu železa z buňky. Tímto způsobem se nekontroluje jen koncentrace železa v organismu, ale současně železo reguluje expresi hepcidinu (Arezes and Nemeth, 2015).

3.6 Regulace koncentrace železa v buňce

Regulace koncentrace Fe probíhá na transkripční i post-transkripční úrovni, a kromě hepcidinu se na ní podílí i speciální regulační proteiny tzv. iron-regulatory proteins 1 a 2 (IRP1 a IRP2, známé i jako ACO1 a IREB2) (Anderson et al., 2012).

Pokud dochází k poklesu koncentrace železa v buňce, IRP se naváže s vysokou afinitou na 5' UTR konec IREs mRNA Ftl a ferroportinu, a tím dojde k jejich degradaci a zabrání se tak translaci. Na mRNA Trf1 se váže IRP na 3' UTR konec a tím dochází k stabilizaci a zabrání se tak degradaci mRNA, která je následovaná translací. Při vysoké koncentraci železa v organismu dochází k opačnému efektu (Anderson et al., 2012).

3.7 Železo a homeostáza žlučových kyselin

Podezření, že by mohl existovat vztah mezi obsahem železa v organismu a homeostázou ŽK vyplynulo ze zjištění, že zvýšené hladiny železa v séru jsou obvykle spojeny s hypercholesterolemií (Brunet et al., 1999; Silva et al., 2015), zatímco nízké hladiny vedou

k poklesu sérových hladin cholesterolu (Kamei et al., 2010). Provedené molekulární analýzy ukázaly, že by tento efekt mohl být podmíněn změnami exprese CYP7A1, který určuje rychlost konverze cholesterolu na ŽK. Během nedostatku železa byla exprese CYP7A1 zvýšená, zatímco přetížení organismu železem expresi CYP7A1 snižovalo bez vztahu k příčině tohoto přetížení. Dopady na homeostázu ŽK, ani zapojené mechanismy však v době zahájení tohoto projektu, nebyly známy

4. Cíl práce

Cílem této dizertační práce bylo zjistit jakou roli má deplece nebo přetížení železem v regulaci mechanismů zodpovědných za syntézu, vylučování a celkový obrat žlučových kyselin a dalších komponent žluče.

Ve vztahu k měnícímu se obsahu železa v organismu, bylo proto dílčími cíli práce zhodnotit změny:

- koncentrací žlučových kyselin v systémové cirkulaci
- biliární sekrece hlavních komponent žluče, tj. individuálních žlučových kyselin, cholesterolu, glutathionu a fosfatidylcholinu
- eliminace žlučových kyselin stolicí
- exprese enzymů a transportních proteinů zodpovědných za homeostázu a reabsorpci žlučových kyselin a sekreci žluče v játrech a v ileu

Navazujícím cílem bylo identifikovat mechanismy, prostřednictvím kterých mění se obsah železa indukuje dané změny.

5. Metody

5.1 Pokusná zvířata

Ve studii byli použiti potkaní samci kmene Wistar (Velaz, Praha, Česká republika) o výchozí hmotnosti 250 ± 20 g. Zvířata byla ustájena v Centrálním viváriu Lékařské fakulty (světelný režim 12 hod tma + 12 hod světlo). Zvířata měla volný přístup k vodě a krmivu. Všechny experimenty byly schváleny etickou komisí Lékařské fakulty v Hradci Králové a provedeny v souladu s pokyny uvedenými ve vyhlášce č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

Zvířata byla rozdělena do čtyř skupin

- Chow diet - kontrolní skupina na standardní dietě (Cat. No. C1000, Altromin, Germany), n=7 zvířat
- ID - iron depletion skupina s deplecí železa, která byla 3 týdny na dietě se sníženým obsahem železa (obsahovala 5,155mg/kg Fe, Cat. No. C1038, Altromin, Germany) (Kamei et al., 2010), n=7 zvířat
- Saline - kontrolní skupina na standardní dietě, které bylo každý druhý den aplikováno intraperitoneálně 8 dávek fyziologického roztoku (1 ml/kg), n=6 zvířat
- IO - iron overload, skupina přetížená železem na standardní dietě, které bylo intraperitoneálně aplikováno 8 dávek gleptoferronu (iron-dextran heptonic acid complex, 100 mg/kg) každý druhý den, jak bylo popsáno Najafzadeh et al. (2010), n=6 zvířat

5.2 *In vivo* studie

V celkové anestezii i.p. podáním pentobarbitalu (50 mg/kg) byl potkanům zakanylován ductus choledochus pro sběr žluče, a. carotis externa pro odběr krve a v. jugularis pro aplikaci fyziologického roztoku (6 ml/kg/h, náhrada ztrát perspirací a odběry; vybrané skupiny s kontrolní dietou a dietou s deplecí železa touto cestou obdržely rovněž radioaktivně značenou ³H-taurocholovou kyselinu). Žluč byla sbírána do předvážených

mikrozkumavek ve 30 min intervalech, vzorky krve byly odebírány uprostřed těchto sběrných intervalů. *In vivo* studie byla ukončena po 120 min usmrcením zvířat exsanguinačním odběrem z břišní aorty. U zvířat ve studii s přetížením železem byl před tímto odběrem ještě proveden odběr portální krve. Okamžitě po usmrcení byla vyjmuta a zvážena játra a střeva pro následné PCR, Western blot, LC-MS, HPLC, histologické a imunohistochemické analýzy. Vzorky plazmy a žluči byly do doby analýzy uchovávány při -80°C. Zvířata s i.p. aplikací fyziologického roztoku a železa byla na 24 hod po 7. dávce umístěna do metabolických klecí pro sběr stolice. Stolica byla po dobu 72 hod sušena při pokojové teplotě a následně z ní byly izolovány a stanoveny ŽK již popsanou metodou (Yu et al., 2000)

5.3 *In vivo* studie s aplikací ³H-taurocholové kyseliny

Tato studie byla provedena v rámci hodnocení vlivu nedostatku železa. Cestou v. jugularis byla skupině s kontrolní a na železo ochuzenou dietou, podána nitrožilně nasycovací dávka 12 nmol/kg neznačené taurocholové kyseliny spolu s 1,2 µCi/kg ³H-taurocholátu, následovaná nitrožilním podáním udržovací dávky 100 nmol/l/kg neznačené taurocholové kyseliny a 10 µCi/h/kg ³H-taurocholátu. Kontinuálním podáváním roztoku se zabezpečil stabilní poměr ³H-značené a neznačené kyseliny taurocholové, a to umožnilo výpočet biliárních kinetických parametrů. Dávkovací schéma bylo převzato od Iwanaga et al. (2007).

5.4 Biochemické analýzy

Biochemické vyšetření plazmy bylo provedeno na analyzátoru Modular PP (Roche, Basel, Switzerland). Na stanovení fosfolipidů a cholesterolu byly použity komerčně dostupné kity (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Cat. No. MAK049; Cayman Chemical, Michigan, USA, Cat. No.10007640). Koncentrace redukovaného (GSH) a oxidovaného glutathionu (GSSH) v játrech byly stanoveny pomocí HPLC analýzy dříve popsanou metodou (Hirsova et al., 2013). Pro stanovení ³H-taurocholátu byl každý vzorek plazmy (25 µL) a žluče (5 µL) smíchán s 5 mL Ecolite scintilačním roztokem a inkubován 3 hod ve tmě (na potlačení luminiscenčního šumu). Poté byly vzorky analyzovány na Tri-Carb (Canberra Packard) podle návodu výrobce. Hematologické parametry byly analyzovány ve studii s nedostatkem železa bezprostředně po odběru krve na analyzátoru Sysmex XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan) podle doporučení výrobce. Jaterní koncentrace železa byla stanovena atomovou absorpční spektroskopií (Evenson, 1988).

5.5 LC-MS analýza

Pro stanovení koncentrace jednotlivých žlučových kyselin bylo použito 50 µL plazmy. Ta byla precipitována 160 ml acetonitrilu s následnou centrifugací při 15000g po dobu 10 min při pokojové teplotě. Supernatant byl odpařen při 60°C pod proudem dusíku, a exsikát pak rozpuštěn v 50 µL 40% methanolu a inkubován po dobu 1 hod při -20°C. Po 10 min centrifugaci při 15000g (10°C) se na LC-MS analýzu použilo 10 µL. Vzorky žluče byly ředěné 500x destilovanou vodou a pak se postupovalo stejně jako u plazmy. Vzorky byly separovány pomocí HPLC systému (Dionex Ultimate 3000, Dionex Softron GmbH, Germany) vybaveného Pinnacle DB C18 kolonou (100 × 2,1 mm, 3 µm, Restek, USA) a vhodnou předkolonou. Mobilní fáze byla složena z vody, methanolu, octanu amonného a kyseliny mravenčí, průtok byl 0,3 mL/min, s teplotou 55°C uvnitř kolony. Koncentrace octanu amonného a kyseliny mravenčí byla po celou dobu 0,005 M a 0,012 % (v/v). Kolona byla následně promyta 95% methanolem po dobu 9 min a stabilizovaná 40% methanolem po dobu 5 min (octan amonný a kyselina mravenčí byly přítomny v obou krocích). ŽK byly detekovány v triplikátech na quadrupolovém hmotnostním spektrometru (TSQ Quantum Access Max vybaveného H-ESI II sondou, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) pracujícím v SRM modu.

5.6 RT-PCR a Western blot analýza

Genová exprese (mRNA) byla stanovena kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí po předchozí reverzní transkripci (qRT-PCR) na 7500 HT Fast-Real-Time PCR Systému od Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA). Postup izolace, příprava vzorku stejně jako podmínky pro RT-PCR byly provedené a vypočítané dle zavedené metody (Hirsova et al., 2013).

Vzorky pro Western blot analýzu byly připravené a hodnocené dle zavedené metody (Hirsova et al., 2013).

5.7 Reportérový test - buněčné kultury a konstrukty DNA

HepaRGTM (GIBCO®) buněčná linie a medium byly získány od Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Pro indukci diferenciaci buněčné linie byla provedena inkubace ve dvou krocích dle zavedené metody (Gripon et al., 2002; Hirsova et al., 2016). HepaRG buňky byly 24 hodin kultivovány v různých koncentracích (1 a 10 μM – imitovaly nízké a normální hladiny železa) s citrátem amonno-železitým (Sigma-Aldrich) a s chelátory železa deferoxaminem a deferasiroxem (10 μM), které indukovaly depleci železa. Po inkubaci byly buňky promyty PBS a byl přidán TRI-reagent pro izolaci mRNA, která byla použita na qRT-PCR analýzu. Jako endogenní kontrola posloužil RLP0 gen. Proteiny pro Western blot analýzu byly izolované použitím RIPA pufru s inhibitory proteas a fosfatase (ROCHE) po 48 hodinové inkubaci s citrátem amonno-železitým (1 a 10 μM).

Reportérový test. Plazmidy lidských receptorů pSG5-hPXR, pSG5-FXR and pSG5-LXR α byly poskytnuty jako dar od Dr. S. Kliewer (University of Texas, Dallas, TX, USA) a Dr. Makoto Makishima (Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan). Promotor CYP7A1-luc (-1887/+24) luciferázového reportérového genu byl darován Dr. J. Chiangem (Northeastern Ohio Universities College of Medicine). HepG2 buněčná linie (buněčná linie lidského karcinomu jater) byla získána od European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). Buňky byly kultivovány dle popsané metody (Rulcova et al., 2010). Všechny testy se uskutečnily v médiu bez antibiotik.

