

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Doktorský studijní program  
Lékařská farmakologie**

**Studium potenciálního významu pravastatinu v prevenci  
cholestatického poškození jater**

**The study of the potential importance of pravastatin in the  
prevention of the cholestatic liver impairment**

**Mgr. Gabriela Karlasová (roz. Kolouchová)**

Školitel: Doc. MUDr. Stanislav Mičuda, Ph.D.

Hradec Králové, 2011

Obhajoba dne:

**Prohlášení:**

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

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

**Hradec Králové, říjen 2011**

# PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali během studia a tak přispěli i k této práci. Můj největší dík patří Doc. MUDr. Stanislavovi Mičudovi, Ph.D., mému školiteli, který mě svým odborným a přátelským přístupem vedl během studia a jehož rady a připomínky mi byly cenným přínosem.

Zvláště ráda bych poděkovala Mgr. Petře Hiršové a MUDr. Jolaně Cermanové, Ph.D. za podnětnou spolupráci při řešení problematiky studia, PharmDr. Evě Doleželové, Ph.D., Ing. Hance Laštůvkové a Lence Kriesfalusyové za pomoc v oblasti praktické. Poděkování náleží také Prof. MUDr. Vladimíru Geršlovi, CSc., přednostovi Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové, za osobní podporu a všem ostatním spolupracovníkům na Ústavu Farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové za vytvoření příjemných pracovních podmínek pro realizaci mé práce.

V neposlední řadě patří dík mým rodičům a manželovi Alešovi za podporu, kterou mi během studia projevovali.

Tato dizertační práce byla finančně podpořena výzkumným záměrem MŠMT 0021620820 a granty GA UK 122 408/2008C, SVV-2010-260907 a SVV-2011-262901.

# OBSAH

1	ÚVOD.....	12
1.1	Základní anatomie, histologie a fyziologie jater .....	12
1.2	Metabolizmus žlučových kyselin .....	16
1.2.1	Syntéza žlučových kyselin.....	17
1.2.2	Regulace syntézy žlučových kyselin .....	18
1.2.2.1	CYP7A1 .....	18
1.2.2.2	CYP8B1.....	20
1.2.2.3	CYP27A1 .....	20
1.2.3	Tok žluči .....	21
1.2.3.1	Transportní systémy v játrech.....	21
1.2.3.1.1	Bazolaterální uptake žlučových kyselin .....	22
1.2.3.1.2	Bazolaterální eflux žlučových kyselin.....	23
1.2.3.1.3	Intracelulární transport žlučových kyselin .....	23
1.2.3.1.4	Kanalikulární exkrece žlučových kyselin.....	24
1.2.3.2	Cholangiocelulární transport žlučových kyselin .....	25
1.2.3.3	Intestinální transport žlučových kyselin.....	26
1.2.4	Regulace metabolismu žlučových kyselin .....	26
1.2.5	Hematobiliární bariéra.....	26
1.3	Metabolizmus cholesterolu.....	28
1.3.1	Lipoproteiny .....	28
1.3.2	Transport cholesterolu .....	29
1.3.3	Lipoproteinové receptory .....	31
1.3.3.1	LDL-receptor .....	31
1.3.3.2	VLDL-receptor .....	32
1.3.3.3	Scavengerové receptory.....	32
1.3.3.3.1	SR-A receptor .....	32
1.3.3.3.2	SR-B receptor .....	32
1.3.3.4	ABCA1 .....	33
1.3.4	Syntéza cholesterolu .....	33
1.3.5	Regulace syntézy cholesterolu.....	34
1.3.5.1	Dlouhodobá regulace.....	34
1.3.5.2	Krátkodobá regulace.....	35
1.3.5.3	Farmakologická regulace.....	35
1.3.6	Exkrece cholesterolu.....	35
1.3.7	Regulace exkrece cholesterolu .....	35
1.3.7.1	FXR .....	36
1.3.7.2	LXR .....	36
1.3.7.3	PPAR- $\alpha$ .....	37
1.3.7.4	LRH-1 .....	38
1.4	Metabolizmus železa .....	39
1.4.1	Transport železa.....	39
1.4.2	Regulace homeostázy železa .....	42
1.4.2.1	Regulace intracelulární homeostázy železa.....	43
1.4.2.2	Regulace vstřebávání železa.....	43
1.4.2.3	Systémová homeostáza železa.....	44
1.5	Cholestáza.....	47
1.5.1	Klinický obraz cholestázy .....	48



1.5.2	Laboratorní známky cholestázy.....	48
1.5.3	Histologické známky cholestázy .....	48
1.5.4	Molekulární mechanismus cholestázy.....	49
1.5.5	Farmakoterapie cholestázy .....	50
1.5.5.1	Kyselina ursodeoxycholová (UDCA).....	51
1.5.5.2	Rifampicin .....	52
1.5.5.3	Fenobarbital .....	52
1.5.5.4	S-adenosyl-L-methionin (SAME) .....	52
1.5.5.5	Bezafibrát.....	52
1.5.5.6	Ovlivnění nukleárních receptorů CAR, PXR a FXR v léčbě cholestatických onemocnění.....	53
1.5.5.7	Další terapie .....	53
1.6	Statiny .....	54
1.6.1	Mechanismus účinku.....	54
1.6.2	Pleiotropní účinky statinů.....	55
1.6.3	Statiny v léčbě cholestázy.....	55
2	CÍLE PRÁCE .....	57
3	METODY .....	58
3.1	Chemikálie.....	58
3.2	Pokusná zvířata.....	58
3.3	In vivo studie .....	59
3.4	Analytické metody.....	59
3.5	RT-PCR .....	61
3.6	Western blot.....	64
3.7	Histologické vyšetření jater .....	65
3.8	Statistická analýza .....	66
4	VÝSLEDKY.....	67
4.1	Hodnocení celkové toxicity .....	67
4.1.1	Mortalita .....	67
4.1.2	Změny tělesné hmotnosti.....	68
4.1.3	Změny hmotnosti jater.....	68
4.2	Histologické vyšetření jater.....	69
4.3	Expresí indikátorů proliferace a fibrogenese.....	72
4.4	Biochemické vyšetření plazmy.....	74
4.5	Metabolismus žlučových kyselin .....	75
4.5.1	Tok žluči .....	75
4.5.2	Expresí genů zapojených do homeostázy žlučových kyselin .....	76
4.6	Metabolismus cholesterolu.....	78
4.6.1	Biliární exkrece cholesterolu .....	78
4.6.2	Obsah cholesterolu a triglyceridů v játrech .....	78
4.6.3	Expresí genů zapojených do homeostázy cholesterolu.....	79
4.7	Metabolismus železa .....	80
4.7.1	Koncentrace železa v plazmě .....	80
4.7.2	Obsah železa v játrech .....	82
4.7.3	Expresí genů zapojených do homeostázy železa .....	83
4.7.4	Expresí molekul zapojených do homeostázy železa na úrovni proteinu .	84
4.8	Expresí vybraných nukleárních receptorů .....	88
4.9	Permeabilita hematobiliární bariéry .....	89
4.9.1	Koncentrace melibiózy a rhamnózy v plazmě.....	89
4.9.2	Biliární exkrece melibiózy a rhamnózy.....	90

4.9.3	Poměr biliární exkrece melibiózy a rhamnózy .....	93
4.10	Farmakokinetika pravastatinu v průběhu chronické obstrukční cholestázy .....	96
5	DISKUZE .....	98
5.1	Hodnocení celkové toxicity .....	98
5.2	Metabolismus žlučových kyselin .....	99
5.3	Metabolismus bilirubinu .....	102
5.4	Hematobiliární bariéra .....	103
5.5	Metabolismus cholesterolu .....	104
5.6	Metabolismus železa .....	106
6	ZÁVĚR .....	109
7	SOUHRN .....	111
8	SUMMARY .....	113
9	POUŽITÁ LITERATURA .....	115
10	PŘÍLOHY .....	134

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Lalůček centrální vény.....	13
Obrázek 2: Portální lalůček.....	13
Obrázek 3: Složení žluči.....	16
Obrázek 4: Syntéza žlučových kyselin.....	18
Obrázek 5: Regulace CYP7A1.....	19
Obrázek 6: Regulace CYP8B1.....	20
Obrázek 7: Regulace CYP27A1.....	21
Obrázek 8: Jaterní homeostáza žlučových kyselin.....	25
Obrázek 9: Hematobliární bariéra.....	27
Obrázek 10: Lipoproteinová částice.....	29
Obrázek 11: Fentonova reakce.....	39
Obrázek 12: Degradace hemu.....	41
Obrázek 13: Regulace hepcidinu cestou IL-6/STAT3.....	45
Obrázek 14: Regulace hepcidinu cestou BMP/SMAD.....	46
Obrázek 15: Histologické vyšetření jater.....	70
Obrázek 16: Změny v expresi jaterních transportních proteinů a enzymů majících důležitou úlohu v metabolismu žlučových kyselin v průběhu neléčené a pravastatinem léčené obstrukční cholestázy u potkanů.....	101
Obrázek 17: Změny v expresi jaterních transportních proteinů, enzymů a receptorů majících důležitou úlohu v metabolismu cholesterolu v průběhu neléčené a pravastatinem léčené obstrukční cholestázy u potkanů.....	106
Obrázek 18: Změny v expresi jaterních transportních proteinů a regulačních molekul majících důležitou úlohu v metabolismu železa v průběhu neléčené a pravastatinem léčené obstrukční cholestázy u potkanů.....	108

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam použitých genů.....	62
Tabulka 2: Seznam použitých protilátek.....	65
Tabulka 3: Biochemické vyšetření plazmy.....	74
Tabulka 4: Expres vybraných genů zapojených do homeostázy žlučových kyselin a bilirubinu.....	77
Tabulka 5: Expres vybraných genů zapojených do homeostázy cholesterolu.....	80
Tabulka 6: Expres vybraných genů zapojených do homeostázy železa.....	83
Tabulka 7: Relativní exprese vybraných nukleárních receptorů na úrovni mRNA.....	88

## Seznam grafů

Graf 1: Kaplan-Meierova křivka přežití zvířat.....	67
Graf 2: Tělesná hmotnost zvířat v průběhu studie.....	68
Graf 3: Hmotnost jater potkanů.....	69
Graf 4: Expres vybraných indikátorů proliferace (PCNA), fibrogenyze ( $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ ) a HO-1 v játrech na úrovni proteinu.....	73
Graf 5: Tok žluči a biliární exkrece stanovené v intervalu 0-30.....	75
Graf 6: Biliární exkrece (BE) cholesterolu.....	78
Graf 7: Obsah cholesterolu a triglyceridů v játrech.....	79

Graf 8: Koncentrace železa v plazmě, exprese transferinu na úrovni proteinu a jeho saturace. ....	81
Graf 9: Koncentrace železa v játrech přepočítaná na g jater (a) a obsah železa přepočítaný na celá játra (b). ....	82
Graf 10: Expese HO-1 v játrech (a) a ve slezině (b) na úrovni proteinu.....	84
Graf 11: Obsah hepcidinu v plazmě (a) a játrech (b) na úrovni proteinu.....	85
Graf 12: Obsah IL-6 v játrech (a) a plazmě (b) na úrovni proteinu.....	86
Graf 13: Expese molekul (feritinu, feroportinu, transferinových receptorů, pSTAT3 a DMT-1) zapojených do homeostázy železa na úrovni proteinu.....	87
Graf 14: Plazmatické koncentrace melibiózy a rhamnózy v průběhu kinetické studie.....	90
Graf 15: Biliární exkrece (BE) melibiózy a rhamnózy v průběhu kinetické studie.....	91
Graf 16: Kumulativní biliární exkrece (BE) melibiózy a rhamnózy v průběhu kinetické studie.....	93
Graf 17: Poměr biliární exkrece (a) a kumulativní biliární exkrece (b) melibiózy a rhamnózy v průběhu kinetické studie.....	95
Graf 18: Koncentrace pravastatinu (a) a jeho laktonu (b) v plazmě a močová exkrece pravastatinu (c) v průběhu chronické obstrukční cholestázy u potkanů.....	97

## POUŽITÉ ZKRATKY

ABC	ATP binding cassette
ACAT 2	acyl-CoA cholesterol acyltransferáza
AMPK	AMP-dependentní proteinkináza
ASBT	apical sodium-dependent bile acid transporter
ALP	alkalická fosfatáza
AST	aspartátaminotransferáza
BARE	bile acid responsive element
BMP	bone morphogenetic protein
BSEP	bile salt export pump
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAR	constitutive androstane receptor
CETP	cholesterol ester transfer protein
CYP7A1	cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxyláza
CYP27A1	sterol-27-hydroxyláza
CYP8B1	sterol-12 $\alpha$ -hydroxyláza
CYP7B1	oxysterol-7 $\alpha$ -hydroxyláza
DcytB	duodenální cytochrom b
DMT-1	divalent metal transporter 1
6-ECDCA	6-ethylchenodeoxycholová kyselina
FGF15	fibroblast growth factor 15
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FXR	farnesoid X receptor
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GMT	$\gamma$ -glutamyltransferáza
Gp130	signalizační podjednotka receptoru pro IL-6
GW4064	3-(2,6-Dichlorophenyl)-4-(3'-carboxy-2-chlorostilben-4-yl) oxymethyl-5isopropylisoxazole
HAMP	gen kódující hepcidin
HCP1	hem carrier protein 1
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HFE2	gen kódující hemochromatózu

HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A
HNF-4 $\alpha$	hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$
HO-1	hemoxygenáza 1
HPLC	high performance liquid chromatography
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza
HTGL	játerní triacylglycerolová lipáza
IDL	lipoprotein o střední hustotě
IGF-1	insulin growth factor-1
Insig 1, 2	insulin induced gene 1, 2
IL-6	interleukin 6
IRE	iron responsive element
IRP	iron regulatory protein
JAKs	Janus kinases
JNK	Jun N-terminus kinase
Keap2	Kelch-like ECH-associated protein 2
Ki67	nuclear cell proliferation-associated antigen 67
LCAT	lecithin: cholesterol acyltransferáza
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
LRH-1	liver receptor homolog 1
LRP	LDL receptor-related protein
LXR	liver X receptor
LXRE	LXR response element
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDR	multidrug resistance protein
MRP	multidrug resistance-associated protein
MTP	microsomal triglyceride transfer protein
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
NPC1L1	Niemann-Pick C1 like1
Nrf2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NTBI	non-transferrin bound iron
NTCP	Na <sup>+</sup> /taurocholate cotransporting polypeptide
OATP	organic anion transporter
OST $\alpha/\beta$	organic solute transporter $\alpha/\beta$
PBC	primární biliární cirhóza

PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PFIC2	progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 2
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	peroxisome proliferator response element
PSC	primární sklerotizující cholangitida
PXR	pregnane X receptor
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
RXR	retinoid X receptor
SAME	S-adenosyl-L-methionin
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SHP	small heterodimer partner
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin
SMAD	intracelulární mediátory mající důležitou úlohu v přenosu signálů z receptorů na cílové jaderné geny
S1P, S2P	site-1 protease, site-2 protease
SPF	specific pathogen free
SR	scavenger receptor
SRE	sterol response element
SREBP-1, 2	sterol regulatory element-binding protein 1, 2
STAT	signal transducer and activator of transcription
SULT	sulfottransferáza
t-ASBT	truncated form of ASBT
TBA	total bile acids
TfR	transferinový receptor
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor $\beta$ 1
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
UDCA	ursodeoxycholová kyselina
UGT	UDP-glukuronosyltransferáza
Uptake	vychytávání
VDR	vitamin D nuclear receptor
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě

Zkratky uvedených transportních proteinů a biotransformačních enzymů jsou napsány velkými písmeny vyskytují-li se u člověka, malými písmeny vyskytují-li se u potkana.

# 1 ÚVOD

## 1.1 Základní anatomie, histologie a fyziologie jater

Játra-*hepar* (ř. *jecur*) jsou měkký, pružný a křehký orgán hnědočervené barvy. Jsou největší a nejtěžší žlázou těla. Hmotnost jater se pohybuje mezi 1200 a 1400 g u žen a mezi 1400 a 1800 g u mužů. Na základě větvení *a. hepatica propria*, *v. portae* a žlučovodů se játra dělí na čtyři základní segmenty. Pravý jaterní lalok má dva základní segmenty: *segmentum anterius* a *segmentum posterius*. Levý jaterní lalok má také dva základní segmenty: *segmentum mediale* a *segmentum laterale* (Dylevský *et al*, 2000, kapitola 4.4). Z hlediska rozmanitosti metabolických pochodů jsou játra nejbohatším orgánem lidského těla. V játrech probíhá metabolismus sacharidů, lipidů a lipoproteinů, syntéza bílkovin i likvidace metabolicky změněných molekul proteinů. Důležitá je úloha jater ve vychytávání, metabolismu a vylučování cizorodých látek včetně léčiv a karcinogenů.

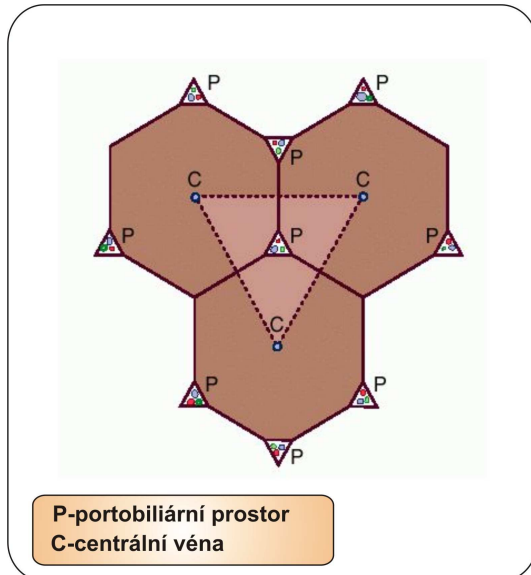
Játra jsou pokryta tenkým vazivovým pouzdrém (*capsula fibrosa hepatis Glissoni*). Pouzdro je zesíleno v hilu, kde do jater vstupuje *vena portae* a *arteria hepatica propria* a kde z jater vystupují *ductus hepaticus dexter* a *sinister* a lymfatické cévy. Základní strukturální komponentou jaterního parenchymu je jaterní buňka – hepatocyt. Hepatocyty jsou uspořádány v typický trámčitý epitel. Trámce jsou obvykle tvořeny dvěma řadami těsně k sobě přiléhajících buněk. Uvnitř trámců jsou uloženy intercelulární žlučovody. V prostorech mezi trámci probíhají jaterní sinusoidy vystlané fenestrovaným endotelem, který od samotných hepatocytů odděluje štěrbinovitý Disseho prostor. V tomto prostoru se nacházejí fagocytující buňky, které patří do monocytomakrofágového systému (Kupfferovy buňky) a hvězdicové buňky strádající tuk (Itovy buňky).

Morfologickou jednotku parenchymu jater představuje lalůček centrální vény – *lobulus venae centralis* (obrázek 1). Je tvořen trámci jaterních buněk, které se sbíhají směrem k centru lalůčku, které představuje centrální véna. Jaterní lalůček má tvar nepravidelného šestibokého hranolu se zaoblenými stěnami. U člověka je vazivové tkáně v játrech málo a lalůčky k sobě těsně přiléhají. Pouze na místech, kde se stýkají tři jaterní lalůčky, se nachází více vaziva. Tato místa představují tzv. portobiliární prostory. V portobiliárním prostoru se nachází žíla (*vena interlobularis*), interlobulární artérie (*arteria interlobularis*) a interlobulární žlučovod. Z vazivové tkáně portobiliárních



prostorů odstupují jemná retikulární vlákna, která tvoří opěrnou síť pro hepatocyty i endotelové buňky jaterních sinusoid (Martínek a Vacek, 2009, kapitola 4).

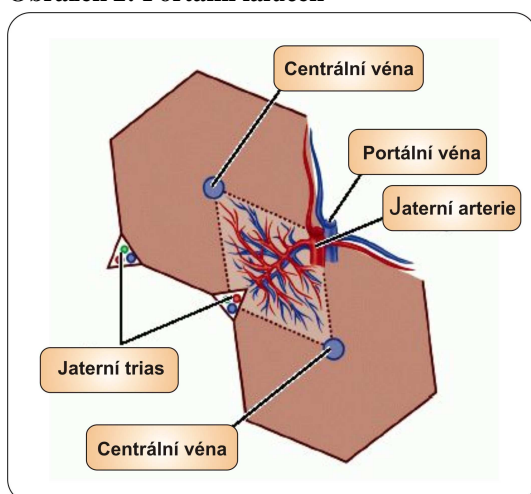
**Obrázek 1: Lalůček centrální vény**



Převzato a upraveno z: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/hepatic+lobules>

Kromě lalůčku centrální vény lze z funkčního hlediska v jaterním parenchymu odlišit ještě lalůček portální – *lobulus venae interlobularis* (obrázek 2). Tento lalůček představuje část jaterního parenchymu, která je zásobována jednou vénou a jednou artérií interlobulární. Žluč je z portálního lalůčku odváděna interlobulárním žlučovodem. Portální lalůček je zhruba trojúhelníkovitý.

**Obrázek 2: Portální lalůček**



Převzato a upraveno z: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/liver+acinus>

*Vena portae* přivádí do jater 60–70 % krve. Tato krev je bohatá na živiny, ale obsahuje jen malé množství kyslíku. Naopak *arteria hepatica propria* dodává krev bohatou na živiny a kyslík. *Vena portae* vstupuje do jater v hilu a opakovaně se v dalším průběhu větví až na *venae interlobulares*. Od interlobulárních vén odstupují větve, které jsou uloženy na periferii jaterního lalůčku jako *venae circumlobulares*. Z nich dále odstupují *venae praecapillares*, které ústí do jaterních sinusoid. Jaterní sinusoidy probíhají jaterním lalůčkem a slévají se do centrální vény (*vena centralis*), která je uložena ve středu lalůčku. Několik centrálních vén se slévá do vény sublobulární (*vena sublobularis*). Spojením sublobulárních vén vznikají dvě nebo více vén jaterních (*venae hepaticae*), které ústí do *vena cava inferior*.

Hepatocyty jsou buňky o velikosti 20–30  $\mu\text{m}$ . Na jejich povrchu směřujícím do Disseho prostoru (bazolaterální membrána/krevní pól) je vyvinuto velké množství mikrokloků, které výrazně zvětšují plochu pro intenzivní výměnu látek mezi krví a hepatocyty. Mezi dvěma hepatocyty vzniká tubulární prostor. V této oblasti byla na buněčné membráně (kanalikulární membrána/žlučový pól) prokázána vysoká aktivita alkalické fosfatázy a adenosintrifosfatázy. Tyto prostory jsou ohraničeny dobře vyvinutými *zonulae ocludentes* a představují intercelulární žlučové vývody. Hepatocyty obsahují jádra, v cytoplasmě se nachází četné ribozomy, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie, ale také lysozomy a peroxizomy. Z inkluzí nacházíme v hepatocytech velké množství glykogenu a tukové kapénky. Hepatocyt je buňka, která plní v organismu největší počet funkcí. Hepatocyty syntetizují proteiny pro vlastní potřebu i pro export. Produkují krevní bílkoviny –albumin, protrombin, fibrinogen, dále transferin a různé lipoproteiny a kontinuálně je uvolňují do krevního oběhu. Z tohoto hlediska někteří autoři zařazují játra mezi žlázy s vnitřní sekrecí (Konrádová *et al*, 2000, kapitola Trávicí systém).

Základní exokrinní funkcí jater je tvorba žluče a její odvod prostřednictvím systému vývodů–žlučovodů. Primární jsou intercelulární žlučové kanálky tvořící anastomozující síť, která se napojuje Herringovými kanálky na interlobulární žlučovody lokalizované v portobiliárních prostorech. Žlučovody se postupně spojují a vytváří tak *ductus hepaticus dexter et sinister*, které opouští játra v jaterním hilu (Konrádová *et al*, 2000, kapitola Trávicí systém). Tyto vývody se spojují mimo játra a vytvářejí *ductus hepaticus communis*. Ten se spojuje s *ductus cysticus*, který vede ze žlučníku, za vzniku společného žlučovodu *ductus choledochus* ústícího do duodena v duodenální papile.

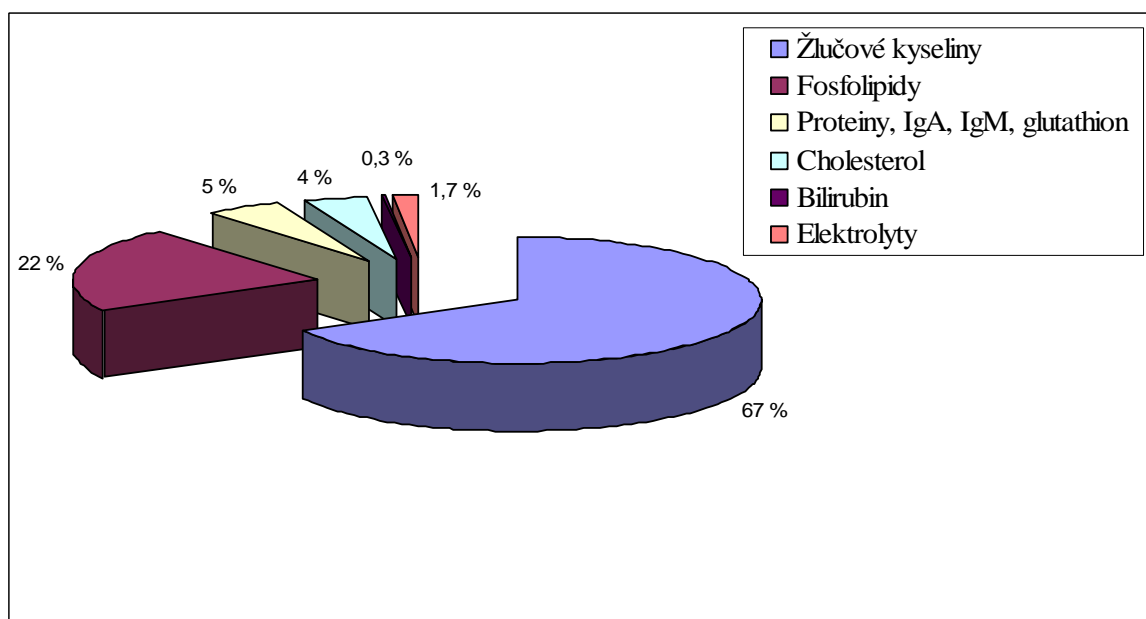
Kolem vyústění je Oddiho svěrač a před vyústěním do duodena se společný žlučovod spojuje s hlavním pankreatickým vývodem (Ganong *et al*, 2005, kapitola 26).

Játra jako jeden z metabolicky nejvýkonnějších a nejvýznamnějších orgánů lidského organismu se podílejí na řadě fyziologických funkcí; účastní se metabolismu hlavních substrátů (sacharidů, lipidů, proteinů), řadu látek syntetizují, podílejí se na metabolismu hormonů i vitaminů, jsou významným depotem řady látek. Neméně významné jsou funkce detoxikační a imunologické. Každá noxa s účinkem na jaterní buňku se pak projeví změněným metabolismem s řadou laboratorních i klinických korelátů. Mezi látky s významným potenciálem ovlivnění výše zmíněných funkcí zařazujeme i farmaka (Wilhelm *et al*, 2007).

## 1.2 Metabolismus žlučových kyselin

Tvorba žluče je řízena osmotickým gradientem tvořeným kontinuální sekrecí jednotlivých komponent (elektrolytů, žlučových kyselin, fosfolipidů, cholesterolu a bilirubinu) z hepatocytů do žlučovodů (obrázek 3). Vzniklý osmotický gradient zajišťuje sekreci vody z krve do žluči skrze kanály nazvané aquaporiny. Hlavní složkou žluče udržující osmotický gradient nezbytný pro její tvorbu jsou soli žlučových kyselin, které tvoří až 67 % suché hmotnosti žluči (Konrádová *et al*, 2000, kapitola Trávicí systém). Ve žluči jsou nejčastěji zastoupenými žlučovými kyselinami kyselina chenodeoxycholová (45 %) a kyselina cholová (31 %), označované jako primární žlučové kyseliny. U vepřů, a potkanů a myši se nachází ještě další primární žlučové kyseliny, kyselina hyocholová a kyselina muricholová. Ve střevě jsou primární žlučové kyseliny činností bakterií přeměňovány na sekundární žlučové kyseliny, kyselinu deoxycholovou (z kyseliny cholové) a lithocholovou (z kyseliny chenodeoxycholové). Jak primární, tak sekundární žlučové kyseliny jsou ve střevě reabsorbovány a transportovány zpět do jater. V játrech je karboxylová skupina žlučových kyselin konjugována s glycinem nebo taurinem za vzniku kyseliny glykocholové a taurocholové. Tento proces sekrece žlučových kyselin z jater do žluči a dále do střeva s následnou reabsorpcí je nazýván enterohepatální cirkulace (Dawson, 2011).

Obrázek 3: Složení žluči



Převzato a upraveno z: Kuntz *et al*, 2008, kapitola 3.

Žlučové kyseliny vykonávají důležité fyziologické funkce:

- Jsou nezbytné pro tvorbu žluče. Jejich sekrece přes membránu hepatocytu proti koncentračnímu gradientu spouští sekreci vody a dalších složek žluče a zajišťuje tak tok žluči.
- Slouží k odstraňování nadbytečného cholesterolu, bilirubinu a dalších odpadních látek z organismu.
- Spolu s fosfolipidy rozpouštějí cholesterol ve žluči a předcházejí tak srážení cholesterolu ve žlučnίκu.
- V tenkém střevě působí jako emulgátory, usnadňují tak trávení a absorpci tuků a lipofilních vitaminů ve střevě.
- Žlučové soli jsou důležitým modulátorem intestinální bakteriální flóry. Je-li narušená sekrece žluče, např. u cirhotických pacientů nebo u zvířat s podvazem žlučovodu, dochází k přemnožení bakterií ve střevě. Uplatňuje se zde jednak přímý inhibiční účinek žlučových kyselin na růst bakterií, ale také nepřímý vliv zprostředkovaný nukleárním receptorem FXR (farnesoid X receptor) aktivovaným samotnými žlučovými kyselinami. Biliární trakt je za fyziologických okolností téměř bez přítomnosti bakterií (Maillette de Buy Wenniger *et al*, 2010).

Žlučové kyseliny jsou tedy na jedné straně nezbytné pro řadu biologických funkcí, ale na straně druhé mohou být, pokud se v organismu kumulují, značně cytotoxické. Vysoká koncentrace hydrofobních žlučových kyselin poškozuje buněčné membrány, mitochondrie a spouští proces apoptózy. Některé žlučové soli nacházejí uplatnění v terapii jaterních, zejména cholestatických, onemocnění, např. ursodeoxycholát, nor-ursodeoxycholát, taurocholát a 6-ethyl chenodeoxycholát (Mareček, 2007; Binder *et al*, 2006).

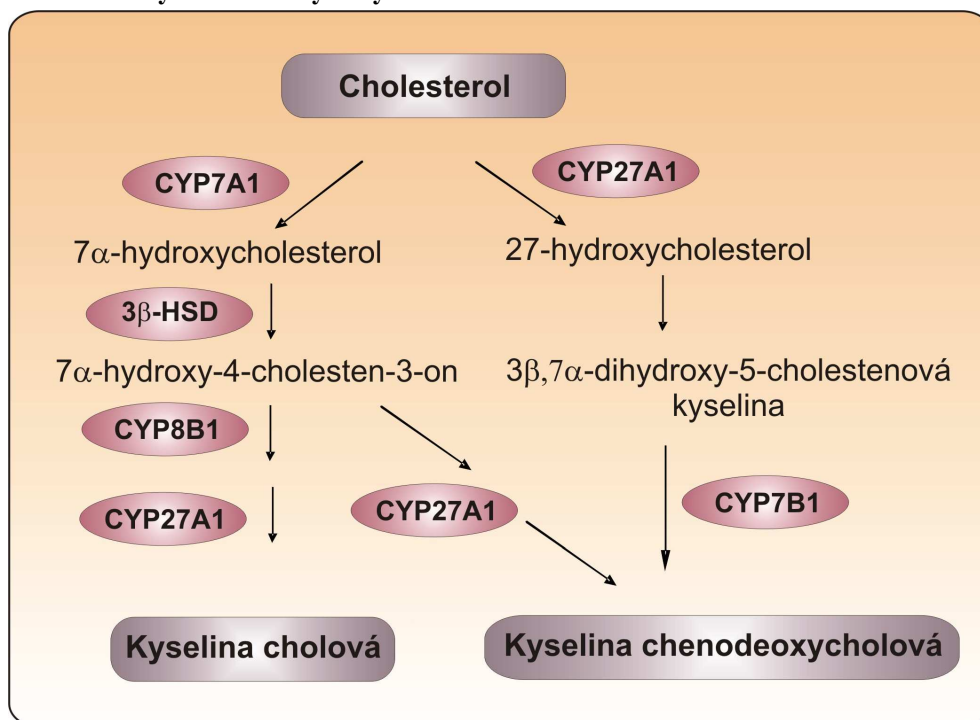
### 1.2.1 Syntéza žlučových kyselin

Žlučové kyseliny vznikají v játrech z cholesterolu a prostřednictvím žluče se dostávají do střeva, kde usnadňují absorpci lipidů a vitaminů rozpustných v tucích. A protože žlučové kyseliny podporují také exkreci nemetabolizovaného cholesterolu do žluči, je syntéza žlučových kyselin zásadním regulátorem homeostázy cholesterolu.

Vlastní syntéza žlučových kyselin může probíhat klasickou (označuje se také jako neutrální, protože meziprodukty jsou neutrální steroly) nebo alternativní (označuje se také

jako kyselá, protože meziprodukty jsou opatřeny karboxylovou skupinou) cestou (obrázek 4). Klasická cesta je zahájena hydroxylací cholesterolu v pozici 7 $\alpha$  za katalýzy CYP7A1 (cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylázy), alternativní cesta začíná hydroxylací v pozici 27 za katalýzy CYP27A1 (sterol-27-hydroxylázy) (Lundell *et al*, 2008). Klasická cesta produkuje více než 50 % z celkového množství žlučových kyselin, alternativní cesta 30–50 % (Björkhem *et al*, 2002). Alternativní cestou vzniká kyselina chenodeoxycholová, zatímco neutrální cestou vzniká kyselina cholová i chenodeoxycholová. Poměr kyseliny cholové a chenodeoxycholové, a tím i hydrofobicitu žluče, určuje CYP8B1 (sterol-12 $\alpha$ -hydroxyláza). Indukce CYP8B1 zvyšuje množství kyseliny cholové, čímž se zvýší solubilizace cholesterolu ve žluči a klesá litogenní index (poměr cholesterol/žlučové kyseliny ve žluči) (Li a Chiang, 2009).

**Obrázek 4: Syntéza žlučových kyselin**



CYP7A1, cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxyláza; CYP27A1, sterol-27-hydroxyláza; CYP8B1, sterol-12 $\alpha$ -hydroxyláza; CYP7B1, oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxyláza; 3 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza.

Převzato a upraveno z: Li a Chiang, 2009.

## 1.2.2 Regulace syntézy žlučových kyselin

### 1.2.2.1 CYP7A1

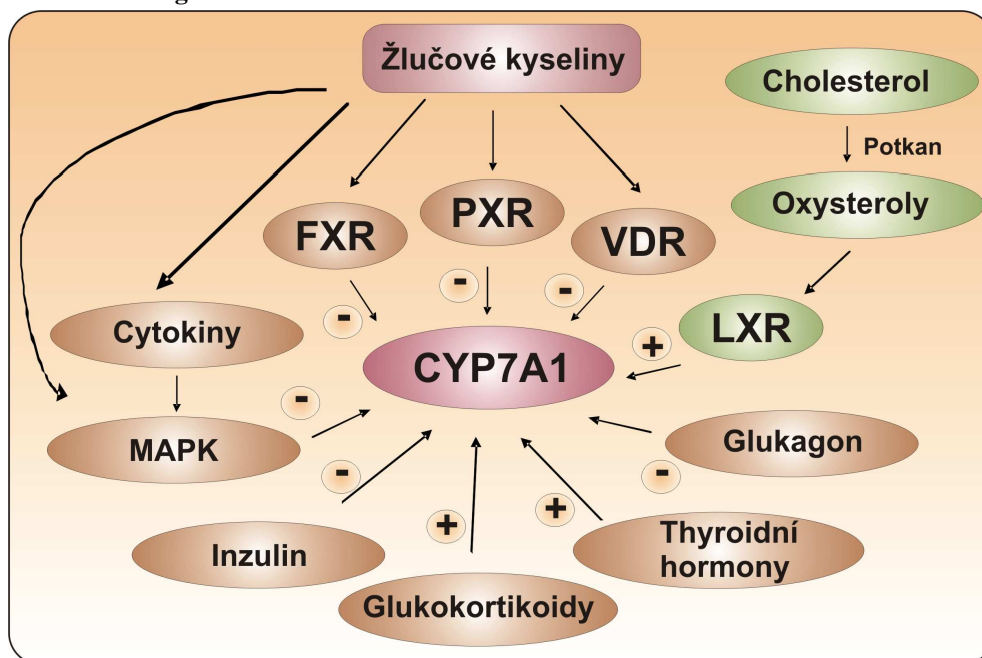
Pro homeostázu žlučových kyselin je zcela zásadní regulace CYP7A1 tzv. negativní zpětnou vazbou. Žlučové kyseliny se váží na nukleární receptor FXR, který

vytváří heterodimer s RXR (retinoid X receptor). Aktivovaný FXR indukuje SHP (small heterodimer partner), který snižuje expresi LRH-1 (liver receptor homolog 1). LRH-1 se váže na BARE (bile acid responsive elements) v promotoru cílového genu a stimuluje tak expresi CYP7A1 v játrech. Žlučovými kyselinami aktivovaný FXR tedy nepřímo potlačuje expresi CYP7A1 tzv. SHP-dependentním mechanismem (obrázek 5) (Tirona a Kim, 2005).

Exprese CYP7A1 je regulována také SHP-independentním mechanismem. Žlučové kyseliny indukují tvorbu prozánětlivých cytokinů (TNF $\alpha$ , IL-6 $\beta$ ) a stimulují MAPK (mitogen-activated protein kinase) aktivující JNK (Jun N-terminus kinase). JNK mohou fosforylovat a následně inaktivovat HNF-4 $\alpha$  (hepatic nuclear factor 4 $\alpha$ ), což snižuje jaterní expresi CYP7A1. SHP-independentním mechanismem je exprese CYP7A1 potlačena i prostřednictvím dalších nukleárních receptorů, PXR (pregnane X receptor) a VDR (vitamin D nuclear receptor), aktivovaných žlučovými kyselinami. U hlodavců je exprese Cyp7a1 stimulována také prostřednictvím LXR- $\alpha$  aktivovaným oxysteroly (Abrahamsson *et al.*, 2005).

V regulaci 7 $\alpha$ -hydroxylázy se uplatňují také hormony. Glukokortikoidy a thyroidní hormony expresi tohoto enzymu zvyšují, inzulin a glukagon naopak snižují (Norlin a Wikvall, 2007).

Obrázek 5: Regulace CYP7A1



FXR, farnesoid X receptor; PXR, pregnane X receptor; VDR, vitamin D nuclear receptor, LXR, liver X receptor; MAPK, mitogen-activated protein kinase.

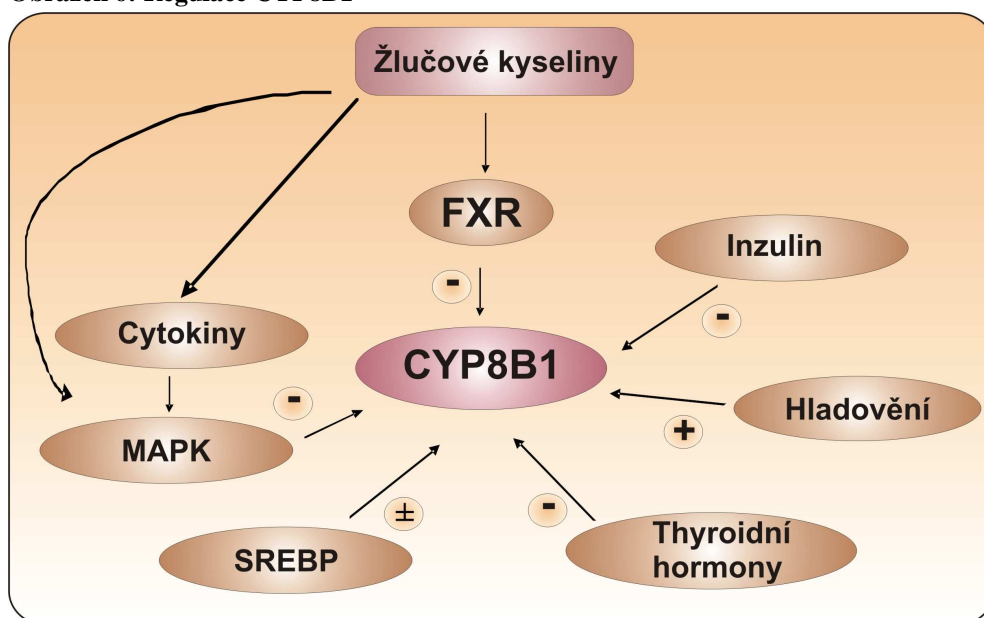
Převzato a upraveno z: Norlin a Wikvall, 2007.

### 1.2.2.2 CYP8B1

V regulaci CYP8B1 mají opět významnou úlohu žlučové kyseliny, které vazbou na nukleární receptor FXR snižují expresi tohoto enzymu. I v případě CYP8B1 se uplatňuje SHP-independentní mechanismus, kde prozánětlivé cytokiny aktivují MAPK kaskádu inhibující HNF-4 $\alpha$  (obrázek 6).

CYP8B1 obsahuje v promotoru SRE (sterol response element) a je tedy ovlivněn SREBP (sterol regulatory element-binding protein). SREBP-1 tento enzym aktivuje, SREBP-2 působí naopak inhibičně (viz. 1.3.5.1). U potkanů je exprese enzymu v játrech potlačena vlivem inzulinu a thyroidních hormonů a stimulována hladověním (Norlin a Wikvall, 2007).

Obrázek 6: Regulace CYP8B1



FXR, farnesoid X receptor; CYP8B1, sterol-12 $\alpha$ -hydroxyláza; MAPK, mitogen-activated protein kinase; SREBP, sterol regulatory element-binding protein.

Převzato a upraveno z: Norlin a Wikvall, 2007.

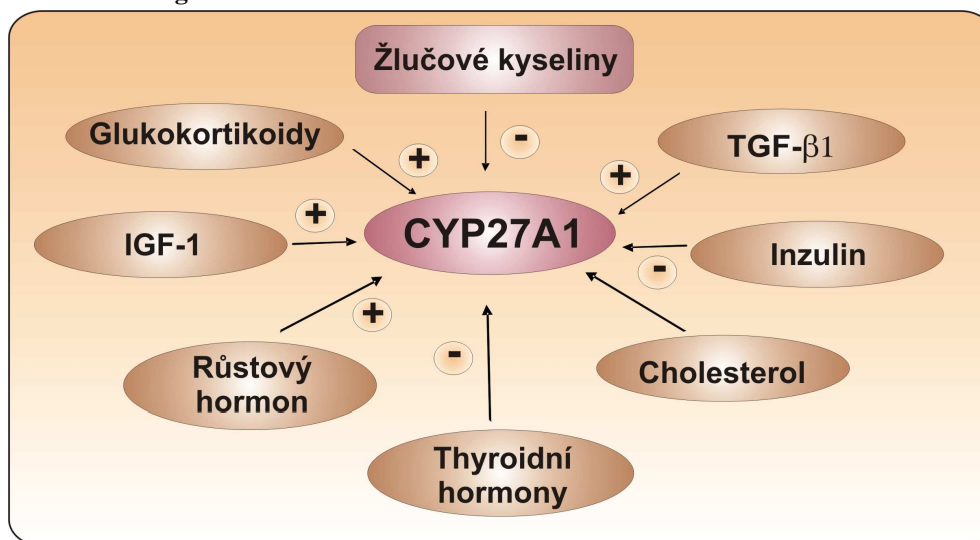
### 1.2.2.3 CYP27A1

Exprese tohoto enzymu je u potkana potlačena žlučovými kyselinami (obrázek 7), ale není zvýšena vlivem cholesterolu jako je tomu u králíka. Studie s potkaními hepatocyty odhalily inhibiční vliv inzulinu na expresi CYP27A1, zatímco studie zabývající se hormonální regulací prokázaly stimulační vliv růstového hormonu, IGF-1 (insulin growth factor-1) a glukokortikoidů a naopak inhibiční vliv tyroxinu na expresi enzymu (Araya *et al*, 2003). Prokázaný antiaterogenní účinek CYP27A1 je zprostředkován přeměnou



cholesterolu na polárnější 27-hydroxycholesterol a 3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenovou kyselinu v makrofázích cévního endotelu. Vzniklé produkty jsou lépe transportovány krví do jater a vylučovány ve formě žlučových kyselin žlučí. TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1), který stabilizuje aterosklerotický plát, odstraňuje cholesterol z makrofágů a podporuje návrat cholesterolu do jater, zvyšuje expresi CYP27A1 a tím i jeho antiaterogenní účinky (Hansson *et al*, 2005).

Obrázek 7: Regulace CYP27A1



CYP27A1, sterol-27-hydroxyláza; IGF-1, insulin growth factor-1; TGF- $\beta$ 1, transforming growth factor  $\beta$ 1. Převzato a upraveno z: Norlin a Wikvall, 2007.

### 1.2.3 Tok žluči

Až 95 % žlučových kyselin je ve střevě reabsorbováno a transportováno zpět do jater. Jen malá část žlučových kyselin opouští organismus stolicí a tyto ztráty jsou okamžitě nahrazeny syntézou z cholesterolu v játrech. Transport žlučových kyselin v organismu je umožněn přítomností transportních proteinů na bazolaterální a kanalikulární membráně hepatocytů.

#### 1.2.3.1 Transportní systémy v játrech

Hepatocyt je polarizovaná epiteliální buňka s bazolaterální (sinusoidální) a kanalikulární (apikální) plazmatickou membránou. Jaterní uptake složek žluče (a jejich prekurzorů) probíhá na bazolaterální membráně, která je v přímém kontaktu s portální krví přes fenestrace sinusoidálních endoteliálních buněk a Disseho prostory. Uptake je následován přesunem žlučových solí ke kanalikulárnímu pólu difúzí v cytoplasmě nebo

intracelulární lipidovou membránou v závislosti na jejich hydrofobních vlastnostech. Kanalikulární membrána představuje exkreceční pól hepatocytu a vytváří lem žlučového kanálku (obrázek 8).

#### **1.2.3.1.1 Bazolaterální uptake žlučových kyselin**

Bazolaterální transportní systémy jsou nezbytné pro vytváření žluče, protože asi 95 % žlučových solí exkretovaných do žluče játry je ve střevě reabsorbováno a podstupují tak enterohepatální cirkulaci. Žlučové kyseliny jsou přenášeny k membráně hepatocytu ve vazbě na albumin. Disociace žlučových kyselin z této vazby je usnadněna konformační změnou albuminu po kontaktu s bazolaterální membránou hepatocytu. Nekonjugované žlučové soli jsou slabé kyseliny při fyziologickém pH nenabitě a mohou tak pronikat přes buněčné membrány pasivní difúzí. Konjugáty žlučových kyselin s glycinem nebo taurinem vyžadují pro jaterní uptake aktivní transportní systémy. Jaterní uptake je zprostředkován jak na sodíku závislým tak na sodíku nezávislým mechanismem (Trauner a Boyer, 2003).

#### *NTCP ( sodium-dependent taurocholate co-transporting polypeptide)*

NTCP je zodpovědný za natrium-dependentní uptake konjugovaných a v menší míře nekonjugovaných žlučových solí. Transport zprostředkovaný tímto proteinem je jednosměrný, přičemž se jedná o kotransport dvou  $\text{Na}^+$  s jednou molekulou žlučové kyseliny (Funk *et al.*, 2008). Substrátem NTCP jsou rovněž další látky, např. dehydroepiandrosteronsulfát, thyroïdní hormony, estron-3-sulfát, ale také sulindak a rosuvastatin. Nicméně, pro jaterní uptake a eliminaci léčiv má tento transportní protein pouze omezený význam.

#### *OATP (organic anion transporting polypeptide)*

Bylo popsáno více než 50 členů OATP rodiny. V játrech je bazolaterální natrium-independentní uptake žlučových solí zajištěn třemi členy OATP rodiny. Mezi substráty OATP4A1 patří žlučové soli, bilirubin monoglukoronid, thyroïdní a steroidní hormony. Substrátová specifita dalších dvou členů, OATP1B1 a OATP1B2, přítomných na bazolaterální membráně je obdobná. Pro jaterní eliminaci léčiv jsou nejvýznamnějšími transportními proteiny z této rodiny OATP1B1, OATP1B3 a OATP2B1, mezi jejichž substráty patří zejména statiny, sartany (valsartan a olmesartan) a antagonist endothelinového receptoru bosentan (Funk *et al.*, 2008).

#### **1.2.3.1.2 Bazolaterální eflux žlučových kyselin**

Transportní proteiny, zajišťující na bazolaterální membráně eflux žlučových solí z hepatocytů zpět do krve, jsou za fyziologických podmínek exprimovány jen ve velmi malém množství. Jejich exprese je ale indukována za cholestatických podmínek, čímž je zajištěno snížení toxického vlivu těchto látek na hepatocyty a současně zvýšená koncentrace žlučových kyselin v plazmě podporuje jejich alternativní exkreci v ledvinách a sníženou absorpci ve střevě (Alrefai *et al*, 2007).

#### *MRP1, -3, -4, -5, -6 ( multidrug resistance-associated protein)*

Tyto transportéry fungují jako ATP-dependentní pumpy, jejichž substráty jsou konjugáty endogenních a exogenních sloučenin s glukuronidem a glutathionem (Claudel *et al*, 2011). Exprese MRP3 a MRP4 není regulována nukleárním receptorem FXR, nýbrž prostřednictvím receptoru CAR (constitutive androstane receptor). Za cholestatických podmínek stoupá exprese zejména těchto dvou transportních proteinů.

#### *OST $\alpha/\beta$ (organic solute transporter)*

Tyto transportéry jsou lokalizovány na bazolaterální membráně buněk ve střevě, ledvinách a játrech (Ballatori *et al*, 2008). Exprese těchto transportních proteinů je indukována potravou s obsahem žlučových kyselin, po navození experimentální cholestázy u hlodavců a u lidí s cholestatickým onemocněním. V průběhu cholestázy zajišťují transport sulfatovaných a glukuronidovaných žlučových kyselin, které jsou následně eliminovány močí (Zollner *et al*, 2006).

#### **1.2.3.1.3 Intracelulární transport žlučových kyselin**

Mechanismus transcelulárního pohybu žlučových kyselin není, navzdory rozsáhlým znalostem o transportu žlučových kyselin přes plazmatické membrány hepatocytů, zcela objasněn. Přenos žlučových kyselin je řízen koncentračním gradientem mezi bazolaterální a kanalikulární membránou. Žlučové kyseliny se váží na speciální intracelulární proteiny (3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenázu, glutathion S-transferázu), jejichž expresi zvyšují prostřednictvím FXR nukleárního receptoru. Dalším způsobem transportu, který se zde může uplatnit, je intracelulární transport žlučových kyselin zprostředkovaný vezikulami. Při vysoké nabídce žlučových kyselin stoupá obsah hydrofobních žlučových kyselin v intracelulárních organelách, zejména v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Pohyb vezikul pak usnadňuje jejich transport ke kanalikulární membráně. Tato hypotéza

byla potvrzena sníženou biliární sekrecí žlučových kyselin po podání inhibitoru mikrotubulů kolchicinu (Alrefai *et al*, 2007).

#### **1.2.3.1.4 Kanalikulární exkrece žlučových kyselin**

Kanalikulární sekrece představuje zásadní krok, který určuje rychlost celého procesu vzniku žluče.

