

SOUHRN

Játra jsou životně důležitým orgánem zajišťujícím řadu homeostatických funkcí. Stěžejní úloha jater je při tvorbě a sekreci žluči, vychytávání, detoxikaci a vylučování endogenních látek a xenobiotik.

Tvorba žluče je důležitá jak pro absorpci lipidů ve střevě, tak pro vylučování různých endogenních látek a xenobiotik (např. žlučové kyseliny, bilirubin, cholesterol, fosfolipidy a léčiva). Tato funkce je výrazně porušena během extrahepatální a intrahepatální cholestázy, tj. stavu charakterizovaném částečnou nebo úplnou zástavou toku žluče. Dochází k jaterní a následně i k systémové kumulaci toxických látek typu žlučových kyselin a bilirubinu, které mohou v závislosti na intenzitě a době trvání cholestázy podmínit vážné poškození organismu. Ve snaze kompenzovat vzniklou situaci se aktivují tzv. spontánní anticholestatické obranné mechanismy, jejichž účelem je zmírnit stav pomocí alespoň částečného přesměrování exkrece daných látek z jater do ledvin. Podstatou tohoto procesu je změna exprese, lokalizace a funkce odpovědných transportních proteinů v játrech a ledvinách. Druhým mechanismem, který významně ovlivňuje tvorbu žluče a pohyb látek mezi krví a žlučí, je tzv. hematobiliární bariéra tvořená intercelulárními kontakty typu „tight-junctions“ (těsné spoje) a „gap-junctions“. Zatímco „gap-junctions“ slouží k výměně látek mezi buňkami, „tight-junctions“ tvoří právě tu bariéru mezi krví a žlučí, jejíž kvalita spolu s transportními procesy na hepatocytech řídí tvorbu žluče. Je prokázáno, že těsné spoje regulují pohyb iontů, vody a rozpuštěných látek paracelulárními prostory mezi hepatocyty.

V rámci této dizertační práce byly studovány oba mechanismy odpovědné za tvorbu a sekreci žluče – transportní proteiny a hematobiliární bariéra. Dále byly studovány akutní a chronickou obstrukční cholestázou navozené změny exprese transportérů a integrity hematobiliární bariéry a změny farmakokinetiky léčiv, které jsou substráty pro vybrané transportní proteiny. V první studii jsme se zaměřili na sledování změn biliární a renální exkrece rhodaminu 123, substrátu P-glykoproteinu (P-gp), u potkanů s akutní a chronickou obstrukční cholestázou navozenou podvazem žlučového vodu v trvání jednoho a sedmi dnů. Již v mnoha studiích byla potvrzena zvýšená exprese P-gp na úrovni mRNA i proteinu během obstrukční cholestázy. Jde prakticky o jediný známý kanalikulární efluxní transportér, jehož exprese je během tohoto patologického stavu indukovaná. Jedním z možných vysvětlení je pokles koncentrace jeho substrátů v hepatocytech a následně i na kanalikulární membráně v důsledku snížené exprese bazolaterálních „Organic cation transporter 1“ (OCT1) a „Organic anion transporting polypeptide

1a4“ (Oatp1a4) transportérů pro vylučování látek z krve. Tento fakt by mohl i částečně vysvětlit nesrovnalost mezi zvýšenou expresí P-gp a nezměněnou, resp. sníženou biliární exkrecí rhodaminu 123. Porovnáním renální a biliární exkrece bylo zjištěno, že rhodamin 123 je vylučován především ledvinami, zatímco játra přispívají k jeho exkreci do žluče jenom z 23 %. Pozorovaná snížená produkce žluči a biliární exkrece rhodaminu 123 během akutní cholestázy a zachovaná exkrece do žluče během chronické cholestázy je v rozporu se zvýšenou expresí P-gp v játrech. Částečně lze tento fakt vysvětlit na základě fyzikálně-chemických vlastností léčiva. Jedná se o fluorescenční barvivo, které za fyziologického pH nese kladný náboj. Navzdory předpokladu, že rhodamin 123 vstupuje do hepatocytu pasivní difúzí, je nutno, vzhledem k jeho částečné rozpustnosti ve vodě, také počítat s příspěvkem aktivního transportu přes bazolaterální membránu hepatocytu zprostředkovaného Oct1 transportérem. Dalším vysvětlením zvýšené exprese P-gp během cholestázy je zvýšená kumulace lipofilních endogenních i exogenních látek, které prostupují bazolaterální membránou hepatocytů především pasivní difúzí a následně aktivují nukleární faktory (CAR, PXR), které regulují expresi P-gp. Rhodamin 123 je aktivně vylučován do moče prostřednictvím P-gp a změny v expresi tohoto transportéru jsou doprovázeny změnami v renální tubulární sekreční clearance jeho substrátů. Během akutní cholestázy byla tubulární sekreční clearance rhodaminu 123 a exprese P-gp zachována, což bylo vysvětleno již dříve prokázaným nefroprotektivním efektem cytokinů. Sníženou renální exkreci a clearance rhodaminu 123 během chronické cholestázy lze vysvětlit sníženou expresí P-gp. V této studii použitý model extrahepatální cholestázy s obnoveným tokem žluči poskytuje možnost studia funkčních následků cholestázy pro farmakokinetiku a farmakodynamiku endogenních látek i xenobiotik.