5.8 Statistické vyhodnocení

Pro studii s deplecí železa bylo pro statistické hodnocení použito 7 zvířat na skupinu a pro studii s přetížením železa bylo použito 6 zvířat na skupinu. Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm SD (standartní odchylka). Pro zjištění statistické významnosti byl použit nepárový t-test, anebo jednofaktorová ANOVA s Newman-Keuls post-hoc testem. Časová závislost kumulativní žlučové sekrece byla hodnocena dvoufaktorovou ANOVA s Dunn post-hoc testem. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při $p < 0,05$. Analýza výsledků byla provedena GraphPad Prism 6.0 softwarem (San Diego, USA).

6. Výsledky část 1. Homeostáza ŽK během deplece železa (ID)

6.1 ID dieta vedla k změnám hematologických a biochemických parametrů

Deplece železa u zvířat byla ve studii navozena speciální dietou, jak již bylo popsáno Kamei et al. (2010). Serologické vyšetření potvrdilo pokles koncentrace železa (Tabulka 2), vyšetření hematologické redukce hematokritu a snížení koncentrace hemoglobinu. Tyto změny byly doprovázeny sníženou koncentrací cholesterolu v séru (Tabulka 2).

Tabulka 2. Vliv deplece železa na obsah železa v játrech a biochemické a hematologické vyšetření plazmy.

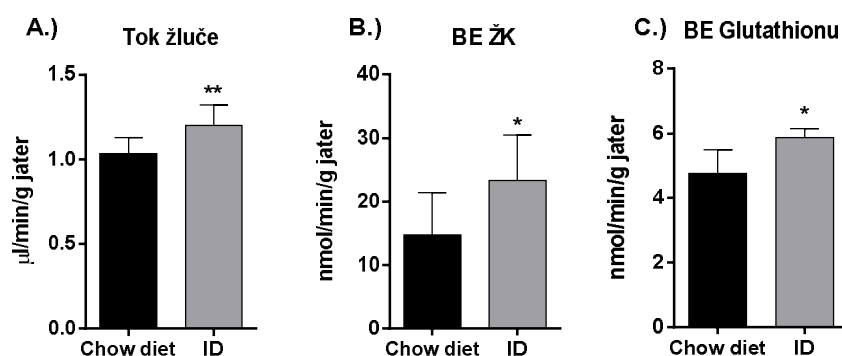
Parameter	Chow diet	ID
<i>Játra</i>		
Fe (μmol/g tkáně)	464 ± 131	227 ± 69**
<i>Plazma</i>		
Fe (μmol/L)	21 ± 1.8	15 ± 0.7**
ALT (μkat/L)	0.7 ± 0.06	1.2 ± 0.2
AST (μkat/L)	2.6 ± 0.4	3.1 ± 0.8
Cholesterol (mmol/L)	1.8 ± 0.06	1.4 ± 0.09**
TAG (mmol/L)	0.9 ± 0.76	0.15 ± 0.03
Erytrocyty (10 ¹² /L)	8.9 ± 0.15	8.8 ± 0.15
Hemoglobin (g/L)	166 ± 2.5	146 ± 3.1***
Hematokrit	0.48 ± 0.007	0.42 ± 0.008**

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, (n = 7 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

6.2 Tok žluče, žlučových kyselin a glutathionu

Tělesná hmotnost byla u ID zvířat proti kontrolní skupině snížena (0.48 ± 0.03 kg vs. 0.44 ± 0.02 kontrola a ID potkani; p < 0.01). Vzhledem k tomu, že mezi skupinami nedošlo k signifikantní změně hmotnosti jater (18.4 ± 1.1 g vs. 19.3 ± 1.9 g kontrola a ID potkani), byla biliární sekrece vztáhnuta na jejich hmotnost. Deplece železa vedla u potkanů k signifikantnímu zvýšení toku žluče (Graf 1A), který byl doprovázen zvýšenou biliární sekrecí obou hlavních osmotických složek žluče, ŽK (vypočítané jako suma všech ŽK analyzovaných LC-MS metodou) a glutathionu (Graf 1B-C).

Graf 1: Prezentuje (A) tok žluče (B) biliární sekrece ŽK (C) biliární sekreci glutathionu.

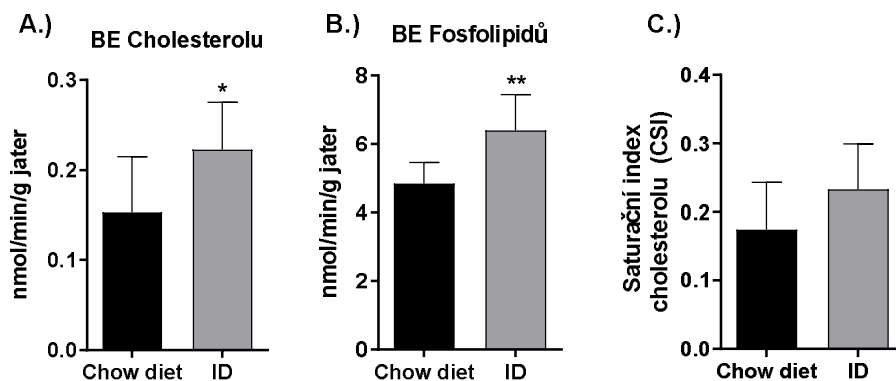


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, (n = 7 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, **p < 0.01; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa; BE, biliární sekrece; ŽK, žlučové kyseliny

6.3 Biliární sekrece fosfolipidů, cholesterolu

Analýza obou komponent žluče prokázala statisticky významné zvýšení jejich biliární sekrece (Graf 2A-B). Saturační index žluči (CSI) se však signifikantně nezměnil (Graf 2C).

Graf 2: Biliární sekrece komponentů žluče (A) cholesterolu (B) fosfolipidů a (C) saturační index.

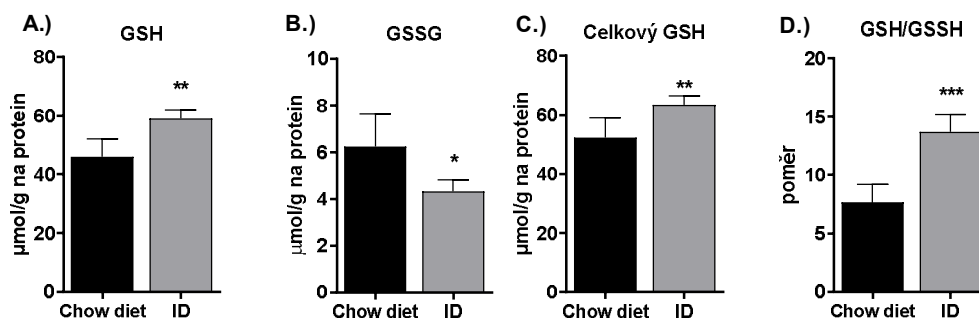


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, (n = 7 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, **p < 0.01; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa; BE, biliární sekrece

6.4 Obsah glutathionu v játrech

Deplece železa u potkanů vedla v játrech k zvýšenému obsahu redukováného glutathionu (GSH) a k poklesu jeho oxidované formy (GSSG), což bylo provázáno signifikantním nárůstem celkového obsahu glutathionu a jeho poměru mezi redukovanou/oxidovanou formou ve tkáni (Graf 3A-D).

Graf 3 Koncentrace různých forem glutathionu v játrech.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, (n = 7 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa; GSH, redukováný glutathion; GSSG, oxidovaný glutathion

6.5 ID nepodmínilo vzestup biliární sekrece ^3H -taurocholové kyseliny

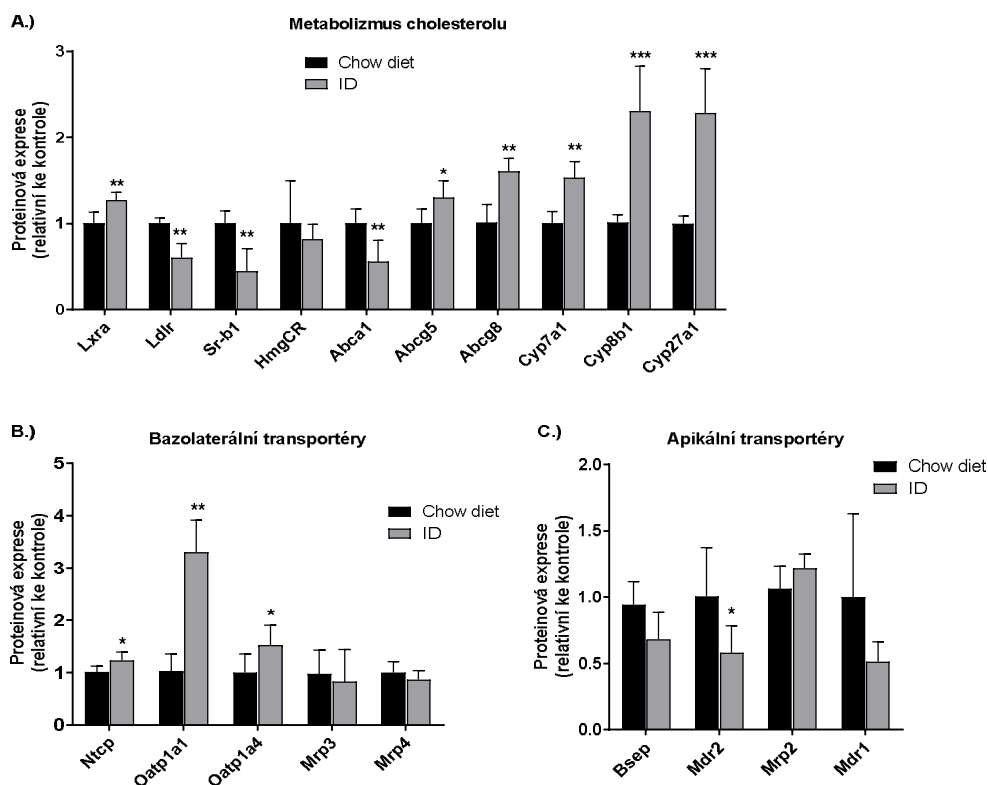
Dalším krokem bylo zjistit, jestli zvýšení biliární sekrece ŽK u ID skupiny bylo způsobeno jejich zvýšenou dispozicí v důsledku zvýšené syntézy nebo indukci transportních proteinů v játrech. Za tímto účelem byla použita další skupina kontrolních a ID potkanů. Nová ID skupina reprodukovala nárůst kumulativní produkce žluče. Po zahájení kontinuální nitrožilní infuze s nárazovou dávkou bylo ustálených plazmatických koncentrací ^3H -taurocholátu dosaženo během 45 min. Poté byla žlučová clearance stabilní během celé doby trvání experimentu. Ani jeden ze sledovaných farmakokinetických parametrů ^3H -taurocholátu

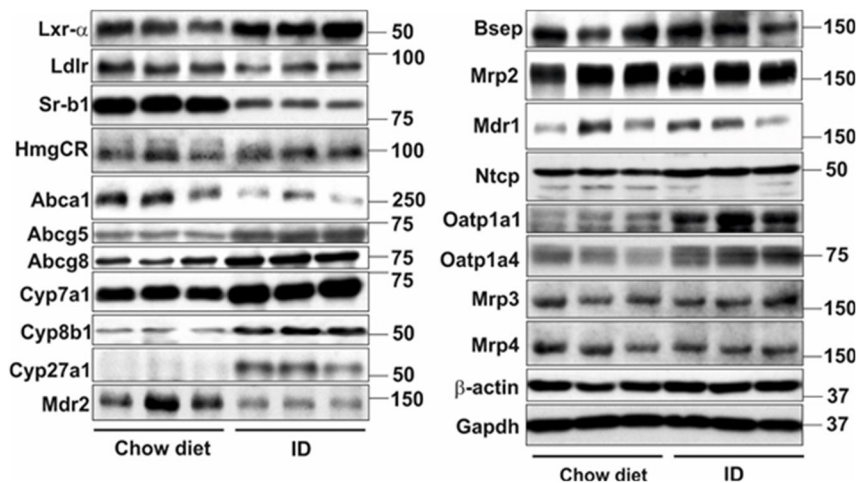
nebyl v ID skupině změněn v porovnání s kontrolní skupinou. Tyto výsledky potvrzují, že ID nestimuluje sekreci žluče prostřednictvím upregulace kanalikulárních transportérů ŽK.