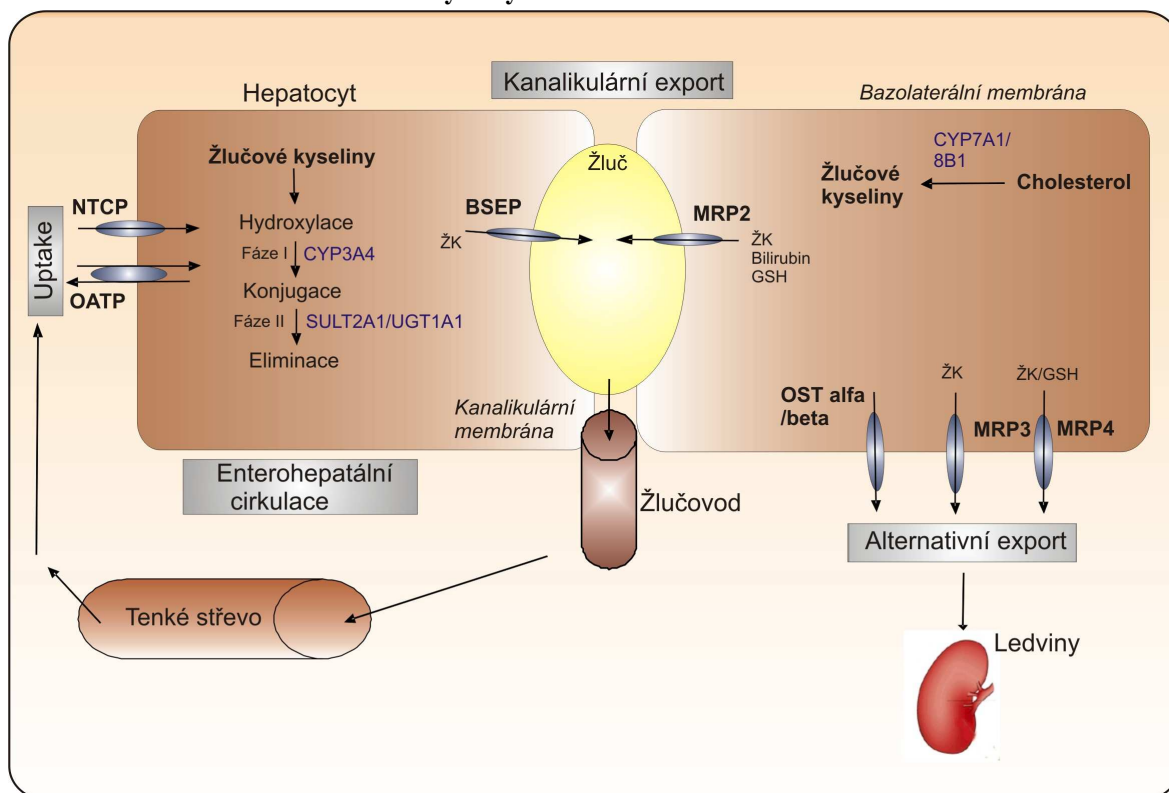
##### *BSEP (bile salt export pump)*

Tato exportní pumpa zajišťuje přenos konjugovaných i nekonjugovaných monovalentních žlučových solí do kanalikulárního prostoru. Mezi substráty BSEP patří i látky, které nemají povahu žlučových kyselin, např. pravastatin a vinblastin (Funk *et al*, 2008). Mutace v genu pro BSEP je příčinou progresivní familiární intrahepatální cholestázy typu 2 (PFIC2), která je spojená s absencí transportního proteinu na kanalikulární membráně (Chandra a Brouwer, 2004; Koster a Karpen, 2008).

##### *MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2)*

MRP2 zajišťuje kanalikulární exkrece velkého množství organických anionů, jedná se především o divalentní konjugáty s glutathionem, glukuronátem a sulfátem vytvořené v konjugáční fázi II, ale také o léčiva (pravastatin, fluvastatin, methotrexát, ampicilin, irinotekan). Je transportérem pro divalentní žlučové kyseliny (sulfatovaný tauro- a glykolithocholát), nikoli pro monovalentní žlučové kyseliny. Absence MRP2 na kanalikulární membráně způsobuje u člověka Dubin-Johnson syndrom, projevující se konjugovanou hyperbilirubinémií (Claudel *et al*, 2011).

**Obrázek 8: Jaterní homeostáza žlučových kyselin**



Jaterní homeostáza žlučových kyselin je rozdělena do 4 fází:

Uptake žlučových kyselin z portální krve do hepatocytu (fáze 0) probíhá na bazolaterální membráně a je zajišťován transportními proteiny NTCP ( $\text{Na}^+$ /taurocholate cotransporting polypeptide) a OATP (organic anion transporting polypeptide). Poté následuje hydroxylace žlučových kyselin (fáze I) za pomoci enzymu CYP3A4 (u potkana Cyp3a2) a konjugace (fáze II) katalyzovaná dehydroepiandrosteron sulfotransferázou (SULT2A1) a UDP-glukuronosyl transferázou (UGT1A1) za vzniku hydrofilních a méně toxických produktů. Nakonec dochází k exportu (fáze III) žlučových kyselin do žluči prostřednictvím kanalikulárních transportních proteinů BSEP (bile salt export pump) a MRP2 (multidrug resistance-associated protein) (Kakizaki *et al.*, 2009). Syntéza žlučových kyselin *de novo* z cholesterolu je katalyzována enzymy CYP7A1 (cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylázou) a CYP8B1 (sterol-12 $\alpha$ -hydroxylázou). Alternativní export do ledvin zprostředkovávají transportní proteiny z rodiny MRP (multidrug resistance-associated protein) a OST $\alpha/\beta$  (organic solute transporter  $\alpha/\beta$ ).

### 1.2.3.2 Cholangiocelulární transport žlučových kyselin

V procesu sekrece žluči mají významnou úlohu i epiteliální buňky žlučových kanálků (cholangiocyty). Velké a středně velké intrahepatální žlučové kanálky (ne o průměru menším než 30  $\mu\text{m}$ ) obsahují transportní systémy zapojené do sekrečních a absorpčních mechanismů. Složky žluče včetně žlučových solí, glukózy a léčiv tak mohou být transportovány ze žluči do cholangiocyty. Nicméně, pouze minoritní část žlučových solí se nachází ve žluči jako volné monomery a tak jen malé množství žlučových solí je k dispozici pro absorpci do cholangiocyty. Hlavním transportním proteinem přítomným na

apikální membráně cholangiocytlů je ASBT (apical sodium-dependent bile acid transporter) (Xia *et al*, 2006). Žlučové soli jsou exkretovány skrze bazolaterální membránu do peribiliárního plexu prostřednictvím transportéru MRP3 a t-ASBT (truncated form of ASBT) (Kip *et al*, 2004).

### 1.2.3.3 Intestinální transport žlučových kyselin

Nejen žlučové kyseliny, ale také cholesterol a fosfolipidy, podstupují enterohepatální cirkulaci, při které jsou navraceny zpět do jater a opětovně vyloučeny žlučí. Klíčovým transportním proteinem zajišťujícím Na<sup>+</sup>-dependentní uptake žlučových solí z intestinálního lumen do enterocyty je ASBT. Substrátem ASBT jsou konjugované i nekonjugované žlučové soli, přičemž nejvyšší afinitu má pro konjugované dihydroxy žlučové soli (Maillette de Buy Wenniger a Beuers, 2010). Je-li nějakým způsobem vyřazena funkce ASBT (resekce či bypass terminálního ilea, postradiační, toxické či zánětlivé poškození ilea, případně vzácné mutace ASBT), dochází ke značnému narušení enterohepatální cirkulace žlučových kyselin a vzniká tzv. primární malabsorpční syndrom žlučových kyselin (Leníček *et al*, 2006). Na apikální membráně jsou dále přítomny transportéry z rodiny MDR a MRP a Na<sup>+</sup>-independentní transportér žlučových solí OATP1A5. Eflux žlučových solí z enterocytů do portálního řečiště zajišťuje MRP3 exprimovaný především v terminálním ileu a kolon, dále MRP1 a MRP5 (Trauner a Boyer, 2003; Yu *et al*, 2007).

### 1.2.4 Regulace metabolismu žlučových kyselin

Homeostáza žlučových kyselin je udržována nukleárními receptory, které regulují nejen syntézu žlučových kyselin, ale také hepatobiliární transportní systémy a enzymy důležité pro detoxikaci žlučových kyselin. Mezi nejdůležitější nukleární receptory uplatňující se v metabolismu žlučových kyselin patří FXR, PXR a CAR. FXR je aktivován žlučovými kyselinami, zatímco ligandy CAR a PXR receptorů jsou zejména xenobiotika, ale také bilirubin (CAR) a žlučové kyseliny (PXR). Mimořádně významnou roli mají nukleární receptory v adaptivní regulaci při cholestatických onemocněních jater (Kliewer *et al*, 2002; Wagner *et al*, 2005; Goodwin *et al*, 2004). Více uvádí kapitola 1.3.7.

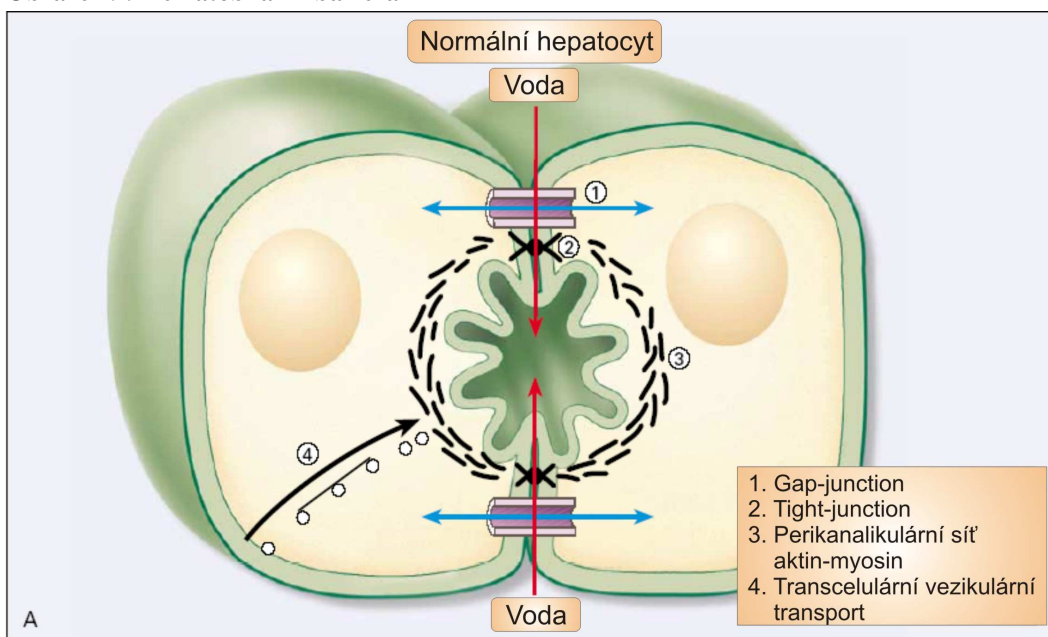
### 1.2.5 Hematobiliární bariéra

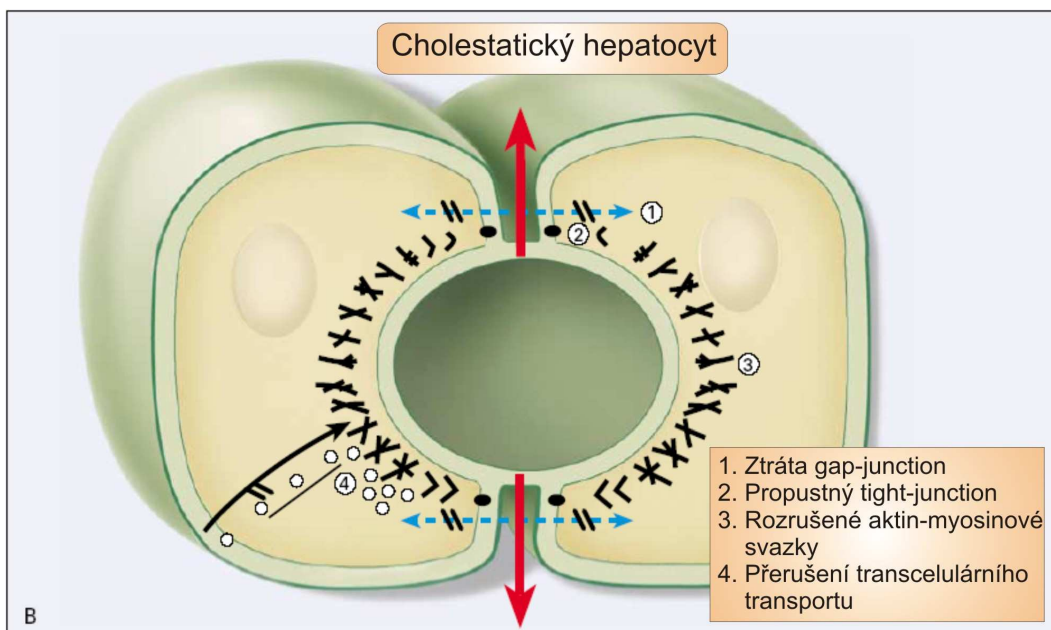
Dalším mechanismem, který významně ovlivňuje tvorbu žluče a pohyb látek mezi krví a žlučí je tzv. hematobiliární bariéra (obrázek 9). Je tvořena intercelulárními kontakty

typu tight junction (těsné spoje) a gap junction (štěrbínovité spojení). Zatímco gap junction slouží k mezibuněčné komunikaci, tight junction tvoří právě tu bariéru mezi krví a žlučí, jejíž kvalita spolu s transportními procesy na hepatocytech řídí tvorbu žluče. Těsné spoje regulují pohyb rozpuštěných látek, iontů a vody paracelulárními prostory mezi hepatocyty (Kojima *et al*, 2003a; Takakuwa *et al*, 2002a) a proto při jakémkoliv transportu léčiv do žluče je nutno uvážit i funkčnost dané bariéry. Zejména u obstrukční cholestázy bylo prokázáno, že kvalita bariéry je výrazně porušena v důsledku stoupajícího intraluminálního tlaku a hromadění žlučových kyselin a dochází tak ke zvýšenému pohybu látek mezi žlučí a krví (Kojima *et al*, 2003b). Proto byl v naší pracovní skupině zaveden test permeability za použití mono- a disacharidu (Tomsik *et al*, 2008; Kolouchova *et al*, 2011). Toto použití vycházelo ze širokých znalostí testování permeability střevní sliznice založené na skutečnosti, že monosacharid prochází volně transcelulárně, zatímco jediná cesta pro disacharidy je paracelulární (D'Antiga *et al*, 1999; Hallemeesch *et al*, 2000; Katouzian *et al*, 2005).

Dalším prvkem důležitým pro tvorbu žluče je perikanalikulární síť aktin-myosin, která je zodpovědná za kanalikulární kontrakce usnadňující tok žluče. Zejména při obstrukční cholestáze dochází k poškození aktin-myosinových svazků, což je příčinou ztráty tonu kanalikulární membrány a poklesu kontrakcí. Vzniká tak žlučová zátka v kanalikulárním lumen. Současná změna transcelulárního transportu solutů má za následek kumulaci těchto látek v perikanalikulární oblasti hepatocytů (Trauner *et al*, 1998).

**Obrázek 9: Hematobiliární bariéra**





Převzato a upraveno z: Trauner *et al.*, 1998.

## 1.3 Metabolismus cholesterolu

Stejně jako u ostatních živin, i v případě metabolismu cholesterolu jsou játra ústředním orgánem. Homeostáza cholesterolu je udržována regulací jaterních enzymů, receptorů a dalších proteinů důležitých pro metabolismus cholesterolu, lipoproteinů i žlučových kyselin (Ehrmann a Hůlek, 2010, kapitola 3.4.4).

Cholesterol je nezbytnou součástí buněčných membrán, prekurzorem steroidních hormonů (glukokortikoidů, mineralokortikoidů, pohlavních hormonů) a žlučových kyselin. Většina cholesterolu v plazmě je ve formě esterů, které tvoří jádro lipoproteinových částic (obrázek 10). Esterifikaci cholesterolu katalyzuje LCAT (lecithin: cholesterol acyltransferáza), plazmatický enzym syntetizovaný v játrech, přičemž je mastná kyselina přenášena z molekuly lecithinu na molekulu cholesterolu.

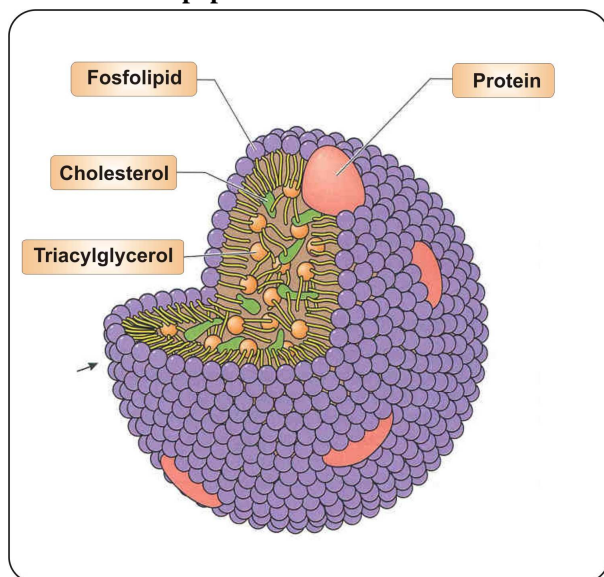
### 1.3.1 Lipoproteiny

Všechny tuky v plazmě jsou transportovány ve formě lipoproteinů. Lipoproteiny jsou částice sférického tvaru tvořené jádrem a obalem (obrázek 10). V jádře lipoproteinové částice jsou soustředěny hydrofóbní triacylglyceroly a estery cholesterolu. Obal je tvořen z molekul polárnějších fosfolipidů a neesterifikovaného cholesterolu a jedné nebo více molekul specifických bílkovin označovaných apolipoproteiny (apoproteiny) (Insel *et al.*, 2011, kapitola 5). Apolipoproteiny jsou strukturální bílkoviny lipoproteinů mající rozličné funkce: jsou především kofaktory enzymů lipidového metabolismu, zprostředkovávají



vazbu lipoproteinů na specifické receptory, účastní se přenosu lipidových komponent a stabilizují lipidovou emulzi. Obecně lze říci, že apolipoproteiny skupiny B jsou důležité pro absorpci lipidů ze střeva, pro sekreci a transport VLDL a pro vazbu LDL na membránové receptory. Apolipoproteiny skupiny C jsou regulátory hydrolýzy lipoproteinů bohatých na triacylglyceroly. Apolipoproteiny skupiny A jsou důležité pro metabolismus cholesterolu a jeho esterů, zatímco apolipoproteiny skupiny E jsou zodpovědné za katabolismus zbytků chylomikronů či zbytků VLDL. Hlavní funkcí těchto částic je transport ve vodě nerozpustných lipidů vodním prostředím krve (Gropper *et al*, 2009, kapitola 5).

**Obrázek 10: Lipoproteinová částice**



Převzato a upraveno z: [http://homepage.smc.edu/wissmann\\_paul/anatomy2textbook/1cholesterol.html](http://homepage.smc.edu/wissmann_paul/anatomy2textbook/1cholesterol.html)

Na základě rozdílné hustoty závislé na poměru mezi lipidovou a bílkovinnou složkou rozlišujeme:

- chylomikrony,
- lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein – VLDL),
- lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoprotein – LDL),
- lipoproteiny o střední hustotě (intermediate density lipoprotein – IDL),
- lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoprotein – HDL).

### 1.3.2 Transport cholesterolu

**Chylomikrony** bohaté na triacylglyceroly se tvoří v buňkách sliznice tenkého střeva vstřebáváním tuků v potravě. Lymfou jsou chylomikrony transportovány do

krevního řečiště kde jsou hydrolyzovány působením endotelové lipoproteinové lipázy za vzniku chylomikronových zbytků (chylomicron remnants). Uvolněné mastné kyseliny slouží jako zdroj energie adipocytům a svalovým buňkám. Chylomikronové zbytky nesoucí cholesterol z diety, obsahují apoB<sub>48</sub> a apoE a jsou vychytávány svými receptory v játrech (LRP – proteiny podobné receptoru LDL). Vznik těchto receptorů v buňkách jaterní tkáně je regulován množstvím cholesterolu a tuků v dietě (Racek *et al*, 2006, kapitola 19.2).

**Lipoproteiny o velmi nízké hustotě** jsou tvořeny v játrech a po uvolnění do krevního řečiště pomocí proteinu MTP (microsomal triglyceride transfer protein) jsou obsažené triacylglyceroly štěpeny lipoproteinovou lipázou za vzniku mastných kyselin, které poslouží jako zdroj energie v příslušných buňkách. Vznikají částice IDL (VLDL remnants), z nichž dále vznikají LDL. LDL částice opatřené apoB<sub>100</sub> jsou po vazbě na membránový receptor internalizovány a rozloženy. Vzniklý volný cholesterol inhibuje aktivitu 3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA reduktázy, která je klíčovým enzymem pro syntézu (*de novo*) cholesterolu v buňce (Zadák *et al*, 2008, kapitola 3.4.3).

**LDL částice** je centrálním lipoproteinem podílejícím se na patogenezi aterosklerózy, neboť právě ve formě těchto partikulí vstupuje cholesterol do stěny arterie. Prekurzorem LDL je lipoprotein VLDL, který se tvoří v játrech a obsahuje velké množství triacylglycerolů a tři druhy apolipoproteinů (apo B, apo C a apo E). Z VLDL částic jsou účinkem lipoproteinové lipázy lokalizované na endotelu štěpeny triacylglyceroly a vznikají tak částice IDL. IDL jsou dále štěpeny za vzniku LDL. LDL částice jsou nejdůležitější transportní formou esterů cholesterolu a zajišťují jeho přísun ke všem extrahepatálním buňkám, které nejsou schopny tvořit cholesterol v množství dostatečném pro buněčný metabolismus. V játrech je uvolněný cholesterol katabolizován na žlučové kyseliny a vyloučen do žluče nebo je opět využit k syntéze lipoproteinů. Oxidací a glykací pozměněné lipoproteiny LDL lipoproteiny jsou přednostně vychytávány scavengerovými receptory monocytů–makrofágů, které mohou být přetvářeny v pěnové buňky. Modifikace LDL, zejména ve stěně arterie, je způsobena přítomností nadbytku volných radikálů, které jsou i za normálních okolností v organizmu všudypřítomny (Vojáček *et al*, 2004, kapitola 3.1.1).

**HDL částice** jsou tvořeny v hepatocytech a enterocytech. Do krve vstupují jako nascentní HDL diskoidního tvaru a sestávají pouze z dvojvrstvy fosfolipidů a apolipoproteinů (zejména apoA-I a apoA-II, které představují 80 % a 20 % z celkového obsahu proteinů) (Rocco *et al*, 2009; Nguyen *et al*, 2009). Nascentní HDL jsou akceptory neesterifikovaného cholesterolu, který je následně esterifikován za katalýzy enzymu LCAT (Hossain *et al*, 2009). Akumulací esterů cholesterolu se diskoidní částice přeměňuje na sférickou–HDL<sub>3</sub>. Další kumulací esterů cholesterolu se HDL<sub>3</sub> mění na HDL<sub>2</sub>. Mezi HDL a částicemi bohatými na triacylglyceroly (VLDL a chylomikrony) může docházet k výměně esterů cholesterolu za triacylglyceroly za vzniku IDL a chylomikronových zbytků. Tato výměna je zprostředkována proteinem CETP (cholesterol ester transfer protein). Částice HDL<sub>2</sub> jsou transformovány zpět na HDL<sub>3</sub> lipolýzou triacylglycerolů a fosfolipidů účinkem jaterní triacylglycerolové lipázy (HTGL). Estery cholesterolu obsažené ve VLDL, chylomikronových zbytcích a IDL jsou vychytávány hepatocyty a degradovány. Stejně tak je tomu i v případě HDL. Částice HDL tak hrají klíčovou úlohu v tzv. reverzním transportu cholesterolu, který umožňuje odstraňování přebytečného cholesterolu z periferních tkání zpět do jater, jediného orgánu, který dovede cholesterol odbourávat na žlučové kyseliny a vylučovat cestou žluče z organismu (Spillmann *et al*, 2010; McGillicuddy *et al*, 2009).

### 1.3.3 Lipoproteinové receptory

Za vazbu a následnou internalizaci lipoproteinů do buňky jsou na buněčné membráně zodpovědné specifické receptory.

#### 1.3.3.1 LDL-receptor

Tento receptor poprvé identifikovali v roce 1985 Brown a Goldstein při studiu familiární hypercholesterolemie, za což obdrželi Nobelovu cenu.

LDL-receptor je transmembránový protein, který rozpoznává apo-B<sub>100</sub> na povrchu LDL částic a zprostředkovává tak jejich endocytózu (Dudek *et al*, 2006, kapitola 1). Endozomy následně splynou s lysozomy uvnitř buňky a činností enzymů receptor uvolní navázanou LDL částici. LDL-receptor se vrací na povrch buňky kde je připraven pro navázání další částice. Exprese tohoto receptoru je zpětnovazebně regulována dostupností intracelulárního cholesterolu. Tento proces je označován jako LDL-receptor dependentní vychytávání. Druhým způsobem jakým vstupuje LDL do buněk je non-LDL-receptor

dependentní vychytávání prostřednictvím scavengerových receptorů (scavenger receptor typ A (SR-A) a členové CD36 receptorové rodiny) (Lazar *et al*, 2001).

### **1.3.3.2 VLDL-receptor**

Tento receptor náleží do rodiny LDL-receptorů, ale váže pouze lipoproteiny s apoE (chylomikrony, VLDL a IDL). Je exprimován především v srdci, svalové a tukové tkáni, mozku a makrofázích. V játrech se nachází pouze ve stopových množstvích v cévách a Kupfferových buňkách a o jeho funkci zde je známo velmi málo (Takahashi *et al*, 2004). Předpokládá se, že tento receptor vazbou lipoproteinových částic usnadňuje funkci lipoproteinové lipázy lokalizované na povrchu endotelových buněk v jeho bezprostřední blízkosti. Exprese VLDL-receptoru je regulována prostřednictvím FXR, což naznačuje další mechanismus jakým mohou žlučové kyseliny modulovat metabolismus lipidů a lipoproteinů (Sirvent *et al*, 2004).

### **1.3.3.3 Scavengerové receptory**

Silně modifikované LDL částice (zejména v důsledku oxidativní modifikace zprostředkované kyslíkovými radikály) nemohou být vychytávány LDL receptory. Ty totiž nejsou schopny rozeznat pozměněnou strukturu apoB<sub>100</sub>. Modifikované LDL částice mohou být ale vychytávány jinými, tzv. scavengerovými (úklidovými či zametacími) receptory. Aktivita těchto receptorů nacházejících se na povrchu makrofágů, buněk hladkého svalstva a endotelových buněk není ovlivněna obsahem intracelulárního cholesterolu a cholesterol se tak za určitých okolností může v buňce nekontrolovatelně hromadit. Scavengerové receptory jsou rozděleny do dvou tříd: A (SR-A I/II/III) a B (SR-BI, CD36).

#### **1.3.3.3.1 SR-A receptor**

Tento transmembránový protein exprimovaný na makrofázích hraje velmi důležitou roli v aterogenezi. Zprostředkovává vychytávání modifikovaných LDL částic do arteriální stěny, kde jsou pohlcovány makrofágy a přetvářeny v tzv. pěnové buňky, které jsou základem aterosklerotického plátu (Platt *et al*, 2001).

#### **1.3.3.3.2 SR-B receptor**

Tento glykoprotein je opatřen velkou extracelulární smyčkou zakotvenou v plazmatické membráně na obou koncích. Receptor SR-B1, exprimovaný hlavně v játrech a steroidogenních tkáních, je považován za HDL-receptor. SR-B1 s vysokou afinitou

a selektivitou váže estery cholesterolu obsažené v hydrofóbním jádře HDL částice a zajišťuje jejich přenos do buňky. Zbylé lipoproteiny spolu s apolipoproteiny se vrací zpět do plazmy (Wiersma *et al*, 2010). Absence SR-B1 je spojena se zvýšeným rizikem rychlého rozvoje aterosklerózy, protože je znemožněn transport cholesterolu do jater a jeho následná exkrece žlučí. Naopak při zvýšené expresi tohoto receptoru je riziko aterosklerózy výrazně nižší (Chen *et al*, 2009).

#### 1.3.3.4 ABCA1

ABCA1 je transmembránový protein, opatřený dvěma vazebnými doménami pro ATP, zásadně důležitý pro jednosměrný přenos cholesterolu z buněk do HDL. ABCA1 zajišťuje přenos cholesterolu do apoA-1 za vzniku diskoidní nascentní HDL částice (Neufeld *et al*, 2002). ABCA1 makrofágů cévní stěny je nezbytný pro odstraňování cholesterolu a obranu proti ateroskleróze. Mutace v ABCA1 genu způsobuje tzv. Tangierskou chorobu, která je charakterizována úplnou absencí HDL lipoproteinů v plazmě a ukládáním esterů cholesterolu v pěnových buňkách. Naopak zvýšená exprese tohoto proteinu zvyšuje plazmatickou koncentraci HDL v plazmě a snižuje tak riziko vzniku aterosklerózy (Tanaka *et al*, 2008).

### 1.3.4 Syntéza cholesterolu

Většina cholesterolu přítomného v organismu je endogenního původu. Každý den člověk vytvoří asi 1 g cholesterolu a potravou získá asi 0,3 g. Syntéza cholesterolu probíhá nejaktivněji v hepatocytech, kůře nadledvin, kůži a enterocytech (Holeček, 2006, kapitola 6.6).

Syntéza cholesterolu se uskutečňuje ve třech krocích:

- syntéza izopentenylidifosfátu,
- kondenzace šesti molekul izopentenylidifosfátu za tvorby skvalenu,
- cyklizace skvalenu řadou reakcí na tetracyklický produkt, který je bezprostředně převeden na cholesterol.

Limitujícím krokem při syntéze cholesterolu z acetyl-CoA je přeměna HMG-CoA na mevalonát pomocí HMG-CoA reduktázy, jejíž aktivita je zvyšována inzulinem a hormony štítné žlázy a snižována glukagonem a glukokortikoidy.

### 1.3.5 Regulace syntézy cholesterolu

V organismu je intracelulární obsah cholesterolu regulován:

- syntézou cholesterolu v hladkém endoplazmatickém retikulu,
- receptorem zprostředkovanou endocytózou LDL,
- efluxem cholesterolu přes plazmatickou membránu do HDL částic,
- intracelulární esterifikací cholesterolu.

#### 1.3.5.1 Dlouhodobá regulace

Dlouhodobá regulace syntézy cholesterolu spočívá v regulaci tvorby HMG-CoA reduktázy a dalších enzymů nezbytných pro tvorbu cholesterolu. Při kumulaci sterolů v buňce je aktivita HMG-CoA reduktázy snížena o více než 90 %, současně je snížena také exprese LDL-receptorů na povrchu buňky. Klíčovou úlohu v homeostáze cholesterolu má SREBP-2 (sterol regulatory element binding protein 2). SREBP-2 je lokalizován v membráně endoplazmatického retikula, do cytoplazmy vyčnívá dvěma doménami, N terminální doménou a C terminální doménou. Při poklesu sterolů v intracelulárním prostoru dochází k štěpení intaktního SREBP-2 a k uvolnění jeho N terminální domény do cytozolu. Uvolněná doména putuje do jádra kde zahájí expresi genů (LDL-receptoru, HMG-CoA reduktázy, skvalen syntázy atd). Vzestup intracelulární koncentrace cholesterolu naopak štěpení SREBP-2 inhibuje (Leichner *et al*, 2009).

Aktivace štěpení SREBP-2 je velmi složitý proces řízený SCAP (SREBP cleavage-activating protein), který se váže na C terminální doménu SREBP-2. Steroly inhibují působení SCAP na SREBP-2 a tím i štěpení SREBP-2. Vazba C terminální domény SCAP a C terminální domény SREBP-2 umožní translokaci tohoto komplexu do Golgiho aparátu, kde působením proteázy S1P (site-1protease) a S2P (site-2protease) dojde k odštěpení N terminální domény SREBP-2. Uvolněná doména putuje do jádra a aktivuje transkripci příslušných genů. Při dostatku oxysterolů v buňce je blokován přesun SREBP/SCAP komplexu z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu činností proteinů nazývaných Insig-1 a Insig-2 (insulin induced gene 1 a 2), které způsobí konformační změny SCAP (Sato, 2010).

Druhým způsobem dlouhodobé (pomalé) regulace je kontrolovaná degradace (proteolýza) HMG-CoA reduktázy, která je stimulována cholesterolem, jeho oxidovanými deriváty, mevalonátem a farnesolem. HMG-CoA reduktáza je opatřena tzv. sterol-sensing doménou, která při nadbytku cholesterolu a dalších sterolů podléhá konformační změně, čímž se stává vnímavější k degradaci proteazomem.

### 1.3.5.2 Krátkodobá regulace

Krátkodobá regulace syntézy cholesterolu zahrnuje inhibici HMG-CoA reductázy fosforylací katalyzovanou prostřednictvím AMP-dependentní proteinkinázy (AMPK). Kináza je aktivní při vysoké koncentraci AMP v buňkách. Glukagon a adrenalin zvyšují cAMP v buňkách a snižují tedy syntézu cholesterolu. Inzulin naopak vede k poklesu intracelulárního cAMP, k aktivaci HMG-CoA reductázy a tím i syntézy cholesterolu (Motoshima *et al*, 2006; Pallottini *et al*, 2004).

### 1.3.5.3 Farmakologická regulace

Syntéza cholesterolu může být regulována také podáním hypolipidemik, zejména statinů. Statiny jsou inhibitory HMG-CoA reductázy, které významně snižují až blokují syntézu cholesterolu na počátku metabolického řetězce. Jejich užívání je indikováno zejména u izolované hypercholesterolemie, ale své uplatnění nachází i v léčbě smíšených dislipidemií, kde kromě hladin cholesterolu je porušena rovnováha i jiných krevních lipidů (např. triacylglycerolů). V těchto indikacích jsou statiny často kombinovány s jinými skupinami hypolipidemik (např. fibráty).

### 1.3.6 Exkrece cholesterolu

Cholesterol je z organismu vylučován játry do žluče zejména ve formě žlučových kyselin. Více než 95 % žlučových kyselin podléhá enterohepatální cirkulaci (Nakahara *et al*, 2002) a je reabsorbováno z distálního ilea zpět do jater, kde mohou žlučové kyseliny inhibovat svou vlastní syntézu prostřednictvím nukleárního receptoru FXR. Exkrece nezměněného cholesterolu se v játrech uskutečňuje dvojitým mechanismem, MDR2-dependentním a MDR2-independentním (Wiersma *et al*, 2009). První mechanismus je zprostředkován pomocí transportního proteinu MDR2, který přenáší do žluči zejména fosfolipidy. Druhý z uvedených mechanismů je zajištěn transportéry pro cholesterol ABCG5/ABCG8 (ATP-binding cassette transporters G5/G8) lokalizovanými na kanalikulární membráně hepatocytu (Kamisako *et al*, 2004).

### 1.3.7 Regulace exkrece cholesterolu

Expresi biotransformačních enzymů a transportních proteinů zapojených do homeostázy cholesterolu kontrolují nukleární receptory, zejména FXR, LXR, PPAR- $\alpha$  a LRH-1.

### 1.3.7.1 FXR

FXR reguluje především syntézu žlučových kyselin z cholesterolu ovlivněním klíčového enzymu CYP7A1, ale také transport, konjugaci a exkreci žlučových kyselin (Trauner *et al*, 2010). FXR aktivovaný žlučovými kyselinami indukuje expresi SHP, který po interakci s LRH-1 inhibuje transkripci CYP7A1. Aktivace FXR také zvyšuje expresi enzymů zapojených do detoxifikace žlučových kyselin (CYP3A4, SULT2A1), snižuje expresi transportních proteinů pro vychytávání žlučových kyselin do hepatocytů (NTCP, OATP), zvyšuje expresi kanikulárních transportních proteinů (MRP2, BSEP) a alternativních bazolaterálních transportních proteinů (MRP3/4, OST $\alpha/\beta$ ).

Prostřednictvím nukleárního receptoru FXR regulují lipidový metabolismus zejména žlučové kyseliny, přičemž nejúčinnějším ligandem tohoto receptoru je kyselina chenodeoxycholová (Hageman *et al*, 2010; Crawley *et al*, 2010). FXR indukuje expresi SR-B1 (Chao, 2010), ale současně snižuje expresi apoA-I a tím i plazmatickou hladinu HDL. Bylo zjištěno, že FXR zvyšuje aktivitu lipoproteinové lipázy a tím zvyšuje clearance VLDL a chylomikronů a současně inhibuje sekreci VLDL z jater (Mencarelli *et al*, 2010). Dalším způsobem jakým žlučové kyseliny zasahují do metabolismu cholesterolu je indukce exprese LDL-receptoru na bazolaterální membráně hepatocytů aktivací MAP kinázové kaskády (Nakahara *et al*, 2002).

### 1.3.7.2 LXR

Velmi důležitým regulátorem exprese genů zapojených do transportu a metabolismu cholesterolu je LXR (liver X receptor). Po navázání ligandu vytváří obě jeho izoformy (LXR- $\alpha$  a LXR- $\beta$ ) heterodimer s RXR (retinoid X receptor), který reguluje expresi cílových genů vazbou na LXREs (LXR response elements) v promotoru cílových genů (Baranowski *et al*, 2008). Při nadbytku cholesterolu stimuluje návrat cholesterolu do jater s jeho následnou exkrecí do žluče a inhibuje intestinální absorpci a syntézu cholesterolu *de novo* v játrech. Důsledkem jeho aktivace je především indukce ABCG5/ABCG8 na kanikulární membráně hepatocytů s následným zvýšením exportu cholesterolu do žluče (Baranowski *et al*, 2008). Tyto transportéry jsou po aktivaci LXR ve zvýšené míře exprimovány také na apikální membráně enterocytů, kde přenáší absorbovaný cholesterol zpět do střevního lumen (Oosterveer *et al*, 2010). Absorpce cholesterolu je vlivem LXR potlačena rovněž sníženou expresí NPC1L1 (Niemann-Pick C1 like 1), který je odpovědný za intestinální příjem cholesterolu a fytoosterolů (Costet *et al*, 2010).



LXR stimulací exprese transportérů ABCA1 a ABCG1, zajišťujících eflux buněčného cholesterolu do HDL, a apoE, který se nachází na povrchu lipoproteinů a je s vysokou afinitou vázán na LDL-receptor, významně podporuje transport cholesterolu z periferie do jater a zdá se, že modulace LXR by mohla být jedním z dalších terapeutických přístupů při léčbě aterosklerózy.

U hlodavců je exprese Cyp7a1 regulována nejen prostřednictvím FXR, ale také pomocí nukleárního receptoru LXR- $\alpha$ , který je aktivován deriváty cholesterolu (Nakahara *et al*, 2002). Skutečnost, že exprese CYP7A1 u lidí není indukována LXR- $\alpha$ , může vysvětlit zvýšenou citlivost ke vzniku hypercholesterolemie.

### 1.3.7.3 PPAR- $\alpha$

Dalším nukleárním receptorem, který zasahuje do metabolismu lipidů a žlučových kyselin je PPAR- $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor). Také tento receptor vytváří heterodimer s RXR, který usnadňuje navázání na PPREs (peroxisome proliferator response elements) cílových genů (Seo *et al*, 2008). Výsledkem aktivace tohoto receptoru je útlum syntézy apoC-III, který je inhibítoem lipoproteinové lipázy lokalizované především v krevních kapilárách svalové a tukové tkáně a následně zrychlené odbourávání lipoproteinů bohatých na triacylglyceroly. PPAR- $\alpha$  dále zvyšuje syntézu apoA-I, který je základem nascentní HDL částice a tím zintenzivňuje reverzní transport cholesterolu. Tato schopnost PPAR- $\alpha$  je dále umocněna zvýšením exprese ABCA1, který zprostředkovává přenos cholesterolu z nitra buněk periferních tkání a jeho navázání na částice nesoucí apoA-I, a zvýšením exprese SR-B1, který na povrchu hepatocytů váže HDL částice a zajišťuje tak vstup cholesterolu do jater (Paumelle *et al*, 2008). PPAR- $\alpha$  je místem účinku některých hypolipidemik, zejména fibrátů. Další skupinou hypolipidemik, která zprostředkovává část svých účinků přes jaderné receptory PPAR- $\alpha$ , jsou statiny (Chen *et al*, 2010; Huang *et al*, 2009). Statiny snižují syntézu cholesterolu inhibicí HMG-CoA reduktázy a tím snižují tvorbu i řady meziproductů, např. geranylgeranylpyrofosfátu a dalších geranylovaných proteinů. Ty se podílí na fosforylaci receptoru, který se tak stává méně citlivý na endogenní působky (např. mastné kyseliny). Při snížené hladině geranylovaných proteinů se v průběhu terapie statiny snižuje fosforylace receptorů PPAR- $\alpha$ , které se tak stávají k endogenním působkům vnímavější (Soška, 2006).

#### 1.3.7.4 LRH-1

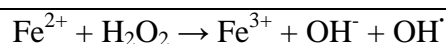
Také další nukleární receptor LRH-1 významně zasahuje do metabolismu cholesterolu a žlučových kyselin. LRH-1 stimuluje bazální expresi CYP7A1 a CYP8B1, ale je rovněž zapojen do zpětnovazebné regulace exprese těchto enzymů prostřednictvím receptoru FXR. FXR aktivovaný žlučovými kyselinami indukuje SHP. SHP se následně váže na LRH-1 a způsobí tak jeho inhibici s následnou represí CYP7A1 a CYP8B1 (Lee *et al*, 2008).

LRH-1 ovlivňuje i expresi dalších molekul zapojených do metabolismu HDL a reverzního transportu cholesterolu (Xu *et al*, 2010). LRH-1 pozitivně reguluje ApoA-I, hlavní proteinovou složku HDL, která slouží jako akceptor pro cholesterol transportovaný z periferních tkání (Delerive *et al*, 2004). Velmi důležitou úlohu v reverzním transportu cholesterolu má CETP (cholesteryl ester transfer protein), enzym přenášející estery cholesterolu z HDL do částic VLDL, IDL a LDL, které jsou postupně odstraňovány játry. Exprese CETP se zvyšuje při vysokých hladinách cholesterolu prostřednictvím LXR a LRH-1 receptorů, čímž je nepřímo usnadněn reverzní transport cholesterolu. LRH-1 se ale podílí také na downregulaci CETP a to vlivem žlučových kyselin na regulační dráhu FXR-SHP-LRH-1. LRH-1 dále zvyšuje expresi SR-B1 lokalizovaného na bazolaterální membráně hepatocytu (Fayard *et al*, 2004) a ABCG5/ABCG8 na kanalikulární membráně hepatocytu (Freeman *et al*, 2004), čímž podporuje exkreci cholesterolu do žluči.

## 1.4 Metabolismus železa

Ionty železa jsou nezbytné pro všechny formy života, protože se účastní transportních systémů v dýchacím řetězci. U živočichů mají ionty železa významnou úlohu také při reverzibilní vazbě a uvolňování molekulárního kyslíku (Šimek, 2005). Atom železa je schopen velmi snadno vázat i uvolňovat elektron, a tak měnit své mocenství z dvojmocné feroformy na trojmocnou feriformu a naopak. Železo se ze všech biogenních kovů vyskytuje v organismu v nejvyšším množství, což obnáší asi 35 mg/kg u žen a 45 mg/kg u mužů. Největší podíl celkového množství železa v organismu je obsažen v hemoglobinu (60-70 %), asi 10 % je součástí myoglobinu, cytochromů a jiných enzymů, asi 20 % tvoří zásoby v podobě vazby na feritin a hemosiderin, méně jak 1 % je obsaženo v cirkulujícím poolu v krvi. Vedle své nejznámější funkce transportu kyslíku plní železo i řadu dalších vitálních funkcí. Je nezbytné pro syntézu nukleových kyselin (DNA i RNA) i řady proteinů, účastní se řízení buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy, je důležité pro syntézu myelinu a formování dendritů neuronů, což se odráží v ovlivňování pochodů učení a paměti (Penka *et al*, 2009, kapitola 2). Nicméně, samotné železo může být velice toxické a může být zapojeno do rozvoje oxidativního tkáňového poškození přeměnou peroxidu vodíku na volné radikály (tzv. Fentonovou reakcí) poškozující buněčné membrány, proteiny a DNA.

Obrázek 11: Fentonova reakce



Aby k těmto škodlivým pochodům nedocházelo, jsou syntetizovány proteiny výhradně určené pro transport a skladování železa (Šimek, 2005).

### 1.4.1 Transport železa

Železo se do jater dostává převážně pomocí transferinu, je-li transportní kapacita transferinu za patologických okolností saturována, může se významným zdrojem železa pro játra stát železo nevázané na transferin (non-transferrin-bound iron, NTBI).

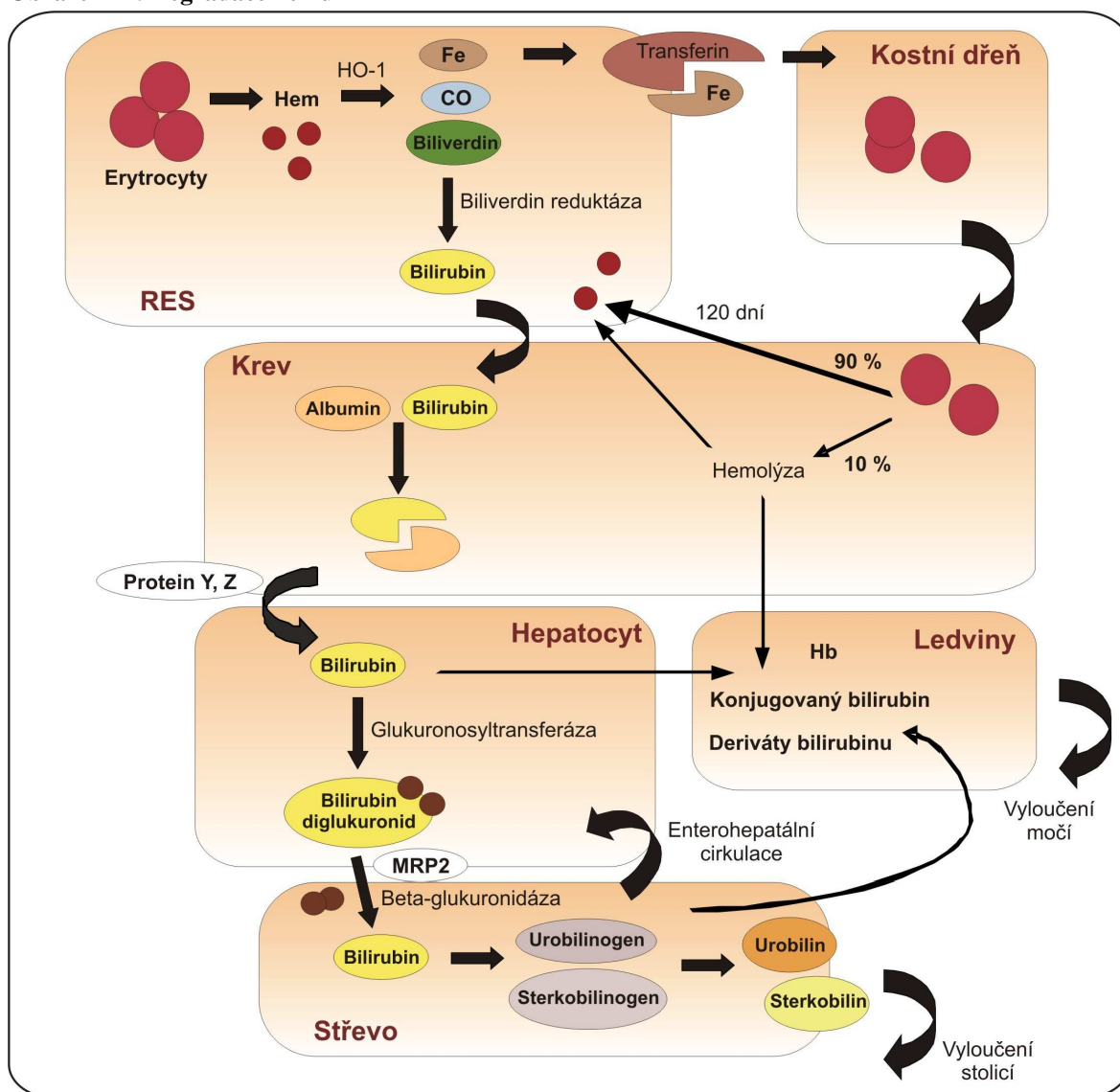
Molekula transferinu, obsahující železo, má vysokou afinitu k specializovaným receptorům, lokalizovaným na buněčných membránách s nejvyšší expresí na buňkách hemopoézy. Byly již popsány 2 typy transferinových receptorů (TfR) (Penka *et al*, 2009,

kapitola 2). Železo vázané na transferin přechází do hepatocytů převážně pomocí transferinového receptoru 1 (TfR1), jehož exprese je regulována intracelulární koncentrací železa. Transferinový receptor 2 (TfR2) zajišťuje nízkoafinitní transport železa do hepatocytu a je prokazatelný pouze na několika typech buněk (Chen a Chloupkova, 2009), zejména na hepatocytech a v menší míře erytrocytech a v doudenu (Chua *et al*, 2010). Vzniklý komplex transferin-transferinový receptor je endocytózou přenesen do nitra hepatocytů. Vznikající vezikuly se mění na endozomy, které uvolňují železo po okyselení protony přenášené ATPázou. Současně je železo redukováno z trojmocného na dvojmocné a proniká přes endozomální membránu kanálem DMT-1 (divalent metal transporter 1) do cytoplazmy. Po uvolnění železa jsou molekuly TfR recyklovány k expresi na povrch cytoplazmatické membrány, kde opět slouží jako receptory pro transferin. Hepatocyty exprimují mnohonásobně více transferinových receptorů než neparenchymové buňky v játrech, např. Kupfferovy, sinusoidální, endotelové nebo hvězdicové buňky.

Játra jsou také schopna získávat železo z cirkulujícího hemoglobinu, hemu a feritinu. Délka života červené krvinky je cca  $120 \pm 10$  dní. Po uplynutí této doby se erytrocyty rozpadají nebo jsou fagocytovány (Ehrmann a Hůlek, 2010, kapitola 5.1). Uvolněný hemoglobin je v krevní plazmě vázán na játry tvořenou bílkovinu haptoglobin a vzniklý komplex je vychytáván makrofágy mechanismem endocytózy (Horák *et al*, 2010, kapitola 1). Při degradaci hemoglobino-haptoglobinového komplexu v lysozomech se uvolňuje hem a různé štěpy globinu. Hem je následně degradován hemoxygenázou 1 (HO-1) za vzniku CO,  $Fe^{2+}$  a zeleně zbarveného lineárního tetrapyrolu biliverdinu. Biliverdin je posléze redukován biliverdin reduktázou na oranžově-žlutý bilirubin (Ehrmann a Hůlek, 2010, kapitola 5.1). Jelikož se další krok zpracování bilirubinu odehrává výhradně v hepatocytech, musí být bilirubin vzniklý na jiných místech organismu (ve slezině, kostní dřeni) dopraven do jater. Bilirubin je v plazmě, vzhledem ke své minimální rozpustnosti ve vodě, vázán na albumin a transportován do jater, kde je přenesen pomocí proteinů Y a Z (také nazývané ligandiny) k hladkému endoplazmatickému retikulu. Zde následuje konjugace s kyselinou glukuronovou za katalýzy bilirubin-UDP-glukosiduronáttransferázy (UGT1A1). Vzniklé, ve vodě dobře rozpustné, konjugáty jsou aktivně vylučovány do žluči prostřednictvím kanalikulárního transportéru MRP2 (Vítek, 2009, kapitola 1.6). Ve střevě je konjugát bilirubinu a kyseliny glukuronové rozkládán enzymy střevních bakterií. Výsledkem této dekonjugace bakteriální  $\beta$ -glukuronidázou je bilirubin, který podléhá přeměně na bezbarvý urobilinogen

v terminálním ileu a tlustém stěvě. Další redukcí urobilinogenu pak vzniká sterkobilinogen. Urobilinogen a sterkobilinogen mohou být reabsorbovány a podléhat tak enterohepatální cirkulaci nebo oxidovány v distálních segmentech stěv na barviva urobilin (oranžový) a sterkobilin (žlutý), která jsou vylučována stolicí (Ledvina *et al*, 2005, kapitola 18.6).