Druhá práce se zabývá sledováním změn permeability hematobiliární bariéry za použití rhamnózo/melibiózového permeabilitního testu během akutní obstrukční cholestázy navozené u potkanů podvazem žlučového vodu v trvání jednoho dne. Biliární exkrece obou cukrů byla zvýšená během prvních 60 minut experimentu (z celkových 240 minut) po jejich i.v. aplikaci. V případě kumulativní biliární exkrece byl poměr rhamnóza/melibióza zvýšený během celého experimentu. Biliární exkrece byla v porovnání s renální eliminací obou cukrů zanedbatelná. V případě i.v. aplikace rhamnózy probíhá exkrece především ledvinami s 65% podílem u potkanů a 74% podílem u lidí. Předpokládá se, že zbytek aplikované dávky rhamnózy je metabolizován na rozdíl od melibiózy, která metabolismu nepodléhá. V naší studii činila exkrece rhamnózy 62 %

z podané dávky a exkrece melibiózy 71 % z podané dávky s vysoce převažujícím podílem renální exkrece. U obou cukrů nebyla exkrece do moče ovlivněna akutní cholestázou. Z poměru koncentrace plazma/žluč rhamnózy vyplývá, že rhamnóza prochází hepatocyty podobně jako enterocyty prostřednictvím pasivní difúze a že se rychle vyrovnávají její koncentrace mezi plazmou a nově vytvořenou žlučí. Z výsledků studie vyplývá, že námi zvolený permeabilitní test je vhodný pro studium změny integrity hematobiliární bariéry během akutní cholestázy u potkanů. Tento test prokázal, že hematobiliární bariéra je více propustná během akutní cholestázy a toto poškození lze spolehlivě měřit během prvních 60 minut po podání obou cukrů.

Ve třetí studii jsme se zaměřili na sledování změn farmakokinetiky metotrexátu (MTX) za použití *in vivo* modelu extrahepatální (podvaz žlučovodu v trvání jednoho a sedmi dnů) a intrahepatální cholestázy (aplikace lipopolysacharidu, LPS) u potkanů společně se sledováním změn exprese základních transportérů pro MTX na úrovni mRNA i proteinu. Paralelně byla hodnocena kinetika konjugovaného bilirubinu, endogenního substrátu Mrp2, která se běžně používá pro posouzení závažnosti cholestázy. U lidí je biliární exkrece odpovědná za eliminaci 10–30 % z aplikované dávky MTX. Příspěvek transportních proteinů v játrech na exkreci MTX se však zdá být značně vyšší, jelikož poměr biliární/renální exkrece je 0,94, což naznačuje významnou enterohepatální cirkulaci a aktivní reabsorpci léčiva z gastrointestinálního traktu. Některé kinetické studie naznačují, že biliární exkrece léčiv je během extrahepatální cholestázy poškozena. Také v této studii byla biliární exkrece a biliární clearance MTX během extrahepatální cholestázy snížena, což vedlo k významnému poklesu jeho systémové clearance. V porovnání s extrahepatální cholestázou nebyl pokles biliární clearance u intrahepatální cholestázy tak výrazný. Změna exprese transportérů pro MTX v játrech částečně odpovídá změnám biliární eliminace léčiva. Konkrétně se jedná o tyto transportéry: (1) pro import MTX do hepatocytů – „Organic anion transporting polypeptide 1a1, 1a4 a 1b2“ (Oatp1a1, Oatp1a4 a Oatp1b2); (2) pro exkreci MTX do žluče – „Multidrug resistance-associated protein 2“ (Mrp2) a „Breast cancer resistance protein“ (Bcrp); (3) pro exkreci MTX z hepatocytů zpět do plazmy - „Multidrug resistance-associated protein 3 a 4“ (Mrp3 a Mrp4). Změny exprese transportérů na úrovni proteinu korelují se změnami na úrovni mRNA, což svědčí pro transkripční regulaci jejich exprese během extrahepatální cholestázy. Aplikace LPS vedla ke změnám exprese transportérů většinou na úrovni mRNA. Pouze Oatp1b2 a Mrp3 byly ovlivněny na úrovni proteinu. Ačkoli vedla obstrukční cholestáza ke zvýšení renální exkrece MTX, renální clearance léčiva byla

zvýšená nesignifikantně. To dokazuje, že zvýšená exprese renálních efluxních transportérů (např. Mrp2) není schopna kompenzovat systémovou kumulaci látek typu organických aniontů během extrahepatální cholestázy. Na druhou stranu může indukce Mrp2 chránit buňky proximálních tubulů před kumulací MTX, a tak přispívat k nefroprotektivnímu efektu akutní cholestázy. Zvýšená exprese bazolaterálního efluxního transportéru Mrp3 v ledvinách může podpořit tento efekt. Naproti tomu intrahepatální cholestáza vedla ke snížené expresi Mrp2 a Mrp3 v ledvinách. Navíc byla za tohoto patologického stavu pozorována snížená glomerulární filtrace. Proto by mohlo být významné snížení renální clearance MTX připisováno nejen změně exprese transportérů, ale především snížené perfuzi ledvin. Předpokládaným původcem tohoto stavu je produkce cytokinů navozená aplikací LPS v ledvinách. V závěru lze konstatovat, že změny farmakokinetiky MTX a odpovídající změny exprese transportérů ukazují na významné odlišnosti dvou široce používaných modelů cholestázy.