6.6 ID indukuje enzymy a transportéry zodpovědné za metabolismus ŽK v játrech

Western blot analýza vybraných jaterních proteinů zodpovědných za tvorbu žluče prokázala u ID skupiny v porovnání s kontrolní skupinou upregulaci: Cyp7a1, Cyp8b1, Cyp27a1, Abcg5/8 transportéru (hlavní kanalikulární transportér cholesterolu) a LXRA (Graf 4A). Hlavní basolaterální transportéry, zodpovědné za vychytávání ŽK a léčiv z portální krve, tj. Ntcp a Oatp1a1a/Oatp1a4 byly ID rovněž upregulovány (Graf 4B). Naopak ID redukovalo proteinovou expresi basolaterálních transportérů zodpovědných za vychytávání a eflux cholesterolu do a z jater, a to Ldl-receptoru, Sr-b1 (Scavenger receptor b1) a Abca1 (Graf 4A). Rovněž exprese Mdr2, hlavního kanalikulárního efluxního transportéru pro biliární sekreci fosfadytilcholinu, byla redukována (Graf 4C). Naopak rychlost určující apikální transportér pro exkreci ŽK, Bsep, zůstal u ID skupiny beze změny, což se shoduje s nezměněnou biliární exkrecí ³H-taurocholátu. Podobný výsledek lze pozorovat i v nezměněné proteinové expresi dalšího apikálního transportéru, Mrp2, což bylo v kontrastu se zvýšenou biliární sekrecí glutathionu (Graf 1C) a indukuje to zvýšenou dispozici GSH jako hlavní příčinu tohoto zvýšení.

Graf 4: Změny exprese enzymů, transportních proteinů a regulujících nukleárních receptorů u ID potkanů.



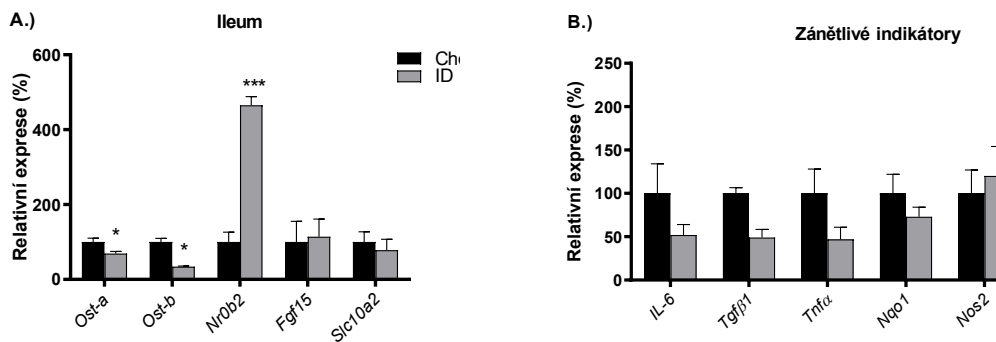


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa.

6.7 ID Změny genové exprese relevantních molekul v ileu

Byla analyzována exprese mRNA molekul zapojených do reabsorpce ŽK v ileu, která prokázala sníženou genovou expresi *Osta/β*, heterodimerního transportéru, důležitého pro reabsorpci ŽK a zvýšení *Nr0b2* (Graf 5A). Jaterní exprese genů aktivovaných během zánětu zůstala beze změny (Graf 5B).

Graf 5: Změny genové exprese, transportních proteinů a zánětlivých indikátorů u ID potkanů.



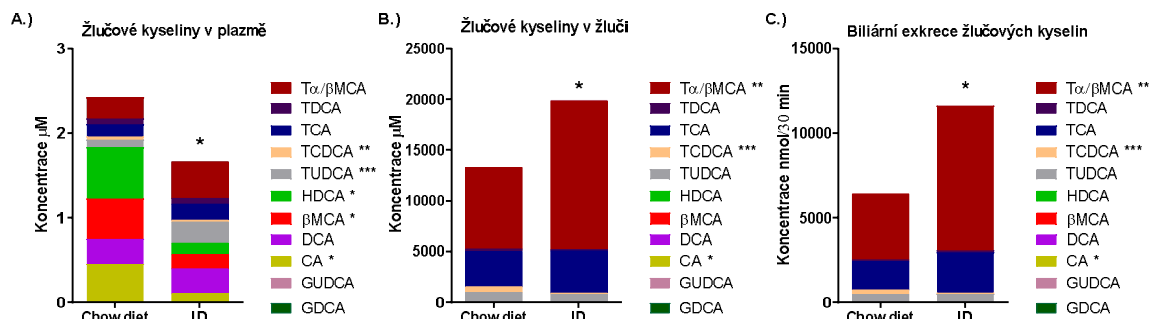
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, (n = 7 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, ***p < 0.001; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa.

6.8 LC-MS detekce ŽK v plazmě a ve žluči

Pomocí LC-MS metody bylo stanoveno 24 nekonjugovaných a konjugovaných ŽK v plazmě a ve žluči. Celková koncentrace ŽK byla vypočítána jako suma koncentrací jednotlivých ŽK. Deplece železa navozená u potkanů dietou vedla ke snížení celkových koncentrací ŽK v plazmě (Graf 6A), a naopak k jejich zvýšení ve žluči (Graf 6B). Většina ŽK se vyskytovala v koncentracích pod detekčním limitem metody (0.02 μM), a proto bylo kvantifikováno 9 ŽK v plazmě a 8 ŽK ve žluči. ID vedl k signifikantní redukci koncentrace tauro-chenodeoxycholové, hyodeoxycholové, β-muricholové a cholové kyseliny v plazmě (Graf 6A) a k redukci biliární koncentrace tauro-chenodeoxycholové a cholové kyseliny. Důležitým zjištěním je i značné zvýšení žlučové koncentrace tauro-α/β-muricholových kyselin u ID potkanů (Graf 6B), které bylo doprovázeno zvýšením její biliární sekrece (Graf

6C). Všechny uvedené výsledky poukazují na důležitou roli železa v regulaci syntézy ŽK u potkanů.

Graf 6: Koncentrace individuálních ŽK v (A) plazmě, (B) žluči a jejich (C) sekrece do žluče.

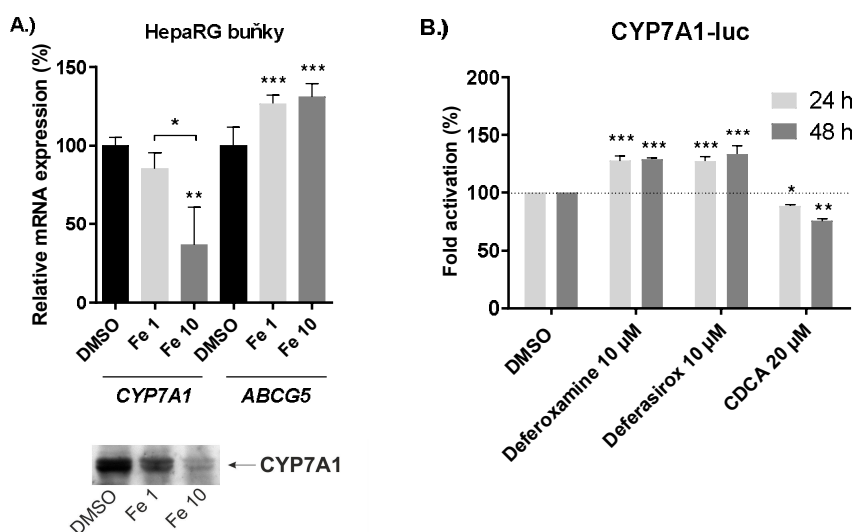


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa; ta/βMCA, kys. tauro-α/β-muricholová kys.; TDCA, kys. taurodeoxycholová; TCA, kys. taurocholová; TCDCA, kys. taurochenodeoxycholová; TUDCA, kys. tauroursodeoxycholová; HDCA, kys. hyodeoxycholová; βMCA, kys. β-muricholová; DCA, kys. deoxycholová; CA, kys. cholová; GUDCA, kys. glykoursodeoxycholová; GDCA, kys. glykodeoxycholová;

6.9 ID indukuje mRNA CYP7A1 v lidských HepaRG i HepG2 buňkách

Výsledky získané na zvířecím modelu byly verifikovány na lidských buněčných modelech. Proto byly provedeny *in vitro* studie s diferencovanou HepaRG buněčnou linií, která je široce akceptovaným buněčným modelem lidských diferencovaných hepatocytů. ID byla v HepaRG buňkách stimulována koncentrací 1 μ M Fe, a koncentrace 10 μ M Fe v mediu měla napodobit fyziologickou plazmatickou koncentraci železa. Nízké koncentrace železa v mediu vedly k indukci mRNA a proteinové exprese CYP7A1 v porovnání s buňkami, které byly kultivovány s 10 μ M koncentrací Fe v mediu (Graf 7A). Z toho lze usoudit, že deplece železa reguluje expresi CYP7A1 podobným způsobem v potkaních i lidských játrech. Na rozdíl od CYP7A1 nebyl efekt různých koncentrací železa na změny v expresi ABCG5 zjištěn (Graf 7A). V následných experimentech prováděných na buňkách HepG2 byly použity chelátory železa k prozkoumání vlivu deplece železa na transaktivaci genů CYP7A1 v experimentech reportérových genů. Opět byla detekována stimulace CYP7A1 (Graf 7B) promotoru po 24 a 48 hod inkubaci s deferoxaminem a deferasiroxem v koncentraci 10 μ M.

Graf 7: Genová exprese CYP7A1 na lidských buněčných liniích.



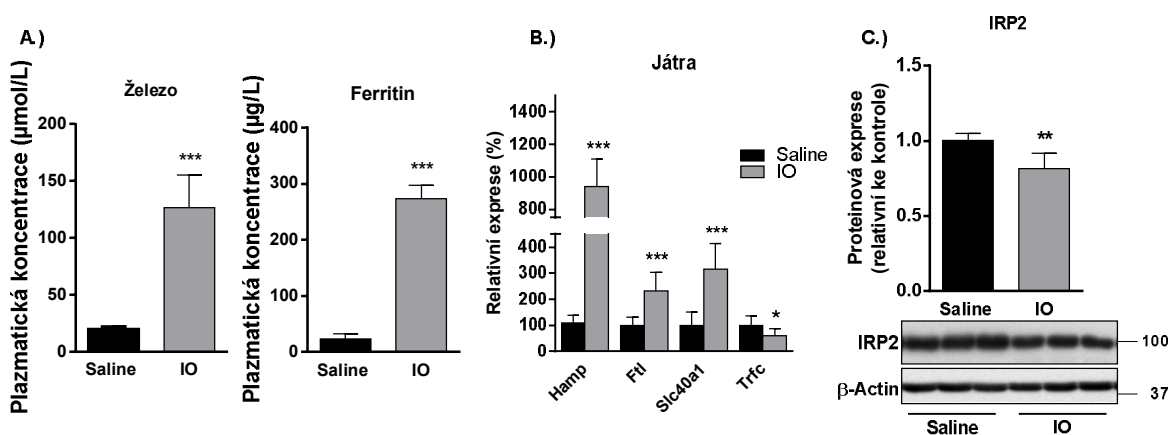
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ze tří experimentů; signifikantní rozdíl oproti kontrole * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; DMSO, dimethylsulfoxid; Fe, železo; CDCA, chenodeoxycholvá kyselina; CYP7A1, Cholesterol 7 α -hydroxylasa;

6. Výsledky část 2. - Homeostáza ŽK během nadbytku železa (IO)

6.10 Jaterní homeostáza železa během IO

Přetížení železem u IO skupiny bylo potvrzeno zvýšením plazmatické koncentrace železa a ferritinu (Graf 8A) a signifikantně zvýšenou mRNA jaterní expresí genů, které jsou klíčové v metabolismu železa, tj. hepcidinu (*Hamp*), ferritinu (*Ftl*), ferroportinu (*Slc40a1*) a represí transferrinového receptoru 1 (*Trfc1*) (Graf 8B). Současně došlo k významnému snížení exprese „iron-response element-binding protein 2“ (IRP2) (Graf 8C), jako indikátoru přebytku železa v játrech (Anderson et al., 2012).