**Obrázek 12: Degradace hemu**



HO-1, hemoxygenáza 1; Hb, hemoglobin; MRP2, multidrug resistance-associated protein 2.

Převzato a upraveno z: Koolman a Rohm, 2005, kapitola: Porphyrin Metabolism.

Pokud dojde k rozštěpení hemoglobinu již v krevní plazmě, je uvolněný hem vázán na další, v játrech vznikající, protein hemopexin. Na povrchu hepatocytů, makrofágů i dalších buněk je exprimován receptor LRP (LDL receptor-related protein, známý také jako CD91), který váže komplex hem-hemopexin. Za fyziologických podmínek jsou obě

popsané cesty (zprostředkované haptoglobinem a hemopexinem) málo významné, avšak při intravaskulární hemolýze se stávají cestami dominantními.

Dalším zdrojem železa pro hepatocyty je feritin. Zatímco tkáňový feritin je hlavním zdrojem zásobního železa, plazmatický feritin železo prakticky neobsahuje. Proto se plazmatický feritin za fyziologických podmínek jako přenašeč železa neuplatňuje. Pokud však dojde k orgánovému poškození, může se tkáňový feritin uvolnit do cirkulace a být vychytáván játry, zejména hepatocyty (Horák *et al*, 2010, kapitola 1).

Intracelulární železo katalyzuje reakce vedoucí ke vzniku kyslíkových radikálů, a proto je koncentrace volného železa uvnitř hepatocytů udržována na velmi nízké úrovni. Naprostá většina intracelulárního železa je uložena ve vazbě na feritin. Za normálních okolností je hlavním faktorem ovlivňujícím syntézu feritinu železo, při zánětech jeho tvorbu stimulují také cytokiny. Pokud se zásoby železa v játrech výrazně zvýší, začne se zde objevovat další zásobní forma železa – hemosiderin, který je agregovaný do větších komplexů a je méně rozpustný ve vodě než feritin (Šimek, 2005).

Zatímco vstup železa do jater je popsán do značných podrobností, obrácený proces je prozkoumán mnohem méně. V případě potřeby se železo uložené v hepatocytech ve formě feritinu nebo hemosiderinu může rychle uvolňovat. Hlavním proteinem transportujícím železo přes plazmatickou membránu hepatocytů je feroportin 1. Exprese feroportinu 1 v hepatocytech při akumulaci železa stoupá, což je ochranný mechanismus proti přetížení železem. Ve stejné situaci klesá exprese feroportinu 1 v enterocytech a s ní i vstřebávání železa ze střeva (Darshan *et al*, 2010). Protože feroportin 1 přenáší do plazmy dvojmocné železo a na transferin se může vázat jen železo trojmocné, je tento transportér v úzkém kontaktu s feroxidázou ceruloplasminem. Ceruloplasmin, transportní bílkovina pro měď podílející se na procesech spojených s kinetikou železa, má také antioxidační vlastnosti. Podporuje totiž přeměnu dvojmocného železa na trojmocné a tím potlačuje tvorbu volných kyslíkových radikálů tzv. Fentonovou reakcí (Mackenzie *et al*, 2008).

#### **1.4.2 Regulace homeostázy železa**

Metabolismus železa je regulován tak, aby ho byl dostatek pro syntézu hemoglobinu a dalších životně důležitých sloučenin, ale aby v organismu nebylo přítomné volné dvojmocné železo.

#### 1.4.2.1 Regulace intracelulární homeostázy železa

Intracelulární metabolismus železa představuje (1) transport železa do buňky, (2) inkorporaci železa do funkčních molekul obsahujících železo, (3) ukládání nadbytečného železa a (4) export železa z buňky. Pro udržování těchto procesů v rovnováze využívá buňka systém IRP/IRE (iron regulatory protein/iron responsive element). Proteiny IRP1 a IRP2, monitorující hladinu železa v buňce, po navázání na IRE mohou buď zablokovat nebo naopak potencovat translaci mRNA, což je dáno lokalizací IRE v molekule mRNA příslušných proteinů (Balusikova *et al*, 2009). Díky tomuto systému se při nedostatku železa stabilizuje mRNA pro transferinový receptor, přinášející železo do buněk, a naopak degraduje mRNA pro proteiny skladovací (ferritin) a pro export železa z buňky (feroportin 1) (Sedláčková *et al*, 2009). V případě nadbytku železa je tomu právě naopak. Tímto mechanismem je tedy regulována exprese genů zapojených do vyčytávání, skladování a exportu železa (Recalcati *et al*, 2010; Kühn *et al*, 2009).

#### 1.4.2.2 Regulace vstřebávání železa

Vzhledem k tomu, že organizmus nemá k dispozici účinný mechanismus jak odstraňovat nadbytečné železo, je základním homeostatickým mechanismem v metabolismu železa přesná regulace jeho vstřebávání probíhající v duodenu (Horák *et al*, 2010, kapitola 1).

Zdrojem železa v potravě jsou hlavně živočišné bílkoviny, kde se železo nachází vázané na hem a jako nehemové železo. Hemové železo se vyskytuje v hemoglobinu a v myoglobinu svalstva. Vstřebávání hemového železa je pro organizmus nejsnadnější a probíhá za pomoci transportního proteinu HCP1 (hem carrier protein 1). Nehemové železo je ve střevním lumen přítomné v trojmocné formě a před absorpcí musí být redukováno ferireduktázou Dcytb (duodenální cytochrom b). Poté následuje přenos přes apikální membránu do cytoplazmy enterocytů transportním proteinem DMT-1 (Penka *et al*, 2009, kapitola 2). Exprese jak Dcytb tak DMT-1 je regulována koncentrací železa v enterocytech přes systém IRP/IRE. Železo může být dočasně uloženo v enterocytu ve formě ferritinu nebo transportováno do krevní plazmy za účasti feroxidázy hefestinu (oxiduje dvojmocné železo na trojmocné) a feroportinu 1 exprimovaných na bazolaterální membráně enterocytů (Darshan *et al*, 2010).

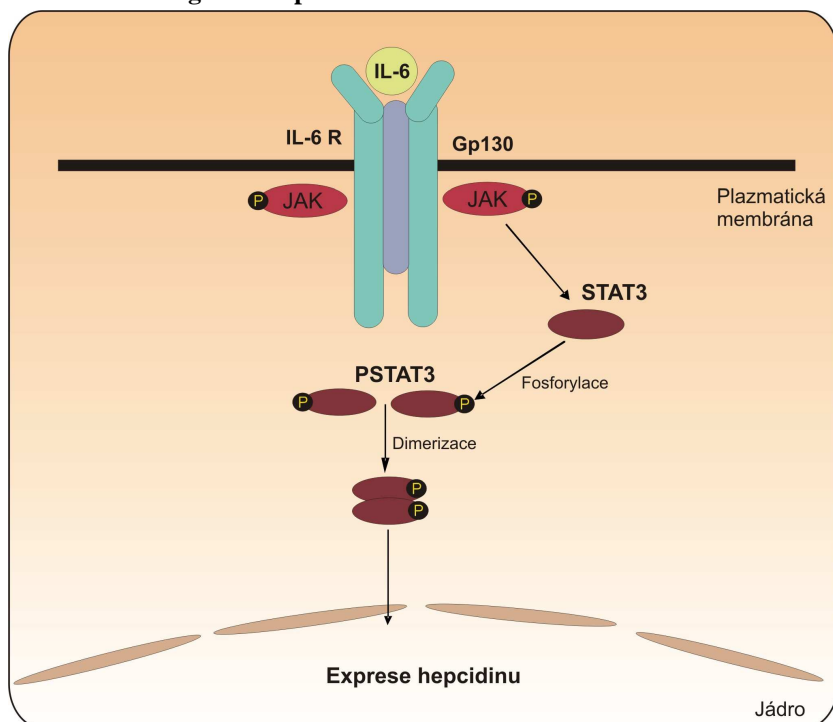
### 1.4.2.3 Systémová homeostáza železa

Klíčové je předávání signálů mezi hepatocyty, enterocyty, monocytomakrofágovým systémem, kosterními svaly a jinými kompartmenty mající za následek velmi citlivé řízení homeostázy železa podle potřeb tkání i celého organismu. Značný význam v systémové regulaci homeostázy železa má protein hepcidin (Yeh *et al*, 2004; Huang *et al*, 2006; Gao *et al*, 2010). Hepcidin, v játrech tvořený peptid s antimikrobiálními vlastnostmi, reguluje příjem železa do organismu prostřednictvím enterocytů a uvolňování železa ze zásob uložených v makrofázích a hepatocytech. Na membráně buněk se váže na ferroportin 1 a způsobuje tak jeho internalizaci s následnou degradací. Je tedy jeho negativním regulátorem (Mackenzie *et al*, 2008). Exprese hepcidinu se zvyšuje při nadbytku železa v organismu a při aktivaci prozánětlivých cytokinů, zejména IL-6. Tato reakce následně redukuje aktivitu DMT-1 přenašeče na apikální membráně enterocytů, snižuje absorpci železa z potravy a indukuje zvýšené ukládání do makrofágů. Celý proces ústí do tzv. funkčního nedostatku železa, při němž je v organismu relativní nadbytek zásobního železa, ale na druhé straně nedostatek železa pro potřeby erythropoézy. Jedná se o reverzibilní změnu v metabolismu železa, která se po odeznění cytokinové odpovědi vrací do původního stavu. Naopak při nedostatku železa v organismu se snižuje syntéza hepcidinu, zvyšuje se resorpce železa z potravy a sekrece zásobního železa z makrofágů (Šimek, 2005).

Jedním z hlavních regulátorů produkce hepcidinu je IL-6 (obrázek 13). Po zánětlivém stimulu se uvolněný IL-6 váže na komplex IL-6 receptoru a gp130. Tato interakce aktivuje JAKs (Janus kinases), které fosforylují proteiny STAT (signal transducer and activators of transcription), zejména STAT3. Po fosforylaci jsou STAT3 ve formě dimerů přemístěny do buněčného jádra, kde regulují expresi hepcidinu a mnoha dalších genů (Wrighting a Andrews, 2006; Hershko *et al*, 2006).



Obrázek 13: Regulace hepcidinu cestou IL-6/STAT3

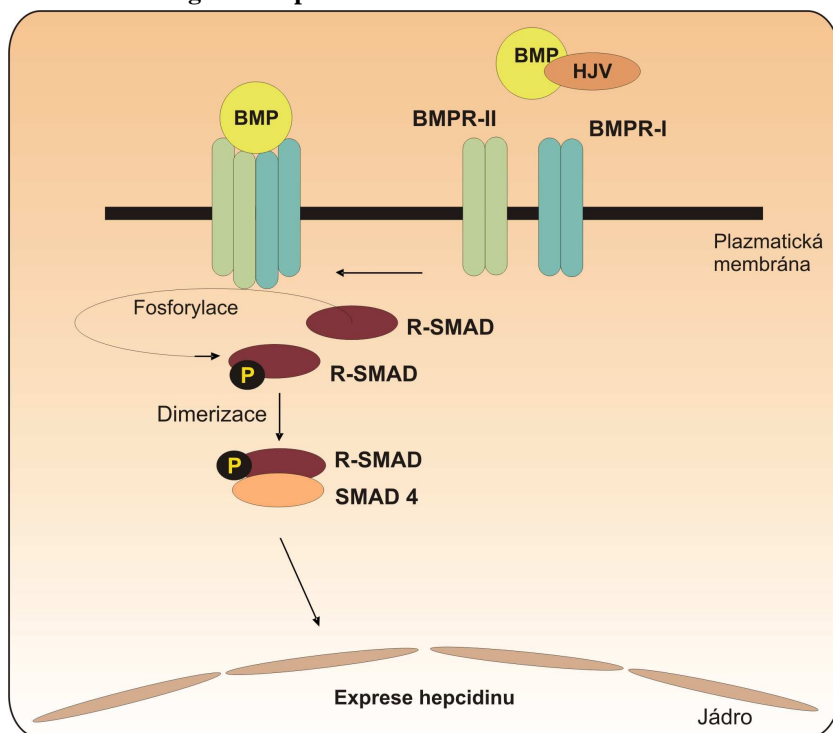


IL-6, interleukin 6; IL-6 R, receptor pro IL-6; JAKs, Janus kinases; STAT3, signal transducer and activators of transcription 3; PSTAT3, fosforylovaná forma STAT3.

Převzato a upraveno z: Hershko *et al*, 2006.

V regulaci produkce hepcidinu se také uplatňuje BMP/SMAD cesta (obrázek 14). BMP (bone morphogenetic protein) jsou cytokiny z rodiny  $TGF\beta$  a protože jsou produkovány hepatocyty, fungují jako autokrinní regulátory. BMP se váže na BMP receptor I a II (BMPI/II) a vzniklý komplex BMP-BMPI/II aktivuje fosforylaci receptoru SMAD (R-SMAD). Fosforylovaný R-SMAD dimerizuje se SMAD 4 (nazývaným také Co-SMAD) a vzniklý heterodimer putuje do jádra kde aktivuje transkripci HAMP genu, který kóduje hepcidin. Vznik komplexu BMP-BMPI/II podporuje hemojuvelin, který je koreceptorem BMP. Mutace genu HFE2 (hemochromatosis type 2), kódujícího hemojuvelin, je příčinou juvenilní hemochromatózy, která je spojená s absencí hepcidinu a kumulací železa v játrech (De Domenico *et al*, 2007).

Obrázek 14: Regulace hepcidinu cestou BMP/SMAD



BMP, bone morphogenetic protein; BMPR-I/II, BMP receptor I a II; HJV, hemojuvelin; R-SMAD, SMAD receptor.

Převzato a upraveno z: De Domenico *et al.*, 2007.

Současné hypotézy předpokládají, že exprese hepcidinu by mohla být také regulována přes saturaci transferinu a stabilizaci TfR2 na úrovni proteinu v kooperaci s HFE. Při zvýšené koncentraci železa stoupá tvorba Tf/TfR2/HFE komplexu mající za následek zvýšenou expresi hepcidinu (Gao *et al.*, 2009).

Nadbytek i nedostatek železa mají za následek závažná poškození organismu. Nedostatek železa (sideropenie) patří k nejrozšířenějším lidským chorobám vůbec. U stavů s nadbytkem železa, typicky u hemochromatózy, se železo hromadí zejména v játrech, která mohou obsahovat až několik gramů železa (Darshan *et al.*, 2010). To může mít za následek rozvoj cirhózy jater a hepatocelulárního karcinomu (Gao *et al.*, 2010). Je tedy prokázáno, že zvýšený obsah železa v játrech spolu s dalšími inzulty (nadměrný přísun alkoholu, NAFLD, hepatitida typu C atd.) může vést k výraznému poškození jater, jehož příčinou je zejména tvorba volných kyslíkových radikálů (Fargion *et al.*, 2011).

## 1.5 Cholestáza

Cholestáza je porucha tvorby a vylučování žluče nebo selhání schopnosti organismu dodat do duodena dostačující množství žluče odpovídajícího složení. Cholestáza vede ke kumulaci bilirubinu a žlučových kyselin v játrech, druhotně pak ke kumulaci složek žluče v séru, modulaci funkce CNS a dalších orgánů (Ehrmann a Hůlek, 2010, kapitola 5.2). Porucha může být lokalizována od jaterní buňky, přes primární žlučovody a vývodné žlučové cesty, až po Vaterovu papilu. Je-li příčina v játrech, je porucha označována jako intrahepatální cholestáza. Je-li příčina mimo játra, označujeme cholestázu jako extrahepatální.

Cholestázu lze dělit z řady hledisek: akutní cholestáza (septické stavy, léky, hormony), chronická cholestáza (primární biliární cirhóza, primární sklerotizující cholangitida, léky), cholestáza anikterická, cholestáza ikterická, cholestáza s poškozením hepatocytů, cholestáza bez poškození hepatocytů apod.

Z klinického pohledu se ukazuje jako velmi prospěšné dělení cholestáz do čtyř velkých skupin:

- nezánětlivé cholestázy – příčinou může být podání hormonů a léků, sepse, intrahepatální cholestáza těhotných, cholestáza při parenterální výživě a paraneoplastické cholestázy;
- cholestázy zánětlivé – cholestatické virové hepatitidy, alkoholická cholestáza;
- cholestázy při poškození žlučovodů – primární biliární cirhóza, primární sklerotizující cholangitida, syndrom mizejících žlučovodů;
- mechanické cholestázy – mohou být způsobeny tumory, konkrementy.

Ve spektru cholestáz jednoznačně dominují cholestázy extrahepatální. Převažující část, až 50 %, tvoří maligní onemocnění, na druhém místě je cholelithiáza. Velmi častou příčinou cholestázy jsou septické stavy, polékové cholestázy se podílí 5–10 %, virové a autoimunitní hepatitidy 5–7 % (Mareček, 2007). Se stoupající incidencí se však v posledních desetiletích manifestují poléková poškození a chronická cholestatická onemocnění, především primární biliární cirhóza a primární sklerotizující cholangitida. Syndrom cholestázy současně provází velký počet různorodých poškození jater a žlučových cest. Řada cholestatických změn je v první fázi plně reverzibilní. Při dlouhodobém trvání cholestázy však dochází k rozsáhlému poškození funkce hepatocytů,

onemocnění progreduje a řada cholestatických syndromů končí ireverzibilním fibrotickým poškozením jater a jaterním selháním (Mareček, 2007).

### **1.5.1 Klinický obraz cholestázy**

Mezi typické objektivní nálezy zejména pokročilé cholestázy patří ikterus, který je způsoben zvýšenou hladinou konjugovaného bilirubinu. Ikterus mívá nazelenalý odstín a je označován jako ikterus verdinový. Pro nemocné je často nejvíce obtěžujícím příznakem chronické cholestázy pruritus, který je způsobený zvýšenou plazmatickou koncentrací žlučových kyselin. Dle nejnovějších poznatků sehrávají svou roli ve výskytu pruritu v průběhu cholestatických onemocnění také autotaxin a kyselina lysofosfatidová (Kremer *et al*, 2010). U chronické cholestázy se mohou objevit xantelazmata (útvary na kůži obsahující tukové polštářky) zejména na očních víčkách. Příčinou je vzestup plazmatického cholesterolu až nad 10–15 mmol/l. Nemocní hubnou, stolice je hypocholická až acholická a někdy průjmovitá. Koliky, teploty a zimnice patří do obrazu extrahepatální cholestázy jako projev cholangitidy. Při delším trvání cholestázy dojde v důsledku špatné absorpce v tucích rozpustných vitaminů (D, E, K, A) k rozvoji příznaků jejich nedostatku. Dochází zejména k osteoporóze a koagulopatii (Ehrmann a Hůlek, 2006, kapitola 5.2).

### **1.5.2 Laboratorní známky cholestázy**

V séru lze nalézt zvýšenou koncentraci konjugovaného bilirubinu, žlučových kyselin a atypický lipoprotein X. Stoupá koncentrace většiny sérových lipidů (cholesterolu, triacylglycerolů i fosfolipidů). U cholestázy nacházíme také zvýšenou aktivitu alkalické fosfatázy (ALP) a  $\gamma$ -glutamyltransferázy (GMT) a trvá-li obstrukce žlučových cest delší dobu, mohou se objevit známky hepatocelulárního poškození (Racek *et al*, 2006, kapitola 217).

### **1.5.3 Histologické známky cholestázy**

U obstrukční cholestázy se objevuje především proliferace žlučovodů manifestovaná zvýšenou expresí proliferačních indikátorů jako je PCNA a Ki67 (Wen *et al*, 2011). Odpovědí organismu na dlouhodobě trvající poškození je fibróza a postupná cirhotická přestavba jaterní tkáně. Fibrózu charakterizuje ukládání mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix) v důsledku molekulární přestavby různých typů kolagenů, proteoglykanů, strukturálních glykoproteinů a kyseliny hyaluronové. Depozita této hmoty

v perisinusoidálních (Disseho) prostorách, spolu s neúplnou tvorbou subendoteliálních bazálních membrán, utlačují hepatocyty a brání nejen průtoku krve, ale potlačují také biosyntetické a vylučovací jaterní funkce. Všeobecným podnětem k fibrogenезi je nekróza nebo apoptóza jaterní buňky s následnou zánětlivou reakcí, která aktivuje sousedící hvězdicové buňky v subendoteliálním prostoru. Po aktivaci tyto buňky ztrácí schopnost skladovat vitamin A a mění se v myofibroblasty produkující a secernující veškeré součásti pojiva (Schneiderka, 2008). Významným peptidovým mediátorem aktivace hvězdicových buněk je zejména TGF- $\beta$ , který podporuje přeměnu hvězdicových buněk v aktivované myofibroblasty, výrazně stimuluje produkci proteinů extracelulární matrix a inhibuje jejich degradaci. Je tedy hlavním profibrogenním cytokinem (Giannelli *et al*, 2010). Myofibroblasty lze charakterizovat pomocí tzv. základních cytoskeletárních proteinů, např.  $\alpha$ -SMA (Wang *et al*, 2010; Špičák *et al*, 2008, kapitola 1.2).

#### **1.5.4 Molekulární mechanismus cholestázy**

Obstrukční cholestáza je stav charakterizovaný částečnou nebo úplnou zástavou toku žluče v důsledku obstrukce žlučových cest. Dochází k jaterní a následně systémové kumulaci toxických látek typu žlučových kyselin a bilirubinu, které mohou v závislosti na intenzitě a době trvání cholestázy vyvolat 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, funkce a lokalizace odpovědných transportních proteinů zejména v játrech a ledvinách.

Hepatocelulární kumulace žlučových kyselin během cholestázy je omezená tím, že je redukován uptake žlučových kyselin (fáze 0) na bazolaterální membráně snížením exprese transportních proteinů NTCP, OATP1A1 a OATP1B2 (Lee a Boyer, 2000; Zollner *et al*, 2006). Na kanalikulární membráně se snižuje exprese MRP2 transportního proteinu, zatímco exprese BSEP je relativně zachována, což vysvětluje schopnost jater pokračovat v exkreci žlučových solí v redukované formě. Zvyšuje se exprese bazolaterálních efluxních pump (MRP3, MRP4, OST $\alpha/\beta$ ), které zajišťují transport kumulujících se žlučových kyselin a bilirubinu zpět do systémové cirkulace a mohou tak být eliminovány ledvinami (Roma *et al*, 2008). Reabsorpce žlučových kyselin v proximálním tubulu ledvin je redukována downregulací ASBT (Zollner *et al*, 2006), pasivní glomerulární filtrace může být dále podpořena aktivní tubulární exkrecí pomocí indukovaných MRP2 a MRP4 transportérů

(Donner a Keppler, 2001; Soroka *et al*, 2001; Tanaka *et al*, 2002). Exprese ASBT a OST $\alpha/\beta$  v cholangiocytech je zvýšená a napomáhá tak reabsorpci žlučových kyselin z neprůchodných žlučových kanálků zpět do jater. Absorpce žlučových kyselin ve střevě je potlačena v důsledku snížené exprese ASBT. Při cholestatickém poškození jater je rovněž potlačena syntéza žlučových kyselin a naopak je aktivována hydroxylace a konjugace žlučových kyselin se sulfátem nebo glukuronidem, čímž je usnadněna jejich eliminace močí (Roma *et al*, 2008).

Řídící úlohu v adaptivní regulaci při cholestatických onemocněních jater mají nukleární receptory, které regulují transkripci genů kódujících proteiny zapojené v hepatobiliárních transportních procesech, syntéze a detoxikaci žlučových kyselin a fibrogenezi. Mezi zmíněné nukleární receptory patří zejména FXR, PXR, CAR a VDR (Hirschfield *et al*, 2010). FXR aktivovaný žlučovými kyselinami indukuje expresi kanalikulárních transportních proteinů BSEP a MRP2, OST $\alpha/\beta$  na bazolaterální membráně a CYP3A4 (u potkana Cyp3a2) a UGT2B4 katalyzujících hydroxylaci a glukuronidaci žlučových kyselin. Naopak potlačuje expresi NTCP na bazolaterální membráně hepatocytů, CYP7A1 a CYP8B1 nezbytných pro vznik žlučových kyselin z cholesterolu a ASBT. Nukleární receptory PXR, CAR a VDR indukují exkreceční systémy a fázi I a II detoxikace.

Kapacita těchto transportních mechanismů je však omezená a nedokáže zabránit pokračujícímu poškození jater a následně celého organismu. Důležitou informací je, že existuje poměrně značná funkční rezerva umožňující při volbě vhodné látky posílení těchto pozitivních kompenzačních změn exprese a funkce transportních proteinů, což představuje potenciálně významný terapeutický přístup (Borch *et al*, 1998).

### **1.5.5 Farmakoterapie cholestázy**

Všechny formy cholestázy vedou k retenci žlučových kyselin v játrech, což je příčinou apoptózy a nekrózy hepatocytů. Současný únik žlučových kyselin do peribiliárních prostorů je příčinou portálního zánětu a fibrotizace indukci chemokinů a cytokinů. Léčba nemocných s cholestatickými jaterními onemocněními by měla být kromě snahy o podchycení primární příčiny onemocnění a udržení průchodnosti žlučových cest, zaměřena na:

- stimulaci sekrece žlučových kyselin a ostatních toxických komponent do moče a žluče, čímž dochází ke snížení jejich koncentrace v cirkulaci i hepatocytech;
- stimulaci metabolismu hydrofobních žlučových kyselin a ostatních toxických látek na více hydrofilní, a proto méně toxické metabolity;
- ochranu cholangiocyty proti toxickému působení žluče;
- inhibici apoptózy a nekrózy jaterních buněk způsobených zvýšenou hladinou cytotoxických žlučových kyselin a cytokinů;
- inhibici fibrózy způsobené únikem žlučových kyselin do peribiliárních prostorů (Mareček, 2007).

#### 1.5.5.1 Kyselina ursodeoxycholová (UDCA)

Ačkoliv v terapii cholestatických onemocnění byla zkoušena řada postupů a látek, je třeba konstatovat, že pouze podávání UDCA je jedinou účinnou farmakologickou léčbou s dlouhodobým klinickým efektem. Všechny ostatní terapeutické postupy jsou buď neúspěšné nebo jsou provázeny výskytem závažných nežádoucích účinků. Základem terapeutického účinku je změna složení žluče po podání UDCA. Nastává vzestup obsahu hydrofilních žlučových kyselin, což vede k poklesu toxického poškození epitelu žlučových cest, k poklesu retence žlučových kyselin v hepatocytech a k inhibici apoptózy. UDCA významně ovlivňuje složení smíšených micel bohatých na fosfolipidy, čímž brání přímému kontaktu žluče s cholangiocyty. Dále stimuluje expresi transportních proteinů BSEP, MDR3 a MRP2, protože je silným agonistou PXR a FXR nukleárních receptorů (Mareček, 2007). Ve dvojité zaslepených studiích bylo jednoznačně potvrzeno, že podávání UDCA v dávce 13–15 mg/kg hmotnosti zlepšuje biochemické parametry i jaterní histologii (Corpechot *et al*, 2005). Příznivý efekt podání UDCA byl potvrzen u řady cholestatických onemocnění: PBC, PSC (Mitchell *et al*, 2001), těhotenské cholestázy (Rautiainen *et al*, 2005), jaterních poruch u cystické fibrózy a u cholestáz indukovaných léčivy. Pozitivní vliv byl rovněž prokázán v léčbě pediatrických cholestatických poruch (Jacquemin *et al*, 1997). Data z poslední doby ukazují, že podání UDCA snižuje také riziko vzniku jaterních i extrahepatálních malignit. Protože u řady pacientů s chronickým cholestatickým onemocněním se jedná o celoživotní léčbu, je velmi pozitivním zjištěním skutečnost, že mnoholetá aplikace UDCA není provázena závažnějšími nežádoucími účinky (Mareček, 2007).

### **1.5.5.2 Rifampicin**

Rifampicin je silným agonistou PXR receptoru a tím zvyšuje hydroxylaci žlučových kyselin indukci exprese CYP3A4 (Wietholtz *et al*, 1996). Dále zvyšuje expresi kanalikulárního transportéru MRP2 a naopak potlačuje expresi CYP7A1 a tím i syntézu žlučových kyselin (Marschall *et al*, 2005). Byl opakovaně úspěšně použit v léčbě pruritu u dětí a dospělých a zlepšuje také jaterní funkce u nemocných s PBC. Je podáván v dávce 300–450 mg/den a ústup pruritu je významný již po 7 dnech léčby. Dlouhodobá aplikace je však omezena některými nežádoucími účinky. V průběhu léčby je nebezpečí hepatotoxicity až vzniku medikamentózně indukované hepatitidy. Bylo pozorováno i zvýšené riziko tvorby žlučových konkrementů a vzniku rezistentních bakteriálních infekcí. Nicméně, většina nemocných léčbu dobře toleruje. V publikovaných pracích byly zaznamenány výsledky 18ti měsíčního léčení bez zvýšeného výskytu nežádoucích reakcí. Nemocné pro tento typ léčby je ovšem nutné pečlivě vybírat a pravidelně monitorovat (Mareček, 2007).

### **1.5.5.3 Fenobarbital**

Fenobarbital je agonistou CAR receptoru. U pacientů s PBC vedl k poklesu sérového bilirubinu, sérové hladiny žlučových kyselin a zmínil pruritus. Z vedlejších účinků byl nejvýznamnější především různý stupeň sedace (Bachs *et al*, 1989).

### **1.5.5.4 S-adenosyl-L-methionin (SAME)**

SAME byl rovněž zkoušen v léčbě nemocných s cholestatickými onemocněními, především u cholestázy těhotných. Byl podáván v dávce 750–1500 mg/den perorálně nebo intravenózně. Byl prokázán jeho pozitivní efekt jak v léčbě pruritu, tak při ovlivňování biochemických parametrů. Jeho působení souvisí s antioxidačními účinky a zlepšením membránové fluidity. Aplikace není provázena závažnějšími nežádoucími účinky. Nicméně, jedná se spíše o potravinový doplněk a většina autorů zaujímá k jeho použití velmi rezervovaný postoj (Mareček, 2007).

### **1.5.5.5 Bezafibrát**

Bezafibrát je agonistou PPAR- $\alpha$  receptorů a zvyšuje tak expresi MDR3 transportéru na kanalikulární membráně a tím i exkreci fosfolipidů do žluče. Zvýšená tvorba micel s hydrofóbními žlučovými kyselinami může vysvětlit terapeuticky významný účinek u pacientů s primární biliární cirhózou a dalšími chronickými onemocněními jater.



O významu tohoto léčiva svědčí také snížená plazmatická koncentrace ALP, GMT a žlučových kyselin (Nakamuta *et al*, 2010).

#### **1.5.5.6 Ovlivnění nukleárních receptorů CAR, PXR a FXR v léčbě cholestatických onemocnění**

Především v této oblasti je možno očekávat v brzké době velký pokrok. Jako nejperspektivnější se jeví využití agonistů FXR receptoru (Claudel *et al*, 2004; Kuipers *et al*, 2004). FXR reguluje expresi transportních proteinů a enzymů zapojených do metabolismu žlučových kyselin a aktivace tohoto receptoru se projeví významným protizánětlivým účinkem. Protože FXR ovlivňuje také aktivitu hvězdicových buněk, předpokládá se, že agonisté tohoto nukleárního receptoru by mohly být využity v léčbě jaterní fibrózy (Fickert *et al*, 2009). A vzhledem k tomu, že při cholestatických onemocněních je exprese FXR v játrech snížena, což může dále umocnit vznikající poškození, jeví se aktivace FXR jako terapeuticky velmi přínosná (Zollner *et al*, 2010). Poznání centrální role receptoru FXR v patogenezi chronických cholestáz vedlo k přípravě velmi silných ligandů pro tento receptor, např. GW4064 (Liu *et al*, 2003) a 6-ethylchenodeoxycholové kyseliny (6-ECDCA) (Pellicciari *et al*, 2002). Podání těchto ligandů u experimentální cholestázy potkanů a myší včetně podvazu žlučových cest, cholestázy indukované ethinylestradiolem nebo kyselinou lithocholovou vedlo k ústupu symptomů cholestázy. Nicméně, aktivací FXR se zvyšuje tok žluči, což může být u cholestázy způsobené úplnou obstrukcí žlučových cest zdrojem vzrůstajícího biliárního tlaku s následnou rupturou žlučových kanálků a je zde tedy potřeba dalších studií.

#### **1.5.5.7 Další terapie**

Pruritus je pro nemocné nejvíce obtěžujícím příznakem chronické cholestázy. Jeho zmírnění je dosahováno především podáváním UDCA nebo rifampicinu. S různou úspěšností bylo zkoušeno podávání cholestyraminu, antihistaminik nebo naloxonu (opiátového antagonisty podávaného v infuzi). Určitý efekt má také světelná terapie.

U nemocných se steatoreou je potřeba snížit obsah tuku v dietě. U chronických cholestáz je nutné sledovat protrombinový čas a hladinu vitaminů A, D, E, K. Osteoporózu u cholestatických jaterních onemocnění je možné modulovat perorálním podáváním nejméně 1,5 g kalcia. Podává se rovněž vitamin D v dávce 50 000 jednotek 3krát denně nebo 100 000 jednotek intramuskulárně jednou měsíčně. Je možno zvážit i podávání bifosfonátů (alendronát) (Mareček, 2007).

## 1.6 Statiny

Statiny (inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktázy) představují v současnosti nejúčinnější léčiva pro snížení plazmatických hladin cholesterolu, zejména ve formě LDL. Kombinace jejich hypolipidemického účinku s účinkem antioxidačním a protizánětlivým z nich činí velmi efektivní terapii kardiovaskulárních onemocnění spojených s aterosklerózou (Clearfield *et al*, 2002; Rosenson *et al*, 2004). Řada studií ovšem ukazuje, že jejich pozitivní efekt není omezen pouze na vaskulární onemocnění, ale příznivý vliv byl popsán rovněž u nádorových, zánětlivých a degenerativních onemocnění (Gbelcova *et al*, 2008). Tyto vlivy jsou dávány do souvislosti s dalšími účinky těchto léčiv, které nejsou vázány na snížení plazmatických koncentrací cholesterolu, tzv. pleiotropními účinky statinů. Jednotlivé látky z této skupiny jsou proto předmětem intenzivního výzkumu několika medicínských oborů. K základním zástupcům této skupiny patří simvastatin, atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, rosuvastatin a pravastatin.

### 1.6.1 Mechanismus účinku

Statiny jsou kompetitivními inhibitory HMG-CoA reduktázy, klíčového enzymu v syntéze cholesterolu, který katalyzuje přeměnu HMG-CoA na mevalonát. Snížená intracelulární koncentrace cholesterolu po podání statinů aktivuje SREBP-2, který reguluje expresi genů zapojených do homeostázy cholesterolu, včetně LDL-receptoru. Zvýšená syntéza jaterních LDL-receptorů spolu s jejich redukovanou degradací způsobuje rychlejší odstraňování LDL cholesterolu z oběhu (Paumelle *et al*, 2007). Některé studie naznačují, že statiny mohou snižovat hladinu LDL také tím, že zvyšují eliminaci prekurzorů LDL (VLDL a IDL) a snižují jaterní produkci VLDL (Cattaneo *et al*, 2004).

Statiny jsou rovněž agonisté nukleárního receptoru PPAR- $\alpha$ , který je zapojen do regulace lipidového a glukózového metabolismu a je exprimován zejména v játrech, ledvinách, srdci a svalové tkáni. PPAR- $\alpha$  vytváří heterodimer s RXR- $\alpha$ , což umožní vazbu na PPREs (peroxisome proliferator response elements) a zvýší tak expresi cílových genů. PPAR- $\alpha$  aktivuje uptake a katabolismus mastných kyselin s následným poklesem triacylglycerolů, stimuluje glukoneogenezi a zvyšuje tvorbu apoA-I a tím i HDL lipoproteinu (Seo *et al*, 2008).

Vzhledem k prokázanému přímému vztahu mezi zvýšenou hodnotou cholesterolu v plazmě a výskytem aterosklerózy s následujícím vznikem kardiovaskulárních komplikací, jsou statiny v dnešní době lékem první volby u pacientů

s hypercholesterolémií. Vysoký počet indikovaných pacientů a poměrně dlouhá doba klinického používání statinů umožnily provedení řady rozsáhlých klinických studií, které prokázaly jejich dobrou toleranci, relativní bezpečnost a především účinnost, která se projevila v podobě významného snížení kardiovaskulární morbidity a mortality u pacientů s hypercholesterolémií (Češka, 2004).

### 1.6.2 Pleiotropní účinky statinů

Preklinický výzkum za poslední roky také dokázal, že statiny vykazují v buněčných systémech pleiotropní efekt, neboť svým působením na HMG-CoA reduktázu neinhibují pouze biosyntézu cholesterolu, ale i vznik dalších intermediárních produktů této dráhy, např. farnesylpyrofosfátu a geranylgeranylpyrofosfátu. Tyto látky, označované jako izoprenoidy, jsou nezbytné pro posttranslační úpravu řady proteinů (např. malé GTP-vazebné proteiny Ras a Rho) zapojených do vnitrobuněčných signálních drah důležitých pro proliferaci, diferenciaci nebo migraci buněk (Svoboda *et al*, 2005). To pravděpodobně vysvětluje příznivé působení statinů na stabilizaci aterosklerotických plátů ve velkých tepnách a zlepšení jejich baroreflexní aktivity, vliv na systém renin-angiotenzin-aldosteron, snížení tonu sympatiku a zodpovídá za jejich účinky protizánětlivé, antitrombotické, antiapoptotické a antioxidační (Kölbel *et al*, 2009).

### 1.6.3 Statiny v léčbě cholestázy

U pacientů s chronickým cholestatickým onemocněním se ve velkém procentu případů (75–95 %) vyskytuje hypercholesterolémie s výrazným vzestupem LDL, která zvyšuje riziko kardiovaskulární morbidity a mortality (Balmer *et al*, 2008). Jako velmi perspektivní se jevílo podat těmto jedincům hypolipidemika ze skupiny statinů (Longo *et al*, 2001). Dlouhodobé podávání statinů hypercholesterolemickým pacientům s primární biliární cirhózou (PBC) se ukázalo jako bezpečné a léčba byla všeobecně dobře tolerována (Abu Rajab *et al*, 2010; Stojakovic *et al*, 2010). Vliv na jaterní onemocnění samotné nebyl doposud v klinické studii jednoznačně definován. Stávající data pocházejí z ojedinělých případů léčby nemocných s PBC, kde se přínosným ukázalo zejména podání zástupce hydrofilních statinů, pravastatinu. Jeho dlouhodobá aplikace vedla k výraznému zlepšení nejen biochemických, ale i histologických parametrů cholestatického poškození jater a k poklesu plazmatických koncentrací žlučových kyselin s následným zmírněním pruritu a sníženému výskytu xantomů (Kurihara *et al*, 1993).

Preklinické studie prokázaly příznivý vliv statinů nejen na metabolismus lipidů, ale také na další změny související s cholestatickým onemocněním. Příznivý vliv rosuvastatinu (Awad *et al*, 2010), simvastatinu (Dold *et al*, 2009) a fluvastatinu (Demirbilek *et al*, 2007) se projevil zejména zmírněním oxidačního stresu a zánětlivých změn. Nicméně, mechanismus působení statinů u cholestatických onemocnění jater není dosud objasněn a tato slibná terapeutická alternativa vyžaduje dalších studií.

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané práce bylo zhodnotit význam pravastatinu v prevenci rozvoje jaterního poškození u potkanů s navozenou chronickou obstrukční cholestázou. Pozornost byla zaměřena především na studium vlivu pravastatinu na:

- cholestatické jaterní poškození za použití standardních mikroskopických a biochemických technik,
- paracelulární permeabilitu hematobiliární bariéry za použití L rhamnózo/melibiózového permeabilitního testu,
- expresi enzymových a transportních mechanismů zapojených do eliminace fyziologických anionů (žlučových kyselin a bilirubinu), které se v průběhu cholestázy v organismu kumulují,
- změny enzymových a transportních mechanismů zapojených do homeostázy cholesterolu v průběhu chronické obstrukční cholestázy,
- změny enzymových a transportních mechanismů zapojených do homeostázy železa v průběhu obstrukce žlučových cest.

## 3 METODY

### 3.1 Chemikálie

Sodná sůl pravastatinu byla získána ze Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Primární, králičí a myší, polyklonální protilátky byly získány od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Abcam (Cambridge, MA, USA) a Millipore (Billerica, MA, USA) (tabulka 2). Sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou (ovčí protilátka proti myšínmu IgG a oslí protilátka proti králičímu IgG) byly získány z GE Healthcare (Praha, ČR). Další chemikálie a provozní materiál byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a Bio-Rad Laboratories (Herkules, CA, USA).

### 3.2 Pokusná zvířata

Ve studii byli použiti potkani kmene Wistar (SPF, Anlab, Praha, Česká republika) o výchozí hmotnosti 280–320 g. Zvířata byla ustájena v Centrálním viváriu Lékařské fakulty v Hradci Králové (klimatizované prostory, teplota vzduchu 20–24°C, vlhkost 30–70 %, světelný režim 12 hod tma + 12 hod světlo, 12 výměn kubatury místnosti za 1 hodinu), kde byla umístěna v PVC klecích na dřevěných prachuprostých hoblinách. 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.

Potkani byli rozděleni do pěti skupin (n=6 v každé skupině):

- Sh (kontrolní skupina „sham-operovaných“ zvířat s aplikací fyziologického roztoku)
- Sh-P5 (kontrolní skupina „sham-operovaných“ zvířat s aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg)
- BDO (zvířata s obstrukcí žlučového a aplikací fyziologického roztoku)
- BDO-P5 (zvířata s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg)
- BDO-P1 (zvířata s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg)

Dávka pravastatinu 1 mg/kg byla odvozena z maximální denní doporučené dávky léčiva v klinické praxi, která činí 80 mg. Pro naši studii jsme zvolili také dávku 5x vyšší,

5 mg/kg, ve které jsou obvykle statiny aplikovány v podobném typu studií. Roztok pravastatinu byl aplikován 1x denně intraperitoneálně po dobu 7 dní, přičemž první aplikace byla uskutečněna 2 hodiny po operaci.

### 3.3 In vivo studie

Podstatou studie byl *in vivo* experiment za použití laboratorních potkanů, u kterých bylo navozeno cholestatické poškození jater obstrukcí *ductus choledochus* implantovanou zaslepenou sondou, která byla vyvedena do podkoží břišní stěny. Za stejných podmínek byla provedena také kontrolní skupina zvířat, která prodělala pouze „sham“ operaci (otevření břišní dutiny s manipulací žlučového) bez obstrukce. V průběhu operace byla zvířata v celkové anestézii indukované jednorázovým podáním pentobarbitalu v dávce 50 mg/kg i.p. Potkanům ve skupině Sh-P5, BDO-P5 a BDO-P1 byl podáván pravastatin po dobu 7 dní, potkanům ve skupině Sh a BDO pouze fyziologický roztok.

*In vivo* kinetická studie byla provedena 7 dní po operaci. Potkanům v celkové anestézii byl zakanylován žlučový (zvířata po „sham“ operaci) nebo uvolněn podvaz (zvířata po obstrukci žlučového). Každému zvířeti byla poté zakanylována *a. carotis* a močový měchýř pro sběr krve a moči, kanylace *v. jugularis* umožnila podání melibiózy a rhamnózy (v dávce 100 mg/kg) a kontinuální aplikaci fyziologického roztoku (2 ml/hod) pro suplementaci ztrát tekutin a udržení toku moče. V průběhu 180 minut byly odebírány vzorky krve (0,3 ml) v intervalech 4', 10', 30', 60', 120' a 180' (exsanguinační odběr), plazma byla získána následnou centrifugací (5000 g, 5 min., 4°C). Moč a žluč byla sbírána v intervalech 0-30', 30-60', 60-90', 90-120', 120-150' a 150-180'. Po uplynutí 180 minut byla narkotizovaná zvířata usmrcena exsanguinačním odběrem z břišní aorty. Okamžitě po usmrcení byla vyjmuta játra pro následné histologické vyšetření a analýzy exprese. Vzorky plazmy, moči a žluči byly do doby analýzy uchovávány při -80°C.

### 3.4 Analytické metody

- Koncentrace melibiózy a rhamnózy byla ve vzorcích plazmy a žluči stanovena metodou HPLC Ing. Luděk Šišperou, CSc. na ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové (Tomsik *et al.*, 2008). Biochemické vyšetření plazmy bylo provedeno na přístroji Cobas Integra<sup>®</sup> 800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) dle pokynů výrobce ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové (Ústav klinické biochemie a diagnostiky).

- Koncentrace cholesterolu ve žluči byla stanovena za použití komerčního kitu CHOLESTEROL LIQUID 500 od firmy PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., k vlastnímu měření byl použit UV-VIS SPEKTROFOTOMETR PharmaSpec UV-1700 (Schimadzu, Japonsko). Ke vzorku žluči (60  $\mu$ l) byl přidán 1 ml směsi hexan-isopropanol (3:2), vzorek byl 20 minut protřepáván a následně centrifugován (10 minut, 3000 otáček, 4°C). Supernatant (700  $\mu$ l) byl odpařen v koncentrátoru (45°C, 15 minut). K odparku byl přidán 1 ml reagentie z kitu firmy PLIVA-Lachema a po promíchání byla změřena absorbance při 500 nm.
- Obsah cholesterolu a triacylglycerolů v játrech byly stanoveny za použití komerčních kitů CHOLESTEROL LIQUID 500 a TRIACYLGLYCEROLY LIQUID 250 S od firmy PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., k vlastnímu měření byl opět použit UV-VIS SPEKTROFOTOMETR PharmaSpec UV-1700 (Schimadzu, Japonsko). 1 g jater byl zhomogenizován ve 4 ml destilované vody. K 1 ml homogenátu bylo přidáno 5 ml methanolu a 10 ml chloroformu. Směs byla v uzavřené zkumavce ponechána při 4 °C do druhého dne (min. 6 hodin). Po uplynutí stanovené doby bylo ke směsi přidáno 6 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , obsah zkumavky byl promíchán a ponechán v chladu 24 hodin. Po centrifugaci (3000 g, 10 minut, 4 °C) byla odstraněna horní frakce a ze spodní frakce bylo odpipetován 1 ml pro stanovení triacylglycerolů (po odpaření bylo ke vzorku přidáno 100  $\mu$ l isopropanolu, vzorek byl promíchán a po uplynutí 10 minut byl obsah triacylglycerolů stanoven dle návodu kitu) a 200  $\mu$ l pro stanovení cholesterolu (po odpaření bylo ke vzorku přidáno činidlo z kitu a obsah cholesterolu byl dále stanoven dle návodu kitu). Stanovení bylo provedeno Mgr. Martinou Slanařovou ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové (Klinika gerontologická a metabolická).
- Koncentrace žlučových kyselin v plazmě byla stanovena spektrofotometricky za použití komerčního kitu (Diazyme, Poway, USA). Do plastové zkumavky bylo napipetováno 810  $\mu$ l temperované reagentie R1 (37°C) a přidáno 12  $\mu$ l vzorku. Po 3 minutách bylo do zkumavky přidáno 270  $\mu$ l reagentie R2, směs byla promíchána a okamžitě byla změřena absorbance. Koncentrace žlučových kyselin ve žluči byla stanovena stejným způsobem s tím rozdílem, že vzorky musely být pro vysokou koncentraci žlučových kyselin naředěny 100x vodou.



- Koncentrace železa v játrech byla stanovena atomovou absorpční spektrometrií (Unicam, Solaar 959, U.K.) ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové PharmDr. Magdalenou Holečkovou (Ústav klinické biochemie a diagnostiky).
- Koncentrace pravastatinu a jeho laktonu ve vzorcích plazmy a moči byla stanovena pomocí ultra účinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Vzorky byly zpracovány mikroextrakcí na tuhou fázi pomocí stříkačky (MEPS – microextraction by packed sorbent), která umožnila použití velmi malých objemů vzorků. Stanovení bylo provedeno na katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Mgr. Hanou Vlčkovou a PharmDr. Lucií Novákovou, Ph.D.

### 3.5 RT-PCR

Analýzy genové exprese byly provedeny metodou qRT-PCR s použitím Applied Biosystems 7500 HT Fast Real-Time PCR systému (Foster City, USA) (Brcakova *et al*, 2009). RNA byla ze vzorků jaterní tkáně izolována za použití TRI reagentu (Sigma-Aldrich) a následně přepsána do cDNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu (Applied Biosystems). Do reakce probíhající v triplikátech bylo pipetováno 30 ng cDNA. Cílená amplifikace templátu cDNA proběhla za použití TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mixu a Taq-Man<sup>®</sup> Gene Expression Assay mixu pro daný gen (tabulka 1) získaných od Applied Biosystems, HMG-CoA reduktáza byla získána od Generi-Biotech (Česká republika). Jako endogenní kontrola byl použit GAPDH. V případě exprese feritinu, feroportinu, hepcidinu a transferinového receptoru 1 a 2 byly použity dva referenční geny, GAPDH (4352338E, Applied Biosystems, Foster City, USA), a Ywhaz (rYwhaz\_Q1, GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, ČR). Použitý teplotní profil byl: 95°C po dobu 20 s, 40 cyklů: 95°C po dobu 3 s, 60°C po dobu 30 s.

#### Relativní kvantifikace genové exprese

Relativní kvantifikace zjišťuje změny v množství mRNA určitého genu ve skupině vzorků a vyjadřuje ji jako relativní poměr k množství mRNA vnitřní kontroly. Tento referenční gen je často tzv. *housekeeping* gen, jehož cDNA je amplifikována společně se stanovovaným genem. Pro stanovení koeficientu stupně změny exprese R byla použita Pfafflova metoda beroucí v potaz možný rozdíl mezi rychlostí–efektivitou amplifikace u jednotlivých genů. Pro výpočet je tedy nezbytné stanovit efektivitu amplifikace pro každý gen.

Tyto se určí ze směrnice kalibrační křivky pomocí vzorce:

$$E = 10^{-1/\text{směrnice}}$$

Výpočet poměru množství cílového genu ku referenčnímu genu se provedl dle vzorce:

$$R = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta C_{\text{target}} \text{ (kontrola-vzorek)}}}{E_{\text{housekeeping}}^{\Delta C_{\text{housekeeping}} \text{ (kontrola-vzorek)}}}$$

kde  $E_{\text{target}}$  a  $E_{\text{housekeeping}}$  jsou hodnoty efektivity určené ze směrnice kalibrační křivky pro každý gen.  $\Delta C_{\text{target}}$  a  $\Delta C_{\text{housekeeping}}$  jsou rozdíly  $C_t$  hodnot (threshold cycle-fluorescenční práh) mezi kontrolními a zkoušenými vzorky pro každý gen.