Graf 8: Biochemické a molekulární indikátory přetížení organismu železem.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, ($n = 6$ pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu (100 mg/kg) ob den.

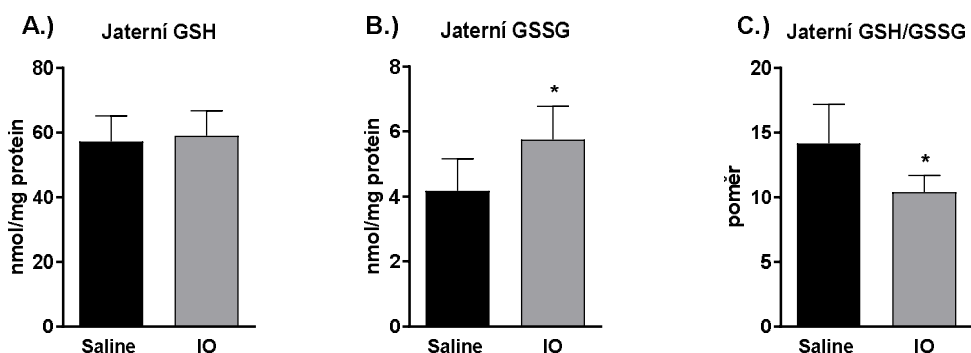
6.11 Biochemické vyšetření plazmy

Akumulace železa v jaterní tkáni může indukovat oxidační poškození jater (Philippe et al., 2007). Pro zjištění jaterního poškození v použitém IO modelu byla analyzována plazma a korespondující jaterní biomarkery. Škodlivý efekt IO na jaterní funkci byl potvrzen mírným, ale signifikantním nárůstem aktivity aspartátaminotransferasy (AST) a zvýšenou plazmatickou koncentrací cholesterolu a bilirubinu v plazmě.

6.12 Oxidační stres v játrech

Indukce oxidačního stresu v játrech IO potkanů byla potvrzena nárůstem koncentrace oxidované formy glutathionu (GSSG) (Graf 9B) a poklesem poměru GSH/GSSG (Graf 9C).

Graf 9: Koncentrace různých forem glutathionu v játrech a jejich poměr.

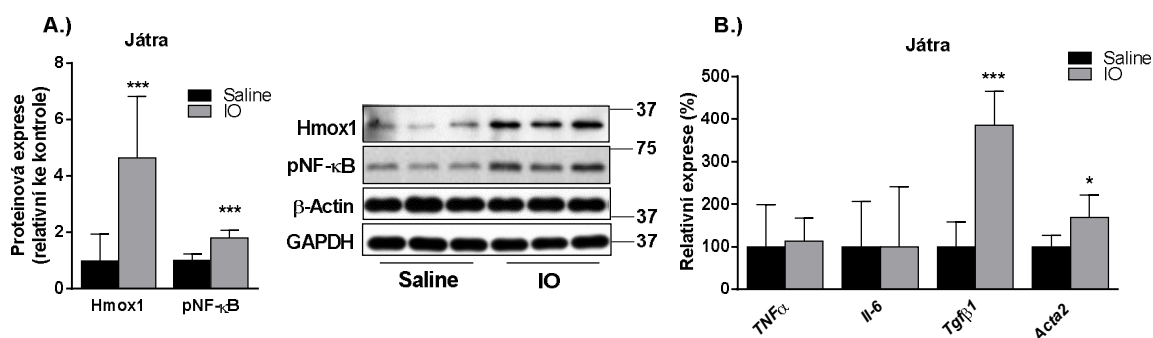


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu (100 mg/kg) ob den. GSH, redukovaný glutathion; GSSH, oxidovaný glutathion.

6.13 Zvýšená exprese zánětlivých indikátorů

Změny v koncentraci glutathionu byly doprovázeny nárůstem exprese proteinů, které jsou aktivovány oxidačním stresem. Jedná se o hemoxygenasu 1 (Hmox1) a fosforylovanou p65 podjednotku NF- κ B (Graf 10A). Kumulace železa v játrech vedla k aktivaci exprese *Tgfb1*, doprovázené nárůstem exprese jím regulovaného *Acta2* (kóduje α -SMA protein) (Graf 10B), tj. chronické profibrotické cesty (Mehta et al., 2018).

Graf 10: Genová exprese zánětlivých indikátorů.

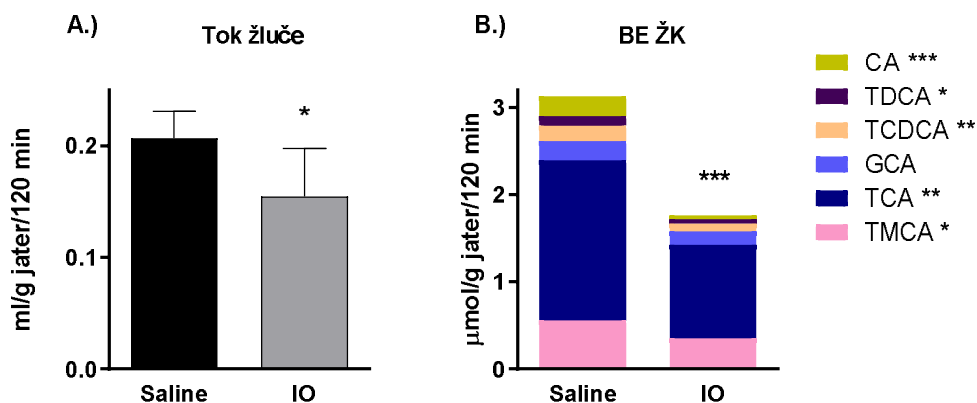


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0,05, ***p < 0.001; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu (100 mg/kg) ob den.

6.14 Tok žluče a koncentrace ŽK ve žluči u IO potkanů

Přetížení železem způsobilo u potkanů signifikantní zpomalení toku žluče (Graf 11A) a snížení biliární sekrece ŽK (Graf 11B).

Graf 11: Tok žluče a biliární sekrece individuálních ŽK.

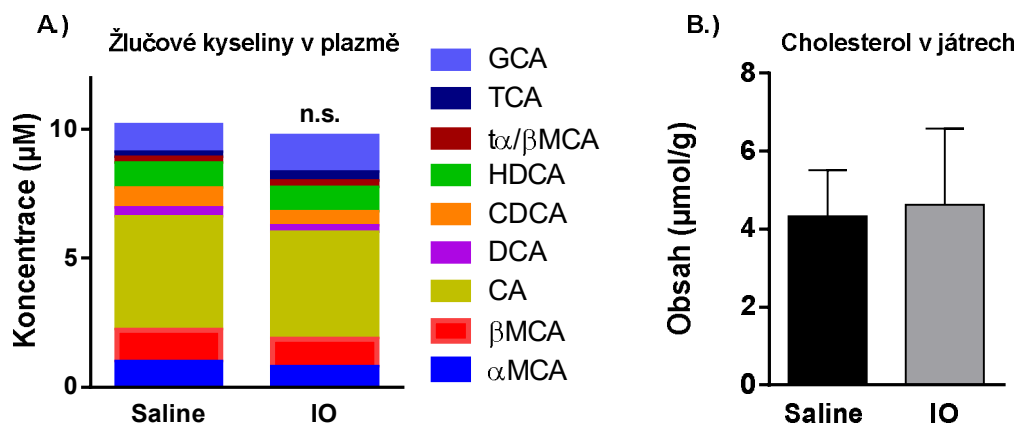


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, ***p < 0.001; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) obden; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu (100 mg/kg) obden; BE, biliární sekrece; ŽK, žlučové kyseliny; CA, kys. cholová; TDCA, kys. taurodeoxycholová; TCDCa, kys. taurochenodeoxycholová; GCA, kys. glykocholová; TCA, kys. taurocholová; TMCA, kys. taumuricholová.

6.15 Biliární sekrece hlavních složek žluče

Biliární sekrece glutathionu, cholesterolu a fosfolipidů se mezi kontrolními a IO potkany signifikantně nelišila. Rovněž nezměněny zůstaly systémové koncentrace ŽK v plazmě a koncentrace cholesterolu v játrech (Graf 12A-B). Tyto údaje podporují závěr, že snížení produkce žluči u IO potkanů odráží sníženou biliární sekreci ŽK.

Graf 12: Biliární sekrece osmotických složek žluče.

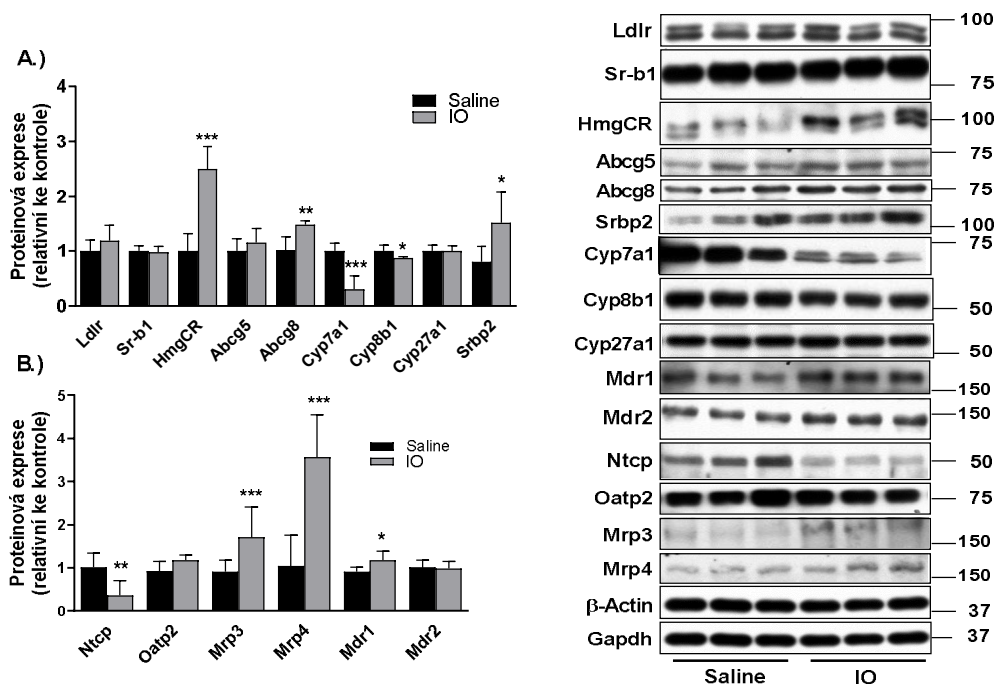


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu (100 mg/kg) ob den; BE, biliární sekrece; GCA, kys. glykocholová; TCA, kys. taurocholová; τα/βMCA, kys. tauro-α/β-muricholová; HDCA, kys. hyodeoxycholová; CDCA, kys. chenodeoxycholová; DCA, kys. deoxycholová; CA, kys. cholová; αMCA, kys. α-muricholová; βMCA, kys. β-muricholová;

6.16 Působení IO na jaterní expresi molekul odpovědných za obrat ŽK a cholesterolu

Western blot analýzy byla zjištěna downregulace Cyp7a1 (Graf 13A), upregulace Hmgcr (Graf 13A), Mdr1 (Graf 13B), hlavního apikálního efluxního transportéru pro léčiva, a Mrp3/Mrp4 (Graf 13B). Nicméně IO také snížil proteinovou expresi Cyp8b1 (Graf 13A) a Ntcp, esenciálního proteinu pro vychytávání ŽK z portální krve do hepatocytů (Graf 13B). Zvýšená exprese Abcg8, apikálního efluxního transportéru pro cholesterol z jater do žluče, nebyla následována odpovídající změnou v Abcg5, což může znamenat, že funkce tohoto heterodimeru nebyla zvýšena, jak naznačuje také nezměněná biliární sekrece cholesterolu.

Graf 13: Expres transportérů a enzymů ŽK.

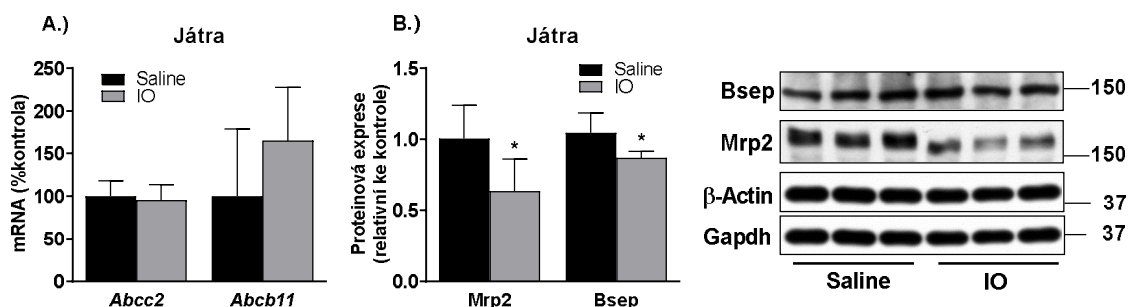


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížena železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu (100 mg/kg) ob den.

6.17 Western blot a PCR analýza Mrp2 a Bsep

Genová exprese obou proteinů nebyla u IO změněna (Graf 16A), zatímco Western blot analýza potvrdila downregulaci jak Bsep, tak Mrp2 na úrovni proteinu (Graf 16B). Předchozí studie popisují, že Bsep a Mrp2 mohou být regulovány posttranskripčně, a to zvýšeným přesunem z kanalikulární membrány do intracelulárního subapikálního prostoru s následnou degradací.

Graf 16: Expres hlavních apikálních transportérů na úrovni mRNA a proteinu

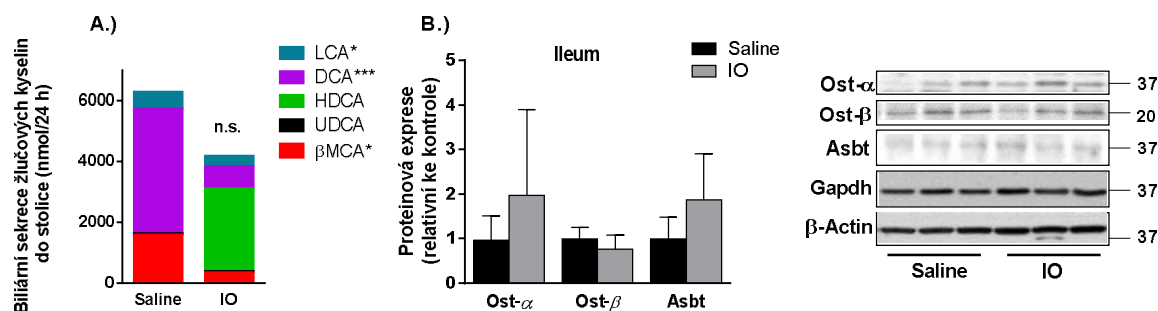


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu (100 mg/kg) ob den.

6.18 IO mění střevní obrat ŽK

Pro posouzení obratu ŽK byla proto analyzována ztráta ŽK do stolice. Obsah ŽK ve stolici byl mezi jednotlivými zvířaty ve skupině vysoce variabilní, proto tendence ke snížení vylučování ŽK u IO potkanů nedosáhla statistické významnosti (Graf 17A). To naznačuje, že snížená biliární sekrece ŽK mohla být kompenzována jejich sníženou reabsorpcí v ileu. Western blot analýza nepotvrdila signifikantní změny exprese proteinů Asbt a Ost α/β , tj. hlavních transportérů pro reabsorpci ŽK na apikálních a bazolaterálních membránách enterocytů ilea (Graf 17B), a proto jsme se soustředili na analýzu individuálních ŽK ve vzorcích stolice. LC-MS analýza individuálních ŽK ukázala, že jejich exkrece do stolice byla snížena u IO s výjimkou kyseliny hyodeoxycholové (HDCA) (Graf 17A). HDCA nebyla vůbec přítomná u kontrolní skupiny potkanů. To naznačuje, že metabolická konverze ŽK střevní mikroflórou může výrazně modifikovat sníženou biliární sekreci ŽK u IO potkanů.

Graf 17: Biliární sekrece individuálních ŽK a ileální transportéry ŽK.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu (100 mg/kg) ob den. LCA, kys. lithocholová; DCA, kys. deoxycholová; HDCA, kys. hyodeoxycholová; UDCA, kys. ursodeoxycholová; β MCA, kys. β -muricholová.

7. Diskuse

Výsledky v této práci tedy prezentují důležité informace o mechanismech zodpovědných za snížení sérových koncentrací cholesterolu a ŽK při depleci železa v organizmu.

Pokud jde o možný vliv ID na sekreci žluči a homeostázu žlučových komponent, většina dosud známých informací se soustředila na homeostázu cholesterolu. Opakovaně bylo pozorováno, že ID má schopnost snižovat sérovou koncentraci cholesterolu u lidí i u potkanů (Stangl and Kirchgessner, 1998; Choi et al., 2001), nicméně odpovědné mechanismy nebyly plně objasněny. Snížená sérová hladina cholesterolu u ID potkanů v naší práci koresponduje s dostupnými literárními údaji, což bylo základní podmínkou pro další hodnocení (Tabulka 2.). Detailní molekulární studií se nám podařilo identifikovat dva hlavní mechanismy zodpovědné za pokles cholesterolemie. Prvním je originální zjištění, že ID zvyšuje biliární sekreci cholesterolu (Graf 2A) prostřednictvím indukce kanalikulárního Abcg5/8 transportéru (Graf 4A). To odpovídá nedávnému pozorování, že nízká hladina železa v séru je predispozičním faktorem pro supersaturaci žluči cholesterolem, což vede ke zvýšení tvorby cholesterolových žlučnickových kamenů u lidí s deplecí železa (Pamuk et al., 2009; Prasad et al., 2015). Ačkoliv následná analýza u ID potkanů prokázala pouze tendenci ke zvýšení indexu saturace cholesterolu ve žluči (Graf 2C), získané informace o zvýšení sekrece cholesterolu do žluči během ID představují první průkaz možného mechanismu. Navíc toto zjištění nabývá na významu v klinické praxi, protože na rozdíl od potkanů, kteří nemají žlučník, u lidí může koncentrování žluče ve žlučníku vést k dalšímu zvýšení koncentrace cholesterolu ve žluči a k následnému výskytu žlučových kamenů (Van Erpecum, 2011). Dalším mezidruhovým rozdílem akcentujícím význam zjištění pro lidi je nižší obsah hydrofilních ŽK jakou je kyselina ursodeoxycholová, která redukuje krystalizaci cholesterolu za patofyziologických podmínek (Wang and Carey, 1996).

Zvýšená syntéza ŽK z cholesterolu je druhým hlavním mechanismem, který vede k poklesu plazmatické koncentrace cholesterolu u ID, jak bylo naznačeno v práci Kamei et al. (2010), ve které detekovali upregulaci Cyp7a1. Avšak absence analýzy ŽK a jejich spekter v této studii nechala otázku mechanismu regulace otevřenou. Proto jsme se soustředili na detekci enzymů, které jsou odpovědné za metabolismus ŽK v játrech v kombinaci s LC-MS analýzou koncentrací individuálních ŽK. Důležitým bylo zjištění, že ID indukuje nejen Cyp7a1, ale i další klíčové enzymy syntézy ŽK, Cyp8b1 a Cyp27a1. Jejich upregulace byla doprovázená zvýšenou biliární sekrecí ŽK, především tauro- α / β MCA, za kterou odpovídá indukce Cyp27a1, zatímco zvýšený poměr biliární sekrece CA/CDCA korespondoval s indukcí Cyp8b1. V játrech potkanů s deplecí železa tedy dochází ke komplexní indukci syntézy ŽK.

Předešlé studie prokázaly redukcí jaterního obsahu cholesterolu u potkanů s ID (Kamei et al., 2010). Tento literární údaj koreluje se zvýšenou biliární sekrecí cholesterolu a jeho zvýšenou proměnou na ŽK, a také se sníženým vychytáváním cholesterolu do jater přes redukované Ldl a Sr-b1 receptory (Graf 4A). Nicméně jaterní obsah cholesterolu byl u našich zvířat s ID nezměněn, což je patrně způsobeno nezměněnou expresí Hmg-CoA reduktázy a snížením exprese efluxního transportéru Abca1 pro přenos cholesterolu z hepatocytů do plazmy (Graf 4A). To znamená, že redukováná sekrece cholesterolu z hepatocytů na basolaterální membráně kompenzuje zvýšenou biliární eliminaci cholesterolu na úkor snížení plazmatické koncentrace cholesterolu u ID potkanů.

Zvýšení biliární sekrece ŽK je možné dosáhnout jejich zvýšenou syntézou, ale rovněž zvýšeným transportem do žluče prostřednictvím Bsep. Za účelem rozlišení obou mechanismů jsme provedli dodatečnou *in vivo* clearance studii s infuzí radioaktivně značeného ³H-taurocholátu. Za těchto podmínek byl vynechán podíl *de novo* syntézy ŽK. I u těchto zvířat došlo k nárůstu toku žluče, což potvrdilo choloretický účinek ID. Nicméně koncentrace ³H-

taurocholátu v plazmě i rychlost jeho biliární sekrece nebyla u ID potkanů změněna, co poukazuje na absenci podílu Bsep na pozorovaných změnách v homeostáze ŽK. Zvýšená exprese Ntcp a Oatp transportérů zodpovědných za vychytání ŽK z plazmy na bazolaterální membráně, nebyla spojena se zvýšeným biliární sekrecí ³H-taurocholátu, což lze vysvětlit oboustranným transportem ³H-taurocholátu přes bazolaterální membránu. Tyto údaje dále podporují skutečnost, že zvýšená syntéza a následně jaterní dispozice ŽK, je hlavní determinantou, která je zodpovědná za stimulaci toku žluče během ID. Naopak pozorovaná redukce střevního *Osta/β* transportéru může přispět k jejich snížené plazmatické koncentraci během ID v důsledku snížení reabsorpce ŽK v ileu (Graf 5A). Tyto mechanismy mohou rovněž přispívat ke zmírnění cholestatického poškození jater prostřednictvím redukce dispozice železa, jak bylo uvedeno v předchozích studiích (Peretz et al., 2006; Otagawa et al., 2008; Cermanova et al., 2014).