**Tabulka 1: Seznam použitých genů**

Gen	ID genu
Abca1	Rn00710172_ml
Abcg5	Rn00587092_ml
Abcg8	Rn00590367_ml
Acat2	Rn00596636_ml
Bcrp	Rn00710585_ml
Bsep	Rn00582179_ml
CAR	Rn00576085_ml
Cyp3a2	Rn00756461_ml
Cyp7a1	Rn00564065_ml
Cyp8b1	Rn00579921_ml
Feritin	Rn00821071_ml
Ferroportin	Rn00391197_ml

FXR	Rn00572658_ml
Hepcidin	Rn00584987_ml
HMG-CoA red.	rHmgcr_Q2(FAM)
HNF1 $\alpha$	Rn00562020_ml
LDLr	Rn00598442_ml
LRH-1	Rn00572649_ml
LXR	Rn00581185_ml
Mdr1a	Rn00591394_ml
Mdr1b	Rn00561753_ml
Mdr2	Rn00562185_ml
Mrp2	Rn00563231_ml
Mrp3	Rn00589786_ml
Mrp4	Rn01465702_ml
Ntcp	Rn00566894_ml
Oatp1a1	Rn00755148_ml
Oatp1a4	Rn00756233_ml
PPAR- $\alpha$	Rn00566193_ml
PXR	Rn00583887_ml
SHP	Rn00589173_ml
Sr-b1	Rn00580588_ml
SREBP-2	Rn01502638_ml
Transferin receptor 1	Rn01474701_ml
Transferin receptor 2	Rn01481694_ml
Ugt1a1	Rn00754947_ml

---

### 3.6 Western blot

Játra nebo slezina (200 mg) byly homogenizovány v 1 ml vychlazeného pufru (25 mM TRIS.HCl (pH=7,6), 0,1 % (w/w) TRITON-X) obsahujícím 0,5 µg/ml leupeptinu a 50 µg/ml benzamidinu za použití homogenizátoru MagNA Lyser (Roche Diagnostics GmbH, Německo) 2 × 15 s při 6500 rpm. Supernatant byl získán centrifugací získaných homogenátů (3000 g, 4°C, 10 min). Pro stanovení exprese transferinu byla použita plazma. Nukleární frakce pro stanovení exprese pSTAT3 byla získána homogenizací jater (200 mg) v Ripa pufru obsahujícím inhibitory proteáz aprotinin, leupeptin a benzamidin za použití MagNA Lyseru (2 × 15 s při 6500 rpm). Pelety získané první centrifugací (1000 g, 4°C, 10 minut) byly resuspendovány v pufru obsahujícím 20mM HEPES (pH=7,4), 0,1M KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 10 % glycerol a inhibitory proteáz za použití ultrazvuku. Supernatant byl získán druhou centrifugací (17 000 g, 4°C, 20 minut).

Koncentrace celkového proteinu byla stanovena BCA metodou (BCA Protein Assay kit, Pierce, Rockford, IL, USA) a vzorky byly uloženy při -80°C.

Homogenáty, nukleární frakce, případně plazma (100 µg proteinu na jamku) byly separovány v SDS-PAGE polyakrylamidovém gelu o koncentraci 6,25 % (transferin, pSTAT3), 7,50 % (TfR1, TfR2, DMT-1), 10 % (HO-1, PCNA, αSMA, hepcidin, feritin a IL-6) a 15 % (TGFβ).

Poté byly proteiny přeneseny na nitrocelulózovou membránu (GE Healthcare, Praha, ČR). Zbylá vazebná kapacita membrány byla blokována laktoglobuliny v 5% roztoku odtučněného mléka v TRIS pufru (0,05 % Tween 20) (TBST) po dobu jedné hodiny.

Membrány byly inkubovány s primární protilátkou po dobu jedné hodiny (v případě α-SMA byla nutná inkubace přes noc) v koncentracích, které uvádí tabulka 2. Po vymytí membrány v roztoku TBST následovala inkubace se sekundární protilátkou opět po dobu jedné hodiny. Po vymytí membrány v TBST byla provedena detekce přidáním chemiluminiscenčního činidla (ECL kit, Amerham-Pharmacia, Buckinghamshire, Velká Británie). Obraz získaný expozicí filmu (Hyperfilm, Amerham-Pharmacia, Buckinghamshire, Velká Británie) byl dále analyzován po naskenování do počítače

(ScanMaker i900, UMAX, Praha, ČR) s následnou kvantifikací za použití softwaru QuantityOne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a výsledné pruhy byly porovnávány a vyhodnoceny denzitometricky. Jako endogenní kontrola byl stanoven  $\beta$ -aktin.

**Tabulka 2: Seznam použitých protilátek**

<b>Antigen</b>	<b>Dodavatel</b>	<b>Číslo produktu</b>	<b>Ředění PP</b>	<b>Ředění SP</b>
HO-1	Sigma Aldrich	SLO8122	1:1000	1:2000 (anti-rabbit)
$\alpha$ -SMA	Sigma Aldrich	SAB2500963	1:1000	1:2500 (anti-goat)
TGF- $\beta$	Millipore	MAB1032	1:500	1:1000 (anti-mouse)
Transferin	Abcam	ab8241	1:10 000	1:10 000 (anti-rabbit)
IL-6	Abcam	ab6672	1:1000	1:2000 (anti-rabbit)
PCNA	Abcam	ab29	1:5000	1:8000 (anti-mouse)
Ferroportin	Abcam	ab58695	1:1000	1:2000 (anti-rabbit)
pSTAT3	Abcam	ab32143	1:1000	1:2000 (anti-rabbit)
Feritin	Abcam	ab69090	1:2000	1:4000 (anti-rabbit)
Hepcidin	Abcam	ab30760	1:1000	1:2000 (anti-rabbit)
DMT-1	Abcam	ab55812	1:1000	1:2000 (anti-rabbit)
TfR1	Abcam	ab1086	1:1000	1:2000 (anti-mouse)
TfR2	Abcam	ab84287	1:1000	1:2000 (anti-rabbit)
$\beta$ -aktin	Sigma Aldrich	A5316	1:5000	1:8000 (anti-mouse)

PP – primární protilátka, SP – sekundární protilátka

### 3.7 Histologické vyšetření jater

Játra byla odebrána bezprostředně po usmrcení zvířete a fixována v 10% roztoku formalinu. Histologické preparáty jaterní tkáně byly obarveny hematoxylin-eosinem a hodnoceny prof. MUDr. Jaroslavem Mokřým, Ph.D. pomocí světelné mikroskopie (Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové).

### **3.8 Statistická analýza**

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM (n=6 v každé skupině). Statistické hodnocení experimentálních dat bylo provedeno jednofaktorovou ANOVOU a Tukey post hoc testem, případně nepárovým t-testem za použití GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, Kalifornie). Za statisticky signifikantní byla považována hodnota  $p < 0,05$ .

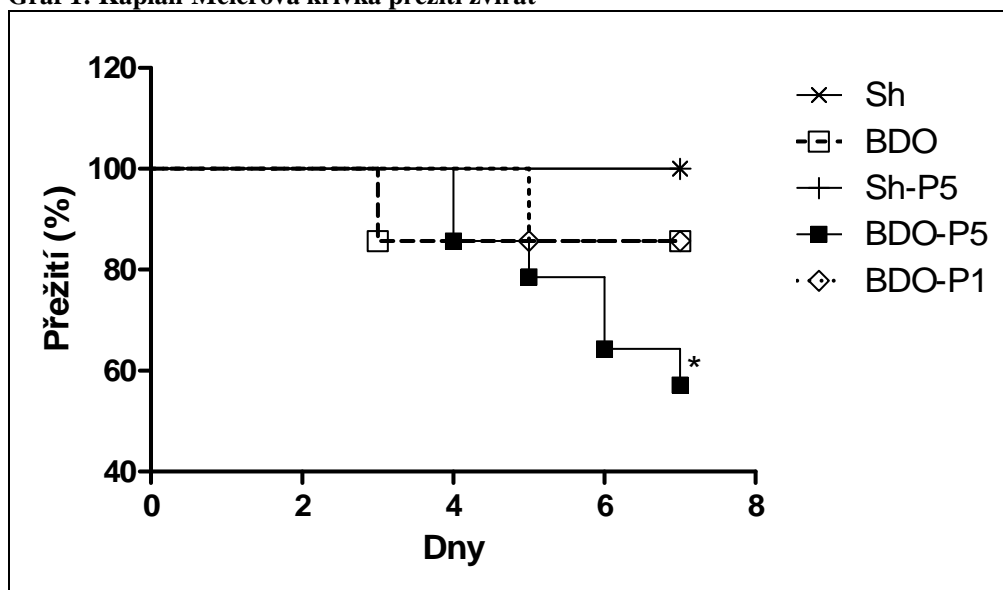
## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Hodnocení celkové toxicity

#### 4.1.1 Mortalita

Celková mortalita zaznamenaná v naší studii činila 19 %. Největší měrou se na této hodnotě podílela skupina BDO-P5, tedy skupina zvířat s podvazem žlučovéhoodu a aplikovanou dávkou pravastatinu 5 mg/kg, kde v průběhu sedmidenní periody uhynulo 6 zvířat ze 14. Nejčastější příčinou úhynu byla pitvou zjištěná biliární peritonitida, která vznikla následkem ruptury cysty vytvořené v pahýlu choledochu. V kontrolních skupinách k úhynu nedošlo, ve skupinách BDO a BDO-P1 uhynulo po jednom zvířeti. Křivky přežití v jednotlivých skupinách znázorňuje graf 1.

Graf 1: Kaplan-Meierova křivka přežití zvířat



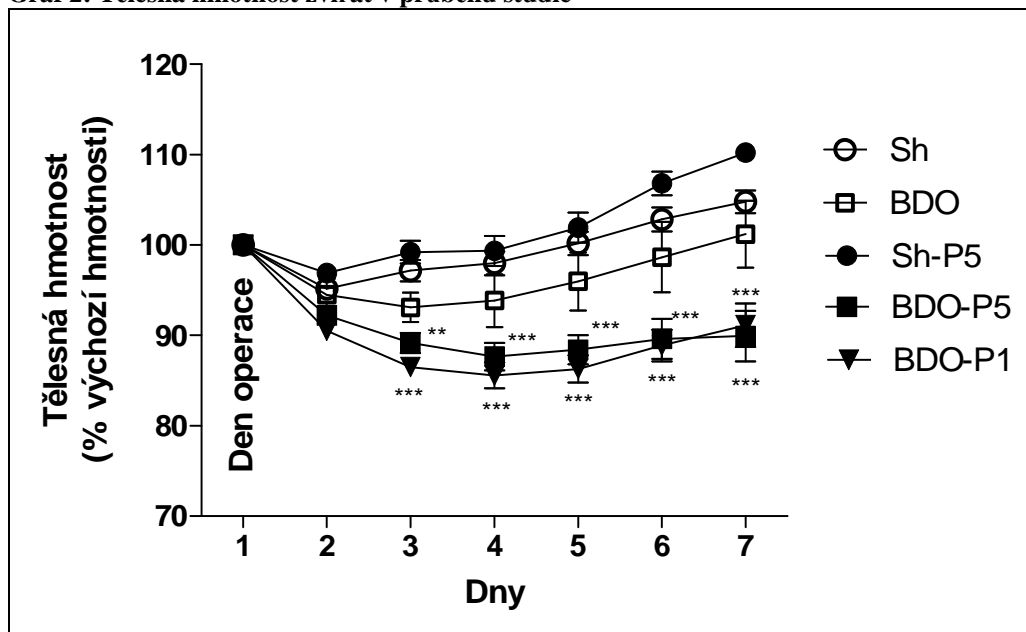
Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; BDO, potkani s obstrukcí žlučovéhoodu; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučovéhoodu a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučovéhoodu a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 4.1.2 Změny tělesné hmotnosti

Hodnoty hmotnosti získané převažováním zvířat v pravidelnou denní dobu ukázaly, že potkani v experimentálních skupinách BDO-P5 a BDO-P1 přibývali na hmotnosti v průběhu studie nejméně (graf 2), a to v porovnání jak s kontrolními skupinami, tak se skupinou BDO. Nicméně, ve skupině BDO-P1 byl od 4. dne studie pozorován plynulý vzestup hmotnosti potkanů, zatímco ve skupině BDO-P5 byla od 4. – 5. dne pozorována v přírůstku hmotnosti postupná stagnace.

Graf 2: Tělesná hmotnost zvířat v průběhu studie



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M, n = 6.

Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; BDO, potkani s obstrukcí žlučovodu; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučovodu a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučovodu a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

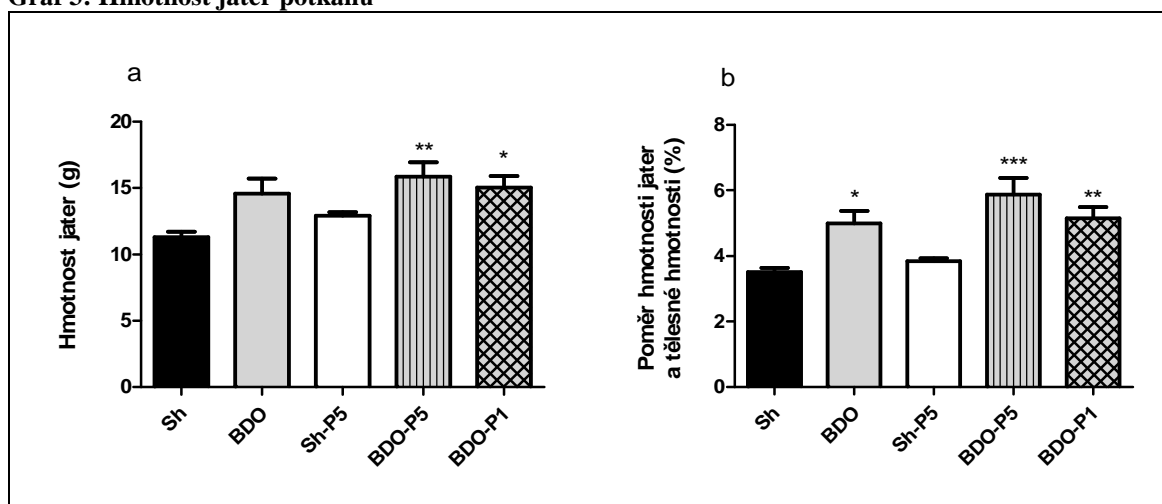
## 4.1.3 Změny hmotnosti jater

Po provedení kinetické *in vivo* studie 7. den po operaci byla bezprostředně po usmrcení zvířat vykrvením v celkové anestézii vyjmuta játra, která byla zvážena (graf 3) a neprodleně zamražena v tekutém dusíku. Hmotnost jater vztážená k celkové hmotnosti potkana byla signifikantně zvýšena u skupiny BDO na 142 % ( $p < 0,05$ ) v porovnání s kontrolní skupinou Sh. Hmotnost jater byla významně zvýšena také u dalších dvou experimentálních skupin s aplikovaným pravastatinem BDO-P5 a BDO-P1 a to na 167 %



( $p < 0,001$ ) a 147 % ( $p < 0,01$ ) v porovnání s Sh. Oproti skupině BDO nebyly pozorované změny statisticky signifikantní, nicméně ve skupině BDO-P5 byla hmotnost jater zvýšena o dalších 18 %. Rozdíl mezi BDO a BDO-P1 byl takřka zanedbatelný (3 %). Pravděpodobnou příčinou zvýšené hmotnosti jater jsou proliferativní a fibrotické změny jaterní tkáně (obrázek 15 a graf 4).

**Graf 3: Hmotnost jater potkanů**



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M,  $n = 6$ .

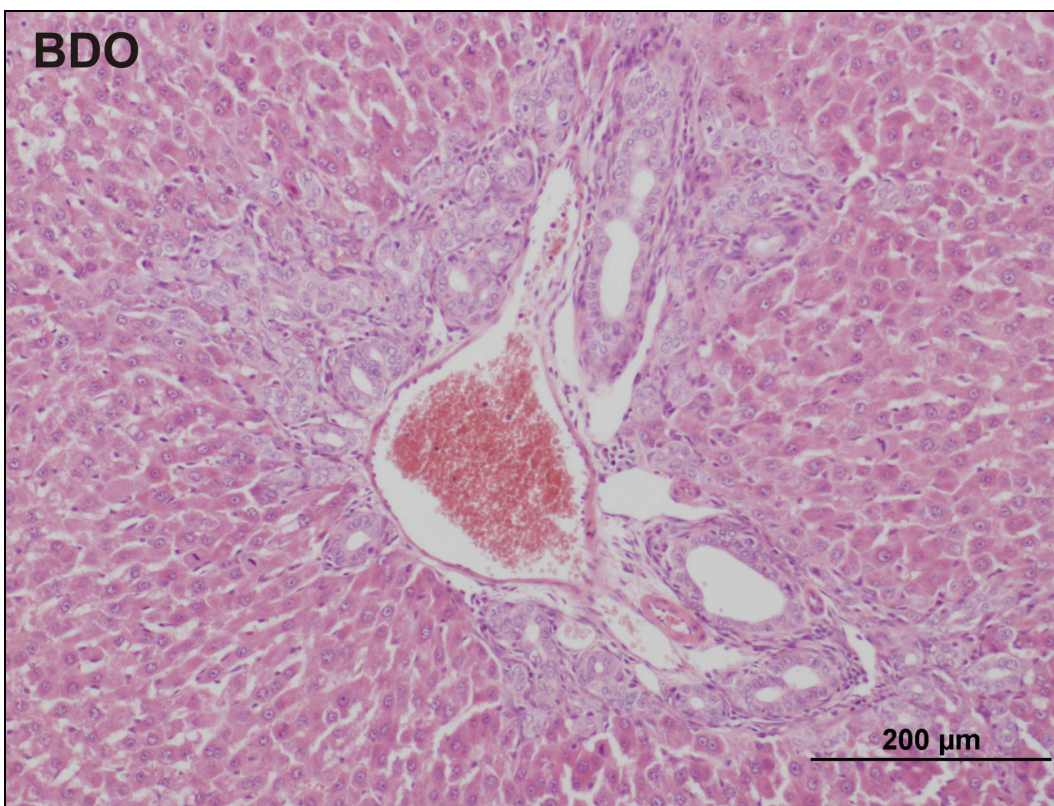
Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

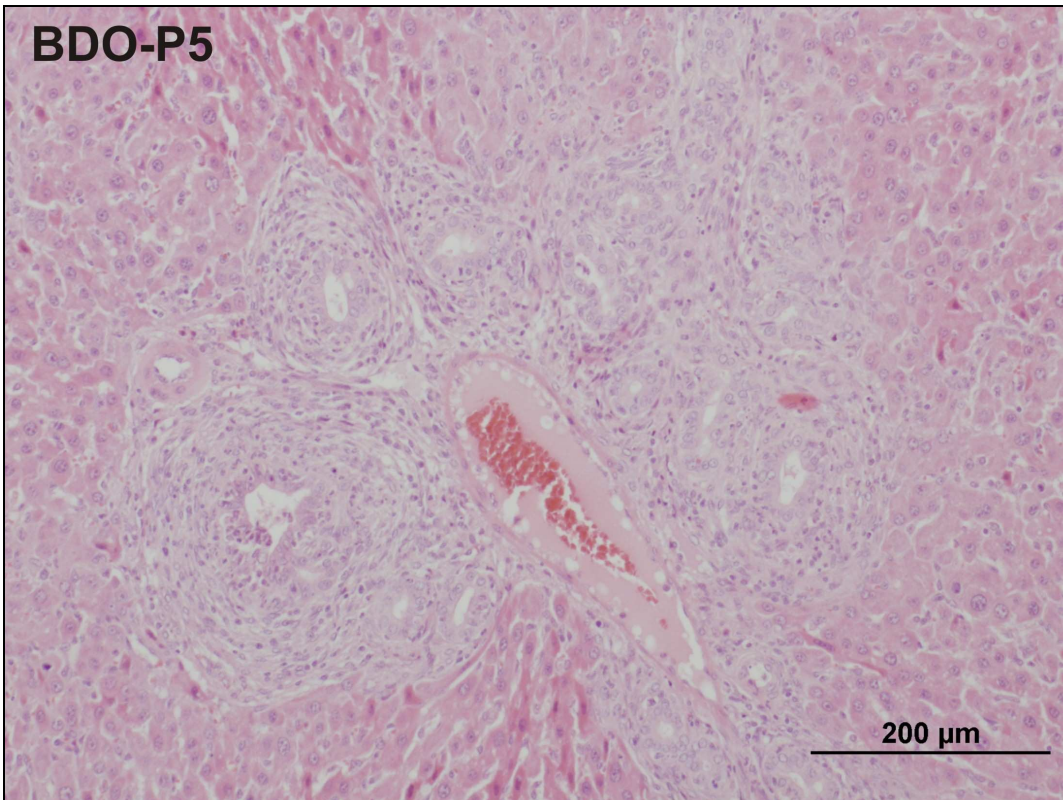
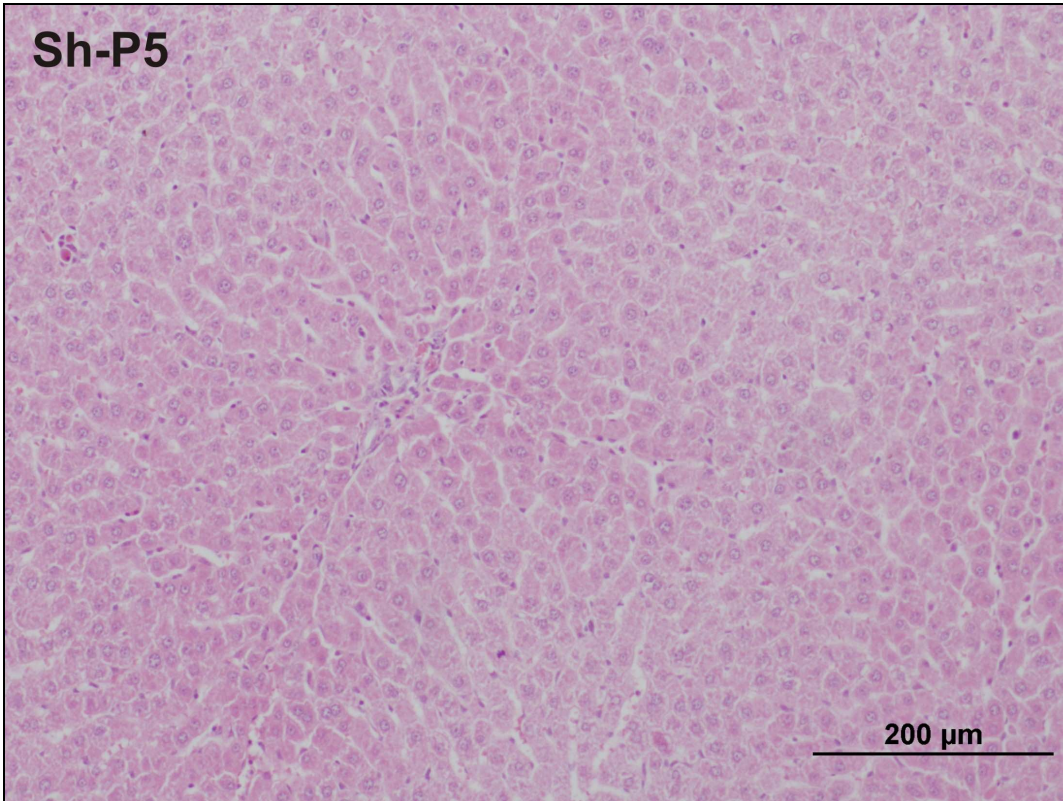
## 4.2 Histologické vyšetření jater

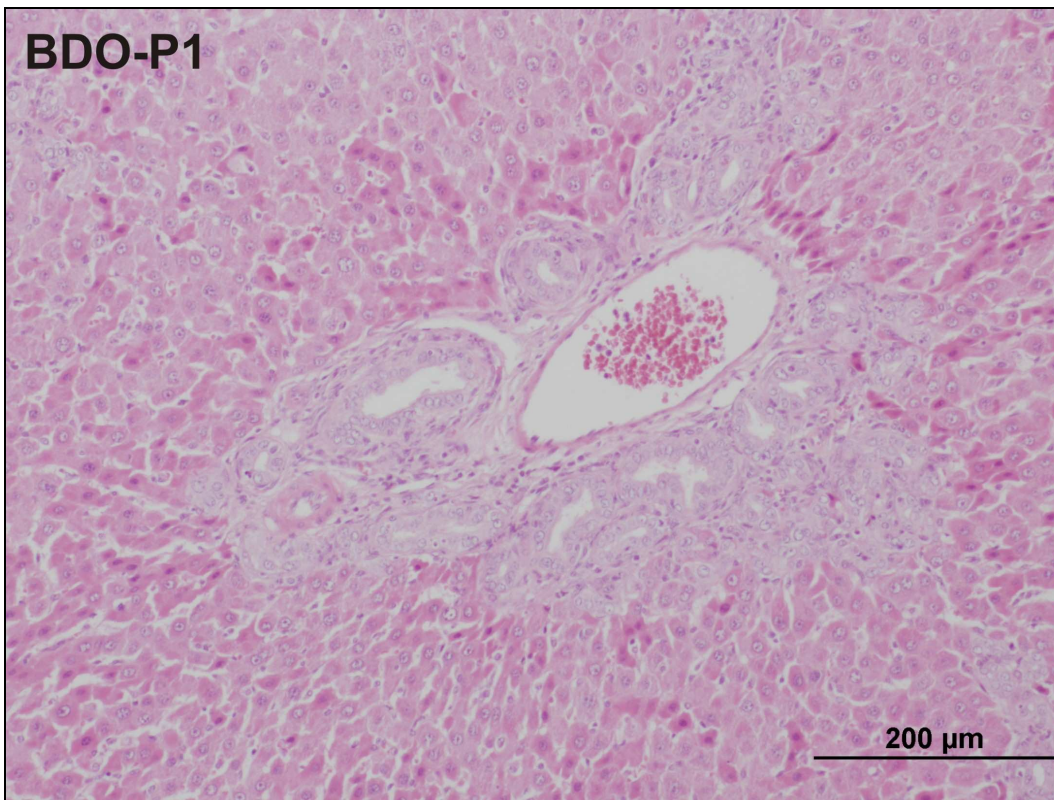
Vzorek odebraný před zamražením jater byl podroben histologické analýze, která u kontrolních sham-operovaných zvířat neprokázala žádné změny v architektuře jaterní tkáně. U BDO zvířat byla pozorována výrazná proliferace žlučovodů se zvětšenými periportálními prostory a rozšířenými žlučovými kanálky. V histologických preparátech byla dále nalezena počínající fibrotická přestavba jaterní tkáně a ojediněle také tuková degenerace hepatocytů. Popsané změny jsou ve skupině BDO-P5 výraznější v porovnání se skupinou BDO, zatímco ve skupině s dávkou pravastatinu 1 mg/kg byly proliferativní a fibrotické změny sníženy v porovnání s BDO i BDO-P5 skupinami, což potvrzuje také exprese PCNA a  $\alpha$ -SMA (graf 4). Histologické nálezy jsou demonstrovány na obrázku 15.

Obrázek 15: Histologické vyšetření jater





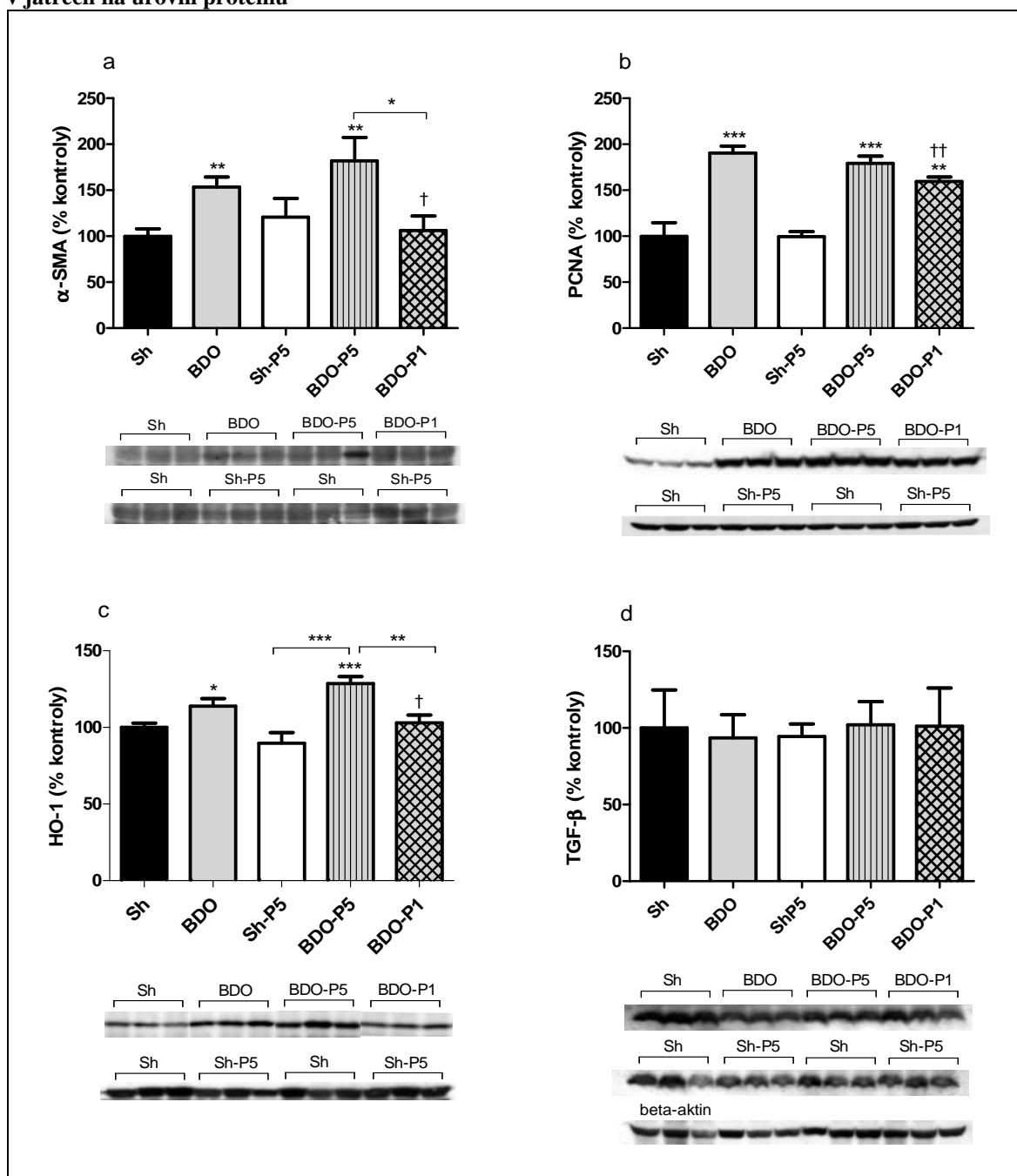




### 4.3 Expresse indikátorů proliferace a fibrogeneze

Expresse PCNA stanovená v játrech metodou Western blot byla významně zvýšena u všech skupin zvířat, které prodělaly podvaz žlučovodu (graf 4b). Ve skupině BDO-P1 byl ale pozorován významný pokles o 31 % ( $p < 0,01$ ) v expresi tohoto proliferačního indikátoru oproti BDO skupině. Obdobné změny nastaly také v expresi indikátoru fibrogeneze  $\alpha$ -SMA, jehož expresse byla statisticky významně zvýšena pouze u skupin BDO a BDO-P5, nikoliv u skupiny BDO-P1, v porovnání se skupinou kontrolní (graf 4a). Expresse HO-1 v játrech byla významně zvýšena nejen ve skupině BDO na 110 % ale také ve skupině BDO-P5 na 130 % v porovnání se skupinou Sh. Na rozdíl od skupiny s vyšší aplikovanou dávkou pravastatinu byl ve skupině BDO-P1 zaznamenán v expresi HO-1 statisticky významný pokles oproti BDO i BDO-P5 (graf 4c). Expresse TGF- $\beta$  zůstala nezměněna.

**Graf 4: Expres vybraných indikátorů proliferace (PCNA), fibrogenyze ( $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ ) a HO-1 v játrech na úrovni proteinu**



Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly (průměr  $\pm$  S.E.M, n = 6).

Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Signifikantní rozdíl oproti BDO (†  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$ ).



## 4.4 Biochemické vyšetření plazmy

Získané výsledky biochemického vyšetření shrnuje tabulka 3. Příčinou ikteru pozorovaného u BDO zvířat byla zvýšená plazmatická koncentrace bilirubinu a konjugovaného bilirubinu. Mezi další změny, typické pro obstrukční cholestázu, patřila zvýšená koncentrace žlučových kyselin a hypercholesterolémie. Aplikace vyšší dávky pravastatinu nezmírnila biliární obstrukcí navozené změny vybraných biochemických parametrů, naopak koncentrace bilirubinu a žlučových kyselin byla ještě zvýšena. Překvapivé změny byly ale pozorovány ve skupině BDO-P1, kde byla oproti neléčené BDO skupině významně snížena koncentrace celkového bilirubinu, konjugovaného bilirubinu i žlučových kyselin. U všech zvířat s obstrukcí žlučovodu byla statisticky významně zvýšena koncentrace železa v plazmě.

**Tabulka 3: Biochemické vyšetření plazmy**

	Sh	BDO	Sh-P5	BDO-P5	BDO-P1
Celkový bilirubin ( $\mu\text{M}$ )	$2,7 \pm 0,3$	$54 \pm 4,3$ ***	$3,5 \pm 1,3$	$67 \pm 12$ ***	$28 \pm 4,0$ ** <sup>†</sup>
Konjug. bilirubin ( $\mu\text{M}$ )	$2,0 \pm 0$	$25 \pm 3,8$ ***	$<0,1^a$	$40 \pm 9$ *** <sup>†</sup>	$12 \pm 2,1$ <sup>†</sup>
Celkový protein (g/l)	$44 \pm 0,9$	$48 \pm 1,2$	$44 \pm 2,2$	$47 \pm 1,4$	$50 \pm 1,2$
Albumin (g/l)	$27 \pm 0,4$	$29 \pm 1,0$	$26 \pm 1,4$	$25 \pm 1,6$	$28 \pm 0,6$
Cholesterol (mM)	$1,1 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$ **	$1,2 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,3$ **	$2,1 \pm 0,1$ **
Triglyceridy (mM)	$1,3 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
LDL cholesterol (mM)	$0,2 \pm 0,02$	$0,8 \pm 0,1$ ***	$0,1 \pm 0,02$	$0,6 \pm 0,1$ *	$0,8 \pm 0,1$ ***
HDL cholesterol (mM)	$0,8 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$
Železo ( $\mu\text{M}$ )	$9,8 \pm 1,1$	$29 \pm 3,2$ ***	$7,6 \pm 0,5$	$20 \pm 2,0$ *	$28 \pm 3,8$ ***
TBA ( $\mu\text{M}$ )	$7,5 \pm 0,8$	$18 \pm 3,4$ **	$9,8 \pm 1,2$	$34 \pm 9,0$ **	$11 \pm 2,2$ <sup>†</sup>

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M (n = 6). <sup>a</sup> pod mezí detekce.

Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; BDO, potkani s obstrukcí žlučovodu; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučovodu a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučovodu a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; TBA, celkové žlučové kyseliny.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

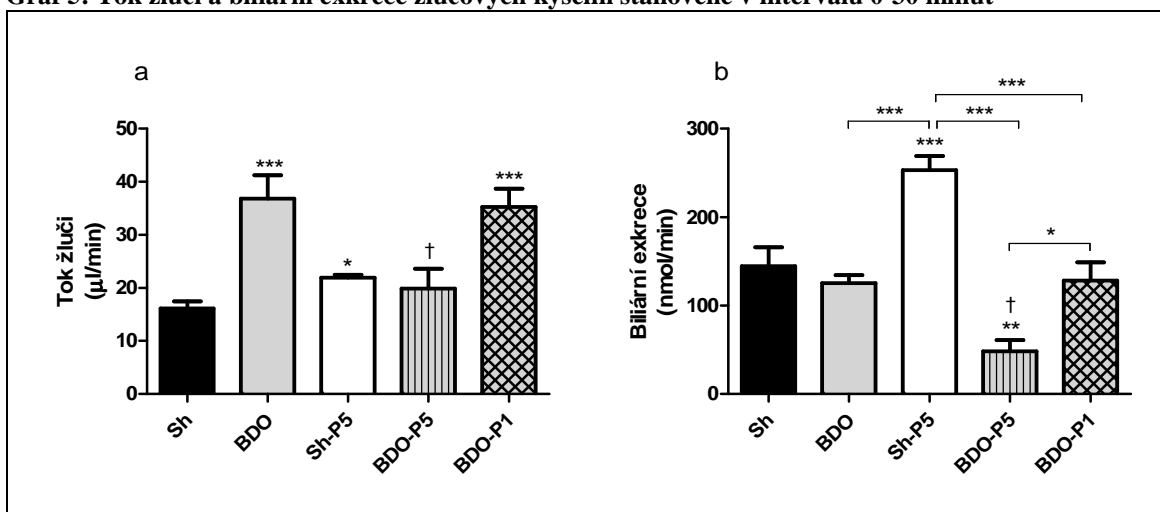
Signifikantní rozdíl oproti BDO (<sup>†</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>††</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>†††</sup>  $p < 0,001$ ).

## 4.5 Metabolismus žlučových kyselin

### 4.5.1 Tok žluči

Tok žluči a biliární exkrece žlučových kyselin jsou znázorněné v grafu 5. V průběhu kinetické studie byly v pravidelných intervalech sbírány vzorky žluči. Do výpočtů toku žluči a biliární exkrece žlučových kyselin byly použity vzorky z prvního intervalu (0-30'), které nejlépe korespondují s navozeným patofyziologickým stavem. Po rozvolnění podvazu a zprůchodnění žlučových cest byl pozorován významně vyšší tok žluče u BDO a BDO-P1 skupin v porovnání s Sh. Ve skupině BDO-P5 byl tok žluče oproti neléčené BDO skupině snížen v důsledku potlačené exprese kanalikulárních transportních proteinů Bsep a Mrp2 (viz. tabulka 4). Snížená exprese Bsep vysvětluje nejen snížený tok žluče ve skupině BDO-P5, ale také sníženou biliární exkreci a současně zvýšenou plazmatickou koncentraci žlučových kyselin (viz. tabulka 3).

Graf 5: Tok žluči a biliární exkrece žlučových kyselin stanovené v intervalu 0-30 minut



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M, n = 6.

Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Signifikantní rozdíl oproti BDO (†  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$ ).

#### 4.5.2 Exprese genů zapojených do homeostázy žlučových kyselin

Hodnoty exprese vybraných markerů ovlivňujících metabolismus žlučových kyselin a bilirubinu u sham-operovaných potkanů a potkanů s podvazem žlučovodu jsou zaznamenány v tabulce 4.

Expresse genů zapojených do homeostázy žlučových kyselin a bilirubinu byly stanoveny ve vzorcích jater na úrovni mRNA metodou RT-PCR. Ve skupině BDO byla snížena exprese bazolaterálních transportních proteinů Ntcp a Oatp1a1 zodpovídajících za vychytávání žlučových kyselin z portální krve do hepatocytu. U obstrukční cholestázy dochází také k poklesu exprese Bsep a Mrp2, které zajišťují transport žlučových kyselin a bilirubinu přes kanalikulární membránu do žluče. V naší studii nebyly změny v expresi Bsep a Mrp2 transportních proteinů statisticky významné, což je pravděpodobně způsobeno krátkou dobou trvání podvazu, nicméně z našich výsledků je patrný trend poklesu v expresi zmíněných proteinů. Dalším, pro obstrukční cholestázu typickým, nálezem byla zvýšená exprese Mdr1b na kanalikulární membráně hepatocytu a Mrp3 na membráně bazolaterální.

Ve skupině BDO-P5 byla snížena exprese Mrp2 na 50 % ( $p < 0,01$ ), což bylo statisticky významné v porovnání jak s kontrolní skupinou, tak se skupinou neléčených podvázaných zvířat. Snížená byla také exprese druhého, pro transport žlučových kyselin nezbytného, proteinu lokalizovaného na kanalikulární membráně –Bsep, jehož exprese poklesla v této skupině na 67 % ( $p < 0,05$ ) v porovnání s Sh.

Také ve skupině s nižší aplikovanou dávkou pravastatinu byl zaznamenán pokles exprese Mrp2 na 50 % ( $p < 0,05$ ) v porovnání s Sh, ale exprese Bsep byla zvýšena na 110 % ( $p < 0,05$ ), což může vysvětlit vyšší tok žluči a biliární exkreci žlučových kyselin ve skupině BDO-P1 porovnáme-li ji se skupinou BDO-P5.

Zvýšená exprese Cyp7a1 ve skupině BDO byla aplikací pravastatinu snížena více než o 400 % ( $p < 0,05$ ). Významně snížena byla ve skupinách BDO-P5 a BDO-P1 také exprese enzymů Cyp8b1 a Cyp3a2 v porovnání s Sh a Ugt1a1 v porovnání s BDO.

Neméně zajímavé byly změny u kontrolních zvířat, kterým byl podán pravastatin v dávce 5 mg/kg. Zde pravastatin zvýšil expresi transportních proteinů Oatp1a4, Mrp2, Bsep a Mrp4 v porovnání s Sh skupinou. Vzestup exprese byl v této skupině dále zaznamenán u Cyp7a1, a to na 200 % ( $p < 0,05$ ) oproti skupině Sh.



**Tabulka 4: Expresse vybraných genů zapojených do homeostázy žlučových kyselin a bilirubinu**

	<b>BDO</b>	<b>Sh-P5</b>	<b>BDO-P5</b>	<b>BDO-P1</b>
Mrp2	93 ± 16	150 ± 17 *	50 ± 9 ** †	50 ± 12 * †
Mrp3	1800 ± 240 ***	110 ± 17	1600 ± 390 **	2400 ± 240 ***
Mrp4	80 ± 16	210 ± 32 *	73 ± 7	67 ± 8
Mdr1a	120 ± 23	110 ± 12	100 ± 12	116 ± 15
Mdr1b	5200 ± 970 ***	780 ± 420	8100 ± 1900 ***	5400 ± 690 ***
Ntcp	40 ± 9 ***	110 ± 9	39 ± 7 ***	36 ± 5 ***
Bsep	78 ± 6	230 ± 33 **	67 ± 8 *	110 ± 7 †
Oatp1a1	49 ± 8 **	130 ± 12	35 ± 3 ***	48 ± 8 ***
Oatp1a4	57 ± 11	440 ± 60 **	48 ± 6 *	66 ± 9
Ugt1a1	120 ± 8	120 ± 10	77 ± 8 ††	66 ± 11 * ††
Cyp7a1	920 ± 190 **	200 ± 36 *	520 ± 90 *	430 ± 80 * †
Cyp8b1	15 ± 3 ***	99 ± 9	12 ± 4 ***	7,0 ± 1 *** †
Cyp3a2	50 ± 16 **	100 ± 20	15 ± 4 ***	22 ± 5 ***

Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly (průměr ± S.E.M, n = 6).

BDO, potkani s obstrukcí žlučového; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

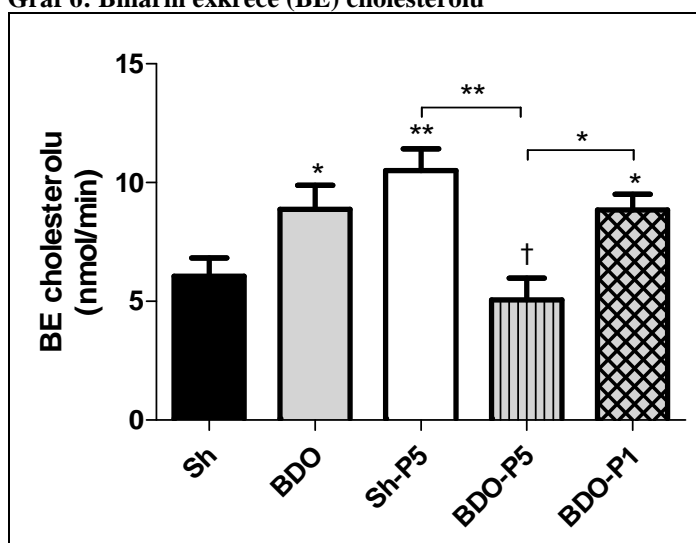
Signifikantní rozdíl oproti BDO (†  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$ ).

## 4.6 Metabolismus cholesterolu

### 4.6.1 Biliární exkrece cholesterolu

Zvýšený tok žluče u Sh-P5, BDO a BDO-P1 (graf 5) byl pravděpodobně příčinou statisticky významně zvýšené biliární exkrece cholesterolu (graf 6). Ve skupině BDO-P5 byla významně snížena exprese Bsep a Mrp2 kanalikulárních transportních proteinů (tabulka 4), čemuž také odpovídá pokles toku žluči a tím i biliární exkrece cholesterolu.

Graf 6: Biliární exkrece (BE) cholesterolu



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M, n = 6.

Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

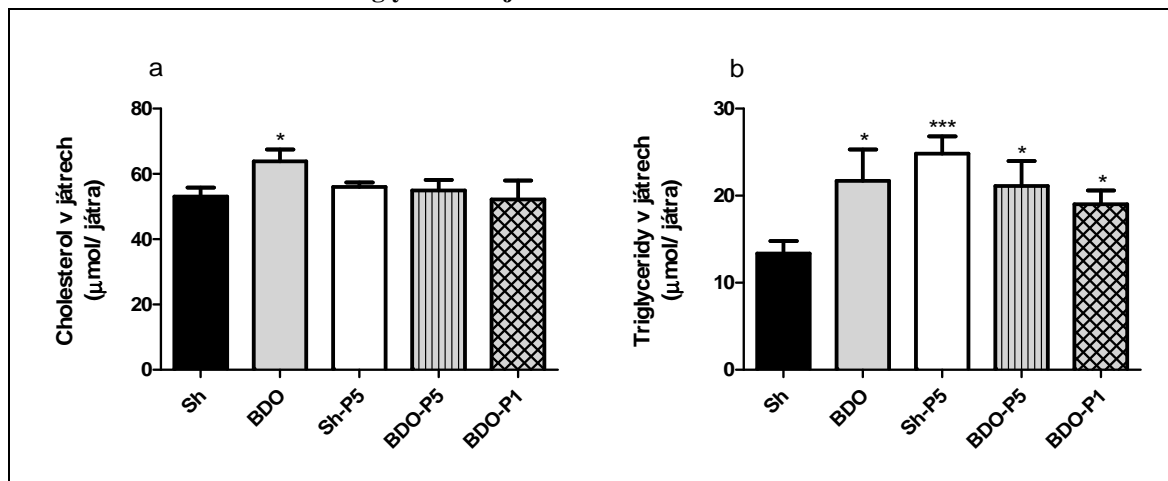
Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Signifikantní rozdíl oproti BDO (†  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$ ).

### 4.6.2 Obsah cholesterolu a triglyceridů v játrech

Obsah cholesterolu v játrech byl zvýšen pouze u skupiny BDO na 120 % v porovnání se skupinou Sh. Obsah jaterního cholesterolu u potkanů s navozenou obstrukcí žlučových cest a současně léčených pravastatinem se nelišil od kontrolní skupiny zvířat. Obsah triglyceridů byl naproti tomu zvýšen nejen u BDO, ale také u Sh-P5, BDO-P5 a BDO-P1, tedy ve všech skupinách, kterým byl podáván pravastatin (graf 7).

Graf 7: Obsah cholesterolu a triglyceridů v játrech



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M, n = 6.

Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat bez léčby; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 4.6.3 Expres genů zapojených do homeostázy cholesterolu

Expres vybraných genů na úrovni mRNA majících důležitou úlohu v metabolismu cholesterolu jsou shrnuty v tabulce 5. K výrazným změnám v expresi transportních proteinů u potkanů ze skupiny BDO došlo na kanalikulární i bazolaterální membráně hepatocytů. Na kanalikulární membráně byla snížena exprese Abcg5 a Abcg8, transportních proteinů zajišťujících eflux cholesterolu do žluče, na 10 % ( $p < 0,001$ ) a 12 % ( $p < 0,01$ ) v porovnání s Sh. Expres Mdr2 byla naopak zvýšena na 190 % ( $p < 0,05$ ). Na membráně bazolaterální byla nalezena zvýšená exprese LDL-receptoru zajišťujícího vychytávání LDL-cholesterolu do hepatocytu a snížená exprese Abca1 na 37 % ( $p < 0,001$ ) v porovnání s Sh. U BDO byla dále pozorován vzestup exprese HMG-CoA reduktázy, enzymu klíčového pro syntézu cholesterolu. Pozorované změny tak mohou vysvětlit kumulaci cholesterolu v játrech ve skupině BDO (graf 7). Aplikace zejména nižší dávky pravastatinu potkanům s podvazem žlučového způsobila pokles v expresi LDL-receptoru, Acat2 a HMG-CoA reduktázy a vzestup v expresi Abca1 a Mdr2 proteinu, což koresponduje se sníženým obsahem cholesterolu v játrech v porovnání s BDO.

**Tabulka 5: Expres vybraných genů zapojených do homeostázy cholesterolu**

	<b>BDO</b>	<b>Sh-P5</b>	<b>BDO-P5</b>	<b>BDO-P1</b>
LDLr	140 ± 11 *	180 ± 28 *	100 ± 12	93 ± 12 †
Sr-b1	93 ± 12	110 ± 11	88 ± 12	94 ± 11
Abca1	37 ± 5 ***	130 ± 19	66 ± 11	74 ± 4 †
Abcg5	10 ± 2 ***	96 ± 29	11 ± 4 ***	10 ± 2 ***
Abcg8	12 ± 2 **	120 ± 29	19 ± 6 *	12 ± 4 *
Mdr2	190 ± 24 *	88 ± 5	230 ± 26 *	270 ± 20 * †
HMG-CoA red.	200 ± 33 *	89 ± 17	130 ± 30	92 ± 7 ††
Acat2	110 ± 20	92 ± 12	53 ± 5 *** †	48 ± 7 *** †

Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly (průměr ± S.E.M, n = 6).

BDO, potkani s obstrukcí žlučového; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

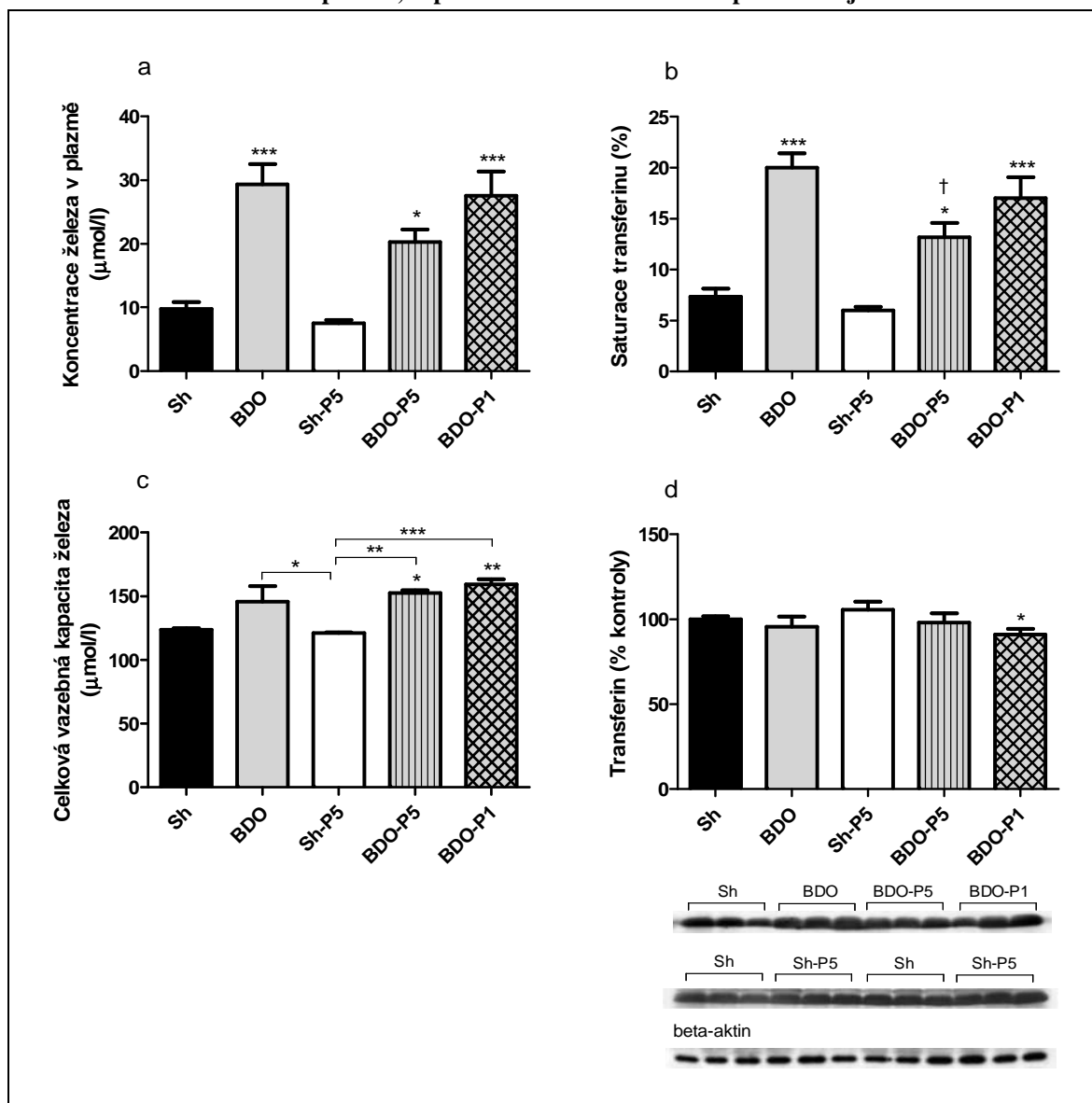
Signifikantní rozdíl oproti BDO (†  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$ ).