Zvýšený tok žluče může být rovněž důsledkem upregulace Mrp2 transportéru, který je klíčový pro transport anionických sloučenin přes kanalikulární membránu do žluče, a to včetně osmoticky aktivního glutathionu (Ruiz et al., 2007). Deplece železa v naší experimentální skupině zvířat nevedla ke změnám exprese Mrp2 (Graf 4C), přesto však došlo ke zvýšení biliární sekrece glutathionu. Vysvětlení tohoto jevu lze nalézt ve zvýšení jaterního obsahu redukované formy glutathionu (GSH). Tato akumulace patrně souvisí s jeho obrannou funkcí proti oxidativnímu poškození jater prostřednictvím inaktivace reaktivních forem kyslíku (ROS). Poměr GSH/GSSG je proto obecně používán jako indikátor oxidačního stresu v tkáních (Chen et al., 2013). Akumulace železa v tkáních je známým faktorem generování volných radikálů Fentonovou reakcí (Fleming and Ponka, 2012). Lze proto předpokládat, že snížení jaterního obsahu železa pomocí ID potravy vedlo u zvířat ke snížené oxidaci GSH v důsledku snížené tvorby volných radikálů, následované zvýšenou dispozicí a zvýšenou biliární sekrecí glutathionu.

Prozánětlivé cytokiny jako IL-1, IL-6 a TNF- α mohou inhibovat tvorbu žluči snížením exprese bazolaterálních i kanalikulárních transportních proteinů, což je podkladem pro vznik cholestázy během zánětlivých onemocnění (Boyer 2013). Deplece železa může vést ke snížení exprese zmíněných cytokinů během zánětu (Darshan et al., 2010). Proto jsme provedli analýzu mRNA hlavních cytokinů, které jsou indukovány během akutního nebo chronického zánětu v játrech (Graf 5B). U zvířat s ID nedošlo ke změně genové exprese zánětlivých markerů, což naznačuje, že tyto cytokiny nejsou zodpovědné za změny v játrech pozorované u ID potkanů.

Indukce genové exprese *Abcg5/8*, *Abcb4*, *Abcc3*, *Nr0b2* (Shp), *Cyp7a1*, *Cyp8b1* a *Srebf1* v experimentální ID skupině naznačuje aktivaci nukleárních receptorů jako FXR a LXR α , které představují hlavní regulační receptory pro zmíněné geny (Halilbasic et al., 2013). Proto byly analyzovány geny, které představují typické cílové struktury pro jednotlivé nukleární receptory. Genová exprese Bsep a Shp, která je regulovaná především FXR, však vykazovala nejednotnou odpověď; první byl nezměněn a druhý výrazně up-regulován. Podobná reakce byla detekována v ileu, kde *Osta/β* geny regulované FXR byly reprimované (Graf 4A). Proto můžeme očekávat, že aktivace FXR receptoru nehraje důležitou roli ve sledovaných změnách u ID potkanů, což potvrdila i následná *in vitro* studie. *Nr0b2* (Shp) gen může být také indukován stimulací LXR α (Kim et al., 2009). Rovněž zvýšení exprese dalších genů regulovaných LXR α jakými jsou *Cyp7a1*, *Abcg5/8* a *Srebf1*, silně naznačuje, že ID podporuje v játrech potkanů signalizaci přes LXR α receptor. Tuto hypotézu potvrzuje nález zvýšené proteinové exprese LXR α receptoru. Nezměněná mRNA LXR α svědčí pro posttranskripční modulaci jeho exprese u ID skupiny.

Protože v literatuře byly jisté pochybnosti o schopnosti LXR α transaktivovat lidský CYP7A1 (Li and Chiang, 2012), provedli jsme mechanistické experimenty v diferencovaných lidských HepaRG buňkách a v buňkách HepG2 exprimujících exogenní LXR α společně

s transfekcí luciferasou značeného CYP7A1 promotoru, kde GW3965 byl použit jako syntetický ligand LXR α . V této *in vitro* studii jsme potvrdili, že ID indukuje mRNA expresi CYP7A1, což svědčí pro podobný účinek nedostatku železa v lidských hepatocytech, jaký jsme pozorovali v potkaních játrech a otevírá klinickou relevanci našich poznatků. Nicméně koexprese CYP7A1 promotoru s LXR α , FXR nebo PXR prokázala na buňkách HepG2 supresivní účinek na CYP7A1 promotorový konstrukt a GW3965 neměl žádný účinek na aktivaci promotoru CYP7A1 v nepřítomnosti nebo přítomnosti LXR α . Podobně ligandy FXR a PXR, CDCA a rifampicin, měly supresivní účinek na transaktivaci promotoru CYP7A1, což je v souladu s jejich rolí v regulaci CYP7A1 (Li and Chiang, 2015). Na základě těchto pozorování můžeme tvrdit, že deplece železa indukuje lidských buňkách expresi CYP7A1 nezávisle na LXR α , FXR a PXR. Naše data rovněž vyloučily možnosti regulace CYP7A1 přes pERK a pJNK kinázy, což je v souladu s absencí změn protizánětlivých cytokinů.

Po vyloučení těchto základních cest regulace syntézy ŽK zůstala velkou výzvou identifikace mechanismu, jakým dochází k indukci Cyp7a1/CYP7A1 během nedostatku železa. Odpověď přinesla studie (Liang et al., 2017) publikovaná paralelně s tou naší, kde se podařilo ověřit hypotézu, že modulace mRNA Cyp7a1 železem je prováděna přímo přes IRP1 a IRP2 proteiny, které se podílejí na regulaci koncentrace železa v buňkách. Obecně platí, že pokud vznikne v buňkách deficit železa, IRP se vážou na iron-responsive elements (IREs) v netranslatovaných oblastech (UTR) mRNA pro divalentní transportér 1 (DMT1) a transferrinový receptor 1 a zvyšují jejich expresi stabilizací mRNA, zatímco vazba IRP na UTR feritinu a ferroportinu 1 blokuje translaci jeho mRNA. Pokud je železo v přebytku, získává IRP1 cluster 4Fe-4S a vytvoří inaktivní akonitasu, zatímco IRP2 podléhá degradaci, takže jejich vazba na UTRs obecně klesá (Anderson et al., 2012; Liang et al., 2017). Liang et al. (2017) prokázali, že Cyp7a1 má ve svém 3'-UTR non-kanonickou strukturu IRE, která může účinně vázat jak IRP1, tak i IRP2 a zvýšit transkripci tohoto enzymu. Zvýšený obsah železa v játrech snižuje IRP1 a IRP2 a následně snižuje expresi Cyp7a1, zatímco desferrioxamin, chelátor železa, má indukční účinek. Poškození struktury IRE v UTR genu Cyp7a1 ruší modulační účinek železa. Změny exprese IRP proteinů detekované v našich studiích v játrech potkanů s deficitem železa (indukce IRP), jakož i s jeho přebytkem (redukce IRP), korespondují s těmito závěry a potvrzují významnou roli IRP v regulaci Cyp7a1 u potkanů s ID a IO.

Pro zjištění komplexního vlivu železa na homeostázu ŽK byla námi následně provedena studie, ve které byl indukován jeho přebytek s významnou jaterní kumulací. Podobně jako v případě nedostatku železa, i zde byly známy především účinky nadbytku železa na prekursor ŽK, cholesterol. Tyto studie demonstrovaly významné rozdíly mezi podmiňující patologickou situací. Zatímco lidé a myši (Padda et al., 2015) s geneticky podmíněným IO, jakými jsou talasemie nebo dědičná hemochromatóza, mají většinou snížené plazmatické koncentrace cholesterolu, modely hlodavců založené na aplikaci železa obvykle zvyšují plazmatické (Brunet et al., 1999) a případně i jaterní koncentrace cholesterolu (Graham et al., 2010). Podobně je opakovaně popisována významná kumulace železa v játrech asi u jedné třetiny nemocných s metabolickým syndromem provázeným nealkoholovým ztukovatěním jater (NAFLD), u kterých lze rovněž najít významně zvýšený cholesterol v plazmě (Dongiovanni et al., 2011). Tato klinická situace je označována jako dysmetabolický syndrom s nadbytkem železa (Dysmetabolic Iron Overload Syndrome) a zvířecí modely založené na nadměrné aplikaci železa lépe korespondují s tímto stavem. Tomuto poznatku odpovídá i námi detekované ukládání železa v hepatocytech i neparenchymatózních buňkách (např. Kupfferovy buňky) typické pro NAFLD (Valenti et al., 2010), zatímco geneticky podmíněné nemoci vedou k akumulaci železa především v hepatocytech.

Výzkum molekulárních mechanismů zatím neposkytl konzistentní výsledky, které by vysvětlovaly hypercholesterolemii během IO. Brunet a kol. prokázali u potkanů s IO navozeným dietou sníženou jaterní aktivitu jak *Hmgcr*, tak i *Cyp7a1*, což bylo doprovázeno zvýšenou plazmatickou hladinou cholesterolu, jeho nezměněnou koncentrací v játrech a sníženým biliárním vylučováním ŽK a cholesterolu. Snížená exprese genu *Cyp7a1* společně se zvýšenou koncentrací cholesterolu v plazmě byla také detekována u myši s hereditární hemochromatózou navozenou deficitem hefestinu (*Hfe^{-/-}*) u kmene DBA/2, ale ne u myši *Hfe^{-/-}* kmene C57BL/6 (Coppin et al., 2007). V jiné studii vykazovaly myši krmené dietou obohacenou o železo pozitivní korelaci mezi obsahem železa v játrech a mRNA expresí *Hmgcr*, ale nebyl pozorován žádný vztah mezi expresí *Cyp7a1* a koncentrací cholesterolu v plazmě (Graham et al., 2010). Výsledky naší studie přinášejí v tomto kontextu důležité a nové informace, že IO může dokonce vést ke škodlivé kombinaci poklesu *Cyp7a1* a indukce *Hmgcr* (Graf 20B). Je pravděpodobné, že nesrovnalosti v dostupných informacích o změnách *Hmgcr* a *Cyp7a1* během IO jsou spojeny se základní patologií a pramení z odlišného stupně a lokalizace kumulace železa v játrech.

Jaterní *Hmgcr* je regulována transkripčním faktorem SREBP-2 jako odpověď na snížený obsah cholesterolu ve tkáni (Horton et al., 2002). Nezměněné koncentrace cholesterolu v játrech u našich IO potkanů naznačují vliv dalšího faktoru aktivujícího SREBP-2. V poslední době bylo popsáno, že SREBP-2 může být indukován ROS (Seo and Shin, 2017). Zvýšená produkce ROS je typickým průvodním jevem kumulace železa v játrech (Philippe et al., 2007). Snížený jaterní poměr GSH/GSSG (Graf 9C) a indukce exprese *Hmox1* a fosforylace *p65_NF-κB* (Graf 10A) potvrdily vznik oxidačního stresu u našich potkanů s IO. Proto lze předpokládat, že indukce jaterní dráhy ROS-SREBP-2 je zodpovědná za indukci *Hmgcr* u potkanů s IO. Absence kumulace cholesterolu v játrech spolu s jeho nezměněným vylučováním žlučí naznačují, že zvýšené koncentrace cholesterolu v plazmě jsou podmíněny jeho zvýšeným výstupem z jater do krevního řečiště v reakci na zvýšenou syntézu indukovanou *Hmgcr* a na zpomalenou syntézu ŽK díky sníženému *Cyp7a1*. Indukce *Hmgcr* také naznačuje potenciální terapeutickou strategii léčby statiny, léky blokujícími *Hmgcr*, které skutečně projevily příznivé účinky u NASH, tj. syndromu spojeného se zvýšeným ukládáním železa v játrech (Dongiovanni et al., 2015).