## 4.7 Metabolismus železa

### 4.7.1 Koncentrace železa v plazmě

U všech tří skupin s navozenou obstrukční cholestázou (BDO, BDO-P5 a BDO-P1) byla naměřena významně zvýšená plazmatická koncentrace železa, čemuž odpovídala zvýšená saturace transferinu a celková vazebná kapacita železa (graf 8). Expres transferinu na úrovni proteinu byla snížena pouze ve skupině BDO-P1 na 91 % ( $p=0,05$ ) v porovnání s Sh, v ostatních skupinách nebyly v expresi transferinu pozorovány žádné změny.

Graf 8: Koncentrace železa v plazmě, exprese transferinu na úrovni proteinu a jeho saturace



Hodnoty koncentrace železa v plazmě, saturace transferinu a celková vazebná kapacita železa jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M, n = 6. Expres transferinu je vyjádřena jako % kontroly (průměr ± S.E.M, n = 6).

Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

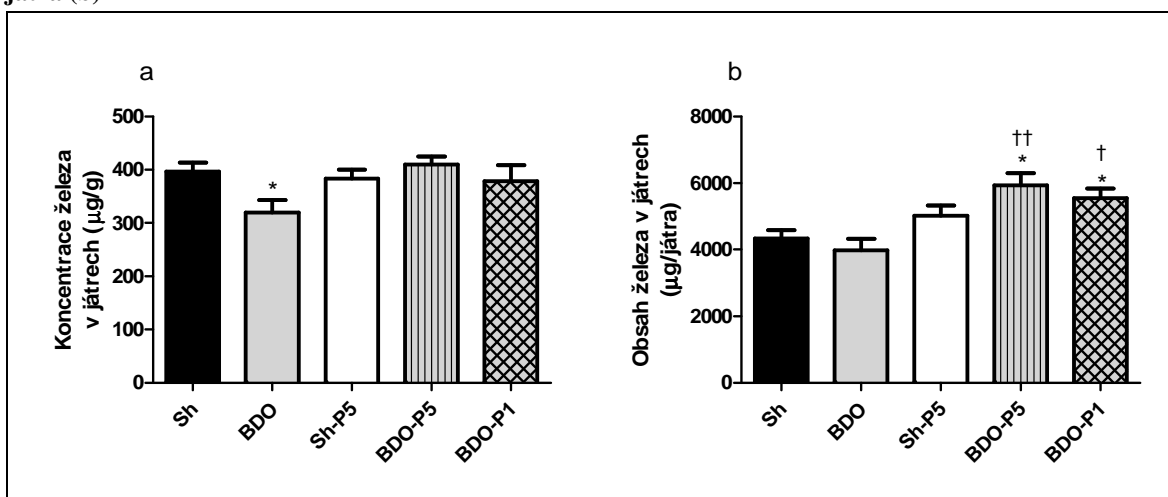
Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Signifikantní rozdíl oproti BDO (†  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$ ).

## 4.7.2 Obsah železa v játrech

Ve vzorcích jater byla stanovena koncentrace železa a následně vypočítán obsah železa vztažený na hmotnost celých jater. Koncentrace železa byla snížena ve skupině BDO na 81 % ( $p=0,05$ ) v porovnání s Sh. Aplikace pravastatinu podvázaným potkanům dokázala tomuto poklesu koncentrace jaterního železa předejít (graf 9a). Jestliže byla koncentrace železa přepočítána na hmotnost celých jater, byl pozorován významný vzestup obsahu železa u skupin BDO-P5 a BDO-P1 na 140 % ( $p<0,05$ ) a 130 % ( $p<0,05$ ) v porovnání s Sh (graf 9b). Vzestup jaterního obsahu železa byl statisticky významný také v porovnání se skupinou BDO.

**Graf 9: Koncentrace železa v játrech přepočítaná na g jater (a) a obsah železa přepočítaný na celá játra (b)**



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M,  $n = 6$ .

Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat; BDO, potkani s obstrukcí žlučovodu; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučovodu a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučovodu a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Signifikantní rozdíl oproti BDO (†  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$ ).

### 4.7.3 Exprese genů zapojených do homeostázy železa

Hodnoty exprese genů ovlivňujících metabolismus železa jsou zaznamenány v tabulce 6. Exprese vybraných genů majících důležitou úlohu v metabolismu železa byly stanoveny na úrovni mRNA metodou RT-PCR. Zvýšená exprese TfR1 zajišťujícího vychytávání železa do hepatocytů, feritinu a feroportinu 1 ve skupině BDO byla po podání pravastatinu ve skupinách BDO-P5 a BDO-P1 dále navýšena. V důsledku podvazu žlučovodu klesla exprese hepcidinu na 37 % ( $p < 0,01$ ), aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg byla tato exprese u BDO-P1 zvýšena o 187 % ( $p < 0,01$ ) oproti neléčené BDO skupině, čímž se prakticky rovnala hodnotě kontrolní skupiny Sh. Exprese transportního proteinu DMT-1 zodpovídajícího na bazolaterální membráně za vychytávání železa do hepatocytů byla u BDO zvýšena na 310 % ( $p < 0,001$ ) v porovnání s Sh. Exprese DMT-1 byla u podvázaných potkanů vlivem podávaného pravastatinu významně zvýšena, porovnáme-li ji s hodnotami exprese nalezenými v experimentální skupině BDO.

**Tabulka 6: Exprese vybraných genů zapojených do homeostázy železa**

	<b>BDO</b>	<b>Sh-P5</b>	<b>BDO-P5</b>	<b>BDO-P1</b>
Feroportin 1	230 ± 46 *	120 ± 17	500 ± 84 *** ††	650 ± 100 *** †††
Feritin	150 ± 14	94 ± 10	170 ± 15 *	180 ± 8 **
TfR1	210 ± 60	99 ± 15	380 ± 41 *** ††	330 ± 32 *** †
TfR2	110 ± 20	100 ± 16	140 ± 28	170 ± 18 *
Hepcidin	37 ± 9 **	63 ± 11	76 ± 19	110 ± 15 ††
DMT-1	310 ± 31 ***	100 ± 33	2500 ± 760 * ††	1500 ± 380 ** ††

Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly (průměr ± S.E.M, n = 6).

BDO, potkani s obstrukcí žlučovodu; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučovodu a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučovodu a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

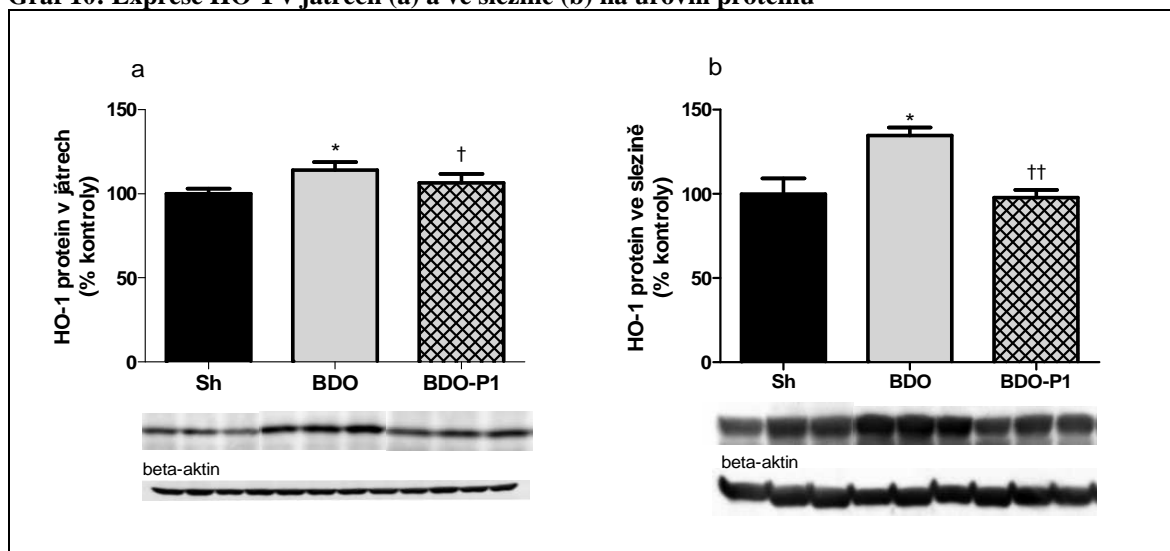
Signifikantní rozdíl oproti BDO (†  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$ ).

#### 4.7.4 Exprese molekul zapojených do homeostázy železa na úrovni proteinu

Abychom získali kompletní představu o změnách v metabolismu železa v průběhu chronické obstrukční cholestázy a případném vlivu pravastatinu a současně potvrdili nebo vyvrátili změny na úrovni mRNA, byla stanovena exprese feritinu, ferroportinu 1, TfR1, TfR2, pSTAT3, DMT-1, hepcidinu a IL-6 v játrech a HO-1 v játrech a ve slezině na úrovni proteinu metodou Western blot. Protože předchozí analýzy na úrovni mRNA neodhalily žádné změny ve skupině Sh-P5 oproti kontrolní skupině Sh (tabulka 6) a jako perspektivní pro další použití u obstrukční cholestázy se jevila pouze nižší dávka pravastatinu (1 mg/kg) byly pro tyto účely použity pouze vzorky ze skupin Sh, BDO a BDO-P1.

Expresi HO-1 v játrech byla zvýšena ve skupině BDO na 110 % v porovnání s Sh. Ve skupině BDO-P1 byl v porovnání s touto skupinou pozorován v expresi tohoto proteinu významný pokles. Abychom tento efekt nižší dávky pravastatinu potvrdili, byla stanovena exprese také ve slezině, orgánu s nejvyšší expresí HO-1. Expresi HO-1 ve slezině byla u BDO rovněž signifikantně zvýšena na 130 % ( $p=0,05$ ) v porovnání Sh. Ve skupině BDO-P1 byla exprese HO-1 ve slezině snížena o 27 % ( $p=0,01$ ) v porovnání s BDO. Změny v expresi HO-1 ve slezině znázorňuje graf 10.

Graf 10: Expresi HO-1 v játrech (a) a ve slezině (b) na úrovni proteinu



Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly (průměr  $\pm$  S.E.M,  $n = 6$ ).

Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den.

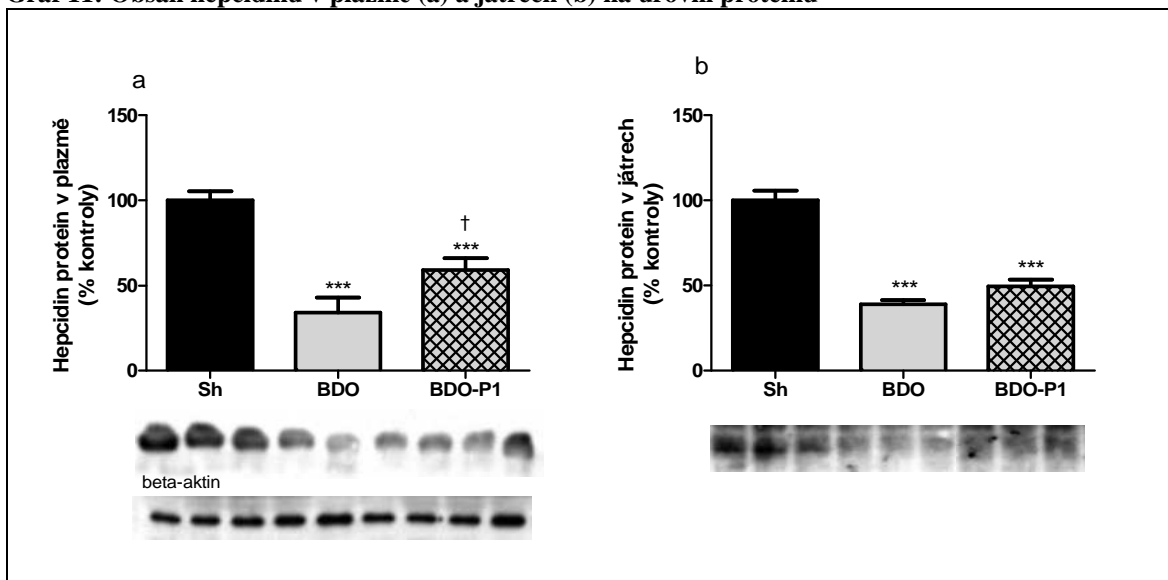
Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Signifikantní rozdíl oproti BDO (†  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$ ).



Na úrovni proteinu byla stanovena také exprese hepcidinu, klíčového regulátoru homeostázy železa, v plazmě a játrech. Ve skupině neléčených cholestatických zvířat byla exprese hepcidinu snížena v plazmě i játrech na 34–39 % v porovnání se zvířaty po sham operaci. Pravastatin zvýšil množství hepcidinu zejména v plazmě, a to o 73 % ( $p=0,05$ ) v porovnání s BDO. Změny v expresi tohoto proteinu jsou znázorněny v grafu 11.

**Graf 11: Obsah hepcidinu v plazmě (a) a játrech (b) na úrovni proteinu**



Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly (průměr ± S.E.M, n = 6).

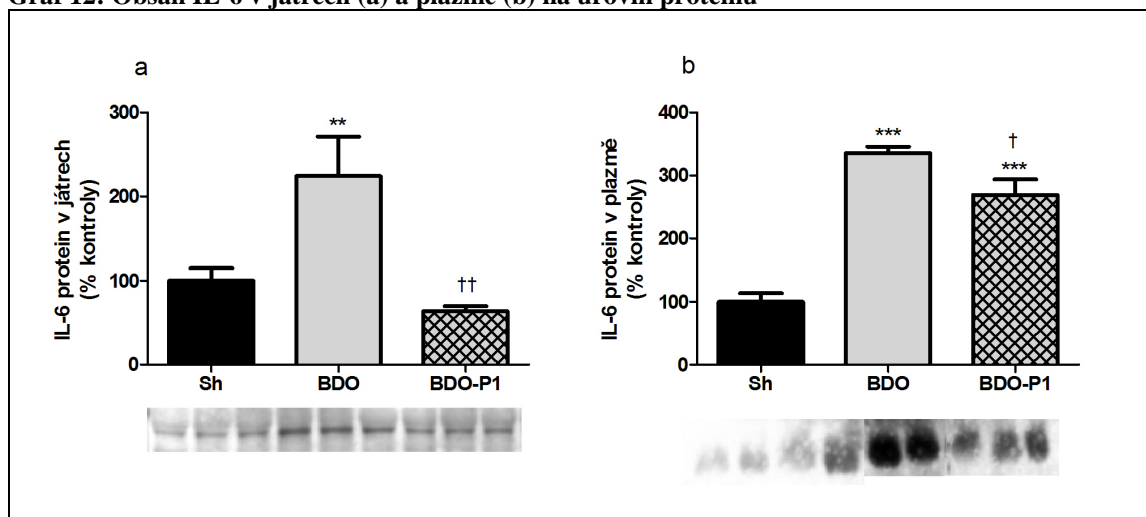
Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Signifikantní rozdíl oproti BDO (†  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$ ).

Protože jedním z hlavních regulátorů produkce hepcidinu je IL-6, který vazbou na komplex IL-6 receptoru a gp130 ovlivňuje fosforylaci pSTAT3 a tím i expresi hepcidinu, byl na úrovni proteinu stanoven také obsah jaterního a plazmatického IL-6 (graf 12). V neléčené BDO skupině byla exprese IL-6 statisticky významně zvýšena v játrech na 220 % ( $p=0,01$ ) a v plazmě na 340 % ( $p=0,001$ ) v porovnání s Sh. Naproti tomu ve skupině cholestatických potkanů léčených pravastatinem v dávce 1 mg/kg byla exprese IL-6 snížena o 72 % ( $p=0,01$ ) v játrech a o 20 % v plazmě v porovnání s BDO.

**Graf 12: Obsah IL-6 v játrech (a) a plazmě (b) na úrovni proteinu**



Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly (průměr ± S.E.M, n = 6).

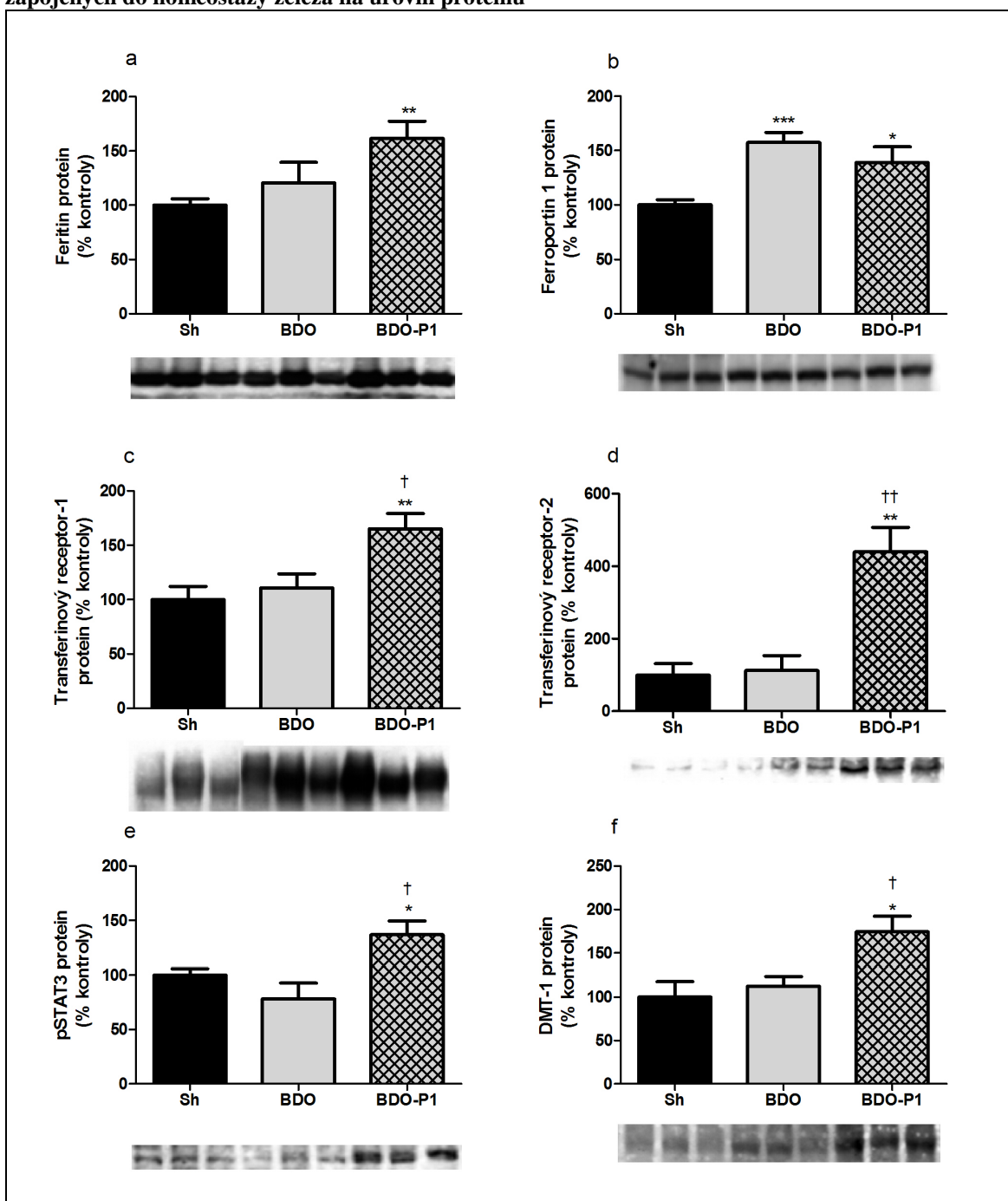
Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Signifikantní rozdíl oproti BDO (†  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$ ).

Analýzy exprese na úrovni proteinu dále odhalily významně zvýšenou expresi ferroportinu 1 ve skupině BDO na 160 % v porovnání s Sh (graf 13b). Po podání pravastatinu cholestatickým potkanům byla zvýšena exprese nejen této efluxní pumpy lokalizované na bazolaterální membráně hepatocytů, nýbrž i feritinu, pSTAT3, DMT-1 a obou transferinových receptorů (graf 13). Výsledky studií exprese na úrovni proteinu tak potvrdily změny na úrovni mRNA získané metodou RT-PCR (tabulka 6).

**Graf 13: Expresa molekul (ferritinu, feroportinu, transferinových receptorů, pSTAT3 a DMT-1) zapojených do homeostázy železa na úrovni proteinu**



Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly (průměr ± S.E.M, n = 6).

Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Signifikantní rozdíl oproti BDO (†  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$ ).

## 4.8 Exprese vybraných nukleárních receptorů

Nezbytným krokem pro pochopení základních regulačních mechanismů v průběhu chronické obstrukční cholestázy byla analýza exprese vybraných nukleárních receptorů (tabulka 7) na úrovni mRNA metodou RT-PCR. Ve skupině BDO byly pozorovány podstatné změny v expresi dvou nukleárních receptorů, CAR a SHP, jejichž exprese byla zvýšena na 260 % ( $p < 0,05$ ) a 540 % ( $p < 0,05$ ) v porovnání s Sh. U BDO-P5 a BDO-P1 byla po aplikaci pravastatinu snížena exprese FXR, SHP, CAR, LRH-1, HNF-1 $\alpha$  a SREBP-2 v porovnání s BDO.

V kontrolní skupině Sh-P5 byla statisticky významně zvýšena exprese receptoru CAR a to na 240 % ( $p = 0,05$ ) v porovnání s Sh, v expresi dalších, námi hodnocených, nukleárních receptorů byl pozorován pouze vzestupný trend.

**Tabulka 7: Relativní exprese vybraných nukleárních receptorů na úrovni mRNA**

	<b>BDO</b>	<b>Sh-P5</b>	<b>BDO-P5</b>	<b>BDO-P1</b>
FXR	130 $\pm$ 26	140 $\pm$ 17	65 $\pm$ 9 * <sup>†</sup>	51 $\pm$ 6 * <sup>†</sup>
PXR	110 $\pm$ 15	140 $\pm$ 21	76 $\pm$ 10	94 $\pm$ 14
CAR	260 $\pm$ 54 *	240 $\pm$ 54 *	110 $\pm$ 25 <sup>†</sup>	96 $\pm$ 5 <sup>†</sup>
LXR- $\alpha$	120 $\pm$ 11	144 $\pm$ 11	110 $\pm$ 11	160 $\pm$ 11 * <sup>†</sup>
SHP	540 $\pm$ 100 *	170 $\pm$ 48	180 $\pm$ 43 <sup>†</sup>	210 $\pm$ 42 <sup>†</sup>
SREBP-2	100 $\pm$ 11	130 $\pm$ 17	66 $\pm$ 7 ** <sup>†</sup>	72 $\pm$ 5 * <sup>†</sup>
PPAR- $\alpha$	150 $\pm$ 20	190 $\pm$ 68	180 $\pm$ 9 ***	260 $\pm$ 21 *** <sup>††</sup>
HNF-1 $\alpha$	140 $\pm$ 32	94 $\pm$ 14	63 $\pm$ 5 **	55 $\pm$ 8 ** <sup>†</sup>
LRH-1	120 $\pm$ 14	100 $\pm$ 18	43 $\pm$ 6 * <sup>†††</sup>	43 $\pm$ 4 * <sup>†††</sup>

Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly (průměr  $\pm$  S.E.M, n = 6).

BDO, potkani s obstrukcí žlučového; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Signifikantní rozdíl oproti BDO (<sup>†</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>††</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>†††</sup>  $p < 0,001$ ).

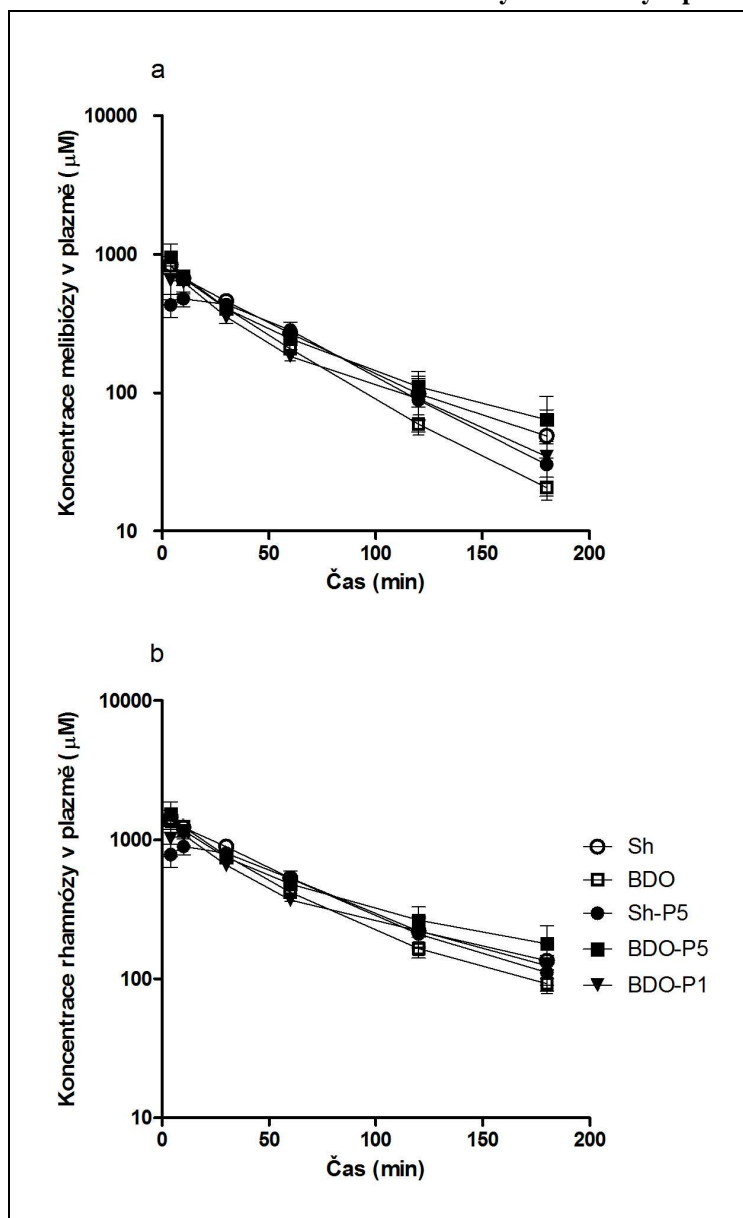
## **4.9 Permeabilita hematobiliární bariéry**

Protože pro správnou tvorbu a tok žluče je nutná správná funkce hematobiliární bariéry, byla za použití rhamnózo/melibiózového testu hodnocena permeabilita této bariéry.

### **4.9.1 Koncentrace melibiózy a rhamnózy v plazmě**

Oba cukry (rhamnóza a melibióza) jsou eliminovány především ledvinami, jejich biliární exkrece je zcela minoritní. Proto není překvapující, že plazmatické koncentrace melibiózy (graf 14a) a rhamnózy (graf 14b) zůstaly u skupin BDO, BDO-P5 a BDO-P1 v porovnání s kontrolními skupinami prakticky nezměněny.

Graf 14: Plazmatické koncentrace melibiózy a rhamnózy v průběhu kinetické studie



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M, n = 6.

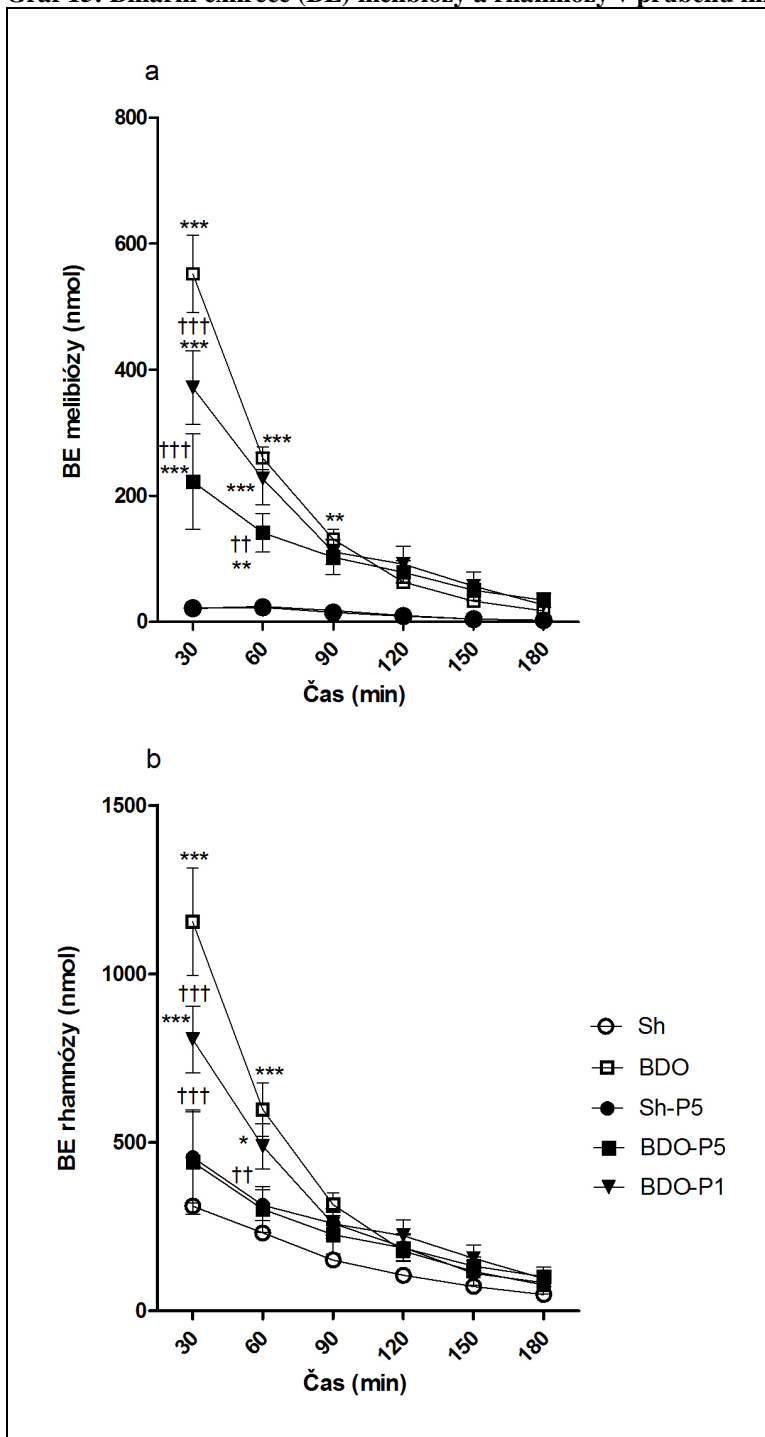
Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

#### 4.9.2 Biliární exkrece melibiózy a rhamnózy

I přes skutečnost, že eliminace melibiózy a rhamnózy žlučí je neporovnatelně nižší než exkrece ledvinami, změny biliární exkrece obou cukrů velmi dobře popisují stav dané bariéry. Biliární exkrece melibiózy a rhamnózy byla u všech skupin s navozeným cholestatickým postižením (BDO, BDO-P5 a BDO-P1) zvýšena především v prvních

intervalech kinetické studie trvající 180 minut (graf 15). Od 90. minuty studie byly rozdíly v biliární exkreci obou cukrů mezi kontrolními a experimentálními skupinami statisticky nevýznamné.

Graf 15: Biliární exkrece (BE) melibiózy a rhamnózy v průběhu kinetické studie



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M, n = 6.

Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací

pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

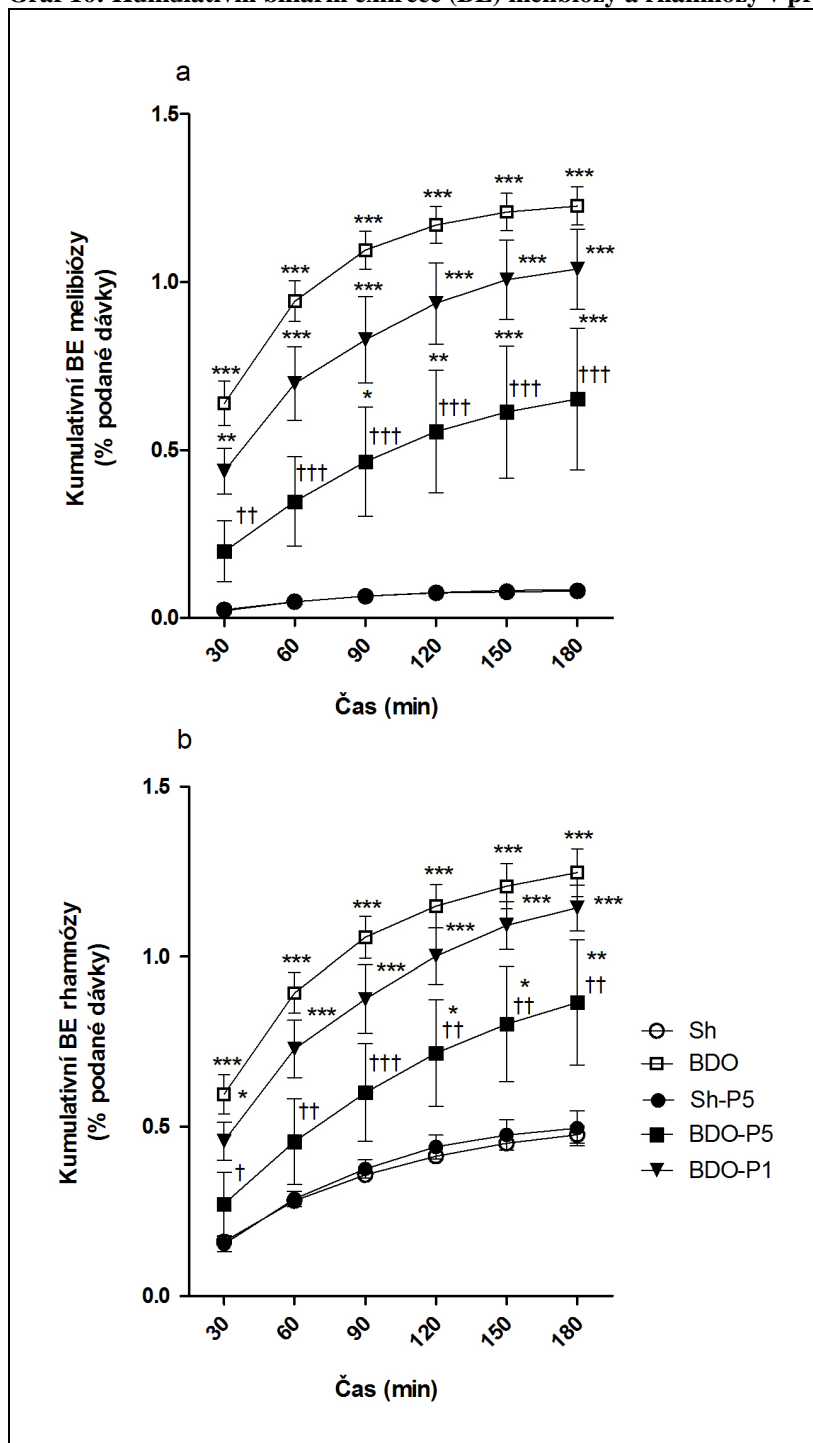
Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Signifikantní rozdíl oproti BDO (<sup>†</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>††</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>†††</sup>  $p < 0,001$ ).

Kumulativní biliární exkrece melibiózy a rhamnózy přepočítaná na procenta podané dávky (graf 16) jednotlivých cukrů byla u skupin BDO, BDO-P5 a BDO-P1 signifikantně vyšší než tomu bylo ve skupinách kontrolních. Ve skupině BDO-P5 nabývala kumulativní biliární exkrece obou cukrů statisticky významně nižších hodnot v porovnání s BDO, což vysvětluje snížený tok žluči pozorovaný v této experimentální skupině (graf 5).



Graf 16: Kumulativní biliární exkrece (BE) melibiózy a rhamnózy v průběhu kinetické studie



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M, n = 6.

Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

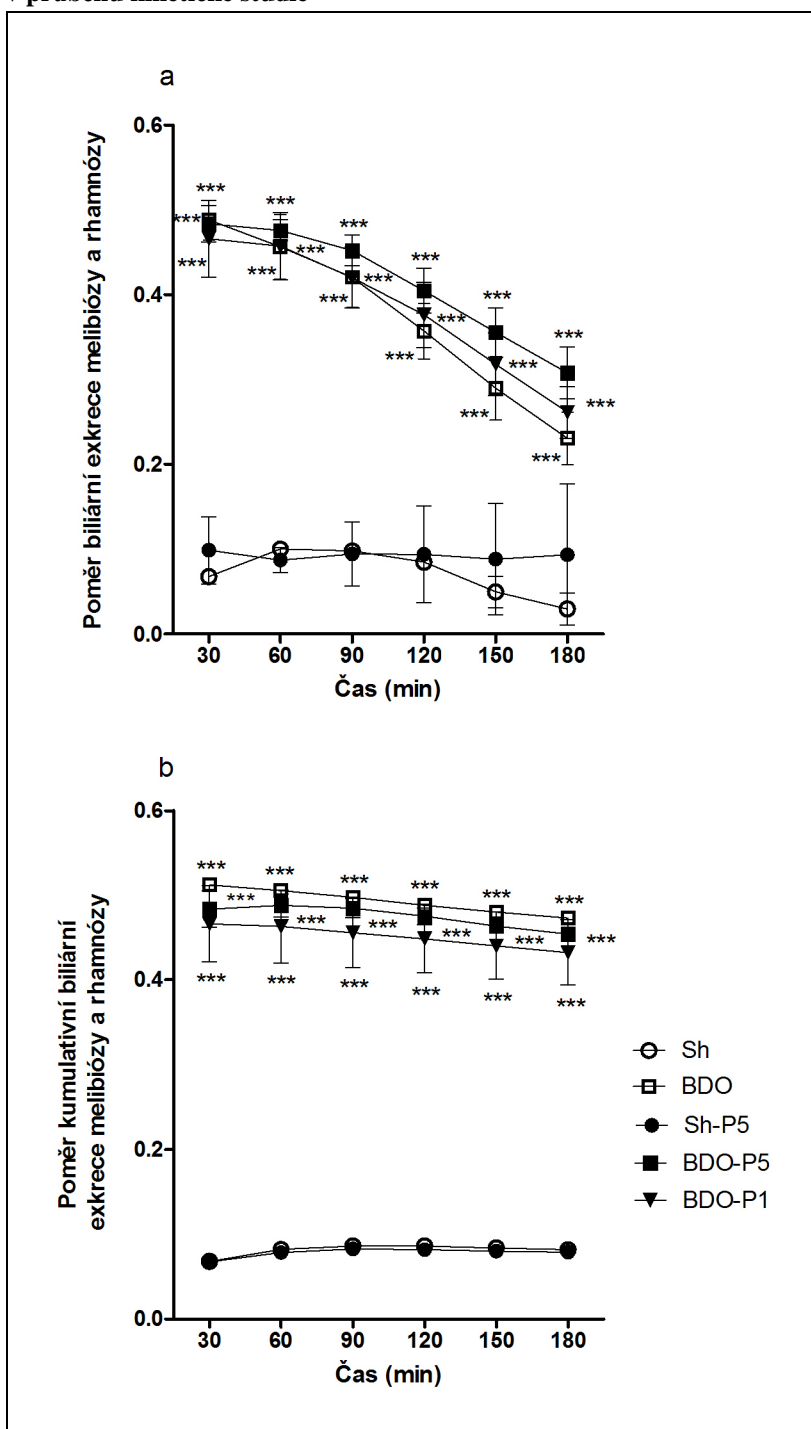
Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Signifikantní rozdíl oproti BDO ( $\dagger p < 0,05$ ;  $\ddagger p < 0,01$ ;  $\ddagger\ddagger p < 0,001$ ).

### **4.9.3 Poměr biliární exkrece melibiózy a rhamnózy**

Hlavním ukazatelem míry poškození hematobiliární bariéry je poměr biliární exkrece melibiózy a rhamnózy, případně poměr kumulativní biliární exkrece melibiózy a rhamnózy. Oba tyto poměry byly u všech skupin zvířat s navozeným cholestatickým poškozením jater výrazně vyšší v porovnání s kontrolními skupinami bez ohledu na podávaný pravastatin. Nicméně, z grafu 17a je patrné, že poměr biliární exkrece melibiózy a rhamnózy se u skupin BDO, BDO-P5 a BDO-P1 v průběhu tříhodinové kinetické studie postupně přibližuje ke kontrolním hodnotám. Tyto změny s největší pravděpodobností souvisí s rozvolněním podvazu a se zmírněním biliárního tlaku.

Graf 17: Poměr biliární exkrece (a) a kumulativní biliární exkrece (b) melibiózy a rhamnózy v průběhu kinetické studie



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M, n = 6.

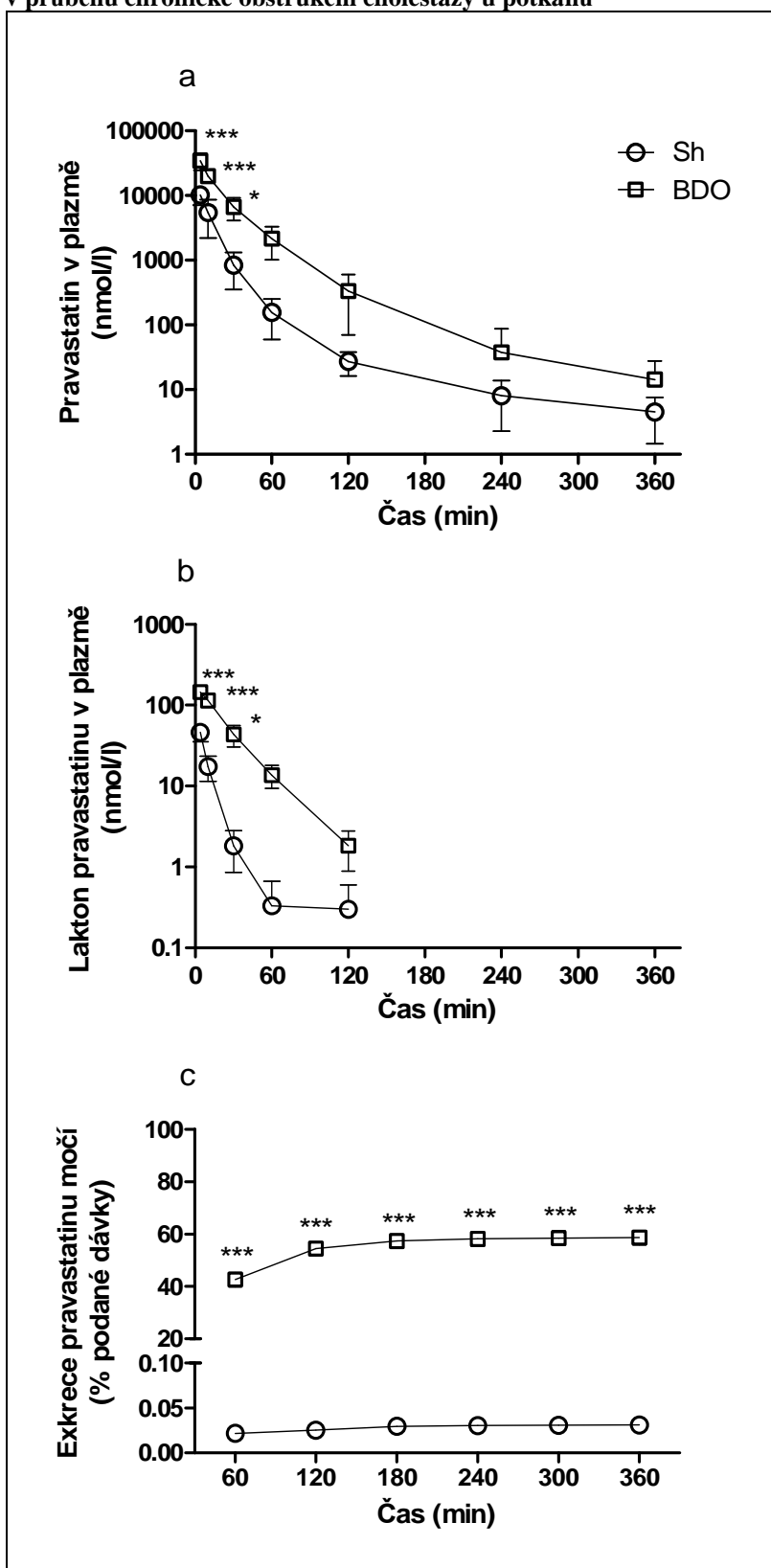
Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat; BDO, potkani s obstrukcí žlučovodu; Sh-P5, potkani po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučovodu a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučovodu a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 4.10 Farmakokinetika pravastatinu v průběhu chronické obstrukční cholestázy

Jedním z nejdůležitějších předpokladů při volbě vhodného léčiva pro tuto studii byla skutečnost, že biliární exkrece pravastatinu je v průběhu chronické obstrukční cholestázy účinně kompenzována močovou exkrecí. Pro potvrzení této teorie byla provedena *in vivo* studie trvající 6 hodin na jejímž počátku byl potkanům aplikován pravastatin v dávce 5 mg/kg i.v. Ve vzorcích plazmy a moči odebíraných v pravidelných intervalech byla koncentrace pravastatinu a jeho laktonu stanovena metodou HPLC. Graf 18c ukazuje, že při obstrukci žlučových cest je močová exkrece pravastatinu mnohonásobně zvýšena v porovnání s kontrolní Sh skupinou, což vysvětluje postupně klesající plazmatické koncentrace pravastatinu a jeho laktonu (graf 18a,b). Graf znázorňující koncentraci laktonu pravastatinu v moči potkanů není z důvodu příliš nízkých a tedy nezměřitelných koncentrací uveden.

Graf 18: Koncentrace pravastatinu (a) a jeho laktonu (b) v plazmě a močová exkrece pravastatinu (c) v průběhu chronické obstrukční cholestázy u potkanů



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M, n = 6.

Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat; BDO, potkani s obstrukcí žlučového.

Signifikantní rozdíl oproti kontrole (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 5 DISKUZE

Obstrukční cholestáza je klinický syndrom doprovázející četná onemocnění jater. Léčba spočívá v chirurgickém odstranění příčiny obstrukce, která ale nedokáže zcela zabránit rozvíjející se sepsi a poškození jaterní tkáně. Proto je důležité zaměřit se na hledání nových terapeutických přístupů, které by s minimálními nežádoucími účinky dokázaly zabránit progresi vzniklého onemocnění. Jako velmi nadějně se jeví statiny, které v mnoha klinických i preklinických studiích projevily řadu velmi pozitivních účinků při cholestatických onemocněních jater. Pro naši studii byl vybrán pravastatin, který se od ostatních zástupců této široce používané skupiny hypolipidemik liší svými farmakokinetickými vlastnostmi. Po podání je rychle absorbován (Hatanaka *et al*, 2000; Kivisto a Niemi, 2007) a vychytáván do hepatocytů pomocí bazolaterálních transportních proteinů Oatp1a1 a Oatp1a4 (Kuroda *et al*, 2004; Tokui *et al*, 1999). Velmi žádoucí u onemocnění jater je také skutečnost, že pravastatin je zcela minimálně metabolizován enzymy CYP450, což vysvětluje nižší výskyt lékových interakcí na úrovni metabolismu (Shitara a Sugiyama, 2006). Většina per os podaného pravastatinu je následně vyloučena převážně v nezměněné formě (Neuvonen *et al*, 2008) do žluče prostřednictvím Mrp2 transportního proteinu (Adachi *et al*, 1996, Yamazaki *et al*, 1996, Yamazaki *et al*, 1997). Rozhodujícím faktorem při volbě vhodného léčiva pro naši studii bylo ale zjištění, že na rozdíl od ostatních statinů může být eliminace pravastatinu žlučí při biliární obstrukci částečně kompenzována močovou exkrecí (Takada *et al*, 2004; Williams a Feely, 2002), což také potvrzují naše výsledky shrnuté v grafu 18. Tato fakta spolu s výsledky studie, ve které pravastatin zmírnil biochemické a klinické projevy u pacientů s primární biliární cirhózou (Kurihara *et al*, 1993) nás vedly k zahájení výzkumu vlivu pravastatinu na cholestatická onemocnění jater.

### 5.1 Hodnocení celkové toxicity

Nejzávažnější cholestatické poškození nejen jater, ale i celého organismu, bylo pozorováno ve skupině BDO-P5. Byla zde zaznamenána zvýšená mortalita (graf 1) spojená se stagnací tělesné hmotnosti v průběhu celé studie (graf 2). Naopak hmotnost jater přepočítaná na tělesnou hmotnost byla v této skupině nejvyšší (graf 3). Tento nález byl v souladu s histologickým vyšetřením jater a zvýšenou expresí proliferačního markeru PCNA a markeru fibrogenyze  $\alpha$ -SMA (graf 4). Cholestatické poškození bylo u těchto zvířat umocněno významně zvýšenou plazmatickou koncentrací bilirubinu, konjugovaného

bilirubinu a žlučových kyselin (tabulka 3). Z těchto výsledků je tedy patrné, že vyšší aplikovaná dávka pravastatinu působila na potkaní organizmus škodlivě až toxicky. Účinky nižší dávky pravastatinu byly zcela odlišné. Mortalita ve skupině BDO-P1 byla minimální (uhynulo pouze jedno zvíře) a v průběhu studie byl zaznamenán pozvolný vzestup tělesné hmotnosti potkanů. Histologické vyšetření prokázalo menší proliferační a fibrotické změny jaterní tkáně v porovnání s BDO a BDO-P5, což koresponduje s výsledky expresních studií (graf 4). Dále byla v této experimentální skupině významně snížena plazmatická koncentrace bilirubinu a žlučových kyselin v porovnání s BDO a BDO-P5. Ze získaných dat lze tedy usuzovat, že pravastatin aplikovaný v dávce 1 mg/kg vykazuje v průběhu obstrukční cholestázy široké spektrum pozitivních účinků. Výrazně zvýšená eliminace ledvinami současně zabraňuje kumulaci léčiva v organizmu.

## 5.2 Metabolismus žlučových kyselin

Důsledkem přerušenoého transportu žluči žlučovými cestami při obstrukční cholestáze je kumulace potenciálně toxických látek, především žlučových kyselin a bilirubinu, v hepatocytech. Ve snaze zabránit dalšímu poškození jater se tak aktivují tzv. anticholestatické obranné mechanismy, jejichž podstatou je snížit uptake žlučových kyselin a bilirubinu do hepatocytu a naopak upřednostnit eliminaci těchto látek ledvinami (Schlattjan *et al*, 2003).

Ve skupině BDO byla pozorována adaptivní odpověď na biliární obstrukci zprostředkovaná nukleárními receptory FXR/SHP a CAR aktivovanými žlučovými kyselinami. Tato odpověď spočívala ve snížení exprese *Ntcp* a *Oatp1a1*, které na bazolaterální membráně zajišťují transport žlučových kyselin z portální krve do hepatocytu, ve snížení exprese kanalikulárních proteinů *Mrp2* a *Bsep* a naopak zvýšení exprese především *Mrp3*, bazolaterálního proteinu umožňujícího návrat žlučových kyselin zpět do krve a alternativní eliminaci ledvinami. Na kanalikulární membráně byla rovněž zvýšena exprese *Mdr2* transportního proteinu, který přenosem fosfatidylcholinu podporuje tvorbu smíšených micel. Všechny námi pozorované změny v expresi vybraných transportních proteinů ve skupině BDO byly v souladu s literárními údaji (Geier *et al*, 2007; Wagner *et al*, 2009; Zollner *et al*, 2009) a potvrdily tak, že experimentální model obstrukční cholestázy byl u potkanů navozen správně (obrázek 16).

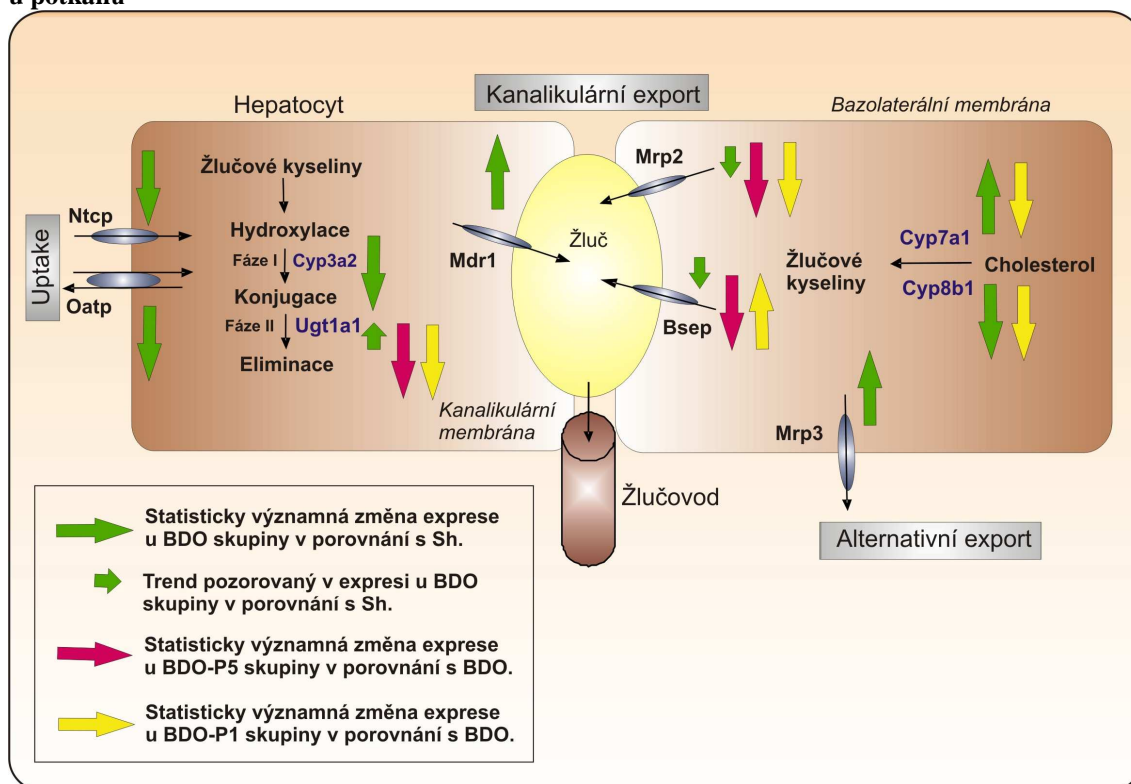
Aplikace pravastatinu BDO potkanům vyvolala pokles exprese *Mrp2* transportního proteinu lokalizovaného na kanalikulární membráně hepatocytu. Tento účinek pravastatinu, způsobený down-regulací FXR nukleárního receptoru, je zřejmě ochranou

zcela neprůchodných žlučvodů před dalším hromaděním žlučových kyselin a před narůstajícím biliárním tlakem (Zhu *et al*, 2011). Ve skupině BDO-P5 byla nicméně v důsledku potlačené exprese Bsep a v důsledku nezměněné exprese enzymů nezbytných pro syntézu žlučových kyselin mnohonásobně zvýšena plazmatická koncentrace žlučových kyselin, zatímco ve skupině BDO-P1 byla tato koncentrace snížena v porovnání s BDO i BDO-P5 skupinami vlivem zachovalé exprese Bsep a především snížené exprese Cyp7a1 a Cyp8b1.

Z předešlých prací je známo, že při obstrukční cholestáze dochází k paradoxně zvýšené expresi enzymu Cyp7a1, který je nezbytný pro syntézu žlučových kyselin z cholesterolu. Tento efekt je vysvětlován omezeným přísunem žlučových kyselin do střeva. V tenkém střevě totiž žlučové kyseliny za normálních okolností aktivují prostřednictvím FXR intestinální faktor Fgf 15, který se v játrech váže na receptor FGFR4 a potlačuje tak expresi tohoto enzymu (Claudel *et al*, 2011). U BDO-P1 skupiny byl pozorován pokles v expresi Cyp7a1, který lze vysvětlit up-regulací nukleárního receptoru PPAR- $\alpha$  a naopak down-regulací LRH-1. Exprese Cyp8b1 ve skupině BDO byla aktivací FXR/SHP regulační dráhy signifikantně snížena v porovnání s kontrolní skupinou. Byla tak upřednostněna tvorba kyseliny chenodeoxycholové a tím redukována intestinální absorpce cholesterolu (Slätis *et al*, 2010). Snížená exprese Cyp8b1 tak na jedné straně snížila tvorbu žlučových kyselin, ale na straně druhé se mohla podílet na kompenzačním zvýšení exprese genů zapojených do syntézy cholesterolu *de novo* v játrech (Murphy *et al*, 2005). Jako příznivé lze proto chápat snížení exprese Cyp8b1 podáním nižší dávky pravastatinu ve skupině BDO-P1 v porovnání s BDO. Vzhledem ke skutečnosti, že exprese FXR/SHP byla ve skupinách BDO-P5 a BDO-P1 potlačena, se lze domnívat, že příčinou snížené exprese Cyp8b1 byla down-regulace receptoru LRH-1, který se významně podílí na regulaci složení žluče.



**Obrázek 16: Změny v expresi jaterních transportních proteinů a enzymů majících důležitou úlohu v metabolismu žlučových kyselin v průběhu neléčené a pravastatinem léčené obstrukční cholestázy u potkanů**



BDO, potkani s obstrukcí žlučového; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

Ntcp, Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide; Oatp, organic anion transporter; Bsep, bile salt export pump; Mrp, multidrug resistance-associated protein; Mdr 1, multidrug resistance protein 1; Ugt1a1, UDP-glukuronosyl transferáza; Cyp7a1, cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxyláza; Cyp8b1, sterol-12 $\alpha$ -hydroxyláza.

Důležitým zjištěním byla schopnost pravastatinu zvýšit tok žluče u kontrolních zvířat. Tento efekt byl podmíněn zvýšením exprese Oatp1a4, Mrp2 a Bsep transportních proteinů s následným zvýšením biliární exkrece žlučových kyselin (Dijkers *et al*, 2010). Vysvětlení přinesla analýza exprese nukleárních receptorů, která odhalila, že pravastatin u zdravých zvířat indukoval expresi nukleárního receptoru CAR. Současně se podařilo potvrdit naše předešlá publikovaná pozorování, že extrahepatální cholestáza vede po uvolnění obstrukce žlučového ke zvýšení tvorby žluče navzdory snížené expresi odpovědných transportérů (viz. kapitola 5.4). Ačkoliv pravastatin v nízké dávce neovlivnil rychlost tvorby žluče u cholestatických zvířat, vyšší dávka způsobila její pokles. Jelikož byl tento efekt spojen s redukcí biliární exkrece žlučových kyselin bez vlivu na expresi odpovědných transportérů, lze předpokládat přímý vliv farmaka. V souladu s tímto tvrzením byla recentně popsána schopnost pravastatinu inhibovat hlavní kanalikulární

transportér pro žlučové kyseliny, Bsep. Nicméně hodnota  $K_i$  pro pravastatin se pohybuje v rozmezí 163-805  $\mu\text{M}$ , což naznačuje výraznou kumulaci farmaka po podání vyšší dávky. Tomu odpovídají i námi pozorované zvýšené plazmatické koncentrace pravastatinu během cholestázy (graf 18). Na základě této kumulace lze vysvětlit i zvýšenou toxicitu léčiva projevující se u cholestatických zvířat po vyšší dávce v analýzách přežívání a biochemické a histologické odpovědi.

### 5.3 Metabolismus bilirubinu

Velmi zajímavým a originálním zjištěním práce bylo snížení plazmatických koncentrací celkového a konjugovaného bilirubinu v cholestatické skupině léčené nižší dávkou pravastatinu. Detailní analýza metabolické dráhy bilirubinu označila za hlavní příčinu tohoto jevu snížení exprese HO-1 v játrech a ve slezině, tj. snížení jeho syntézy z hemu přes biliverdin (Wagner *et al*, 2005; Beilke *et al*, 2009). Bilirubin není pouze odpadní produkt metabolismu hemu, ale v jistém koncentračním rozmezí vykazuje také antioxidační vlastnosti a inhibuje peroxidaci lipidů. Indukce HO-1 je proto během cholestázy často popisována jako cytoprotektivní mechanismus (Scheingraber *et al*, 2009). Překvapujícím recentním zjištěním ale je, že velmi výrazná indukce HO-1 může naopak buňky na působení oxidačního stresu senzitivizovat. Zásadní je tedy míra indukce HO-1, protože nadměrná aktivace HO-1 a tím produkce železa pak převáží protektivní účinky CO a bilirubinu (Froh *et al*, 2007). Froh *et al*. (2007) dále ve své studii s BDO potkany prokázal zhoršení fibrotických změn po podání cobalt protoporfyrinu, induktoru HO-1. A protože železo ve zvýšeném množství vykazuje proliferativní (Fargion *et al*, 2011), profibrogenní až kancerogenní účinky (Immenschuh *et al*, 2010) není překvapující, že ve skupinách BDO a BDO-P5 s indukovanou expresí enzymu byla zvýšená také exprese  $\alpha$ -SMA a PCNA. Ve skupině BDO-P1 byl naopak pozorován významný pokles proliferativních a fibrotických změn oproti BDO skupině. Tak markantní rozdíl mezi skupinami BDO-P5 a BDO-P1 je dán mírou indukce HO-1. U BDO-P5 se při nárůstu hepatotoxicity patrně snoubil vliv oxidačního stresu a přímé toxicity léčiva s indukčním účinkem kumulujícího se statinu na HO-1. Statiny totiž aktivují prostřednictvím Keap1/Nrf2 expresi HO-1, čímž prokazují některé ze svých pleiotropních účinků (Muchova *et al*, 2007; Makabe *et al*, 2010; Habeos *et al*, 2008). Ve studii autora Hsu *et al* (2006) bylo publikováno, že aktivitu HO-1 v játrech zvyšují především lipofilní statiny (simvastatin a lovastatin), které mohou přes plazmatické membrány procházet také pasivní difuzí a tím rychle vstupovat do hepatocytů, kde nadměrnou aktivací HO-1 mohou

způsobit hyperbilirubiněmi často se vyskytující u pacientů léčených těmito statiny. Po podání hydrofilního rosuvastatinu (Muchova *et al*, 2007) aktivita změněna nebyla, což koresponduje s námi nalezenou téměř nezměněnou expresí HO-1 v kontrolní skupině Sh-P5 (data neprezentována). Pokles plazmatických koncentrací žlučových kyselin a tím i oxidačního stresu spolu s protizánětlivým účinkem (pokles IL-6) nižší dávky pravastatinu může vysvětlit, proč exprese HO-1 v experimentální skupině BDO-P1 nebyla zvýšena.

## 5.4 Hematobiliární bariéra

Hematobiliární bariéra je tvořena především těsnými spoji mezi hepatocyty, které zabraňují paracelulární regurgitaci složek žluče zpět do intersticiálního prostoru a následně do krve. Kumulující se látky a stoupající intrabiliární tlak vedou během extrahepatální cholestázy k poruše integrity této bariéry spojené se změnami v jejím molekulárním složení (Kojima *et al*, 2003; Maly *et al*, 2008; Takakuwa *et al*, 2002a; Zhang *et al*, 2010).

Důležitost hodnocení stavu bariéry v průběhu cholestázy podporuje nesrovnalost mezi zjištěným poklesem exprese transportérů zapojených do tvorby žluče a naopak její zvýšenou produkcí po uvolnění obstrukce. Proto bylo v minulosti provedeno několik pokusů o funkční hodnocení permeability hematobiliární bariéry za pomoci molekul typu křenové peroxidázy s následnou histologickou kvantifikací. Problematičnost dané metodiky spočívající v její nedostatečné citlivosti nás proto vedla k originálnímu pokusu využít k tomuto účelu jeden ze standardně používaných testů permeability střevní bariéry za použití rhamnózy a melibiózy (Tomsik *et al*, 2008). Základním hodnotícím kritériem integrity této bariéry je pak poměr biliární exkrece melibiózy a rhamnózy. Oba cukry jsou totiž za fyziologických podmínek eliminovány převážně ledvinami a exkrece žlučí je zcela minoritní. Je-li ale bariéra porušena, jako je tomu ve skupině BDO, narůstá biliární exkrece především melibiózy a tím i zmíněný poměr biliární exkrece melibiózy a rhamnózy. Získaná data umožnila přesnou kvantifikaci i sledování dynamiky změn. To je důležité, protože po odstranění obstrukce dochází poměrně rychle k regeneraci bariéry (graf 17) pravděpodobně v důsledku poklesu intrabiliárního tlaku. S ohledem na předešlé výsledky s akutní cholestázou (Tomsik *et al*, 2008) lze navíc konstatovat, že prodlužování doby trvání obstrukční cholestázy vede k výraznějšímu poškození bariéry s její následnou pomalejší obnovou.

Snaha pravastatinu redukovat biliární tlak sníženou expresí Mrp2 a Bsep kanalikulárních proteinů ve skupinách BDO-P5 a BDO-P1 nedokázala zabránit poškození hematobiliární bariéry. Vzniklou situaci může s největší pravděpodobností vyřešit jen

odstranění obstrukce, čemuž také nasvědčuje postupný pokles hodnoty poměru biliární exkrece melibiózy a rhamnózy po uvolnění podvazu pozorovaný v naší studii.

## 5.5 Metabolismus cholesterolu

Homeostáza cholesterolu je udržována *de novo* syntézou v játrech, absorpcí ve střevě a biliární exkrecí (Betters *et al*, 2010). Je tedy více než pravděpodobné, že homeostáza cholesterolu bude v průběhu chronické obstrukční cholestázy pozměněna, čímž se může významně podílet na cholestatickém poškození jater a následně i celého organismu.

Hypercholesterolemie je běžný symptom doprovázející chronickou obstrukční cholestázu (Longo *et al*, 2001) a u BDO potkanů v naší studii byla spolu se zvýšenou plazmatickou koncentrací celkového i LDL cholesterolu pozorována také kumulace cholesterolu a triacylglycerolů v játrech.

Naše studie pomohla objasnit molekulární mechanismy způsobující hypercholesterolemii v průběhu obstrukční cholestázy. Výrazná byla zejména snížená exprese kanalikulárních transportních proteinů Abcg5/Abcg8 zajišťujících eflux cholesterolu do žluče (Wiersma *et al*, 2009). Při neprůchodnosti žlučových cest byla v důsledku absence žlučových kyselin ve střevě snížena také absorpce cholesterolu mající za následek zvýšenou expresi HMG-CoA reduktázy, klíčového enzymu v syntéze cholesterolu, a LDL-receptoru v játrech, což dále umocňuje kumulaci cholesterolu v organismu. Nicméně, biliární exkrece cholesterolu pokračuje v menší míře i při obstrukci žlučových cest prostřednictvím Mdr2 kanalikulárního proteinu. Mdr2 je transportérem zejména pro fosfolipidy a jeho zvýšená exprese u podvázaných potkanů podporuje tvorbu smíšených micel tvořených fosfatidylcholinem, cholesterolem a zejména žlučovými kyselinami, které se tak stávají méně agresivními vůči cholangiocytm vystýlajícím žlučové kanálky (Li *et al*, 2005). Celkový hypercholesterolemický stav dále umocňuje snížená exprese efluxního transportéru Abca1, který se nachází na bazolaterální membráně hepatocytů a podílí se na tvorbě nascentní HDL částice.

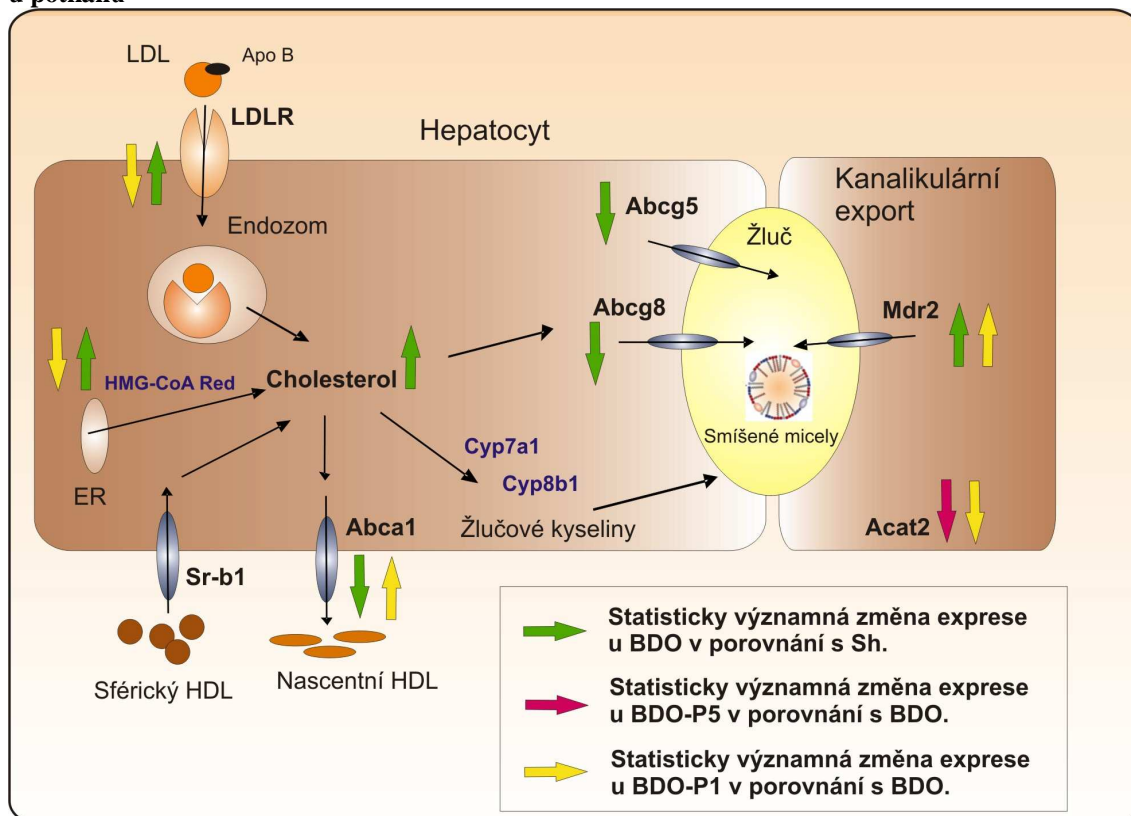
Aplikace pravastatinu potkanům s podvazem žlučovodu nesnížila plazmatické koncentrace celkového cholesterolu a LDL. Tento nález byl již popsán u normocholesterolemických potkanů, jestliže statiny byly podávány po dobu kratší 28 dní (Joles *et al*, 1992). Fujioka *et al* (1995) popsal dokonce zvýšené plazmatické koncentrace cholesterolu o 14 % a 27 % při aplikaci statinů po dobu 7 dní v dávce 50 a 250 mg/kg a vysvětlil tento efekt zvýšenou syntézou lipoproteinů po podání statinu. Tomu také

nasvědčuje námi nalezený zvýšený jaterní obsah triacylglycerolů ve všech skupinách potkanů s aplikací pravastatinu. Nicméně, pro statiny typická inhibice HMG-CoA reduktázy a zvýšená exprese LDL-receptoru byla v naší studii u léčených kontrolních zvířat pozorována, což poukazuje na správnost zvolených dávek. Pravastatin u BDO potkanů normalizoval obsah jaterního cholesterolu, čímž snížil riziko steatózy jater s následným rozvojem cirhózy. Mechanismem účinku pravastatinu byla u BDO-P5 a BDO-P1 skupin snížená exprese Srebp2, který reaguje na zvýšenou intracelulární koncentraci cholesterolu a jeho derivátů, což vedlo k poklesu exprese HMG-CoA reduktázy a LDL-receptoru. Svůj podíl na poklesu obsahu cholesterolu v játrech měla také snížená exprese nukleárního receptoru HNF1 $\alpha$  a tím Acat2, enzymu odpovědného za esterifikaci cholesterolu a jeho následné ukládání do buněk (Pramfalk *et al*, 2005) a ve skupině BDO-P1 také zvýšená exprese efluxního transportního proteinu Abca1.

Biliární exkrece cholesterolu byla významně snížena ve skupině BDO-P5 v důsledku down-regulace Bsep, který transportem žlučových kyselin přes kanalikulární membránu hepatocytu zajišťuje tok žluči a tím i sekreci cholesterolu. V této skupině byla signifikantně snížena, v porovnání s BDO skupinou, nejen exkrece žlučových kyselin a s tím související tok žluči, ale také biliární exkrece cholesterolu. Nic z toho nebylo pozorováno u skupiny zvířat s nižší aplikovanou dávkou pravastatinu, kde exprese Bsep zůstala relativně zachována. Naproti tomu pravastatin aplikovaný kontrolním potkanům signifikantně podpořil v důsledku zvýšené exprese Bsep transportéru tok žluči a tím i exkreci cholesterolu do žluči, což je součástí jeho hypolipidemického účinku.

Výše uvedená zjištění nám tak umožňují vytvořit si komplexní představu o změnách molekulárních mechanismů zapojených do jaterní homeostázy cholesterolu v průběhu cholestázy a jejich ovlivnění pravastatinem (obrázek 17).

**Obrázek 17: Změny v expresi jaterních transportních proteinů, enzymů a receptorů majících důležitou úlohu v metabolismu cholesterolu v průběhu neléčené a pravastatinem léčené obstrukční cholestázy u potkanů**



BDO, potkani s obstrukcí žlučového; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den.

LDLR, LDL receptor; HMG-CoA Red, 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-koenzym A reduktáza; Sr-b1, scavenger receptor class b type 1; Abca1, ATP-binding cassette transporter a1; Abcg5/8, ATP-binding cassette transporter g5/8; Mdr2, multidrug resistance protein 2; Acat2, acyl-CoA cholesterol acyltransferáza; Cyp7a1, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxyláza; Cyp8b1, sterol 12 $\alpha$ -hydroxyláza; ER, endoplazmatické retikulum.

## 5.6 Metabolismus železa

Atom železa je schopen snadno vázat i uvolňovat elektron, čehož živé buňky využívají v celé řadě vitálních biochemických funkcí. Na druhé straně nadbytek železa ohrožuje organismus tvorbou toxických volných radikálů, které mohou oxidací poškozovat proteiny, lipidy i nukleové kyseliny a způsobit tak závažné poškození až smrt buněk. Organismy proto regulují homeostázu železa na buněčné i systémové úrovni (Novotný, 2005), přičemž centrální postavení v regulaci homeostázy železa mají játra (Žourek *et al.*, 2007). Cholestatická onemocnění jater tak mohou do metabolismu železa výrazně zasahovat a tím ovlivňovat celý proces tkáňového poškození.

Klíčovým regulátorem metabolismu železa na systémové úrovni je hepcidin, jehož zvýšená exprese v játrech je odpovědí na zánětlivé podněty, hypoxii, anémii nebo nadbytek železa v organismu (Wallace *et al*, 2011). U BDO zvířat byla sice zvýšena exprese IL-6 v játrech, jednoho z hlavních aktivátorů hepcidinu, ale exprese hepcidinu byla signifikantně snížena. Vysvětlení pro tento rozporuplný nález poskytl ve své práci z roku 2009 Huang *et al.*, když prokázal, že regulační dráha IL-6 – gp130 – STAT3 je u biliární obstrukce inhibována hydrofobními žlučovými kyselinami. Snížené expresi hepcidinu odpovídá vzestup jaterní exprese feroportinu 1, efluxního transportéru zajišťujícího přenos železa z hepatocytu do krve (Yeh *et al*, 2004). Zvýšená exprese feroportinu 1 spolu s nezměněnou expresí transferinových receptorů a tvorbou zásobního feritinu tak může vysvětlit námi pozorovanou sníženou koncentraci celkového železa v játrech a naopak zvýšenou koncentraci železa v plazmě. Kumulace železa v játrech je poměrně častý jev doprovázející chronická onemocnění jater (Peretz *et al*, 2006), který zvyšuje riziko fibrogenese, hepatocelulárního karcinomu a celkové progresse onemocnění (Fargion *et al*, 2011). Snížená koncentrace jaterního železa u potkanů ze skupiny BDO tak může představovat jeden z adaptivních ochranných mechanismů uplatňujících se při obstrukci žlučových cest, který byl pozorován také u pacientů s PBC a biliární atrezií (Huang *et al*, 2006). Lze také předpokládat, že snížená exprese hepcidinu je příčinou zvýšené exprese feroportinu 1 nejen v játrech, nýbrž i v tenkém střevě, které má v metabolismu železa nezastupitelnou úlohu především na úrovni absorpce (Morgan *et al*, 2002; Muñoz *et al*, 2009). V souladu s tímto tvrzením byl vzestup exprese střevních absorpčních mechanismů (feroportinu 1 a DMT-1) prokázán u cirhózy jater (Stuart *et al*, 2004). Ve skupině BDO se právě tyto změny mohly podílet na zvýšení plazmatické koncentrace železa.

Pravastatin podávaný potkanům s obstrukcí žlučovodu výrazně podpořil ukládání železa do metabolicky inaktivní formy, feritinu, která není zdrojem volných kyslíkových radikálů. Současné snížení intracelulární koncentrace volného železa s následnou aktivací IRP je v naší studii doloženo zvýšením mRNA exprese TfR1 a DMT-1. Na zvýšeném vychytávání železa do jater se rovněž podílela zvýšená exprese TfR2, který ve své mRNA postrádá IRE a je regulován zejména saturací transferinu (Volke *et al*, 2009). Jistou kompenzací zvýšeného vychytávání železa do jater představovala indukce exprese feroportinu 1, který zprostředkovává přenos dvojmocného, a tedy potenciálně toxického, železa ven z buňky, čímž jí chrání před oxidačním poškozením. Komplexní mechanismus nabízí obrázek 18.





## 6 ZÁVĚR

Předkládaná práce shrnuje a hodnotí poznatky týkající se vlivu pravastatinu na cholestatické poškození jater způsobené podvazem žlučového u potkanů. Pozornost byla zaměřena na hodnocení jednak hematobiliární bariéry, nezbytné pro správnou tvorbu a tok žluči, ale také na změny biochemických a histologických parametrů. Význam pravastatinu byl dále posuzován dle změn v expresi enzymů a transportérů nezbytných pro jaterní homeostázu zejména žlučových kyselin a bilirubinu. Pro úplnost získaných dat byly provedeny analýzy exprese transportních proteinů a enzymů majících důležitou úlohu v metabolismu železa, potenciálního zdroje volných kyslíkových radikálů, a cholesterolu. Aby byl mechanismus působení pravastatinu objasněn co možná nejlépe, byly následně provedeny analýzy exprese vybraných nukleárních receptorů, které mají v adaptivní regulaci při cholestatických onemocněních jater významnou úlohu.

Z dosažených výsledků lze formulovat následující závěry:

- Pravastatin vykazoval řadu pozitivních účinků na cholestatické jaterní poškození, nicméně existují významné rozdíly mezi cholestatickými skupinami s aplikovanou dávkou pravastatinu 1 mg/kg a 5 mg/kg. Ve skupině s nižší dávkou léčiva byla pozorována snížená koncentrace žlučových kyselin a bilirubinu v plazmě, nižší jaterní obsah cholesterolu a významně nižší proliferační a fibrogenní změny než tomu bylo v neléčené cholestatické skupině a ve skupině s dávkou 5 mg/kg. Naopak cholestatická zvířata s vyšší dávkou statinu vykazovala prohloubení poškození jaterního parenchymu provázené zhoršením jaterních biochemických funkcí, zvýšením koncentrace žlučových kyselin a bilirubinu v plazmě a dalším omezením mechanismů zapojených do tvorby žluče.
- Příznivý pokles koncentrace žlučových kyselin u cholestatických zvířat po podání nižší dávky pravastatinu souvisí především s poklesem exprese základních enzymů zprostředkujících syntézu žlučových kyselin, Cyp7a1 a Cyp8b1, v důsledku snížené exprese nukleárních receptorů FXR/SHP a LRH-1 a aktivace PPAR- $\alpha$  receptoru.
- Pravastatin v dávce 1 mg/kg je schopen u cholestatických zvířat zmírnit kumulaci cholesterolu v játrech v důsledku potlačené syntézy cestou Srebp-2 – HMG-CoA reductáza, snížením jeho esterifikace a ukládání zprostředkované HNF-1 $\alpha$  – Acet-2 a zvýšením jeho efluxu prostřednictvím aktivace LXR $\alpha$  – Abca1.

- Chronická cholestáza vyvolává změny hematobiliární bariéry, které jsou však reverzibilní po odstranění obstrukce.
- Pravastatin neovlivňuje u cholestatických zvířat poškození hematobiliární bariéry, nicméně vysoké dávky léčiva snižují tvorbu žluče a biliární exkreci žlučových kyselin pravděpodobně přímým inhibičním vlivem na Bsep.
- Obstrukční cholestáza podmiňuje vzestup plazmatických koncentrací železa v důsledku snížené jaterní produkce hepcidinu a následně zvýšené exprese ferroportinu-1.
- Aplikace pravastatinu v dávce 1 mg/kg cholestatickým potkanům způsobila vzestup obsahu železa v játrech prostřednictvím zvýšené exprese transportních proteinů zajišťujících vychytávání železa do hepatocytů (TfR1/2 a DMT-1). Toto železo je ukládáno v metabolicky inaktivní formě ve vazbě na feritin.
- Pravastatin v nižší dávce normalizuje expresi hepcidinu v cholestatických játrech, což vyplývá ze snížení koncentrace žlučových kyselin a odstranění jejich inhibičního vlivu na regulační dráhu IL-6 – gp130 – pSTAT3. Pravastatin současně snižuje koncentraci IL-6, což svědčí o jeho protizánětlivém efektu za této patofyziologické situace.
- Pravastatin snižuje u cholestatických zvířat plazmatické koncentrace bilirubinu. Tento efekt je s největší pravděpodobností dán snížením exprese HO-1.

Závěrem lze konstatovat, že pravastatin ve vhodné dávce vykazuje řadu pozitivních účinků v prevenci rozvoje jaterního postižení navozeného extrahepatální cholestázou. Prezentovaná práce přináší nové poznatky zejména o molekulárně-biologických aspektech působení statinů v jaterní tkáni a současně otevírá další témata, která bude nutné rozpracovat do větších detailů, protože právě pravastatin může být jedna z dalších terapeutických alternativ u obstrukční cholestázy.

## 7 SOUHRN

Obstrukční cholestáza je klinický syndrom doprovázející četná onemocnění jater. Časná diagnóza a příslušná léčba obstrukčního ikteru je velmi důležitá, neboť neléčený stav vede k ireparabilním změnám v játrech. Vzniká tak jaterní fibróza, která později přechází do biliární cirhózy se všemi jejími důsledky (portální hypertenze, jícnové varixy, jaterní selhání). Kauzální léčba v podobě chirurgického odstranění obstrukce přitom není často možná. Proto je nezbytné hledání především farmakoterapeutických přístupů, které mohou rozvíjející se onemocnění příznivě ovlivňovat.

V předkládané dizertační práci byl studován vliv pravastatinu, inhibitoru HMG-CoA reductázy, na jaterní poškození v průběhu chronické obstrukční cholestázy u potkanů. Pravastatin, patřící do skupiny široce používaných statinů, oplývá kromě účinků hypolipidemických také účinky protizánětlivými a antioxidačními, tzv. účinky pleiotropními. Při volbě pravastatinu pro tuto studii byl rozhodující jeho pozitivní efekt pozorovaný u nemocných s cholestázou a hydrofilní povaha molekuly nevyžadující metabolismus v postižených játrech a umožňující kompenzační eliminaci ledvinami.

Detailní objasnění účinku pravastatinu v ovlivnění rozvoje jaterního poškození během biliární obstrukce u potkanů bylo provedeno komplexními biochemickými a histologickými vyšetřeními společně s hodnocením změn v enzymových a transportních mechanismech žlučových kyselin (ŽK), bilirubinu, cholesterolu a železa.

Změny biochemických a histologických parametrů byly ve skupině neléčených zvířat s podvazem žlučovodu (BDO) v souladu s údaji uvedenými v literatuře a potvrdily správnost zvoleného modelu. Obstrukční cholestáza byla příčinou hyperbilirubinémie, hypercholesterolémie a zvýšených plazmatických koncentrací ŽK. Histologické analýzy odhalily proliferaci žlučovodů a počínající fibrotickou přestavbu jaterní tkáně. Podávání pravastatinu BDO zvířatům navodilo významné změny, které se lišily v závislosti na aplikované dávce (1 (P1) nebo 5 (P5) mg/kg/den). Zatímco ve skupině BDO-P1 byl pozorován pokles plazmatických koncentrací ŽK, bilirubinu a cholesterolu a proliferační a fibrotické změny byly v porovnání s BDO skupinou zmírněny, ve skupině s vyšší dávkou pravastatinu byla zaznamenána zvýšená mortalita a výsledky biochemických a histologických šetření byly v porovnání s BDO zhoršeny.

Ve skupině BDO byly v průběhu biliární obstrukce navozeny změny exprese transportérů a enzymů, jejichž podstatou bylo zabránit další kumulaci potenciálně

toxických látek (zejména ŽK a bilirubinu) v játrech. Podávání statinu v nižší dávce způsobilo pokles koncentrací ŽK a bilirubinu v plazmě BDO potkanů. Tento efekt byl zprostředkován především snížením syntézy těchto látek prostřednictvím down-regulace odpovědných enzymů Cyp7a1 a Cyp8b1 (ŽK) a hemoxygenázy-1 (HO-1, bilirubin). U BDO-P5 došlo naopak k dalšímu zhoršení exkreční funkce jater v důsledku down-regulace kanalikulárních transportních proteinů Bsep a Mrp2.

Hypercholesterolemie je běžným symptomem obstrukční cholestázy. Naše studie přinesla nové poznatky z oblasti podmiňujících molekulárních mechanismů. U BDO zvířat byly zvýšené hladiny cholesterolu v plazmě i játrech spojené s nárůstem jaterního obsahu HMG-CoA reduktázy, tj. zvýšením syntézy a poklesem efluxu v podobě down-regulace Abca1 a Abcg5/g8 transportérů. Podávání pravastatinu v nižší dávce vedlo k poklesu jaterního obsahu cholesterolu především omezením jeho syntézy (HMG-CoA reduktáza), vychytávání (LDL receptor), esterifikace a depozice (Acat2) a zvýšeného efluxu (Abca1).

Na poškození jater se v průběhu obstrukční cholestázy významně podílí také oxidační stres. Jedním z potenciálních zdrojů volných kyslíkových radikálů je železo, jehož role v průběhu chronické obstrukční cholestázy nebyla dosud popsána. Pozitivním účinkem pravastatinu v průběhu biliární obstrukce bylo zvýšené ukládání železa do metabolicky inaktivní formy, feritinu, která není zdrojem volných kyslíkových radikálů. Zvýšená exprese transferinových receptorů zodpovědných za vychytávání železa do hepatocytů spolu se zvýšenou tvorbou feritinu a zvýšenou expresí efluxního transportéru ferroportinu 1 mohou vysvětlit vzestup jaterního obsahu železa, který byl ve skupině BDO signifikantně snížen. Po podání nižší dávky pravastatinu byla rovněž obnovena obstrukční cholestázou potlačená exprese hepcidinu, klíčového regulátoru metabolismu železa. Pozorované zvýšení obsahu pSTAT3 v této skupině svědčí o sníženém inhibičním vlivu redukováných ŽK na regulační dráhu IL-6 – gp130 – pSTAT3 – hepcidin.

Získaná data umožnila demonstrovat a vysvětlit příznivý vliv pravastatinu na jaterní postižení navozené obstrukční cholestázou. Jako zcela zásadní se jeví správná volba dávky léčiva. Účinek samotný zahrnuje řadu regulačních a exekutivních mechanismů a není spojen s hypocholesterolemickým efektem léčiva. Lze ho tedy řadit k plejadě takzvaných pleiotropních účinků statinů.

## 8 SUMMARY

Obstructive cholestasis is a clinical syndrome accompanying numerous liver diseases. Early diagnosis and appropriate treatment of obstructive jaundice is very important because untreated condition leads to irreparable changes in the liver. This gives rise to liver fibrosis, which later passes into biliary cirrhosis with all its consequences (portal hypertension, esophageal varices, liver failure). The causal therapy such as surgical removal of the obstruction is quite often impossible. Therefore it is necessary to search for pharmacotherapeutic approaches that can positively modulate the developing disease.

In the present thesis, the effect of pravastatin on the liver damage during chronic obstructive cholestasis was investigated in rats. Pravastatin, belonging to a group of widely used inhibitors of HMG-CoA reductase, possesses not only lipid-lowering action but also anti-inflammatory and antioxidant effects, so called pleiotropic effects. The decisive fact for choosing pravastatin as a suitable substance for our study was that pravastatin has already shown positive effects in several patients with cholestasis and its hydrophilic nature does not require metabolism in impaired liver and allows compensatory excretion in the kidney.

Detailed elucidation of pravastatin effect on development of liver injury during bile duct obstruction (BDO) in rats was performed using complex biochemical and histological examinations together with the evaluation of changes in enzyme and transport mechanisms for bile acids (BA), bilirubin, cholesterol, and iron.

Biochemical and histological findings in untreated BDO animals were in accordance with the specifications reported in the literature and thus confirmed reliability of the model. Obstructive cholestasis was the cause of hyperbilirubinemia, hypercholesterolemia, and elevated plasma concentration of BA. Histological analysis revealed bile duct proliferation and early fibrotic remodeling of liver tissue. Administration of pravastatin to BDO animals induced significant changes, which, however, differed accordingly to the dose applied (1 (P1) or 5 (P5) mg/kg/day). While in BDO-P1 group both decrease in plasma concentrations of BA, bilirubin, and cholesterol and attenuation of proliferative and fibrotic changes were observed, in the group with higher dose of pravastatin an increased mortality and worsening of biochemical and histological parameters were noted when compared with BDO animals.

Changes in the expression of several enzymes and transporters were induced during biliary obstruction in BDO group, which is supposed to preclude accumulation of potentially toxic substances (especially BA and bilirubin) in the liver. Administration of pravastatin in the lower dose caused a decrease in plasma concentrations of BA and bilirubin in BDO rats. This effect originated from a decreased synthesis of these substances due to downregulation of responsible enzymes Cyp7a1 and Cyp8b1 (BA) and hemeoxygenase-1 (bilirubin). Conversely, further deterioration of liver excretory function occurs in BDO-P5 rats as a consequence of downregulation of canalicular transporters Bsep and Mrp2.

Hypercholesterolemia is a common symptom of obstructive cholestasis. Our study brings new findings about underlying mechanisms. Increased cholesterol levels in plasma and liver of BDO animals were related to the increase in liver content of HMG-CoA reductase and decrease in efflux of cholesterol due to downregulation of Abca1 and Abcg5/g8 transporters. Administration of pravastatin in lower dose caused a decrease in liver cholesterol content through reduction of its synthesis (HMG-CoA reductase), uptake (LDL receptor), esterification and deposition (Acat2), and increased efflux (Abca1).

Oxidative stress plays an important role in liver injury during obstructive cholestasis. Iron is one of the potential sources of free oxygen radicals whose role has not been yet described during chronic extrahepatic cholestasis in rats. Positive effect of pravastatin during biliary obstruction consisted in increased iron storage in a metabolically inactive form of ferritin that is not a source of free oxygen radicals. Increased expression of transferrin receptors responsible for iron uptake into hepatocytes along with increased ferritin formation and increased expression of efflux transporter ferroportin 1 can explain the rise of liver iron content that was significantly decreased in BDO group. Furthermore, administration of lower dose of pravastatin restored expression of hepcidin, a key regulator of iron metabolism, whose expression was suppressed during obstructive cholestasis. Increased content of pSTAT3 in this group suggests reduction of bile acid inhibitory effect on regulatory pathway IL6 – gp130 – pSTAT3 – hepcidin.

The acquired data enabled to summarize the potentially beneficial effect of pravastatin on the liver damage induced by obstructive cholestasis. The choice of proper drug dose seems to be entirely fundamental. The effect itself includes a number of regulatory and executive mechanisms and is not associated with hypocholesterolemic effect of the drug. So we can classify this effect as so-called pleiotropic effect of the statins.

## 9 POUŽITÁ LITERATURA

- 1) ABRAHAMSSON, A. – GUSTAFSSON, U. – ELLIS, E. – NILSSON, L.M. – SAHLIN, S. – BJÖRKHEM, I. – EINARSSON, C. Feedback regulation of bile acid synthesis in human liver: importance of HNF-4alpha for regulation of CYP7A1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, vol. 330, no. 2, s. 395–399.
- 2) ABU RAJAB, M. – KAPLAN, M.M. Statins in primary biliary cirrhosis: are they safe? *Digestive Diseases and Sciences*, 2010, vol. 55, no. 7, s. 2086–2088.
- 3) ADACHI, Y. – OKUYAMA, Y. – MIYA, H. – MATSUSITA, H. – KITANO, M. – KAMISAKO, T. – YAMAMOTO, T. Pravastatin transport across the hepatocyte canalicular membrane requires both ATP and a transmembrane pH gradient. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 1996, vol. 11, no. 6, s. 580–585.
- 4) ALREFAI, W.A. – GILL, R.K. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharmaceutical Research*, 2007, vol. 24, no. 10, s. 1803–1823.
- 5) ARAYA, Z. – TANG, W. – WIKVALL, K. Hormonal regulation of the human sterol 27-hydroxylase gene CYP27A1. *Biochemical Journal*, 2003, vol. 372, no. Pt2, s. 529–534.
- 6) AWAD, A.S. – KAMEL, R. Effect of rosuvastatin on cholestasis-induced hepatic injury in rat livers. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2010, vol. 24, no. 2, s. 89–94.
- 7) BACHS, L. – PARÉS, A. – ELENA, M. – PIERA, C. – RODÉS, J. Comparison of rifampicin with phenobarbitone for treatment of pruritus in biliary cirrhosis. *The Lancet*, 1989, vol. 1, no. 8643, s. 898–899.
- 8) BALLATORI, N. – FANG, F. – CHRISTIAN, W.V. – LI, N. – HAMMOND, C.L. Ostalpha-Ostbeta is required for bile acid and conjugated steroid disposition in the intestine, kidney, and liver. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2008, vol. 295, no. 1, s. G179–G186.
- 9) BALMER, M.L. – DUFOUR, J.F. Treatment of hypercholesterolemia in patients with primary biliary cirrhosis might be more beneficial than indicated. *Swiss Medical Weekly*, 2008, vol. 138, no. 29–30, s. 415–419.
- 10) BALUSIKOVA, K. – NEUBAUEROVA, J. – DOSTALIKOVA-CIMBUROVA, M. – HORAK, J. – KOVAR, J. Differing expression of genes involved in non-transferrin iron transport across plasma membrane in various cell types under iron deficiency and excess. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2009, vol. 321, no. 1–2, s. 123–133.

- 11) BARANOWSKI, M. Biological role of liver X receptor. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2008, vol. 59, no. 7, s. 31–55.
- 12) BEILKE, L.D. – ALEKSUNES, L.M. – HOLLAND, R.D. – BESSELSSEN, D.G. – BEGER, R.D. – KLAASSEN, C.D. – CHERRINGTON, N.J. Constitutive androstane receptor-mediated changes in bile acid composition contributes to hepatoprotection from lithocholic acid-induced liver injury in mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 2009, vol. 37, no. 5, s. 1035–1045.
- 13) BETTERS, J.L. – YU, L. NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Letters*, 2010, vol. 584, no. 13, s. 2740–2747.
- 14) BINDER, T. – SALAJ, P. – ZIMA, T. – VÍTEK, L. Kyselina ursodeoxycholová, S-adenosyl-L-methionin a jejich kombinace v léčbě těhotenské intrahepatální cholestázy (ICP). *Česká Gynekologie*, 2006, roč. 71, č. 2, s. 92–98.
- 15) BJÖRKHEM, I. – ARAYA, Z. – RUDLING, M. – ANGELIN, B. – EINARSSON, C. – WIKVALL, K. Differences in the regulation of the classical and the alternative pathway for bile acid synthesis in human liver. No coordinate regulation of CYP7A1 and CYP27A1. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, no. 30, s. 26804–26807.
- 16) BORCH, K. – JÖNSSON, K.A. – ZDOLSEK, J.M. – HALLDESTAM, I. – KULLMAN, E. Prevalence of gallstone disease in a Swedish population sample. Relations to occupation, childbirth, health status, life style, medications, and blood lipids. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1998, vol. 33, no. 11, s. 1219–1225.
- 17) BRČAKOVA, E. – FUKSA, L. – CERMANOVA, J. – KOLOUCHOVA, G. – HROCH, M. – HIRSOVA, P. – MARTINKOVA, J. – STAUD, F. – MICUDA, S. Alteration of methotrexate biliary and renal elimination during extrahepatic and intrahepatic cholestasis in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2009, vol. 32, no. 12, s. 1978–1985.
- 18) CATTANEO, D. – BALDELLI, S. – MERLINI, S. – ZENONI, S. – PERICO, N. – REMUZZI, G. Therapeutic use of HMG-CoA reductase inhibitors: current practice and future perspectives. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2004, vol. 14, no. 12, s. 1553–1566.
- 19) CLAUDEL, T. – STURM, E. – KUIPERS, F. – STAELS, B. The farnesoid X receptor: a novel drug target? *Expert Opinion on Investigation Drugs*, 2004, vol. 13, no. 9, s. 1135–1148.
- 20) CLAUDEL, T. – ZOLLNER, G. – WAGNER, M. – TRAUNER, M. Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis and gallstone disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, vol. 1812, no. 8, s. 867–878.
- 21) CLEARFIELD, M.B. Statins: balancing benefits, efficacy and safety. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2002, vol. 3, no. 5, s. 469–477.



- 22) CORPECHOT, C. – CARRAT, F. – BAHR, A. – CHRÉTIEN, Y. – POUPON, R.E. – POUPON, R. The effect of ursodeoxycholic acid therapy on the natural course of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*, 2005, vol. 128, no. 2, s. 297–303.
- 23) CRAWLEY, M.L. Farnesoid X receptor modulators: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2010, vol. 20, no. 8, s. 1047–1057.
- 24) COSTET, P. Molecular pathways and agents for lowering LDL-cholesterol in addition to statins. *Pharmacology & Therapeutics*, 2010, vol. 126, no. 3, s. 263–278.
- 25) ČEŠKA, R. Novinky v hypolipidemické léčbě. *Kardiologická Revue*, 2004, roč. 3, s. 77–83.
- 26) D'ANTIGA, L. – DHAWAN, A. – DAVENPORT, M. – MIELI-VERGANI, G. – BJARNASON, I. Intestinal absorption and permeability in pediatric short-bowel syndrome: a pilot study. *Journal of Pediatric and Gastroenterology and Nutrition*, 1999, vol. 29, no. 5, s. 588–593.
- 27) DARSHAN, D. – FRAZER, D.M. – ANDERSON, G.J. Molecular basis of iron-loading disorders. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2010, vol. 12, s. e36.
- 28) DAWSON, P.A. Role of the intestinal bile acid transporters in bile acid and drug disposition. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2011, vol. 201, s. 169–203.
- 29) DE DOMENICO, I. – WARD, D.M. – KAPLAN, J. Hepcidin regulation : ironing out the details. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, vol. 117, no. 7, s. 1755–1758.
- 30) DELERIVE, P. – GALARDI, C.M. – BISI, J.E. – NICODEME, E. – GOODWIN, B. Identification of liver receptor homolog-1 as a novel regulator of apolipoprotein AI gene transcription. *Molecular Endocrinology*, 2004, vol. 18, no. 10, s. 2378–2387.
- 31) DEMIRBILEK, S. – TAS, E. – GURUNLUOGLU, K. – AKIN, M. – AKSOY, R.T. – EMRE, M.H. – AYDIN, N.E. – AY, S. – OZATAY, N. Fluvastatin reduced liver injury in rat model of extrahepatic cholestasis. *Pediatric Surgery International*, 2007, vol. 23, no. 2, s. 155–162.
- 32) DIKKERS, A. – TIETGE, U.J. Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC. *World Journal of Gastroenterology*, 2010, vol. 16, no. 47, s. 5936–5945.
- 33) DOLD, S. – LASCHKE, M.W. – LAVASANI, S. – MENGER, M.D. – JEPPSSON, B. – THORLACIUS, H. Simvastatin protects against cholestasis-induced liver injury. *British Journal of Pharmacology*, 2009, vol. 156, no. 3, s. 466–474.

- 34) DONNER, M.G. – KEPPLER, D. Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology*, 2001, vol. 34, no. 2, s. 351–359.
- 35) DUDEK, Ronald W. *High-yield cell and molecular biology*. 2nd printing. Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 254 p. ISBN 13: 978-0-7817-6887-0. Chapter 1, The Cell Membrane: Eicosanoids and Receptors/Signal Transduction, p. 21.
- 36) DYLEVSKÝ, Ivan – DRUGA, Rastislav – MRÁZKOVÁ, Olga. *Funkční anatomie člověka*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2000. 664 s. ISBN 80-7169-681-1. Kapitola 4.4, Břišní oddíl trávicího ústrojí, s. 299-324.
- 37) EHRMANN, Jiří – HŮLEK, Petr. *Hepatologie*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2010. 616 s. ISBN 978-80-247-3118-6. Kapitola 3.4.4, Metabolismus lipidů, s. 33; kapitola 5.1, Ikterus, s. 139-151; kapitola 5.2, Cholestáza, s. 151-164.
- 38) FARGION, S. – VALENTI, L. – FRACANZANI, A.L. Beyond hereditary hemochromatosis: New insights into the relationship between iron overload and chronic liver diseases. *Digestive and Liver Disease*, 2011, vol. 43, no. 2, s. 89–95.
- 39) FAYARD, E. – AUWERX, J. – SCHOONJANS, K. LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends in Cell Biology*, 2004, vol. 14, no. 5, s. 250–260.
- 40) FICKERT, P. – FUCHSBICHLER, A. – MOUSTAFA, T. – WAGNER, M. – ZOLLNER, G. – HALILBASIC, E. – STÖGER, U. – ARRESE, M. – PIZARRO, M. – SOLÍS, N. – CARRASCO, G. – CALIGIURI, A. – SOMBETZKI, M. – REISINGER, E. – TSYBROVSKYY, O. – ZATLOUKAL, K. – DENK, H. – JAESCHKE, H. – PINZANI, M. – TRAUNER, M. Farnesoid X receptor critically determines the fibrotic response in mice but is expressed to a low extent in human hepatic stellate cells and periductal myofibroblasts. *The American Journal of Pathology*, 2009, vol. 175, no. 6, s. 2392–2405.
- 41) FREEMAN, L.A. – KENNEDY, A. – WU, J. – BARK, S. – REMALEY, A.T. – SANTAMARINA-FOJO, S. – BREWER, H.B. The orphan nuclear receptor LRH-1 activates the ABCG5/ABCG8 intergenic promoter. *Journal of Lipid Research*, 2004, vol. 45, no. 7, s. 1197–1206.
- 42) FROH, M. – CONZELMANN, L. – WALBRUN, P. – NETTER, S. – WIEST, R. – WHEELER, M.D. – LEHNERT, M. – UESUGI, T. – SCHOLMERICH, J. – THURMAN, R.G. Heme oxygenase-1 overexpression increases liver injury after bile duct ligation in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 2007, vol. 13, no. 25, s. 3478–3486.
- 43) FUJIOKA, T. – NARA, F. – TSUJITA, Y. – FUKUSHIGE, J. – FUKAMI, M. – KURODA, M. The mechanism of lack of hypocholesterolemic effects of pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, in rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, vol. 1254, no. 1, s. 7–12.