Transportní proteiny, které zprostředkovávají vychytání ŽK do hepatocytů a jejich biliární sekreci, nebyly dosud během IO studovány navzdory důkazu redukce biliární sekrece ŽK (Brunet et al., 1999). V naší studii se podařilo prokázat posttranskripční downregulaci hlavních z nich, *Ntcp*, *Bsep* a *Mrp2*, která svým charakterem připomíná zvýšenou degradaci těchto proteinů pozorovanou během zánětu (Zinchuk et al., 2005; Geier et al., 2007). Údaje z imunohistochemie skutečně potvrdily signifikantně sníženou kanalikulární lokalizaci *Bsep* a *Mrp2* v játrech potkanů s IO ve srovnání s kontrolními potkany. Tento způsob regulace odpovídá aktivaci *Tgf-β* kaskády a především probíhajícímu oxidačnímu stresu u potkanů s IO. To potvrzuje i upregulace *Mdr1*, která je indukovaná v játrech vazbou fosforylovaného *NF-κB* na promotor *Mdr1* (Nishanth et al., 2010). Společně se sníženou syntézou ŽK mohou tyto změny přispívat ke snížení biliární sekrece ŽK (Graf 11B) u potkanů s IO a mohou modifikovat biliární sekreci mnoha sloučenin včetně léků. Kromě toho snížené vychytávání ŽK prostřednictvím redukce *Ntcp* a jejich zvýšený eflux z hepatocytů do krve přes indukovaný *Mrp4*, může přispět k nezměněným plazmatickým koncentracím ŽK a zabránit intracelulární akumulaci ŽK v důsledku jejich zhoršené biliární sekrece. Současně naše data vysvětlují pozorované zvýšení plazmatických koncentrací bilirubinu v důsledku downregulace apikálního *Mrp2* (biliární sekrece), upregulace bazolaterálního *Mrp3* (eflux z hepatocytů do krve) a indukce *Hmox-1* (katalyzuje rozklad hemu s následným uvolněním bilirubinu).

Vliv IO na vylučování ŽK do stolice nebyl dosud popsán. Proto jsme provedli analýzy ŽK ve sbírané stolici. Důležitým bylo zjištění, že u potkanů s IO zůstalo vylučování ŽK stolicí neovlivněno (Graf 17A) navzdory jejich snížené dodávce do střeva prostřednictvím žluče, což svědčí pro snížené zpětné vychytávání ŽK ze střeva. Hlavní transportéry pro zpětné vychytávání ŽK ze střeva, *Abst* a *Ost*, však nebyly IO významně ovlivněny. Naproti tomu analýza spektra ŽK ve stolici IO potkanů poukázala na výraznou individuálně variabilní intestinální konverzi ŽK na HDCA. Předchozí studie prokázala neúčinnou absorpci HDCA ze střeva u potkanů kmene *Wistar*, což vedlo k závěru, že fekální ztráty ŽK prostřednictvím jejich konverze na HDCA mohou být důležitým mechanismem pro regulaci dispozice cholesterolu v organismu (Madsen et al., 1975). Lze předpokládat, že variabilní proměna ŽK na HDCA je zprostředkována změnou spektra intestinálních bakterií u IO potkanů (Eysen et al., 1999), nicméně tato hypotéza musí být dále studována. Analýza ŽK ve stolici přinesla i další významné zjištění, a to že změnu v expresi jaterních syntetických drah ŽK lépe reflektuje jejich obsah ve stolici, nežli ve žluči. Týkalo se to především redukce *Cyp8b1*, hlavního enzymu neutrální cesty; zatímco biliární sekrece ukazovala neselektivní snížení syntézy ŽK navzdory nezměněnému klíčovému enzymu kyselé dráhy tj. *Cyp27a1*, obsah ŽK ve stolici ukázal zejména pokles DCA, hlavního reprezentanta této neutrální dráhy u IO potkanů. To potvrdzovala i zvýšená tvorba HDCA, metabolitu kyseliny muricholové, typického produktu kyselé dráhy syntézy ŽK.

8. Závěr

Z výsledků této dizertační práce vyplývá, že zvýšený i snížený obsah železa v játrech má komplexní účinek na tvorbu žluče a homeostázu ŽK a cholesterolu. Změny v těchto základních funkcích jater jsou během nedostatku a nadbytku železa často protichůdné, což je v souladu s očekávanou závislostí na aktuálním obsahu železa. Nicméně dílčí zapojené mechanismy, prostřednictvím kterých k pozorovaným změnám docházelo, se mezi ID a IO zvířaty částečně liší. Za použití relevantních potkaních *in vivo* modelů jsme zjistili, že nedostatek železa má stimulační účinek na sekreci žluče prostřednictvím aktivace na ŽK závislého i nezávislého mechanismu. Naopak nadbytek železa produkci žluče snižoval inhibicí pouze ŽK zprostředkované cholerézy.

Molekulární analýza odpovědných mechanismů ukázala, že klíčovou roli v pozorovaných změnách homeostázy ŽK a cholesterolu u ID i IO skupin má modulace *Cyp7a1*, hlavního enzymu v procesu syntézy ŽK. Nedostatek železa expresi *Cyp7a1* zvyšuje, zatímco nadbytek železa ji snižuje. To je provázeno odpovídajícími změnami v plazmatických hladinách cholesterolu, ze kterého jsou ŽK syntetizovány. Přínosný byl následně i screening regulačních mechanismů, kde se podařilo prokázat, že hlavní cesty regulace *Cyp7a1*, tj. FXR receptorová kaskáda a děje měnící fosforylaci JNK a ERK kinas, se na pozorovaných změnách nepodílejí. Tato skutečnost byla paralelně potvrzena jinou výzkumnou skupinou, která identifikovala jako nejpravděpodobnější mechanismus přímou modulaci přes IRP proteiny, což koresponduje i s nálezy druhé naší studie zaměřené na vliv nadbytku železa. Zde se nám podařilo potvrdit, že změny v homeostáze ŽK provázejí snížení exprese IPR proteinů. Dodatečná analýza rovněž ukázala, že nedostatek železa zvyšuje přítomnost především IRP2 proteinu.

Důležitým bylo rovněž zjištění zvýšené biliární sekrece cholesterolu u zvířat s nedostatkem železa prostřednictvím indukce jeho transportních proteinů, což za této situace dále vysvětlilo snížené plazmatické hladiny cholesterolu a poprvé přineslo možné vysvětlení zvýšené tvorby žlučových kamenů u lidí s deplecí železa. U zvířat s nadbytkem železa byl identifikován možný mechanismus zvýšené syntézy cholesterolu prostřednictvím oxidačním stresem aktivované *Srebp2-Hmgcr* kaskády. Současně byla u zvířat s nadbytkem železa

identifikována indukce hlavního enzymu a transportéru pro eliminaci léčiv, což může mít dopad pro farmakokinetiku řady léčiv, která jsou jejich substráty.

Výsledky našich studií přispívají k poznání patofyziologie klinicky často se vyskytujících situací, jakými jsou nedostatek železa vznikající zejména během jeho zvýšených ztrát nebo nadměrné potřeby během těhotenství a nadměrná jaterní kumulace provázející ztukovatění jater během obezity. Proto je vhodné dále studovat klinické důsledky změn hladin železa na patofyziologii těchto onemocnění a dopady na aplikovanou terapii. V řešení této problematiky proto výzkumný tým pokračuje v kooperaci s odborníky z klinické praxe, zejména v oblasti výzkumu těhotenské cholestázy.

9. Použitá literatura

- Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS and Leibold EA (2012) Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1823**:1468-1483.
- Arezes J and Nemeth E (2015) Hepcidin and iron disorders: new biology and clinical approaches. *International journal of laboratory hematology* **37 Suppl 1**:92-98.
- Boyer JL (2013) Bile formation and secretion, in *Comprehensive Physiology* pp 1035-1078.
- Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bendayan M and Levy E (1999) Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats, in *Hepatology (Baltimore, Md)* pp 1809-1817.
- Cermanova J, Kadova Z, Dolezelova E, Zagorova M, Safka V, Hroch M, Laho T, Holeckova M, Mokry J, Kovarikova P, Bures J, Sterba M and Micuda S (2014) Deferoxamine but not dexrazoxane alleviates liver injury induced by endotoxemia in rats, in *Shock (Augusta, Ga)* pp 372-379.
- Coppin H, Darnaud V, Kautz L, Meynard D, Aubry M, Mosser J, Martinez M and Roth MP (2007) Gene expression profiling of Hfe^{-/-} liver and duodenum in mouse strains with differing susceptibilities to iron loading: identification of transcriptional regulatory targets of Hfe and potential hemochromatosis modifiers. *Genome biology* **8**:R221.
- Darshan D, Frazer DM, Wilkins SJ and Anderson GJ (2010) Severe iron deficiency blunts the response of the iron regulatory gene Hamp and pro-inflammatory cytokines to lipopolysaccharide. *Haematologica* **95**:1660-1667.
- Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fargion S and Valenti L (2011) Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: a promising therapeutic target. *J Hepatol* **55**:920-932.
- Dongiovanni P, Petta S, Mannisto V, Mancina RM, Pipitone R, Karja V, Maggioni M, Kakela P, Wiklund O, Mozzi E, Grimaudo S, Kaminska D, Rametta R, Craxi A, Fargion S, Nobili V, Romeo S, Pihlajamaki J and Valenti L (2015) Statin use and non-alcoholic steatohepatitis in at risk individuals. *J Hepatol* **63**:705-712.
- Esteller A (2008) Physiology of bile secretion. *World J Gastroenterol* **14**:5641-5649.
- Eyssen HJ, De Pauw G and Van Eldere J (1999) Formation of hyodeoxycholic acid from muricholic acid and hyocholic acid by an unidentified gram-positive rod termed HDCA-1 isolated from rat intestinal microflora. *Applied and environmental microbiology* **65**:3158-3163.
- Fleming RE and Ponka P (2012) Iron overload in human disease, in *The New England journal of medicine* pp 348-359.
- Geier A, Wagner M, Dietrich CG and Trauner M (2007) Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochimica et biophysica acta* **1773**:283-308.

- Graham RM, Chua AC, Carter KW, Delima RD, Johnstone D, Herbison CE, Firth MJ, O'Leary R, Milward EA, Olynyk JK and Trinder D (2010) Hepatic iron loading in mice increases cholesterol biosynthesis. *Hepatology (Baltimore, Md)* **52**:462-471.
- Halilbasic E, Claudel T and Trauner M (2013) Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond, in *Journal of hepatology* pp 155-168.
- Hofer T, Marzetti E, Seo YA, Xu J, D. Knutson M and Leeuwenburgh C (2008) *Mechanisms of iron regulation and oxidative stress in sarcopenia and neurodegenerative diseases*. Research Signpost. ISBN 978-81-308-0267-1.
- Horton JD, Goldstein JL and Brown MS (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation* **109**:1125-1131.
- Chen Y, Day SD, Wick AF, Strahm BD, Wiseman PE and Daniels WL (2013) Changes in soil carbon pools and microbial biomass from urban land development and subsequent post-development soil rehabilitation. *Soil Biology and Biochemistry* **66**:38-44.
- Chiang JY (2004) Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol* **40**:539-551.
- Chiang JY (2013) Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol* **3**:1191-1212.
- Choi J, Cooper KL, Hensle TW and Fisch H (2001) Incidence and surgical repair rates of hypospadias in New York state. *Urology* **57**:151-153.
- Kamei A, Watanabe Y, Ishijima T, Uehara M, Arai S, Kato H, Nakai Y and Abe K (2010) Dietary iron-deficient anemia induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study, in *Physiological Genomics* pp 149-156.
- Kim TH, Kim H, Park JM, Im SS, Bae JS, Kim MY, Yoon HG, Cha JY, Kim KS and Ahn YH (2009) Interrelationship between liver X receptor alpha, sterol regulatory element-binding protein-1c, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, and small heterodimer partner in the transcriptional regulation of glucokinase gene expression in liver. *J Biol Chem* **284**:15071-15083.
- Kuntz and Kuntz (2008) *Hepatology*. Springer Medizin Verlag Heidelberg. ISBN 978-3-540-76838-8
- Lawen A and Lane DJ (2013) Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxidants & redox signaling* **18**:2473-2507.
- Li T and Chiang JY (2012) Bile Acid signaling in liver metabolism and diseases. *Journal of lipids* **2012**:754067.
- Li T and Chiang JY (2015) Bile acids as metabolic regulators. *Current opinion in gastroenterology* **31**:159-165.
- Liang H, Huang H, Tan PZ, Liu Y, Nie JH, Zhang YT, Zhang KL, Diao Y, He Q, Hou BY, Zhao TT, Li YZ, Lv GX, Lee KY, Gao X and Zhou LY (2017) Effect of iron on cholesterol 7alpha-hydroxylase expression in alcohol-induced hepatic steatosis in mice. *Journal of lipid research* **58**:1548-1560.
- Ludwig H, Evstatiev R, Kornek G, Aapro M, Bauernhofer T, Buxhofer-Ausch V, Fridrik M, Geissler D, Geissler K, Gisslinger H, Koller E, Kopetzky G, Lang A, Rumpold H, Steurer M, Kamali H and Link H (2015) Iron metabolism and iron supplementation in cancer patients. *Wiener klinische Wochenschrift* **127**:907-919.
- Madsen DC, Chang L and Wostmann B (1975) w-Muricholate: a tertiary bile acid of the Wistar rat. *Proc Indiana Acad Sc* **84**.
- Matsuoka K and Yamamoto A (2017) Study on Micelle Formation of Bile Salt Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Oleo Sci* **66**:1129-1137.

- Mehta KJ, Coombes JD, Briones-Orta M, Manka PP, Williams R, Patel VB and Syn WK (2018) Iron Enhances Hepatic Fibrogenesis and Activates Transforming Growth Factor-beta Signaling in Murine Hepatic Stellate Cells. *The American journal of the medical sciences* **355**:183-190.
- Morita SY and Terada T (2014) Molecular mechanisms for biliary phospholipid and drug efflux mediated by ABCB4 and bile salts. *Biomed Res Int* **2014**:954781.
- Munoz M, Villar I and Garcia-Erce JA (2009) An update on iron physiology, in *World journal of gastroenterology* pp 4617-4626.
- Najafzadeh H, Jalali MR, Morovvati H and Taravati F (2010) Comparison of the prophylactic effect of silymarin and deferoxamine on iron overload-induced hepatotoxicity in rat. *Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology* **6**:22-26.
- Nishanth RP, Ramakrishna BS, Jyotsna RG, Roy KR, Reddy GV, Reddy PK and Reddanna P (2010) C-Phycocyanin inhibits MDR1 through reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 mediated pathways in human hepatocellular carcinoma cell line. *European journal of pharmacology* **649**:74-83.
- Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y and Kawada N (2008) Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* **294**:R311-320.
- Padda RS, Gkouvatsos K, Guido M, Mui J, Vali H and Pantopoulos K (2015) A high-fat diet modulates iron metabolism but does not promote liver fibrosis in hemochromatotic H₂h₂y^{-/-} mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **308**:G251-261.
- Pamuk GE, Umit H, Harmandar F and Yesil N (2009) Patients with iron deficiency anemia have an increased prevalence of gallstones. *Annals of hematology* **88**:17-20.
- Peretz G, Link G, Pappo O, Bruck R and Ackerman Z (2006) Effect of hepatic iron concentration reduction on hepatic fibrosis and damage in rats with cholestatic liver disease. *World J Gastroenterol* **12**:240-245.
- Philippe MA, Ruddell RG and Ramm GA (2007) Role of iron in hepatic fibrosis: one piece in the puzzle. *World J Gastroenterol* **13**:4746-4754.
- Prasad PC, Gupta S and Kaushik N (2015) To study serum iron levels in patients of gall bladder stone disease and to compare with healthy individuals. *The Indian journal of surgery* **77**:19-22.
- Reshetnyak VI (2013) Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World J Gastroenterol* **19**:7341-7360.
- Ruiz ML, Villanueva SS, Luquita MG, Ikushiro S, Mottino AD and Catania VA (2007) Beneficial effect of spironolactone administration on ethynylestradiol-induced cholestasis in the rat: involvement of up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2. *Drug Metab Dispos* **35**:2060-2066.
- Seo K and Shin SM (2017) Induction of Lipin1 by ROS-Dependent SREBP-2 Activation. *Toxicological research* **33**:219-224.
- Silva M, da Costa Guerra JF, Sampaio AF, de Lima WG, Silva ME and Pedrosa ML (2015) Iron dextran increases hepatic oxidative stress and alters expression of genes related to lipid metabolism contributing to hyperlipidaemia in murine model. *Biomed Res Int* **2015**:272617.
- Stangl GI and Kirchgessner M (1998) Different degrees of moderate iron deficiency modulate lipid metabolism of rats. *Lipids* **33**:889-895.
- Tempel W, Grabovec I, MacKenzie F, Dichenko YV, Usanov SA, Gilep AA, Park HW and Strushkevich N (2014) Structural characterization of human cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Lipid Res* **55**:1925-1932.

- Valenti L, Fracanzani AL, Bugianesi E, Dongiovanni P, Galmozzi E, Vanni E, Canavesi E, Lattuada E, Roviario G, Marchesini G and Fargion S (2010) HFE genotype, parenchymal iron accumulation, and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **138**:905-912.
- Van Erpecum KJ (2011) Pathogenesis of cholesterol and pigment gallstones: an update. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* **35**:281-287.
- Wang DQ and Carey MC (1996) Complete mapping of crystallization pathways during cholesterol precipitation from model bile: influence of physical-chemical variables of pathophysiologic relevance and identification of a stable liquid crystalline state in cold, dilute and hydrophilic bile salt-containing systems. *J Lipid Res* **37**:606-630.
- Yu C, Wang F, Kan M, Jin C, Jones RB, Weinstein M, Deng CX and McKeehan WL (2000) Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. *The Journal of biological chemistry* **275**:15482-15489.
- Zinchuk V, Zinchuk O and Okada T (2005) Experimental LPS-induced cholestasis alters subcellular distribution and affects colocalization of Mrp2 and Bsep proteins: a quantitative colocalization study. *Microscopy research and technique* **67**:65-70.

10. Přehled publikační činnosti

Prvoautorské publikace:

1. Prasnicka A, Cermanova J, Hroch M, Dolezelova E, Rozkydalova L, Smutny T, Carazo A, Chladek J, Lenicek M, Nachtigal P, Vitek L, Pavek P, Micuda S. Iron depletion induces hepatic secretion of biliary lipids and glutathione in rats. *Biochim Biophys Acta*. 2017; 1862:1469-80 (IF2017- 4,966)

2. Prasnicka A, Lastuvkova H, Faradonbeh FA, Cermanova J, Hroch M, Mokry J, Dolezelova E, Pavek P, Zizalova K, Vitek L, Nachtigal P, Micuda S. Iron overload reduces synthesis and elimination of bile acids in rat liver. *Scientific Reports-V REVIZI* (IF2017-4,122)

Spoluautorské publikace:

3. Vicen M, Vitverova B, Havelek R, Blazickova K, Machacek M, Rathouska J, Najmanová I, Dolezelova E, **Prasnicka A**, Sternak M, Bernabeu C, Nachtigal P. Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction in vivo and in vitro. *Faseb j*: fj201802245R. (IF2017- 5.595)

4. Kostallari E, Hirsova P, **Prasnicka A**, Verma VK, Yaqoob U, Wongjarupong N, Roberts LR, Shah VH. Hepatic stellate cell-derived PDGFR α -enriched extracellular vesicles promote liver fibrosis in mice through SHP2. *Hepatology*. 2018 Jan 23. doi: 10.1002/hep.29803 (IF2018- 13,246)

5. Dolezelova E, **Prasnicka A**, Cermanova J, Carazo A, Hyrsova L, Hroch M, Mokry J, Adamcova M, Mrkvicova A, Pavek P, Micuda S. Resveratrol modifies biliary secretion of

cholephilic compounds in sham-operated and cholestatic rats. *World J Gastroenterol.* 2017; 23(43): 7678-7692 (IF2017- 3,365)

6. Varejkova M, Gallardo-Vara E, Vicen M, Vitverova B, Fikrova P, Dolezelova E, Rathouska J, **Prasnicka A**, Blazickova K, Micuda S, Bernabeu C, Nemeckova I, Nachtigal P. Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF- κ B and IL-6 in cultured human endothelial cells. *Life Sci.* 2017;175:52-60. (IF2017- 2,685)

7. Cermanova J, Prasnicka A, Dolezelova E, Rozkydalova L, Hroch M, Chládek J, Tomsik P, Kloeting I, Micuda S. Pharmacokinetics of boldine in control and Mrp2-deficient rats. *Physiol Res* 2016;65(Supplementum 4):S489-S497. (IF2016- 1,646)

8. Zagorova M, **Prasnicka A**, Kadova Z, Dolezelova E, Kazdova L, Cermanova J, Rozkydalova L, Hroch M, Mokry J, Micuda S. Boldine attenuates cholestasis associated with nonalcoholic fatty liver disease in hereditary hypertriglyceridemic rats fed by high-sucrose diet. *Physiol Res* 2015;64 Suppl 4:S467-76. (IF2015- 1,293)

Prezentace:

Prasnicka A, Lastuvkova H, Faradonbeh FA, Cermanova J, Hroch M, Mokry J, Dolezelova E, Pavek P, Zizalova K, Vitek L, Nachtigal P, Micuda S. Iron overload reduces synthesis and biliary secretion of bile acids in rats. 15th International Medical Postgraduate Conference 21-22.10 2018, Hradec Králové

Prasnicka A, Lastuvkova H, Faradonbeh FA, Cermanova J, Hroch M, Mokry J, Dolezelova E, Pavek P, Zizalova K, Vitek L, Nachtigal P, Micuda S. Iron overload reduces synthesis and biliary secretion of bile acids in rats. 14th Postgraduate Medical Students Conference, 22.10.2018, Hradec Králové

Prasnicka A, Cermanova J, Hroch M, Dolezelova E, Rozkydalova L, Smutny T, Carazo A, Chladek J, Lenicek M, Nachtigal P, Vitek L, Pavek P, Micuda S. Cholestasis induced by iron depletion in rats. 12th Postgraduate Medical Students Conference, 24.10.2016, Hradec Králové

Plakátová sdělení na odborných setkáních

Prasnicka A, Lastuvkova H, Faradonbeh FA, Cermanova J, Hroch M, Mokry J, Dolezelova E, Pavek P, Zizalova K, Vitek L, Nachtigal P, Micuda S. Modification of bile acid homeostasis by iron overload in rats. 87th EAS Congress, 26-28.5.2019, Maastricht, Nizozemsko

Prasnicka A, Lastuvkova H, Faradonbeh FA, Cermanova J, Hroch M, Mokry J, Dolezelova E, Pavek P, Zizalova K, Vitek L, Nachtigal P, Micuda S. Alteration of cholesterol and bile acid homeostasis by iron overload in rats. XXII kongres o ateroskleróze, 6-9.12.2018, Olomouc

Prasnicka A, Cermanova J, Dolezelova E , Chladek J, Faradonbeh FA, Mokry J, Lenicek M, Nachtigal P, Vitek L, Pavek P, Micuda S. Iron overload reduces synthesis and biliary secretion of bile acids in rats. 67. Farmakologické dny, 2-4.10.2017, Stará Lesná, Slovensko