- 44) FUNK, CH. The role of hepatic transporters in drug elimination. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2008, vol. 4, no. 4, s. 363–379.
- 45) GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vyd. Praha : Galén, 2005. 890 s. ISBN 10 : 80-7262-311-7. Kapitola 26, Řízení funkcí trávicího ústrojí, s. 403–430.
- 46) GAO, J. – CHEN, J. – DE DOMENICO, I. – KOELLER, D.M. – HARDING, C.O. – FLEMING, R.E. – KOEBERL, D.D. – ENNS, C.A. Hepatocyte-targeted HFE and TFR2 control hepcidin expression in mice. *Blood*, 2010, vol. 115, no. 16, s. 3374–3381.
- 47) GAO, J. – CHEN, J. – KRAMER, M. – TSUKAMOTO, H. – ZHANG, A.S. – ENNS, C.A. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metabolism*, 2009, vol. 9, no. 3, s. 217–227.
- 48) GBELCOVA, H. – LENICEK, M. – ZELENKA, J. – KNEJZLIK, Z. – DVORAKOVA, G. – ZADINOVA, M. – POUCKOVA, P. – KUDLA, M. – BALAZ, P. – RUMIL, T. – VITEK, L. Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, 2008, vol. 122, no. 6, s. 1214–1221.
- 49) GEIER, A. – WAGNER, M. – DIETRICH, C.G. – TRAUNER, M. Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, vol. 1773, no. 3, s. 283–308.
- 50) GIANNELLI, G. – MAZZOCCA, A. – FRANSVEA, E. – LAHN, M. – ANTONACI, S. Inhibiting TGF- $\beta$  signaling in hepatocellular carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010 [Epub ahead of print].
- 51) GOODWIN, B. – MOORE, J.T. CAR: detailing new models. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2004, vol. 25, no. 8, s. 437–441.
- 52) GROPPER, Sareen S. – SMITH Jack L. – GROFF James L. *Advanced nutrition and human metabolism*. 5th printing. Belmont : Cengage Learning, 2009. 600 p. ISBN 13: 978-0-495-11657-8. Chapter 5, Lipids, p. 131-168.
- 53) HABEOS, I.G. – ZIROS, P.G. – CHARTOUMPEKIS, D. – PSYROGIANNIS, A. – KYRIAZOPOULOU, V. – PAPAVALASSILIOU, A.G. Simvastatin activates Keap1/Nrf2 signaling in rat liver. *Journal of Molecular Medicine*, 2008, vol. 86, no. 11, s. 1279–1285.
- 54) HAGEMAN, J. – HERREMA, H. – GROEN, A.K. – KUIPERS, F. A role of the bile salt receptor FXR in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2010, vol. 30, no. 8, s. 1519–1528.
- 55) HALLEMEESCH, M.M. – LAMERS, W.H. – SOETERS, P.B. – DEUTZ, N.E. Increased lactulose/rhamnose ratio during fluid load is caused by increased

- urinary lactulose excretion. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2000, vol. 278, no. 1, s. G83–G88.
- 56) HANSSON, M. – WIKVALL, K. – BABIKER, A. Regulation of sterol 27-hydroxylase in human monocyte-derived macrophages: up-regulation by transforming growth factor beta1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, vol. 1687, no. 1–3, s. 44–51.
  - 57) HATANAKA, T. Clinical pharmacokinetics of pravastatin: mechanisms of pharmacokinetic events. *Clinical Pharmacokinetics*, 2000, vol. 39, no. 6, s. 397–412.
  - 58) HERSHKO, CH. Regulating the master iron regulator hepcidin. *Blood*, 2006, vol. 108, no. 9, s. 2890–2891.
  - 59) HIRSCHFELD, G.M. – HEATHCOTE, E.J. – GERSHWIN, M.E. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology*, 2010, vol. 139, no. 5, s. 1481–1496.
  - 60) HOLEČEK, Milan. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2006. 288 s. ISBN 80-247-1562-7. Kapitola 6.6, Metabolismus cholesterolu, s. 140-147.
  - 61) HORÁK, Jiří, et. al. *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2010. 232+16 s barevné přílohy. ISBN 978-80-247-3287-9. Kapitola 1, Metabolismus železa, s. 9-41.
  - 62) HOSSAIN, M.A. – TSUJITA, M. – AKITA, N. – KOBAYASHI, F. – YOKOYAMA, S. Cholesterol homeostasis in ABCA1/LCAT double-deficient mouse. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, vol. 1791, no. 12, s. 1197–1205.
  - 63) HSU, M. – MUCHOVA, L. – MORIOKA, I. – WONG, R.J. – SCHRÖDER, H. – STEVENSON, D.K. Tissue-specific effects of statins on the expression of heme oxygenase-1 in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, vol. 343, no. 3, s. 738–744.
  - 64) HUANG, Y.H. – CHUANG, J.H. – YANG, Y.L. – HUANG, C.C. – WU, C.L. – CHEN, C.L. Cholestasis downregulate hepcidin expression through inhibiting IL-6-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Laboratory Investigation*, 2009, vol. 89, no. 10, s. 1128–1139.
  - 65) HUANG, Y.H. – YU-HSIEH, H. – HUANG, C.C. – SHIN-MU, V.T. – TAI, M.H. – CHEN, C.L. – CHUANG, J.H. Liver hepcidin and stainable iron expression in biliary atresia. *Pediatric Research*, 2006, vol. 59, no. 5, s. 662–666.
  - 66) HUANG, X.S. – ZHAO, S.P. – BAI, L. – HU, M. – ZHAO, W. – ZHANG, Q. Atorvastatin and fenofibrate increase apolipoprotein AV and decrease triglycerides by up-regulating peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *British Journal of Pharmacology*, 2009, vol. 158, no. 3, s. 706–712.

- 67) CHANDRA, P. – BROUWER, K.L. The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharmaceutical Research*, 2004, vol. 21, no. 5, s. 719–735.
- 68) CHAO, F. – GONG, W. – ZHENG, Y. – LI, Y. – HUANG, G. – GAO, M. – LI, J. – KURUBA, R. – GAO, X. – LI, S. – HE, F. Upregulation of scavenger receptor class B type I expression by activation of FXR in hepatocyte. *Atherosclerosis*, 2010, vol. 213, no. 2, s. 443–448.
- 69) CHEN, H.H. – CHEN, T.W. – LIN, H. Pravastatin attenuates carboplatin-induced nephrotoxicity in rodents via peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated heme oxygenase-1. *Molecular Pharmacology*, 2010, vol. 78, no. 1, s. 36–45.
- 70) CHEN, J. – CHLOUPKOVA, M. Abnormal iron uptake and liver cancer. *Cancer Biology and Therapy*, 2009, vol. 8, no. 18, s. 1699–1708.
- 71) CHEN, X. – BURTON, C. – SONG, X. – MCNAMARA, L. – LANGELLA, A. – CIANETTI, S. – CHANG, CH. – WANG, J. An apoA-I mimetic peptide increases LCAT activity in mice through increasing HDL concentration. *International Journal of Biological Sciences*, 2009, vol. 5, no. 5, s. 489–499.
- 72) CHUA, A.C. – DELIMA, R.D. – MORGAN, E.H. – HERBISON, C.E. – TIRNITZ-PARKER, J.E. – GRAHAM, R.M. – FLEMING, R.E. – BRITTON, R.S. – BACON, B.R. – OLYNYK, J.K. – TRINDER, D. Iron uptake from plasma transferrin by a transferrin receptor 2 mutant mouse model of haemochromatosis. *Journal of Hepatology*, 2010, vol. 52, no. 3, s. 425–431.
- 73) IMMENSCHUH, S. – BAUMGART-VOGT, E. – MUELLER, S. Heme oxygenase-1 and iron liver inflammation: a complex alliance. *Current Drug Targets*, 2010, vol. 11, no. 12, s. 1541–1550.
- 74) INSEL, Paul – ROSS, Don – McMAHON, Kimberley – BERNSTEIN, Melissa. *Nutrition*, 4th printing. Kanada : Jones & Bartlett Learning, 2010. 805 p. ISBN 978-0-7637-7663-3. Chapter 5, Lipids, p. 181–225.
- 75) JACQUEMIN, E. – HERMANS, D. – MYARA, A. – HABES, D. – DEBRAY, D. – HADCHOUEL, M. – SOKAL, E.M. – BERNARD, O. Ursodeoxycholic acid therapy in pediatric patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology*, 1997, vol. 25, no. 3, s. 519–523.
- 76) JOLLES, J. – WILLEKES-KOOLSCHIJN, N. – KOOMANS, H. – VAN TOL, A. – GEELHOED-MIERAS, T. – CROMMELIN, D. – VAN BLOOIS, L. – KRAJNC-FRANKEN, M. – COHEN, L. – GRIFFIOEN, M, et al. Subcutaneous administration of HMG-CoA reductase inhibitors in hyperlipidaemic and normal rats. *Laboratory Animals*, 1992, vol. 26, no. 4, s. 269–280.

- 77) KAKIZAKI, S. – TAKIZAWA, D. – TOJIMA, H. – YAMAZAKI, Y. – MORI, M. Xenobiotic-sensing nuclear receptors CAR and PXR as drug targets in cholestatic liver disease. *Current Drug Targets*, 2009, vol. 10, no. 11, s. 1156–1163.
- 78) KAMISAKO, T. – OGAWA, H. Effects of pravastatin and bezafibrate on biliary lipid excretion and hepatic expression of Abcg5 and Abcg8 in the rat. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2004, vol. 19, no. 8, s. 879–883.
- 79) KATOZIAN, F. – SBLATTERO, D. – NOT, T. – TOMMASINI, A. – GIUSTO, E. – MEIACCO, D. – STEBEL, M. – MARZARI, R. – FASANO, A. – VENTURA, A. Dual sugar gut-permeability testing on blood drop in animal models. *Clinica Chimica Acta*, 2005, vol. 352, no. 1–2, s. 191–197.
- 80) KIP, N.S. – LAZARIDIS, K.N. – MASYUK, A.I. – SPLINTER, P.L. – HUEBERT, R.C. – LARUSSO, N.F. Differential expression of cholangiocyte and ileal bile acid transporters following bile acid supplementation and depletion. *World Journal of Gastroenterology*, 2004, vol. 10, no. 10, s. 1440–1446.
- 81) KIVISTO, K.T. – NIEMI, M. Influence of drug transporter polymorphism on pravastatin pharmacokinetics in human. *Pharmaceutical Research*, 2007, vol. 24, no. 2, s. 239–247.
- 82) KLIEWER, S.A. – WILLSON, T.M. Regulation of xenobiotic and bile acid metabolism by the nuclear pregnane X receptor. *Journal of Lipid Research*, 2002, vol. 43, no. 3, s. 359–364.
- 83) KOJIMA, T. – YAMAMOTO, T. – MURATA, M. – CHIBA, H. – KOKAI, Y. – SAWADA, N. Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes. *Medical Electron Microscopy*, 2003a, vol. 36, no. 3, s. 157–164.
- 84) KOJIMA, T. – YAMAMOTO, T. – MURATA, M. – CHIBA, H. – KOKAI, Y. – SAWADA, N. Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes. *Medical Electron Microscopy*, 2003b, vol. 36, no. 3, s. 157–164.
- 85) KÖLBEL, F. Co všechno (ne)víme o statinech. *Cor et Vasa*, 2009, roč. 51, č. 4, s. 306.
- 86) KOLOUCHOVA, G. – BRČAKOVA, E. – HIRSOVA, P. – SISPERA, L. – TOMSIK, P. – CERMANOVA, J. – HYSPLER, R. – SLANAROVA, M. – FUKSA, L. – LOTKOVA, H. – MICUDA, S. Pravastatin modulates liver bile acid and cholesterol homeostasis in rats with chronic cholestasis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2011, vol. 26, no. 10, s. 1544–1551.
- 87) KONRÁDOVÁ, Václava – UHLÍK, Jiří – VAJNER, Luděk. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany : H & H, 2000. 291 s. ISBN 10: 80-86022-80-3. Kapitola Trávicí systém, s. 153–185.

- 88) KOOLMAN, J. – ROHM, K.H. *Color atlas of biochemistry*. 2nd printing. Notzingen : Georg Thieme Verlag, 2005. 467 p. ISBN 3-13-100372-3. Chapter Porphyrin Metabolism, p. 192-195.
- 89) KOSTERS, A. – KARPEN, S.J. Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica*, 2008, vol. 38, no. 7-8, s. 1043–1071.
- 90) KREMER, A.E. – MARTENS, J.J. – KULIK, W. – RUËFF, F. – KUIPER, E.M. – VAN BUUREN, H.R. – VAN ERPECUM, K.J. – KONDRACKIENE, J. – PRIETO, J. – RUST, C. – GEENES, V.L. – WILLIAMSON, C. – MOOLENAAR, W.H. – BEUERS, U. – OUDE ELFERINK, R.P. Lysophosphatidic acid is a potential mediator of cholestatic pruritus. *Gastroenterology*, 2010, vol. 139, no. 3, s. 1008–1018.
- 91) KÜHN, L.C. How iron controls iron. *Cell Metabolism*, 2009, vol. 10, no. 6, s. 439–441.
- 92) KUIPERS, F. – CLAUDEL, T. – STURM, E. – STAELS, B. The farnesoid X receptor (FXR) as modulator of bile acid metabolism. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2004, vol. 5, no. 4, s. 319–326.
- 93) KUNTZ, E. – KUNTZ, H.D. *Hepatology*. 3rd printing. Wurzberg : Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008. 937 p. ISBN 978-3-540-76838. Chapter 3, Biochemistry and Functions of the Liver, p. 36-76.
- 94) KURIHARA, T. – AKIMOTO, M. – ABE, K. – ISHIGURO, H. – NIIMI, A. – MAEDA, A. – SHIGEMOTO, M. – YAMASHITA, K. – YOKOYAMA, I. – SUZUKI, Y.; et al. Experimental use of pravastatin with primary biliary cirrhosis associated with hypercholesterolemia. *Clinical Therapeutics*, 1993, vol. 15, no. 5, s. 890–898.
- 95) KURODA, M. – KOBAYASHI, Y. – TANAKA, Y. – ITANI, T. – MIFUJI, R. – ARAKI, J. – KAITO, M. – ADACHI, Y. Increased hepatic and renal expressions of multidrug resistance-associated protein 3 in Eisai hyperbilirubinuria rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2004, vol. 19, no. 2, s. 146–153.
- 96) LAZAR, M.A. Progress in cardiovascular biology: PPAR for the course. *Nature Medicine*, 2001, vol. 7, no. 1, s. 23–24.
- 97) LEDVINA, Miroslav – STOKLASOVÁ, Alena – CERMAN, Jaroslav. *Biochemie pro studující medicíny*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 2004. 562 s. ISBN 80-246-0850-2. Kapitola 18.6, Osudy krevního barviva po degradaci, s. 366–370.
- 98) LEE, J. – BOYER, J.L. Molecular alternations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders. *Seminars in Liver Disease*, 2000, vol. 20, no. 3, s. 373–384.
- 99) LEE, Y.K. – SCHMIDT, D.R. – CUMMINS, C.L. – CHOI, M. – PENG, L. – ZHANG, Y. – GOODWIN, B. – HAMMER, R.E. – MANGELSDORF, D.J. – KLIEWER, S.A. Liver receptor-1 regulates bile acid homeostasis but is not

- essential for feedback regulation of bile acid synthesis. *Molecular Endocrinology*, 2008, vol. 22, no. 6, s. 1345–1356.
- 100) LEICHNER, G.S. – AVNER, R. – HARATS, D. – ROITELMAN, J. Dislocation of HMG-CoA reductase and insig-1, two polytopic endoplasmic reticulum proteins, en route to proteasomal degradation. *Molecular Biology of the Cell*, 2009, vol. 20, no. 14, s. 3330–3341.
- 101) LENÍČEK, M. – LUKÁŠ, M. – BUDIŠOVÁ, L. – JIRSA, M. – KOVÁŘ, J. – DONOVAL, R. – BORTLÍK, M. – VÍTEK, L. Určení stupně malabsorpce žlučových kyselin a vliv polymorfismů v promotoru genu CYP7A1. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 2006, roč. 14, č. 35, s. 221–224.
- 102) LI, T. – CHIANG, J.Y. Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. *PPAR Research*, 2009.
- 103) LI, Z. – AGELLON, L.B. – VANCE, D.E. Phosphatidylcholine homeostasis and liver failure. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no. 45, s. 37798–37802.
- 104) LIU, Y. – BINZ, J. – NUMERICK, M.J. – DENNIS, S. – LUO, G. – DESAI, B. – MACKENZIE, K.I. – MANSFIELD, T.A. – KLIEWER, S.A. – GOODWIN, B. – JONES, S.A. Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, vol. 112, no. 11, s. 1678–1687.
- 105) LONGO, M. – CROSIGNANI, A. – PODDA, M. Hyperlipidemia in chronic cholestatic liver disease. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, 2001, vol. 4, no. 2, s. 111–114.
- 106) LUNDELL, K. – WIKVALL, K. Species-specific and age-dependent bile acid composition: aspects on CYP8B and CYP4A subfamilies in bile acid biosynthesis. *Current Drug Metabolism*, 2008, vol. 9, no. 4, s. 323–331.
- 107) MACKENZIE, E.L. – IWASAKI, K. – TSUJI, Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008, vol. 10, no. 6, s. 997–1030.
- 108) MAILLETTE DE BUY WENNIGER, L. – BEUERS, U. Bile salts and cholestasis. *Digestive and Liver Disease*, 2010, vol. 42, no. 6, s. 409–418.
- 109) MAKABE, S. – TAKAHASHI, Y. – WATANABE, H. – MURAKAMI, M. – OHBA, T. – ITO, H. Fluvastatin protects vascular smooth muscle cells against oxidative stress through the Nrf2-dependent antioxidant pathway. *Atherosclerosis*, 2010, vol. 213, no. 2, s. 377–384.
- 110) MALY, I.P. – LANDMANN, L. Bile duct ligation in the rat causes upregulation of ZO-2 and decreases colocalization of claudins with ZO-1 and occludin. *Histochemistry and Cell Biology*, 2008, vol. 129, no. 3, s. 289–99.



- 111) MAREČEK, Z. Farmakoterapie jaterní cholestázy. *Remedia*, 2007, roč. 17, č. 4, s. 316–322.
- 112) MARSCHALL, H.U. – WAGNER, M. – ZOLLNER, G. – FICKERT, P. – DICZFALUSY, U. – GUMHOLD, J. – SILBERT, D. – FUCHSBICHLER, A. – BENTHIN, L. – GRUNDSTRÖM, R. – GUSTAFSSON, U. – SAHLIN, S. – EINARSSON, C. – TRAUNER, M. Complementary stimulation of hepatobiliary transport and detoxification systems by rifampicin and ursodeoxycholic acid in humans. *Gastroenterology*, 2005, vol. 129, no. 2, s. 476–485.
- 113) MARTÍNEK, Jindřich – VACEK, Zdeněk. *Histologický atlas*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2009. 136 s. ISBN 978-80-247-2393-8. Kapitola 4, Soustava trávicí, s. 38–48.
- 114) MCGILLICUDDY, F.C. – DE LA LLERA MOYA, M. – HINKLE, C.C. – JOSHI, M.R. – CHIQUOINE, E.H. – BILLHEIMER, J.T. – ROTHBLAT, G.H. – REILLY, M.P. Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*, 2009, vol. 119, no. 8, s. 1135–1145.
- 115) MENCARELLI, A. – FIORUCCI, S. FXR an emerging therapeutic target for the treatment of atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2010, vol. 14, no. 1–2, s. 79–92.
- 116) MITCHELL, S.A. – BANSI, D.S. – HUNT, N. – VON BERGMANN, K. – FLEMING, K.A. – CHAPMAN, R.W. A preliminary trial of high-dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*, 2001, vol. 121, no. 4, s. 900–907.
- 117) MORGAN, E.H. – OATES, P.S. Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2002, vol. 29, no. 3, s. 384–99.
- 118) MOTOSHIMA, H. – GOLDSTEIN, B.J. – IGATA, M. – ARAKI, E. AMPK and cell proliferation-AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *The Journal of Physiology*, 2006, vol. 574, no. Pt1, s. 63–71.
- 119) MUCHOVA, L. – WONG, R.J. – HSU, M. – MORIOKA, I. – VITEK, L. – ZELENKA, J. – SCHRÖDER, H. – STEVENSON, D.K. Statin treatment increases formation of carbon monoxide and bilirubin in mice: a novel mechanism of in vivo antioxidant protection. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2007, vol. 85, no. 8, s. 800–810.
- 120) MUÑOZ, M. – VILLAR, I. – GARCÍA-ERCE, J.A. An update on iron physiology. *World Journal of Gastroenterology*, 2009, vol. 15, no. 37, s. 4617–4626.
- 121) MURPHY, C. – PARINI, P. – WANG, J. – BJÖRKHEM, I. – EGGERTSEN, G. – GAFVELS, M. Cholic acid as key regulator of cholesterol synthesis, intestinal absorption and hepatic storage in mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, vol. 1735, no. 3, s. 167–175.

- 122) NAKAHARA, M. – FUJII, H. – MALONEY, P.R. – SHIMIZU, M. – SATO, R. Bile acids enhance low density lipoprotein receptor gene expression via a MAPK cascade-mediated stabilization of mRNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, no. 40, s. 37229–37234.
- 123) NAKAMUTA, M. – FUJINO, T. – YADA, R. – YASUTAKE, K. – YOSHIMOTO, T. – HARADA, N. – YADA, M. – HIGUCHI, N. – KATO, M. – KOHJIMA, M. – TAKETOMI, A. – MAEHARA, Y. – NISHINAKAGAWA, T. – MACHIDA, K. – MATSUNAGA, K. – NAKASHIMA, M. – KOTOH, K. – ENJOJI, M. Therapeutic effect of bezafibrate against biliary damage: a study of phospholipid secretion via the PPARalpha-MDR3 pathway. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy & Toxicology*, 2010, vol. 48, no. 1, s. 22–28.
- 124) NEUFELD, E.B. – DEMOSKY, S.J. – STONIK, J.A. – COMBS, C. – REMALEY, A.T. – DUVERGER, N. – SANTAMARINA-FOJO, S. – BREWER, H.B. The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, vol. 297, no. 4, s. 974–979.
- 125) NEUVONEN, P.J. – BACKMAN, J.T. – NIEMI, M. Pharmacokinetic comparison of the potential over-the-counter statins simvastatin, lovastatin, fluvastatin and pravastatin. *Clinical Pharmacokinetics*, 2008, vol. 47, no. 7, s. 463–474.
- 126) NGUYEN, D.V. – DROVER, V.A. – KNOPFEL, M. – DHANASEKARAN, P. – HAUSER, H. – PHILLIPS, M.C. Influence of class B scavenger receptors on cholesterol flux across the brush border membrane and intestinal absorption. *Journal of Lipid Research*, 2009, vol. 50, no. 11, s. 2235–2244.
- 127) NORLIN, M. – WIKVALL, K. Enzymes in the conversion of cholesterol into bile acids. *Current Molecular Medicine*, 2007, vol. 7, no. 2, s. 199–218.
- 128) NOVOTNÝ, J. Poruchy metabolismu železa I. Regulace homeostázy železa. *Vnitřní Lékařství*, 2005, roč. 51, č. 6, s. 681–689.
- 129) OATES, P.S. The relevance of the intestinal crypt and enterocyte in regulating iron absorption. *Pflugers Archiv*, 2007, vol. 455, no. 2, s. 201–213.
- 130) OOSTERVEER, M.H. – GREFFHORST, A. – GROEN, A.K. – KUIPERS, F. The liver X receptor: control of cellular lipid homeostasis and beyond implications for drug design. *Progress in Lipid Research*, 2010, vol. 49, no. 4, s. 343–352.
- 131) PALLOTTINI, V. – MONTANARI, L. – CAVALLINI, G. – BERGAMINI, E. – GORI, Z. – TRENTALANCE, A. Mechanisms underlying the impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in an aged rat liver. *Mechanism of Ageing and Development*, 2004, vol. 125, no. 9, s. 633–639.
- 132) PAUMELLE, R. – STAELS, B. Cross-talk between statins and PPARalpha in cardiovascular diseases: clinical evidence and basic mechanisms. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2008, vol. 18, no. 3, s. 73–78.

- 133) PAUMELLE, R. – STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors mediate pleiotropic actions of statins. *Circulation Research*, 2007, vol. 100, no. 10, s. 394–395.
- 134) PELLICCIARI, R. – FIORUCCI, S. – CAMAIONI, E. – CLERICI, C. – COSTANTINO, G. – MALONEY, P.R. – MORELLI, A. – PARKS, D.J. – WILLSON, T.M. 6Alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002, vol. 45, no. 17, s. 3569–3572.
- 135) PENKA, Miroslav – BULÍKOVÁ, Alena a kol. Neonkologická hematologie. 2. vyd. Praha : Grada Publishing, 2009. 240+8 s barevné přílohy. ISBN 978-80-247-2299-3. Kapitola 2, Patofyziologie hemopoézy, s. 21–29.
- 136) PERETZ, G. – LINK, G. – PAPPO, O. – BRUCK, R. – ACKERMAN, Z. Effect of hepatic iron concentration reduction on hepatic fibrosis and damage in rats with cholestatic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, vol. 12, no. 2, s. 240–245.
- 137) PLATT, N. – GORDON, S. Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional?-The mouse's tale. *Journal of Clinical Investigation*, 2001, vol. 108, no. 5, s. 649–654.
- 138) PRAMFALK, C. – DAVIS, M.A. – ERIKSSON, M. – RUDEL, L.L. – PARINI, P. Control of ACAT2 liver expression by HNF1. *Journal of Lipid Research*, 2005, vol. 46, no. 9, s. 1868–1876.
- 139) RACEK, Jaroslav, et al. *Klinická biochemie*. 2. vyd. Praha : Galén, 2006. 329 s. ISBN 80-7262-324-9. Kapitola 19.2, Jednotlivé lipoproteiny a jejich součásti, s. 174–180 ; kapitola 24.5, Laboratorní známky cholestázy, s. 217.
- 140) RAUTIAINEN, H. – KÄRKKÄINEN, P. – KARVONEN, A.L. – NURMI, H. – PIKKARAINEN, P. – NUUTINEN, H. – FÄRKKILÄ, M. Budesonide combined with UDCA to improve liver histology in primary biliary cirrhosis : a three-year randomized trial. *Hepatology*, 2005, vol. 41, no. 4, s. 747–752.
- 141) RECALCATI, S. – MINOTTI, G. – CAIRO, G. Iron regulatory proteins: from molecular mechanisms to drug development. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010, vol. 13, no. 10, s. 1593–1616.
- 142) ROCCO, A.G. – GIANAZZA, E. – CALABRESI, L. – SENSI, C. – FRANCESCHINI, G. – SIRTORI, C.R. – EBERINI, I. Structural features and dynamics properties of human apolipoprotein A-I in a model of synthetic HDL. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2009, vol. 28, no. 4, s. 305–312.
- 143) ROMA, M.G. – CROCENZI, A. – SÁNCHEZ POZZI, E.A. Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clinical Science*, 2008, vol. 114, no. 9, s. 567–588.

- 144) ROSENSON, R.S. Statins: can the new generation make an impression. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 2004, vol. 9, no. 2, s. 269–279.
- 145) SATO, R. Sterol metabolism and SREBP activation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, vol. 501, no. 2, s. 177–181.
- 146) SEDLÁČKOVÁ, T.; RACEK, J. Metabolismus železa a jeho regulace. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 2009, roč. 17, č. 38, s. 17–23.
- 147) SEO, M. – INOUE, I. – IKEDA, M. – NAKANO, T. – TAKAHASHI, S. – KATAYAMA, S. – KOMODA, T. Statins activate human PPAR $\alpha$  promoter and increase PPAR $\alpha$  mRNA expression and activation in HepG2 cells. *PPAR Research*, 2008.
- 148) SHITARA, Y. – SUGIYAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006, vol. 112, no. 1, s. 71–105.
- 149) SCHEINGRABER, S. – BAUER, M. – BAUER, I. – BARDENS, D. – ABEL, K. – HORN, A.K. – SCHILLING, M.K. – WOLFF, M. Inhibition of hemoxygenase-1 improves survival after liver resection in jaundiced rats. *European Surgical Research*, 2009, vol. 42, no. 3, s. 157–167.
- 150) SCHLATTJAN, J.H. – WINTER, C. – GREVEN, J. Regulation of renal tubular bile acid transport in the early phase of an obstructive cholestasis in the rat. *Nephron Physiology*, 2003, vol. 95, no. 3, s. 49–56.
- 151) SCHNEIDERKA, P. Markery jaterní fibrózy. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 2008, vol. 16, no. 37, s. 14–18.
- 152) SIRVENT, A. – CLAUDEL, T. – MARTIN, G. – BROZEK, J. – KOSYKH, V. – DARTEIL, R. – HUM, D.W. – FRUCHART, J.C. – STAELS, B. The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS Letters*, 2004, vol. 566, no. 1-3, s. 173–177.
- 153) SLÄTIS, K. – GAFVELS, M. – KANNISTO, K. – OVCHINNIKOVA, O. – PAULSSON-BERNE, G. – PARINI, P. – JIANG, Z.Y. – EGGERTSEN, G. Abolished synthesis of cholic acid reduces atherosclerotic development in apolipoprotein E knockout mice. *Journal of Lipid Research*, 2010, vol. 51, no. 11, s. 3289–3298.
- 154) SOROKA, C.J. – LEE, J.M. – AZZAROLI, F. – BOYER, J.L. Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology*, 2001, vol. 33, no. 4, s. 783–791.
- 155) SOŠKA, V. Jaderné receptory PPAR $\alpha$ . *Vnitřní Lékařství*, 2006, roč. 52, č. 6, s. 628–631.

- 156) SPILLMANN, M. – SCHULTHEISS, H.P. – TSCHOPE, C. – VAN LINHOUT, S. High-density lipoprotein-raising strategies: update 2010. *Current Pharmaceutical Design*, 2010; vol. 16, no. 13, s. 1517–1530.
- 157) STOJAKOVIC, T. – CLAUDEL, T. – PUTZ-BANKUTI, C. – FAULER, G. – SCHARNAGL, H. – WAGNER, M. – SOURIJ, H. – STAUBER, R.E. – WINKLER, K. – MÄRZ, W. – WASCHER, T.C. – TRAUNER, M. Low-dose atorvastatin improves dyslipidemia and vascular function in patients with primary biliary cirrhosis after one year of treatment. *Atherosclerosis*, 2010, vol. 209, no. 1, s. 178–183.
- 158) STUART, K.A. – ANDERSON, G.J. – FRAZER, D.M. – MURPHY, T.L. – POWELL, L.W. – FLETCHER, L.M. – CRAWFORD, D.H. Increased duodenal expression of divalent metal transporter 1 and iron-regulated gene 1 in cirrhosis. *Hepatology*, 2004, vol. 39, no. 2, s. 492–499.
- 159) SVOBODA, M. – VYSKOČIL, J. – NOVÁKOVÁ, J. Statiny v onkologii. *Klinická Farmakologie a Farmacie*, 2005, roč. 19, č. 3, s. 155–159.
- 160) ŠIMEK, M. Nové poznatky o metabolismu železa. *Vnitřní Lékařství*, 2005, roč. 51, č. 3, s. 345–353.
- 161) ŠPIČÁK, Julius. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2008. 444 s. ISBN 13: 978-80-247-1783-8. Kapitola 1.2, Patofyziologické mechanizmy fibrózy jater, s. 8–19.
- 162) TAKADA, Y. – TACHIZAWA, H. – KURIHARA, H. – TAKAYANAGI, M. – SASAMOTO, T. – AKASHI, M. – AISO, M. – TAKAMORI, Y. – SANO, N. – TAKIKAWA, H. Comparison of urinary excretion of pravastatin and temocapril in bile duct-ligated rats and Eisai hyperbilirubinemic rats (RHBR). *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 2004, vol. 11, no. 2, s. 125–128.
- 163) TAKAHASHI, S. – SAKAI, J. – FUJINO, T. – HATTORI, H. – ZENIMARU, Y. – SUZUKI, J. – MIYAMORI, I. – YAMAMOTO, T.T. The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 2004, vol. 11, no. 4, s. 200–208.
- 164) TAKAKUWA, Y. – KOKAI, Y. – SASAKI, K. – CHIBA, H. – TOBIOKA, H. – MORI, M. – SAWADA, N. Bile canalicular barrier function and expression of tight-junctional molecules in rat hepatocytes during common bile duct ligation. *Cell and Tissue Research*, 2002a, vol. 307, no. 2, s. 181–189.
- 165) TANAKA, A.R. – KANO, F. – YAMAMOTO, A. – UEDA, K. – MURATA, M. Formation of cholesterol-enriched structures by aberrant intracellular accumulation of ATP-binding cassette transporter A1. *Genes to Cells*, 2008, vol. 13, no. 8, s. 889–904.

- 166) TANAKA, Y. – KOBAYASHI, Y. – GABAZZA, E.C. – HIGUCHI, K. – KAMISAKO, T. – KURODA, M. – TAKEUCHI, K. – IWASA, M. – KAITO, M. – ADACHI, Y. Increased renal expression of bilirubin glucuronide transporters in a rat model of obstructive jaundice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2002, vol. 282, no. 4, s. G656–G662.
- 167) TIRONA, R.G. – KIM, R.B. Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, vol. 94, no. 6, s. 1169–1186.
- 168) TOKUI, T. – NAKAI, D. – NAKAGOMI, R. – YAWO, H. – ABE, T. – SUGIYAMA, Y. Pravastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, is transported by rat organic anion transporting polypeptide, oatp2. *Pharmaceutical Research*, 1999, vol. 16, no. 6, s. 904–908.
- 169) TOMSIK, P. – SISPERA, L. – REZACOVA, M. – NIANG, M. – STOKLASOVA, A. – CERMAN, J. – KNIZEK, J. – BRCAKOVA, E. – CERMANOVA, J. – MICUDA, S. Increased melibiose/rhamnose ratio in bile of rats with acute cholestasis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2008, vol. 23, no. 12, s. 1934–1940.
- 170) TRAUNER, M. – BOYER, J.L. Bile salts transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiological Reviews*, 2003, vol. 83, no. 2, s. 633–671.
- 171) TRAUNER, M. – CLAUDEL, T. – FICKERT, P. – MOUSTAFA, T. – WAGNER, M. Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. *Digestive Diseases*, 2010, vol. 28, no. 1, s. 220–224.
- 172) TRAUNER, M. – MEIER, P.J. – BOYER, J.L. Molecular pathogenesis of cholestasis. *The New England Journal of Medicine*, 1998, vol. 339, no. 17, s. 1217–1227.
- 173) VÍTEK, Libor. *Bilirubin a interní choroby-význam pro kliniku a praxi*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2009. 128 s. ISBN 978-80-247-2351-8. Kapitola 1.6, Vychytávání bilirubinu a jeho transport jaterní buňkou, s. 11–12.
- 174) VOJÁČEK, Jan – MALÝ, Martin. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2004. 276 s. ISBN 80-247-0501-X. Kapitola 3.1.1, Lipoproteiny o nízké hustotě, s. 33–36.
- 175) VOLKE, M. – GALE, D.P. – MAEGDEFRAU, U. – SCHLEY, G. – KLANKE, B. – BOSSERHOFF, A.K. – MAXWELL, P.H. – ECKARDT, K.U. – WARNECKE, C. Evidence for a lack a direct transcriptional of the iron regulatory peptide hepcidin by hypoxia-inducible factors. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 11, s. e7875.
- 176) WAGNER, M. – HALILBASIC, E. – MARSCHALL, H.U. – ZOLLNER, G. – FICKERT, P. – LANGNER, C. – ZATLOUKAL, K. – DENK, H. – TRAUNER,

- M. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology*, 2005, vol. 42, no. 2, s. 266–269.
- 177) WAGNER, M. – ZOLLNER, G. – TRAUNER, M. New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *Journal of Hepatology*, 2009, vol. 51, no. 3, s. 565–580.
- 178) WALLACE, D.F. – MCDONALD, C.J. – OSTINI, L. – SUBRAMANIAM, V.N. Blunted hepcidin response to inflammation in the absence of Hfe and transferrin receptor 2. *Blood*, 2011, vol. 117, no. 10, s. 2960–2966.
- 179) WANG, X. – IKEJIMA, K. – KON, K. – ARAI, K. – AOYAMA, T. – OKUMURA, K. – ABE, W. – SATO, N. – WATANABE, S. Ursolic acid ameliorates hepatic fibrosis in the rat by specific induction of apoptosis in hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology*, 2010, vol. 55, no. 2, s. 379–387.
- 180) WEN, Y.A. – LIU, D. – ZHOU, Q.Y. – HUANG, S.F. – LUO, P. – XIANG, Y. – SUN, S. – LUO, D. – DONG, Y.F. – ZHANG, L.P. Biliary intervention aggravates cholestatic liver injury and induces hepatic inflammation, proliferation and fibrogenesis in BDL mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2011, vol. 63, no. 3, s. 277–284.
- 181) WIERSMA, H. – GATTI, A. – NIJSTAD, N. – OUDE ELFERINK, R.P. – KUIPERS, F. – TIETGE, U.J. Scavenger receptor class B type I mediates biliary cholesterol secretion independent of ATP-binding cassette transporter g5/g8 in mice. *Hepatology*, 2009, vol. 50, no. 4, s. 1263–1272.
- 182) WIERSMA, H. – NIJSTAD, N. – GAUTIER, T. – IQBAL, J. – KUIPERS, F. – HUSSAIN, M.M. – TIETGE, U.J. Scavenger receptor B1 (SR-B1) facilitates hepatic very low density lipoprotein production in mice. *Journal of Lipid Research*, 2010, vol. 51, no. 3, s. 544–553.
- 183) WIETHOLTZ, H. – MARSCHALL, H.U. – SJOVALL, J. – MATERN, S. Stimulation of bile acid 6 alpha-hydroxylation by rifampicin. *Journal of Hepatology*, 1996, vol. 24, no. 6, s. 713–718.
- 184) WILHELM, Z. – HEGYI, P. Fyziologie jater. *Praktické Lékařství*, 2007, roč. 3, č. 5, s. 242–245.
- 185) WILLIAMS, D. – FEELY, J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics*, 2002, vol. 41, no. 5, s. 343–370.
- 186) WRIGHTING, D.M. – ANDREWS, N.C. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*, 2006, vol. 108, no. 9, s. 3204–3209.
- 187) XIA, X. – FRANCIS, H. – GLASER, S. – ALPINI, G. – LESAGE, G. Bile acid interactions with cholangiocytes. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, vol. 12, no. 22, s. 3553–3563.

- 188) XU, Z. – OUYANG, L. – DEL CASTILLO-OLIVARES, A. – PANDAK, W.M. – GIL, G. Alpha(1)-fetoprotein transcription factor (FTF)/liver receptor homolog-1 (LRH-1) is an essential lipogenic regulator. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, vol. 1801, no. 4, s. 473–479.
- 189) YAMAZAKI, M. – AKIYAMA, S. – NI'INUMA, K. – NISHIGAKI, R. – SUGIYAMA, Y. Biliary excretion of pravastatin in rats: contribution of the excretion pathway mediated by canalicular multispecific organic anion transporter. *Drug Metabolism and Disposition*, 1997, vol. 25, no. 10, s. 1123–1129.
- 190) YAMAZAKI, M. – KOBAYASHI, K. – SUGIYAMA, Y. Primary active transport of pravastatin across the liver canalicular membrane in normal and mutant Eisai hyperbilirubinaemic rats. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 1996, vol. 17, no. 8, s. 645–659.
- 191) YEH, K.Y. – YEH, M. – GLASS, J. Hecpudin regulation of ferroportin 1 expression in the liver and intestine of the rat. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2004, vol. 286, no. 3, s. G385–G394.
- 192) YU, X.Q. – XUE, C.C. – WANG, G. – ZHOU, S.F. Multidrug resistance associated proteins as determining factors of pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Current Drug Metabolism*, 2007, vol. 8, no. 8, s. 787–802.
- 193) ZADÁK, Zdeněk. *Výživa v intenzivní péči*. 2. vyd. Praha : Grada Publishing, 2008. 552 s. ISBN 978-80-247-2844-5. Kapitola 3.4.3, Struktura a metabolismus jednotlivých lipoproteinových tříd, s. 67–70.
- 194) ZHANG, M. – WANG, X.Q. – ZHOU, Y.K. Effects of oral *Lactobacillus plantarum* on hepatocyte tight junction structure and function in rats with obstructive jaundice. *Molecular Biology Reports*, 2010, vol. 37, no 6, s. 2989–2999.
- 195) ZHU, Y. – LI, F. – GUO, G.L. Tissue-specific function of farnesoid X receptor in liver and intestine. *Pharmacological Research*, 2011, vol. 63, no. 4, s. 259–265.
- 196) ZOLLNER, G. – TRAUNER, M. Molecular mechanisms of cholestasis. *Wiener Medizinischen Wochenschrift*, 2006, vol. 156, no. 13–14, s. 380–385.
- 197) ZOLLNER, G. – TRAUNER, M. Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *British Journal of Pharmacology*, 2009, vol. 156, no. 1, s. 7–27.
- 198) ZOLLNER, G. – WAGNER, M. – TRAUNER, M. Nuclear receptors as drug targets in cholestasis and drug-induced hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 2010, vol. 126, no. 3, s. 228–243.



- 199) ŽOUREK, M. – LACIGOVÁ, S. – KRČMA, M. – MUDRA, J. – JANKOVEC, Z. – RUŠAVÝ, Z. Přehled metabolismu železa s ohledem na klinickou praxi. *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa*, 2007, roč. 2, s. 100–105.

**Použité internetové zdroje:**

- 200) *Paul Wissmann* [online]. [cit. 2011-03-007]. Cholesterol, Phospholipids, Triglycerides and Lipoproteins. Dostupné z WWW: <[http://homepage.smc.edu/wissmann\\_paul/anatomy2textbook/1cholesterol.html](http://homepage.smc.edu/wissmann_paul/anatomy2textbook/1cholesterol.html)>
- 201) *The Free Dictionary* [online]. 2007 [cit. 2011-02-13]. Hepatic Lobules. Dostupné z WWW: <<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/hepatic+lobules>>.
- 202) *The Free Dictionary* [online]. 2007 [cit. 2011-01-20]. Liver Acinus. Dostupné z WWW: <<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/liver+acinus>>.

# PŘÍLOHY

## Příloha I

KOLOUCHOVA, G. – BRČAKOVA, E. – HIRSOVA, P. – SISPERA, L. – TOMSIK, P. – CERMANOVA, J. – HYSPLER, R. – SLANAROVA, M. – FUKSA, L. – LOTKOVA, H. – MICUDA S. Pravastatin modulates liver bile acid and cholesterol homeostasis in rats with chronic cholestasis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2011, vol. 26, no. 10, s. 1544–1551.

## Příloha II

KOLOUCHOVA, G. – BRČAKOVA, E. – HIRSOVA, P. – CERMANOVA, J. – FUKSA, L. – MOKRY, J. – NACHTIGAL, P. – LASTUVKOVA, H. – MICUDA, S. Modification of hepatic iron metabolism induced by pravastatin during obstructive cholestasis in rats. *Life Sciences*, 2011.

## **PŘÍLOHA I**

KOLOUCHOVA, G. – BRČAKOVA, E. – HIRSOVA, P. – SISPERA, L. – TOMSIK, P. – CERMANOVA, J. – HYSPLER, R. – SLANAROVA, M. – FUKSA, L. – LOTKOVA, H. – MICUDA S. Pravastatin modulates liver bile acid and cholesterol homeostasis in rats with chronic cholestasis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2011, vol. 26, no. 10, s. 1544–1551.

## HEPATOLOGY

**Pravastatin modulates liver bile acid and cholesterol homeostasis in rats with chronic cholestasis**Gabriela Kolouchova,\* Eva Brackova,\*<sup>†</sup> Petra Hirssova,\* Ludek Sispera,<sup>†</sup> Pavel Tomsik,<sup>†</sup> Jolana Cermanova,\* Radek Hyspler,<sup>‡</sup> Martina Slanarova,<sup>‡</sup> Leos Fuksa,\* Halka Lotkova<sup>†</sup> and Stanislav Micuda\*Departments of \*Pharmacology, <sup>†</sup>Medical Biochemistry and <sup>‡</sup>Physiology, Charles University of Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralova, <sup>†</sup>Department of Gerontology and Metabolic Care, Faculty Hospital in Hradec Kralova, and <sup>‡</sup>Department of Biological and Medical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralova, Hradec Kralova, Czech Republic**Key words**

bile acids, bile duct obstruction, cholesterol, nuclear receptors, pravastatin.

Accepted for publication 1 April 2011.

**Correspondence**

Mr Stanislav Micuda, Department of Pharmacology, Charles University of Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralova, Simkova 870, 500 38 Hradec Kralova, Czech Republic. Email: micuda@lfhk.cuni.cz

**Abbreviations**Abca1, ATP-binding cassette transporter a1; Abcg5/8, ATP-binding cassette sub-family G member 5/8; Acat2, acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 2; BDO, bile duct obstruction; Bsep, bile salt export pump; CAR, constitutive androstane receptor; Cyp7a1, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase; Cyp8b1, sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase; FXR, farnesoid X receptor; Hmg-CoA red., hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase; Hnf1 $\alpha$ , hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; LDLr, low-density lipoprotein receptor; LXR, liver X receptor; Mdr, multidrug resistance protein; Mrp, multidrug resistance-associated protein; Ntcp, Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide; Oatp, organic anion transporting polypeptide; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor alpha; PXR, pregnane X receptor; SHP, short heterodimer partner; Sre-b1, scavenger receptor class b1; SREBP-2, sterol regulatory element-binding protein 2; Ugt1a1, UDP-glucuronosyltransferase 1a1.**Introduction**

Obstructive cholestasis is characterized by the hepatic accumulation of toxic biliary compounds, mainly bile acids which, in turn induce an inflammatory response and oxidative damage of liver

**Abstract**

**Background and Aim:** The administration of pravastatin to patients with cholestatic liver disease has suggested the potential of the drug with regard to reducing raised plasma cholesterol and bile acid levels. Information about the mechanisms associated with this effect is lacking. Thus, the aim of the present study is to evaluate pravastatin effects on the liver bile acid and cholesterol homeostasis in healthy and cholestatic rats.

**Methods:** Control sham-operated and reversibly bile duct-obstructed (BDO) rats were treated with pravastatin (1 or 5 mg/kg) or the vehicle alone for 7 days after surgery.

**Results:** Lower doses of pravastatin reduced bile acid plasma concentrations in cholestatic animals. The effect was associated with reduced liver mRNA expression of Cyp7a1, Cyp8b1, Mrp2, Ugt1a1 and the increased expression of Bsep. In addition, BDO-induced increase in the liver content of cholesterol was normalized by pravastatin. The change was accompanied by the reduced liver expression of Hmg-CoA reductase, LDL receptor, and Acat2, and induced the expression of Abca1 and Mdr2. These changes corresponded with the upregulation of nuclear receptors LXR $\alpha$  and PPAR $\alpha$ , and the downregulation of FXR, CAR, SREBP-2 and HNF1 $\alpha$ . High doses of pravastatin lacked any positive effects on bile acids and cholesterol homeostasis, and blocked bile formation through the reduction of the biliary excretion of bile acids.

**Conclusions:** Pravastatin rendered a positive reduction in BDO-induced increases in plasma bile acid concentrations and cholesterol liver content, mainly through the transcriptionally-mediated downregulation of genes involved in the synthesis of these compounds in the liver.

parenchyme. Ongoing injury is partially modulated by the activation of adaptive changes of enzymatic and transport pathways involved in bile acid synthesis, biotransformation and transmembrane movement.<sup>1</sup> These include the downregulation of basolateral uptake (Ntcp and Oatps), the upregulation of basolateral efflux



(Mrp3 and Mrp4) transporters, and the activation of detoxifying enzymes, producing more hydrophilic bile acids and enforcing their secretion back into blood and, subsequently, into urine.<sup>2</sup> Nevertheless, the persistent impairment of the blood-biliary barrier associated with the progressive accumulation of bile constituents, perpetuates inflammation, and makes the adaptive changes insufficient to compensate for ongoing liver damage.<sup>2</sup>

Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors, widely used hypolipidemic drugs, have recently been intensively evaluated concerning their ability to modulate cholestatic liver injury. Encouraging data have emerged from clinical studies reporting that simvastatin, atorvastatin and pravastatin may improve hypercholesterolemia and bile acid accumulation in patients with primary biliary cirrhosis.<sup>4-6</sup> These advantageous effects during cholestasis have been verified in several recent preclinical studies where they demonstrated positive amelioration of hepatic inflammation, lipid peroxidation, fibrosis,<sup>5-8</sup> or the reduction of intrahepatic vessel resistance.<sup>9</sup> Nevertheless, the influence of these agents on the molecules involved in bile formation mechanisms during cholestasis, which were suggested as a potential therapeutic target during cholestasis,<sup>10</sup> has not been described yet. Importantly, several authors have demonstrated an increase in bile production and/or biliary excretion of bile acids after the administration of pravastatin to healthy rodents.<sup>11,12</sup> Thus, pravastatin became attractive for our study because it already had a demonstrated positive effect in humans with cholestasis. Moreover, data exists about its stimulatory influence on bile formation mechanisms in healthy animals and, in contrast to the majority of statins, it is hydrophilic, with proven better chances for compensatory renal elimination during cholestasis.<sup>13</sup>

The aim of the present study is to evaluate the impact of pravastatin treatment on the molecular mechanisms involved in bile acid and cholesterol liver homeostasis in healthy and reversibly bile duct-obstructed rats. Moreover, the recanalization of the obstructed bile ducts allowed a unique evaluation of bile acid and cholesterol biliary excretion, together with blood-biliary barrier integrity using the melibiose/rhamnose dual sugar permeability test.

## Methods

### Animal model

Male Wistar rats (SPF, Anlab, Prague, Czech Republic) with an initial weight of 280–320 g were used throughout the study. The animals were housed under controlled environmental conditions with commercial food and water freely available. All experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (NIH publication, 1996).

The rats were randomly divided into five groups ( $n = 6$  in each group):

- Group 1, control rats (Sh, sham-operated);
- Group 2, control rats with 5 mg/kg b.w. pravastatin treatment (Sh-P5);
- Group 3, bile duct-obstructed rats without treatment (BDO);
- Group 4, bile duct-obstructed rats with 5 mg/kg b.w. pravastatin treatment (BDO-P5);

Group 5, bile duct-obstructed rats with 1 mg/kg b.w. pravastatin treatment (BDO-P1).

The dose was selected based on the maximum dose of 80 mg recommended in humans and on the basis of dosage schedules used in similar studies with other statins.<sup>3,14</sup> Pravastatin or saline was applied to the designed animals intraperitoneally once daily throughout the evaluated period, with the first administration starting 2 h after the initial surgery. Chronic cholestasis was induced by reversible bile duct obstruction lasting for 7 days as described previously.<sup>15</sup>

### In vivo clearance study

Clearance study was performed 7 days after the initial surgery. Under general anesthesia induced by pentobarbital administration (50 mg/kg b.w., i.p.), the bile duct was either cannulated (sham-operated animals), or its obstruction was released (BDO animals). All rats were cannulated in the right jugular vein for sugar administration and for the continuous infusion of physiological saline (2 mL/h), and in the left carotid artery for blood sampling. Thereafter, the rats received a single bolus dose of melibiose and rhamnose (100 mg/kg b.w., i.v.). Blood samples ( $\approx 0.3$  mL) were taken at designated time intervals (0, 4, 10, 30, 60, 120, 180 min after the injection of sugars). Plasma samples were obtained from the whole blood by centrifugation at 5000 g for 5 min at 4°C. Bile samples were collected in pre-weighed tubes at 30-min intervals throughout the experiment. At the end of the experiment, animals were exsanguinated for further biochemical analysis, and organs for the subsequent evaluation of gene expression were immediately frozen in liquid nitrogen and, together with the plasma, bile and urine samples, were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### Analytical procedures

Biliary concentration of melibiose and rhamnose was determined by high performance liquid chromatography with a fluorescent detection according to a previously described method.<sup>16</sup> The ratio of melibiose (disaccharide, which penetrates selectively across the paracellular junctions) to L-rhamnose (monosaccharide, which permeates barriers by transcellular diffusion) excretion into bile was used as the marker of the blood-biliary barrier function. Plasma biochemical parameters (concentration of bilirubin, activities of ALT, AST, etc.) were measured on Cobas Integra 800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. Liver or biliary cholesterol, triglycerides, total bile acids were determined using commercial kits CHOLESTEROL LIQUID 500, TRIACYLGLYCERIDES LIQUID 250 S (PLIVA-Lachema, Czech Republic), and TBA kit (Diazyme, Poway, USA), according to manufacturer's instructions. The concentrations of bile acids and cholesterol in bile were evaluated during the initial collection period (0–30 min) of the *in vivo* clearance study with sugars, which best reflects the situation under bile duct obstruction.

### Quantitative RT-PCR

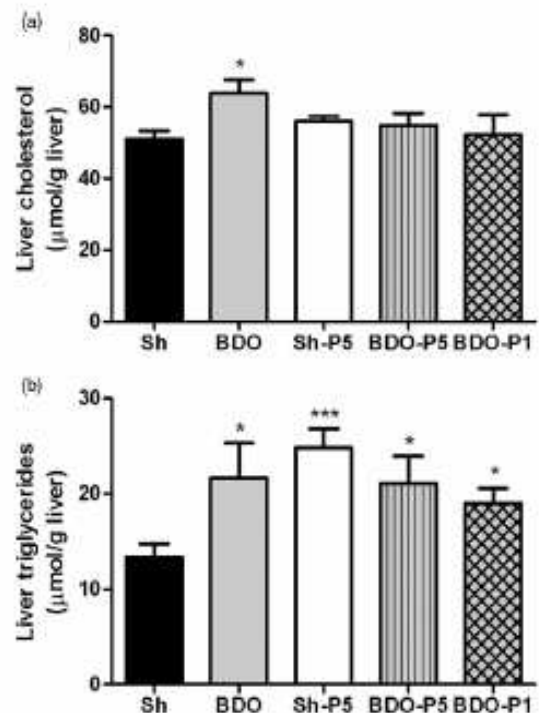
Gene expression analysis was performed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) on a 7500 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City,

**Table 1** Gene expression assays

Gene	
Mrp2	Rn00563231_m1
Mrp3	Rn00589786_m1
Mrp4	Rn01465702_m1
Mdr1a	Rn00591394_m1
Mdr1b	Rn00561753_m1
Mdr2	Rn00562185_m1
Ntcp	Rn00566894_m1
Bsep	Rn00582179_m1
Oatp1a1	Rn00755148_m1
Oatp1a4	Rn00756233_m1
Ugt1a1	Rn00754947_m1
Cyp7a1	Rn00564065_m1
Cyp8b1	Rn00579921_m1
LDLr	Rn00598442_m1
Srb1	Rn00580588_m1
Abca1	Rn00710172_m1
Abcg5	Rn00587092_m1
Abcg8	Rn00590367_m1
Hmg-CoA red.	rHmgcr_Q2IFAM0
Acat2	Rn00596636_m1
FXR	Rn00572658_m1
PXR	Rn00583887_m1
CAR	Rn00576085_m1
LXR	Rn00581185_m1
SHP	Rn00589173_m1
HNF1 $\alpha$	Rn00562020_m1
PPAR $\alpha$	Rn00566193_m1
SREBP-2	Rn01502638_m1
GAPDH	4352338E

Abca1, ATP-binding cassette transporter a1; Acat2, acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 2; Bsep, bile salt export pump; CAR, constitutive androstane receptor; Cyp7a1, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase; Cyp8b1, sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase; FXR, farnesoid X receptor; Hmg-CoA red., hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase; Hnf1 $\alpha$ , hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; LDLr, low-density lipoprotein receptor; LXR, liver X receptor; Mdr, multidrug resistance protein; Mrp, multidrug resistance-associated protein; Ntcp, Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide; Oatp, organic anion transporting polypeptide; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor alpha; PXR, pregnane X receptor; SHP, short heterodimer partner; Srb1, scavenger receptor class b1; SREBP-2, sterol regulatory element-binding protein 2; Ugt1a1, UDP-glucuronosyltransferase 1a1. All assays purchased from Applied Biosystems.

CA, USA), as described previously.<sup>15</sup> RNA was isolated from liver tissue samples using TRI reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and converted into cDNA via a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). 30 ng of cDNA were loaded into the reaction performed in triplicate. The amplifications were run using TaqMan Fast Universal PCR Master Mix and pre-designed Taq-Man Gene Expression Assay kits for respective genes (Table 1) were provided by Applied Biosystems, while HMG-CoA reductase was provided by Generi-Biotech (Czech Republic). The time-temperature profile used in the "fast" mode was: 95°C for 20 s; 40 times: 95°C for 3 s, 60°C for 30 s. The relative expression ratio was then calculated from the  $\Delta\Delta C_{t_{\text{normalized}}}$  values as described previously.<sup>15</sup>



**Figure 1** Changes in liver contents of cholesterol (a) and triglycerides (b) in control and cholestatic animals. The liver content of cholesterol and TAG was increased by cholestasis. Low dose pravastatin prevented cholesterol hepatic accumulation during cholestasis. BDO, bile duct-obstructed; BDO-P1, bile duct-obstructed with 1 mg/kg pravastatin treatment; BDO-P5, bile duct-obstructed with 5 mg/kg pravastatin treatment; Sh, sham-operated; Sh-P5, sham-operated with 5 mg/kg pravastatin treatment. Data expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) ( $n = 6$  in each group). Significantly different from control value (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). Significantly different from untreated BDO animals ( $^{\dagger}P < 0.05$ ).

### Statistical analysis

Experiments were carried out on six animals per group. All experimental data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Differences between experimental and control values were assessed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test or paired  $t$ -test using GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, CA, USA). A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Biochemical parameters

The liver content of triglycerides and cholesterol was increased in BDO animals (Fig. 1a/b). The administration of pravastatin prevented a cholestasis-induced rise in cholesterol content without influence on the liver TAG (triglyceride) content. Obstruction of



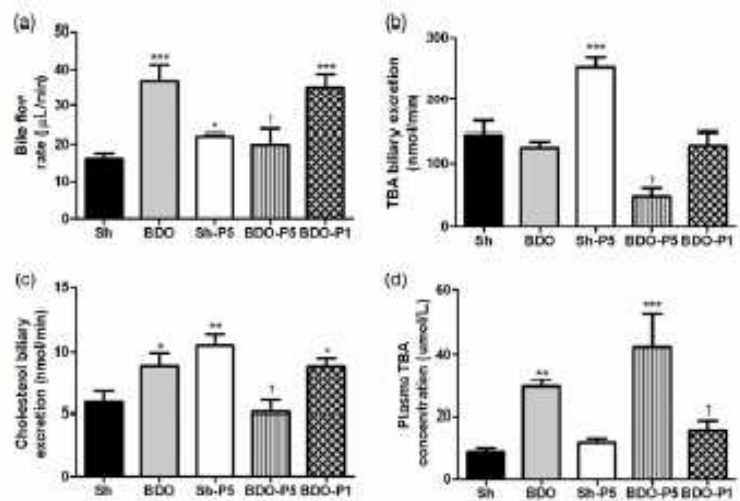
**Table 2** Plasma liver biochemical tests in sham-operated and bile duct-obstructed rats with and without pravastatin treatment

	Sh	BDO	Sh-P5	BDO-P5	BDO-P1
Total bilirubin ( $\mu\text{M}$ )	2.7 $\pm$ 0.3	54 $\pm$ 4.3***	3.5 $\pm$ 1.3	67 $\pm$ 12***	28 $\pm$ 4.0***
Conjugated bilirubin ( $\mu\text{M}$ )	2.0 $\pm$ 0	25 $\pm$ 3.8***	<0.1 <sup>†</sup>	40 $\pm$ 9***	12 $\pm$ 2.1 <sup>†</sup>
Total protein (g/L)	44 $\pm$ 0.9	48 $\pm$ 1.2	44 $\pm$ 2.2	47 $\pm$ 1.4	50 $\pm$ 1.2
Albumin (g/L)	27 $\pm$ 0.4	29 $\pm$ 1.0	26 $\pm$ 1.4	25 $\pm$ 1.6	28 $\pm$ 0.6
Cholesterol (mM)	1.1 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.2**	1.2 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.3**	2.1 $\pm$ 0.1**
Triglycerides (mM)	1.3 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
LDL cholesterol (mM)	0.2 $\pm$ 0.02	0.8 $\pm$ 0.1***	0.1 $\pm$ 0.02	0.6 $\pm$ 0.1*	0.8 $\pm$ 0.1***
HDL cholesterol (mM)	0.8 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1

Values are means  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Significantly different from control value (\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ ). Significantly different from BDO value (<sup>†</sup> $P<0.05$ ; <sup>††</sup> $P<0.01$ ; <sup>†††</sup> $P<0.001$ ). <sup>†</sup>Limit of detection.

BDO, bile duct-obstructed; BDO-P1, bile duct-obstructed with 1 mg/kg b.w. pravastatin treatment; BDO-P5, bile duct-obstructed with 5 mg/kg b.w. pravastatin treatment; Sh, sham-operated; Sh-P5, sham-operated with 5 mg/kg b.w. pravastatin treatment.

**Figure 2** Bile flow rate (a), total bile acid (TBA) biliary excretion (b), cholesterol biliary excretion (c) and plasma concentrations of bile acid (d) detected upon recanalization of bile duct during *in vivo* clearance study. BDO, bile duct-obstructed; BDO-P1, bile duct-obstructed rats with 1 mg/kg pravastatin treatment; BDO-P5, bile duct-obstructed rats with 5 mg/kg pravastatin treatment; Sh, sham-operated; Sh-P5, sham-operated with 5 mg/kg pravastatin treatment. Values are the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) ( $n=6$  in each group). Significantly different from sham-operated animals (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ). Significantly different from untreated BDO animals (<sup>†</sup> $P<0.05$ ).



the bile duct in untreated animals caused elevation in plasma concentrations of bilirubin, conjugated bilirubin, cholesterol and LDL cholesterol when compared to the untreated sham-operated group (Table 2). Pravastatin treatment did not influence any parameters in the control animals. The administration of pravastatin 1 mg/kg b.w. to BDO animals reduced the plasma concentrations of bilirubin and bile acids (Table 2, Fig. 2d, respectively). In contrast, treatment with pravastatin 5 mg/kg significantly increased the plasma concentrations of the total and conjugated bilirubin, even when compared to the BDO group. Pravastatin in either dose did not significantly modify BDO-induced increases in cholesterol levels (Table 2).

#### Liver mRNA expression

The obstruction of the bile duct in untreated animals led to a decrease in the mRNA content of several basolateral and canalicular transporting proteins, Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4, Mrp2 and Bsep, compared to those of sham-operated rats (Table 3). The mRNA expression of the efflux transporters, Mdr1b, Mdr2, and

Mrp3, was increased. In BDO animals, pravastatin administration further reduced the mRNA content of Mrp2, Ugt1a1 and Oatp1a4. This reduction was more apparent with the lower pravastatin dose (1 mg/kg).

Regarding the liver mRNA expression of genes relevant for cholesterol homeostasis, we detected a reduction of Cyp8b1, Abca1, Abcg5 and Abcg8; the induction of the LDL receptor, Cyp7a1; and Hmg-CoA reductase in untreated cholestatic animals compared to the sham-operated group (Table 3).

The treatment of BDO animals with pravastatin caused the downregulation of Cyp7a1, Cyp8b1, LDL receptor, Acat2 and Hmg-CoA reductase compared to untreated BDO rats. Notably, the administration of pravastatin to sham-operated animals increased the expression of Mrp2, Mrp4, Bsep, Oatp1a4, Cyp7a1, LDL and CAR receptors. The expression of the main transcription factors CAR and SHP was increased by cholestasis (Table 4), but the administration of pravastatin reduced their levels as well as those of FXR, and HNF1 $\alpha$ . The liver expression of LXR $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , and SREBP-2 was increased by pravastatin in BDO animals.

**Table 3** Relative expression of genes involved in liver bile acid/cholesterol homeostasis and liver drug transport in sham-operated and bile duct-obstructed rats with and without pravastatin treatment. Data presented as a percentage of control values (measured in sham-operated untreated animals which were taken as 100%)

	BDO	Sh-P5	BDO-P5	BDO-P1
Mrp2	93 ± 16	150 ± 17*	50 ± 9**	50 ± 12*
Mrp3	1800 ± 240***	110 ± 17	1600 ± 390**	2400 ± 240***
Mrp4	80 ± 16	210 ± 32*	73 ± 7	67 ± 8
Mdr1a	120 ± 23	110 ± 12	100 ± 12	116 ± 15
Mdr1b	5200 ± 970***	780 ± 420	8100 ± 1900***	5400 ± 690***
Ntcp	40 ± 9***	110 ± 9	39 ± 7***	36 ± 5***
Bsep	78 ± 6	230 ± 33**	67 ± 8*	110 ± 7†
Oatp1a1	49 ± 8**	130 ± 12	35 ± 2***	48 ± 8***
Oatp1a4	57 ± 11	440 ± 60**	48 ± 6*	66 ± 9
Ugt1a1	120 ± 8	120 ± 10	77 ± 8†	66 ± 11**
Cyp7a1	920 ± 190**	200 ± 36*	520 ± 90*	430 ± 80**
Cyp8b1	15 ± 3***	99 ± 9	12 ± 4***	7 ± 1***
LDLr	140 ± 11*	180 ± 28*	100 ± 12	93 ± 12†
Sr-b1	93 ± 12	110 ± 11	88 ± 12	94 ± 11
Abca1	37 ± 5***	130 ± 19	66 ± 11	74 ± 4†
Abcg5	10 ± 2***	96 ± 29	11 ± 4***	10 ± 2***
Abcg8	12 ± 2**	120 ± 29	19 ± 6*	12 ± 4*
Mdr2	190 ± 24*	88 ± 5	230 ± 26*	270 ± 20**
Hmg-CoA red.	200 ± 33*	89 ± 17	130 ± 30	92 ± 7†
Acat2	110 ± 20	92 ± 12	53 ± 5***	48 ± 7***

Values are means ± SEM ( $n = 6$ ). Significantly different from control value (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Significantly different from BDO value († $P < 0.05$ ; †† $P < 0.01$ ; ††† $P < 0.001$ ). BDO, bile duct-obstructed; BDO-P1, bile duct-obstructed with 1 mg/kg b.w. pravastatin treatment; BDO-P5, bile duct-obstructed with 5 mg/kg b.w. pravastatin treatment; Sh-P5, sham-operated with 5 mg/kg b.w. pravastatin treatment. Abca1, ATP-binding cassette transporter a1; Abcg5/8, ATP-binding cassette sub-family G member 5/8; Acat2, acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 2; BDO, bile duct obstruction; Bsep, bile salt export pump; Cyp7a1, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase; Cyp8b1, sterol 8 $\beta$ -hydroxylase; Hmg-CoA red., hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase; LDLr, low-density lipoprotein receptor; Mdr, multidrug resistance protein; Mrp, multidrug resistance-associated protein; Ntcp, Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide; Oatp, organic anion transporting polypeptide; Sr-b1, scavenger receptor class b1; Ugt1a1, UDP-glucuronosyltransferase 1a1.

### Biliary excretion of bile acids and cholesterol

While bile duct obstruction (BDO and BDO-P1) increased the bile flow rate compared to control (sham-operated) values, the higher dose of pravastatin (BDO-P5) was associated with a significant decrease in the bile flow rate compared to untreated BDO animals (Fig. 2a). This complied with a decrease in the biliary excretion of bile acids in BDO-P5 animals (Fig. 2b). In contrast, sham-operated animals pre-treated with pravastatin, initially exerted a higher bile production and higher bile acid biliary excretion than untreated controls. The biliary excretion of cholesterol was increased in BDO animals and in pravastatin-treated controls (Fig. 2c). While low doses of pravastatin did not change the parameters, higher doses of the drug significantly reduced cholesterol biliary excretion.

### Blood-biliary barrier permeability

The biliary excretion ratio of melibiose and rhamnose was increased throughout the whole experiment in all cholestatic animals, irrespective of the pravastatin dose administered (Fig. 3b). Nevertheless, all cholestatic animals demonstrated a progressive reconstitution of the barrier permeability after removal of the biliary obstruction, as demonstrated by the continual decrease in the sugar ratio. The reconstitution was associated with

contemporary reduction of bile duct obstruction-induced increase in the bile flow rate, with the exception of cholestatic animals with higher doses of pravastatin.

### Discussion

This study, for the first time, demonstrates that the administration of pravastatin in a clinically relevant dose of 1 mg/kg to rats with obstructive cholestasis, modulated the liver expression of several key executive and regulatory molecules controlling the liver homeostasis of bile acids and cholesterol.

The intracellular accumulation of bile acids during obstructive cholestasis activates a defensive response, which is based on, mainly, the FXR-mediated downregulation of basolateral uptake transporters (e.g. Ntcp), and the upregulation of efflux transporters and phase I/II enzymes.<sup>17</sup> We saw the same changes in the BDO group, which formed a reliable rationale for the evaluation of the pravastatin effect in our model of cholestasis. As shown in Table 3, the positive reduction of bile acid plasma concentrations by low-dose pravastatin may be attributed, mainly, to their reduced synthesis through the direct blockade and the downregulation of Hmg-CoA reductase, but, also to the downregulation of two major bile acid-synthetic enzymes: Cyp7a1 and Cyp8b1. In agreement, raised bile acid levels in plasma were seen in pravastatin high-dose



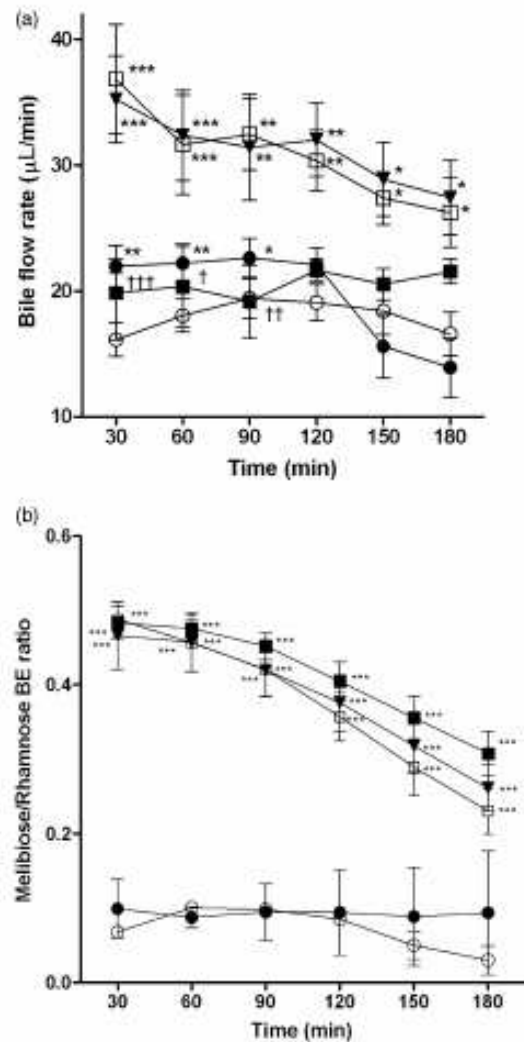
**Table 4** Relative expression of nuclear receptor genes involved in liver bile acid/cholesterol homeostasis regulation in sham-operated and bile duct-obstructed rats with and without pravastatin treatment. Data presented as a percentage of control values (measured in sham-operated untreated animals which were taken as 100%)

	BDO	Sh-P5	BDO-P5	BDO-P1
FXR	130 ± 26	140 ± 17	65 ± 9 <sup>a†</sup>	51 ± 6 <sup>a†</sup>
PXR	110 ± 15	140 ± 21	76 ± 10	94 ± 14
CAR	260 ± 54 <sup>*</sup>	240 ± 54 <sup>*</sup>	110 ± 25 <sup>†</sup>	96 ± 5 <sup>†</sup>
LXR $\alpha$	120 ± 11	144 ± 11	110 ± 11	160 ± 11 <sup>a†</sup>
SHP	540 ± 100 <sup>*</sup>	170 ± 48	180 ± 43 <sup>†</sup>	210 ± 42 <sup>†</sup>
SREBP-2	100 ± 11	130 ± 17	66 ± 7 <sup>***†</sup>	72 ± 5 <sup>a†</sup>
PPAR $\alpha$	150 ± 20	190 ± 68	180 ± 9 <sup>***†</sup>	260 ± 21 <sup>***††</sup>
HNF1 $\alpha$	140 ± 32	94 ± 14	63 ± 5 <sup>**†</sup>	55 ± 8 <sup>***†</sup>

Values are means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) ( $n = 6$ ). Significantly different from control value (<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ). Significantly different from BDO value (<sup>†</sup> $P < 0.05$ ; <sup>††</sup> $P < 0.01$ ). BDO, bile duct-obstructed; BDO-P1, bile duct-obstructed with 1 mg/kg b.w. pravastatin treatment; BDO-P5, bile duct-obstructed with 5 mg/kg b.w. pravastatin treatment; Sh-P5, sham-operated with 5 mg/kg b.w. pravastatin treatment. CAR, constitutive androstane receptor; FXR, farnesoid X receptor; HNF1 $\alpha$ , hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ ; LXR $\alpha$ , liver X receptor  $\alpha$ ; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; PXR, pregnane X receptor; SHP, short heterodimer partner; SREBP-2, sterol regulatory element-binding protein 2.

administered cholestatic animals where downregulation of both enzymes was not seen. Moreover, the ability of pravastatin to directly inhibit Bsep was also recently described,<sup>18</sup> the major canalicular transporter for the biliary excretion of bile acid.<sup>19</sup> This may explain reduced bile acid biliary excretion and bile flow rate upon release of bile duct obstruction in BDO-P5 animals. Importantly, reported Ki of 163–805  $\mu$ M for inhibition of Bsep by pravastatin<sup>14</sup> indicates a significant accumulation of the drug in the high-dose treated cholestatic group. Despite no existing study about pharmacokinetics of any statin during extrahepatic cholestasis, indirect data indeed suggest significant increase in pravastatin plasma concentration in bile duct ligated rats<sup>20</sup> and in MRP2-deficient TR-rats, the genetic model of intrahepatic cholestasis.<sup>20</sup>

The pivotal position in the regulation of bile acid liver processing plays their target FXR receptor and its downstream SHP, induced upon FXR activation during cholestasis and, in turn, blocks the expression of bile acid synthetic enzymes.<sup>17</sup> The strong increase in SHP and the reduction of Cyp8b1 seen in our untreated BDO group supports this concept. Interestingly, pravastatin was able to reduce the FXR expression in cholestatic animals, which was also reflected by the downregulation of SHP. These findings correspond with the same reduction seen in the expression of FXR-sensitive MRP2 and Ugt1a1. Although these data indicate the influence of pravastatin on FXR receptor expression, they cannot explain the upregulation of Bsep or the downregulation of Cyp7a1 in treated cholestatic rats. The contribution of other factors is apparent. Indeed, Seo *et al.* recently demonstrated pravastatin-mediated activation of PPAR $\alpha$ ,<sup>21</sup> the nuclear receptor inducing Mdr2, the principal phospholipid canalicular transporter, and repressing Cyp7a1.<sup>10</sup> Despite the fact that the direct link must be further studied, our finding of increased PPAR $\alpha$  and Mdr2, and



**Figure 3** Time-dependent changes of bile flow rates (a) and their ratio of melibiose/rhamnose ratio (b), the marker of blood-biliary barrier permeability during *in vivo* clearance study. BDO, bile duct-obstructed; BDO-P1, bile duct-obstructed rats with 1 mg/kg pravastatin treatment; BDO-P5, bile duct-obstructed rats with 5 mg/kg pravastatin treatment; Sh, sham-operated; Sh-P5, sham-operated with 5 mg/kg pravastatin treatment. Values are the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) ( $n = 6$  in each group). Significantly different from sham-operated animals (<sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ). Significantly different from untreated BDO animals (<sup>†</sup> $P < 0.05$ , <sup>††</sup> $P < 0.01$ , <sup>†††</sup> $P < 0.001$ ).  $\square$ , Sh;  $\square$ , BDO;  $\blacktriangledown$ , BDO-P1;  $\blacksquare$ , BDO-P5;  $\bullet$ , Sh-P5.



decreased Cyp7a1 expression, indicates the contribution of PPAR $\alpha$  to the BA-reducing effect of low-dose pravastatin during cholestasis.

The predictable hepatic effect of statins in non-cholestatic subjects is the blockade of Hmg-CoA reductase, the rate-limiting enzyme in liver cholesterol synthesis, and the increased expression of LDL receptors. This effect is mediated by the reduced liver content of cholesterol and oxysterols which, in turn, activate SREBP-2, the principal transcription factor for upregulating the expression of the LDL receptor, ultimately leading to the increased clearance of circulating LDL-cholesterol.<sup>22</sup> Activated LDLr expression and a tendency towards the reduction of plasma LDL cholesterol levels in our pravastatin-treated control group, indicates proper dose selection of the drug in this experimental model. Lack of reduction in cholesterol plasma levels in control animals receiving pravastatin was formerly seen also by others, and is ascribed to increased lipoprotein synthesis in the liver and their increased secretion.<sup>23,24</sup>

An increase in biliary cholesterol efflux was reported during the pravastatin therapy.<sup>17</sup> The rate-limiting molecules for biliary cholesterol excretion are heterodimeric transporter Abcg5/Abcg8 localized on the canalicular membrane of hepatocytes.<sup>25</sup> Recent data also indicate that Mdr2,<sup>26</sup> and Sr-b1,<sup>27</sup> the receptor for HDL-cholesterol liver uptake, may be necessary for cholesterol excretion into bile. Accordingly, Kamisako *et al.* assigned the increase in cholesterol biliary excretion after high dose pravastatin administration (0.1% pravastatin in diet, equal to approximately 60 mg/kg) in healthy animals to the induction of Abcg5/Abcg8 and Mdr2.<sup>17</sup> The lower doses used in our controls may explain why we did not detect changes in the expression of these transporters. However, significant induction of cholesterol biliary secretion in our treated controls and its reduction in BDO-P5 suggest another mechanism. Indeed, several authors recently demonstrated that modulation of cholesterol biliary excretion is not necessarily associated with changed expression of these transporters.<sup>28–31</sup> Oude Elferink *et al.*<sup>32</sup> showed that the main driving force for the secretion of cholesterol into bile is biliary secretion of bile acids. We, therefore, hypothesize that changes in cholesterol biliary excretion in our study are attributable to the corresponding decrease (BDO-P5 group) or increase (control pravastatin group) in bile acid biliary secretion and bile flow through modulation of Bsep.

Hypercholesterolemia and liver accumulation of cholesterol is a well-known symptom accompanying extrahepatic cholestasis.<sup>33</sup> Interestingly, hepatocytes paradoxically increase the expression of synthetic Hmg-CoA reductase,<sup>34</sup> upregulate influx LDLr and downregulate exporting Abca1, Abcg5, and Abcg8.<sup>35,36</sup> The reason for such changes is unknown, but newly synthesized cholesterol in the liver might even be a key determinant of increased plasma cholesterol during obstructive cholestasis.<sup>36</sup> Our data, for the first time, demonstrate that pravastatin may reduce liver cholesterol content during cholestasis, even through complete obstruction of the bile duct. This finding indicates the influence on cholesterol synthesis and transport at the basolateral membrane. Indeed, as shown in Table 2, the pravastatin liver cholesterol-lowering effect may be related to the decreased expression of Hmg-CoA reductase, and LDLr. Moreover, the cholesterol reverse export from hepatocytes may be enhanced by increased levels of the Abca1 transporter. These changes are in agreement with increased LXR $\alpha$

expression and the downregulation of SREBP-2 detected in pravastatin-treated cholestatic animals, which indicates that the modulated transcription of nuclear receptors themselves is involved in pravastatin effects during cholestasis. Similarly, cholesterol intracellular esterification and sequestration may be decreased due to the reduced expression of Acat-2 and its regulatory HNF1 $\alpha$  receptor.

A blood-biliary barrier is formed by tight junction interconnections of hepatocytes, and preventing the paracellular regurgitation of biliary solutes.<sup>37</sup> During extrahepatic cholestasis, the integrity of the barrier is impaired with altered expression of their key molecular components.<sup>38,39</sup> This is associated with a leakage of the solutes from bile to blood and vice versa.<sup>40</sup> As a marker of blood-biliary barrier permeability, we used the ratio of melibiose/rhamnose biliary excretion, which sensitively increases during acute cholestasis.<sup>16</sup> Our present data indicate that the blood-biliary barrier becomes further impaired along with the increasing duration of cholestasis. Release of the bile duct obstruction is then associated with a progressive improvement in barrier permeability, which may reflect a decline in intrabiliary pressure.<sup>41</sup> The importance of the barrier contribution to the bile formation process was indicated by increased bile production in the BDO and the BDO-P1 groups, despite the slightly reduced secretion of bile acids, and by the same dynamics of change in bile production and blood-biliary barrier permeability (Fig. 3).

In summary, our data provide evidence that the administration of pravastatin to cholestatic rats downregulates the expression of regulatory nuclear factors FXR, CAR, and SREBP-2, and upregulates the LXR $\alpha$ , and the PPAR $\alpha$  receptors. The corresponding reduction in the expression of bile acids and cholesterol synthetic enzymes (Cyp7a1, Cyp8b1 and Hmg-CoA reductase), reduced LDLr for cholesterol liver uptake; reduced Acat2 for intracellular cholesterol sequestration; and increased Abca1 for reversed cholesterol transport back to plasma may be attributable to the ability of pravastatin to reduce the concentration of plasma bile acids and liver cholesterol levels during obstructive cholestasis.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Charles University (No. 122408); the Ministry of Education of the Czech Republic (No. MSM 0021620820); and the Ministry of Health of the Czech Republic (No. NS/9739-3/2008). We gratefully acknowledge the skillful technical assistance of Jitka Hajkova and Hana Lastuvkova.

## References

- 1 Trauner M, Wagner M, Fickert P, Zollner G. Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: clinical implications for understanding and treating cholestasis. *J. Clin. Gastroenterol.* 2005; **39**: S111–24.
- 2 Wagner M, Zollner G, Trauner M. New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *J. Hepatol.* 2009; **51**: 565–80.
- 3 Wagner M, Halilbasic E, Marchall HU *et al.* CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology* 2005; **42**: 420–30.
- 4 Kurihara T, Akimoto M, Abe K *et al.* Experimental use of pravastatin in patients with primary biliary cirrhosis associated with hypercholesterolemia. *Clin. Ther.* 1993; **15**: 890–8.



- 5 Ritzel U, Leonhardt U, Nather M, Schafer G, Armstrong VW, Ramadori G. Simvastatin in primary biliary cirrhosis: effects on serum lipids and distinct disease markers. *J. Hepatol.* 2002; **36**: 454–8.
- 6 Stojakovic T, Claudel T, Putz-Bankuti C et al. Low-dose atorvastatin improves dyslipidemia and vascular function in patients with primary biliary cirrhosis after one year of treatment. *Atherosclerosis* 2010; **209**: 178–83.
- 7 Awad AS, Kamel R. Effect of rosuvastatin on cholestasis-induced hepatic injury in rat livers. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2010; **24**: 89–94.
- 8 Demirbilek S, Tas E, Gurunluoglu K et al. Fluvastatin reduced liver injury in rat model of extrahepatic cholestasis. *Pediatr. Surg. Int.* 2007; **23**: 155–62.
- 9 Dold S, Laschke MW, Lavasani S, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Simvastatin protects against cholestasis-induced liver injury. *Br. J. Pharmacol.* 2009; **156**: 466–74.
- 10 Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *Br. J. Pharmacol.* 2009; **156**: 7–27.
- 11 Carrella M, Fong LG, Loguercio C, Del Piano C. Enhancement of fatty acid and cholesterol synthesis accompanied by enhanced biliary but not very-low-density lipoprotein lipid secretion following sustained pravastatin blockade of hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase in rat liver. *Metabolism* 1999; **48**: 618–26.
- 12 Kamiyako T, Ogawa H. Effects of pravastatin and bezafibrate on biliary lipid excretion and hepatic expression of Abcg5 and Abcg8 in the rat. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004; **19**: 879–83.
- 13 Takada Y, Tachizawa H, Kurihara H et al. Comparison of urinary excretion of pravastatin and temocapril in bile duct-ligated rats and Eisai hyperbilirubinemic rats (EHBR). *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 2004; **11**: 125–8.
- 14 Tnsbicka J, Hennesberg M, Odenthal M et al. Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* 2010; **53**: 702–12.
- 15 Brecakova E, Fukoa L, Cermanova J et al. Alteration of methotrexate biliary and renal elimination during extrahepatic and intrahepatic cholestasis in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2009; **32**: 1978–85.
- 16 Tomcik P, Sispera L, Rezacova M et al. Increased melibiose:raffinose ratio in bile of rats with acute cholestasis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008; **23**: 1934–40.
- 17 Geier A, Wagner M, Dietrich CG, Trauner M. Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 2007; **1773**: 283–308.
- 18 Hirano M, Maeda K, Hayashi H, Kusuhara H, Sugiyama Y. Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005; **314**: 876–82.
- 19 Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B et al. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 10046–50.
- 20 Kivisto KT, Griek O, Hofmann U et al. Disposition of oral and intravenous pravastatin in MRP2-deficient TR- rats. *Drug Metab. Dispos.* 2005; **33**: 1593–6.
- 21 Seo M, Inoue I, Ikeda M et al. Statins activate human PPARalpha promoter and increase PPARalpha mRNA expression and activation in HepG2 cells. *PPAR Res.* 2008; **2008**: ID316306:1–11.
- 22 Gill S, Chow R, Brown AJ. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog. Lipid Res.* 2008; **47**: 391–404.
- 23 Fujioka T, Nara F, Tsujita Y, Fukushima J, Fukami M, Kuroda M. The mechanism of lack of hypocholesterolemic effects of pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; **1254**: 7–12.
- 24 Joles J, Willekes-Koolschijn N, Koomans H et al. Subcutaneous administration of HMG-CoA reductase inhibitors in hyperlipidaemic and normal rats. *Lab. Anim.* 1992; **26**: 269–80.
- 25 Kosters A, Kunne C, Looije N, Patel SB, Oude Elferink RP, Groen AK. The mechanism of ABCG5/ABCG8 in biliary cholesterol secretion in mice. *J. Lipid Res.* 2006; **47**: 1959–66.
- 26 Langheim S, Yu L, von Ibergmann K et al. ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile. *J. Lipid Res.* 2005; **46**: 1732–8.
- 27 Wiersma H, Galli A, Nijstad N, Kuipers F, Tietje UJ. Hepatic SR-B1, not endothelial lipase, expression determines biliary cholesterol secretion in mice. *J. Lipid Res.* 2009; **50**: 1571–80.
- 28 Geuken E, Visser DS, Leuvenink HG et al. Hepatic expression of ABC transporters G5 and G8 does not correlate with biliary cholesterol secretion in liver transplant patients. *Hepatology* 2005; **42**: 1166–74.
- 29 Kosters A, Frijters RJ, Kunne C et al. Diogenin-induced biliary cholesterol secretion in mice requires Abcg8. *Hepatology* 2005; **41**: 141–50.
- 30 Kosters A, Frijters RJ, Schaap FG et al. Relation between hepatic expression of ATP-binding cassette transporters G5 and G8 and biliary cholesterol secretion in mice. *J. Hepatol.* 2003; **38**: 710–16.
- 31 Coy DJ, Wooten-Kee CR, Yan B et al. ABCG5/ABCG8-independent biliary cholesterol excretion in lactating rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2010; **299**: G228–35.
- 32 Oude Elferink RP, Paulusma CC, Groen AK. Hepatocanalicular transport defects: pathophysiologic mechanisms of rare diseases. *Gastroenterology* 2006; **130**: 908–25.
- 33 McIntyre N, Harry DS, Pearson AJ. The hypercholesterolaemia of obstructive jaundice. *Gut* 1975; **16**: 379–91.
- 34 Campbell KM, Sabla GE, Bezerra JA. Transcriptional reprogramming in murine liver defines the physiologic consequences of biliary obstruction. *J. Hepatol.* 2004; **40**: 14–23.
- 35 Kamisako T, Ogawa H. Effect of bile duct obstruction on the expression of intestinal mRNA related to cholesterol and bile acid metabolism in the rat. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2007; **22**: 125–31.
- 36 Bravo I, Amigo L, Cohen DE et al. Role of plasma and liver cholesterol- and lipoprotein-metabolism determinants in LpX formation in the mouse. *Biochim. Biophys. Acta* 2007; **1770**: 979–88.
- 37 Kojima T, Yamamoto T, Murata M, Chiba H, Kokai Y, Sawada N. Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes. *Med. Electron Microsc.* 2003; **36**: 157–64.
- 38 Maly IP, Landmann L. Bile duct ligation in the rat causes upregulation of ZO-2 and decreased colocalization of claudins with ZO-1 and occludin. *Histochem. Cell Biol.* 2008; **129**: 289–99.
- 39 Takakuwa Y, Kokai Y, Sasaki K et al. Bile canalicular barrier function and expression of tight-junctional molecules in rat hepatocytes during common bile duct ligation. *Cell Tissue Res.* 2002; **307**: 181–9.
- 40 Zhang M, Wang XQ, Zhou YK et al. Effects of oral *Lactobacillus plantarum* on hepatocyte tight junction structure and function in rats with obstructive jaundice. *Mol. Biol. Rep.* 2010; **37**: 2989–99.
- 41 Chen CY, Shieh SC, Wu MC, Lin XZ. The effects of bile duct obstruction on the biliary secretion of ciprofloxacin in piglets. *Am. J. Gastroenterol.* 1999; **94**: 2408–11.

## **PŘÍLOHA II**

KOLOUCHOVA, G. – BRČAKOVA, E. – HIRSOVA, P. – CERMANOVA, J. – FUKSA, L. – MOKRY, J. – NACHTIGAL, P. – LASTUVKOVA, H. – MICUDA, S. Modification of hepatic iron metabolism induced by pravastatin during obstructive cholestasis in rats. *Life Sciences*, 2011.





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lifescie](http://www.elsevier.com/locate/lifescie)

## Modification of hepatic iron metabolism induced by pravastatin during obstructive cholestasis in rats

Gabriela Kolouchova<sup>a</sup>, Eva Brackova<sup>a,c</sup>, Petra Hirsova<sup>a</sup>, Jolana Cermanova<sup>a</sup>, Leos Fuksa<sup>a</sup>, Jaroslav Mokry<sup>b</sup>, Petr Nachtigal<sup>c</sup>, Hana Lastuvkova<sup>a</sup>, Stanislav Micuda<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Histology and Embryology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Biological and Medical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 March 2011

Accepted 12 August 2011

Available online xxx x

#### Keywords:

Pravastatin

Cholestasis

Iron

Hepcidin

Ferroportin 1

### ABSTRACT

**Aims:** To evaluate iron biochemistry and contributing liver mechanisms during obstructive cholestasis and pravastatin treatment in rats.

**Main methods:** A rat model of cholestasis induced by bile duct ligation (BDL) was used for the study. The detection of iron and the expression of relevant molecules were performed one week after surgery in the control and cholestatic animals after treatment with either saline or pravastatin (1 mg/kg/day).

**Key findings:** Saline-administered BDL rats showed, in comparison to sham-operated animals, a significant increase in plasma iron concentration, increased liver protein content of heme oxygenase-1 (HO-1) and a decline in the expression of hepcidin. Ferroportin 1 expression was increased with a simultaneous reduction in intrahepatic iron concentration. The administration of pravastatin to BDL animals attenuated proliferation changes in liver parenchyma, prevented HO-1 induction, restored hepatic mRNA hepcidin expression to control levels and induced the expression of ferritin, transferrin receptors (TFR1/2) and divalent metal transporter-1. This was accompanied by an increased content of intrahepatic iron when compared to the BDL animals, and a reduction of hyperbilirubinemia.

**Significance:** Cholestasis-induced increase in plasma and decrease in hepatic iron levels were associated with up-regulation of liver HO-1 and ferroportin 1. Pravastatin alleviated cholestatic liver impairment and raised liver iron content by modulation of heme catabolism and an increase of hepatic iron uptake and storage capacity.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Iron plays a key role in essential biological functions including oxygen transport, mitochondrial energy metabolism and deoxyribonucleotide synthesis. The principal tissue that regulates iron turnover in the body is the liver, specifically hepatocytes (Munoz et al., 2009), which express several executive and regulatory molecules. First, the iron is taken up by hepatocytes, mainly as a complex with transferrin via specific receptors TFR1 and TFR2 (transferrin receptor 1 and 2). Intracellular iron is then stored in the cytosol as ferritin, the main iron storage protein responsible for the maintenance of cellular free iron balance. Ferritin provides a source of iron for synthetic reactions, but also serves as a defence mechanism against free radical formation by binding free iron that is not needed for immediate metabolic use (Barbeito et al., 2009). The export of iron from hepatocytes mediates ferroportin 1, which is sensitively regulated by hepcidin (Yeh et al., 2004). Hepcidin is secreted into the

blood exclusively from hepatocytes in response to increased liver iron levels or inflammation (De Domenico et al., 2007). The binding of hepcidin to ferroportin 1 results in the internalisation of ferroportin 1 and the loss of its function. Consequently, iron absorption through enterocytes, and iron release from hepatocytes and macrophages, is reduced (Papanikolaou and Pantopoulos, 2005).

In contrast to the exceptional contribution of iron to physiological functions, an excess of free iron may induce toxicity, based on its ability to catalyse the generation of free radicals which attack cellular macromolecules and promote tissue injury (Galaris and Pantopoulos, 2008). Recently, the alteration of iron homeostasis was demonstrated during obstructive cholestasis (Peretz, et al., 2006), a status which typically imposes liver injury through the generation of free radicals (Aksu et al., 2010). Although the impact on hepatic executive molecules is still unknown, Huang et al. (2009) have demonstrated that the accumulation of bile acids during cholestasis down-regulates hepcidin expression in the liver through the inhibition of IL-6-induced STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) phosphorylation. Moreover, the reduction of hepatic iron concentration by phlebotomy, performed after bile duct ligation in rats, has been shown to attenuate cholestatic liver damage (Peretz et al., 2006). Taken together, an understanding of iron

\* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Simkova 870, 500 38 Hradec Kralove, Czech Republic. Tel.: +420 495816313; fax: +420 495513022.

E-mail address: micuda@fihk.cuni.cz (S. Micuda).



homeostasis in rats with common bile duct ligation may unveil another mechanism, which could be modulated in order to alleviate liver injury caused by extrahepatic cholestasis.

The aim of this study was to evaluate pathway changes involved in iron liver processing during obstructive cholestasis in rats. In addition, pravastatin was administered to separate groups of cholestatic animals. The rationale was that statins – HMG-CoA reductase inhibitors – repeatedly demonstrated a protective anti-inflammatory and anti-oxidative influence during cholestatic liver injury (Awad and Kamel, 2010; Demirebilek et al., 2007; Dold et al., 2009; Trebicka et al., 2010). Part of this effect is ascribed to their ability to modulate heme oxygenase-1, the rate-limiting enzyme for heme degradation and free iron release (Muchova et al., 2007; Peterson et al., 2009). However, the modification of iron liver processing during cholestasis by any statin is unknown.

## Materials and methods

### Materials

Pravastatin sodium was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Primary rabbit and mouse polyclonal antibodies were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and from Abcam (Cambridge, MA, USA). As the loading control for Western blot, rabbit polyclonal  $\beta$ -actin antibody was purchased from Genetec (Prague, Czech Republic). Horseradish peroxidase-linked sheep anti-mouse and donkey anti-rabbit immunoglobulin G were purchased from GE Healthcare (Prague, Czech Republic). All other reagents and supplies were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA), respectively, and were of the highest purity available.

### Animals

Male Wistar rats (Velaz, Czech Republic) with an initial weight of 260–290 g were used throughout the study. The animals were housed under controlled environmental conditions (12-hour light–dark cycle; temperature  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) with commercial food and water freely available. All experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (NIH publication, 1996) and under the supervision of the Ethical Committee of the Faculty of Medicine in Hradec Kralove.

The rats were divided into three groups ( $n=6$  in each group): Group 1, control rats (Sh, sham-operated treated with saline); Group 2, bile duct-ligated rats treated with saline (BDL); and Group 3, bile duct-ligated rats with 1 mg/kg b.w. pravastatin treatment (BDL-P1). Chronic cholestasis was induced by bile duct ligation (BDL) over a seven day period. Briefly, in rats under general anaesthesia (pentobarbital sodium 50 mg/kg b.w. i.p.), the abdominal cavity was opened and the common bile duct was exposed and ligated. The BDL-P1 group received 1 mg/kg b.w. of pravastatin i.p. once daily throughout the period, starting with the first dose 2 h after surgery. The control rats were sham-operated, in that the bile duct was only manipulated and left unobstructed. Seven days after surgery, the animals were exsanguinated under anaesthesia induced by pentobarbital (50 mg/kg b.w.) and organs for subsequent evaluation of expression, together with plasma samples, were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis.

### Analytical procedures

The concentrations of bilirubin and iron in plasma and the activity of ALT (alanine aminotransferase) in plasma were measured on Cobas Integra® 800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. The total bile acid concentration in plasma was determined using an analytical commercial kit from

PLIVA-Lachema with a UV–VIS spectrophotometer PharmaSpec UV-1700 (Schimadzu, Japan). The iron content in the liver was also measured. Samples were dried and, after a cooling period, they were weighted and digested by microwave digestion with nitric acid and hydrogen peroxide. The iron content was determined using graphite furnace atomic absorption spectrometry (Unicam, Solaar 959, U.K.).

### Western blot

The livers or spleens (200 mg) were minced in an ice-cold buffer (1 ml) (25 mM TRIS.HCl (pH = 7.6), 0.1% (w/w) TRITON-X), containing 0.5  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin and 50  $\mu\text{g/ml}$  benzamide and were homogenised with MagNA Lyser (Roche Diagnostics GmbH, Germany)  $2 \times 30$  s at 6000 rpm. Supernatants were obtained after a 10,000 g centrifugation at  $4^\circ\text{C}$  for 10 min. Plasma was applied for the assessment of transferrin expression. Nuclear fraction for the assessment of pSTAT3 expression was obtained by homogenisation of liver (200 mg) in an ice-cold Ripa buffer (1 ml) containing protease inhibitors. Pellets obtained after the first centrifugation ( $4^\circ\text{C}$ , 10 min, 1000 g) were re-suspended in a buffer containing 50 mM HEPES (pH = 7.4), 0.1 M KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 10% glycerol and protease inhibitors. Supernatants were obtained after a 17,000 g centrifugation at  $4^\circ\text{C}$  for 20 min. The protein concentration was determined with a BCA assay (Pierce, Rockford, IL, USA) and samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Homogenates (100  $\mu\text{g}$  of proteins) were separated by SDS-PAGE on 6.25% (for transferrin), 7.5% (for TIR1/2, DMT-1), 10% (for HO-1, PCNA – Proliferating cell nuclear antigen,  $\alpha$ SMA – alpha-smooth muscle actin, hepcidin, ferritin and IL-6) and 15% (for TGF- $\beta$ ) polyacrylamide gels. After the proteins were transferred to a PVDF membrane (GE Healthcare, Prague, Czech Republic), it was blocked for 1 h with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST). The membrane was then incubated with primary antibodies for 1 h at the following concentrations: transferrin, ferroportin 1, pSTAT3, HO-1, PCNA,  $\alpha$ SMA, IL-6, ferritin, hepcidin, TIR1, TIR2, DMT-1 and TGF- $\beta$  at 1:10000, 1:1000, 1:1000, 1:1000, 1:5000, 1:1000, 1:2000, 1:1000, 1:1000, 1:1000, 1:1000 and 1:500, respectively. It was washed four times with TBST, and incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated secondary antibody at the following concentrations: transferrin, ferroportin 1, pSTAT3, HO-1, PCNA,  $\alpha$ SMA, IL-6, ferritin, hepcidin, TIR1, TIR2, DMT-1 and TGF- $\beta$  at 1:10000, 1:2000, 1:2000, 1:3000, 1:8000, 1:2500, 1:4000, 1:2000, 1:2000, 1:2000, 1:2000 and 1:1000, respectively. After washing the membrane four times with the TBST buffer, a chemiluminescence process and the quantification of immunoreactive bands on the exposed films were carried out as described previously (Brckova et al., 2009). The equal loading of proteins onto the gel was confirmed by the immunodetection of  $\beta$ -actin.

### Real-time quantitative RT-PCR

The examination of gene expression was performed by qRT-PCR as described previously (Brckova et al., 2009) on 7500 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). RNA was isolated from liver tissue samples using TRIzol reagent (Invitrogen, USA) and converted into cDNA via a High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). 30 ng of cDNA was loaded into reaction performed in triplicate. The amplifications were run using TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix and pre-designed TaqMan® Gene Expression Assay kits for the following genes: ferritin (Rn00821071\_ml), ferroportin 1 (Rn00391197\_ml), Transferrin receptor 1 (Rn01474701\_ml), Transferrin receptor 2 (Rn01481694\_ml), Divalent metal transporter-1 (DMT-1, Rn00565927\_ml) and hepcidin (Rn00584987\_ml). All were provided by Applied Biosystems (Foster City, USA). The time–temperature profile used in the 'fast' mode was as follows:  $95^\circ\text{C}$  for 3 min; 40 times:  $95^\circ\text{C}$  for 7 s,  $60^\circ\text{C}$  for 25 s. For normalisation, two reference genes were selected using the geNorm according to (Vandesompele et al., 2002), Gapdh (4352338E, Applied



Biosystems, Foster City, USA), and Ywhaz (rYwhaz\_Q1, GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Kralove, CR). Briefly, the expression of data was normalised by the geometric mean of Gapdh and Ywhaz expressions. Finally, the relative expression between control and affected groups was determined by the comparison of normalised data.

#### Liver histology

Livers were collected immediately after death and fixed in 10% neutral buffered formalin. To evaluate microscopic changes within the rat livers, light microscopy of hematoxylin–eosin stained liver sections was performed as described previously (Micuda et al., 2007).

#### Statistical analysis

Experiments were carried out on six animals per group. All experimental data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Differences between experimental and control values were assessed by one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test or the unpaired t-test using GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, California). A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

### Results

#### Real-time quantitative RT-PCR

The mRNA levels of all evaluated genes in the liver are shown in Fig. 1. In the BDL group, there was a significant increase in the

expression of ferroportin 1 to 180% and a decrease in hepcidin expression to 37% as compared with the control group. The treatment with pravastatin caused a restoration of hepcidin expression, and significant elevation in ferroportin 1 (to 650%), ferritin (to 180%), TfR1 (to 330%), TfR2 (to 170%), and DMT-1 (to 1500%) expression in the liver compared with the control group.

#### Western blot

Liver protein expression of ferritin, TfR1, TfR2, and DMT-1 was unchanged by cholestasis but increased in BDL-pravastatin animals when compared with BDL group (Fig. 2). Ferroportin 1 protein expression was increased by cholestasis but slightly decreased in treated BDL-P1 animals (Fig. 2b). The nuclear expression of pSTAT3 was increased in pravastatin-treated BDL animals compared to the untreated BDL group (Fig. 2e). Furthermore, we detected increased protein levels of PCNA, IL-6,  $\alpha$ SMA, and HO-1 in the BDL liver (Fig. 3). The administration of pravastatin to the BDL animals attenuated induction of these molecules. The increased HO-1 protein content during cholestasis and its reduction in pravastatin-treated BDL rats was also confirmed in the spleen (Fig. 3f). The expression of TGF- $\beta$  was not altered in the experimental groups as compared to the sham-operated animals (Fig. 3d).

#### Iron biochemistry

Iron plasma concentrations and transferrin saturations were increased in the BDL animals (Fig. 4a, b). The administration of

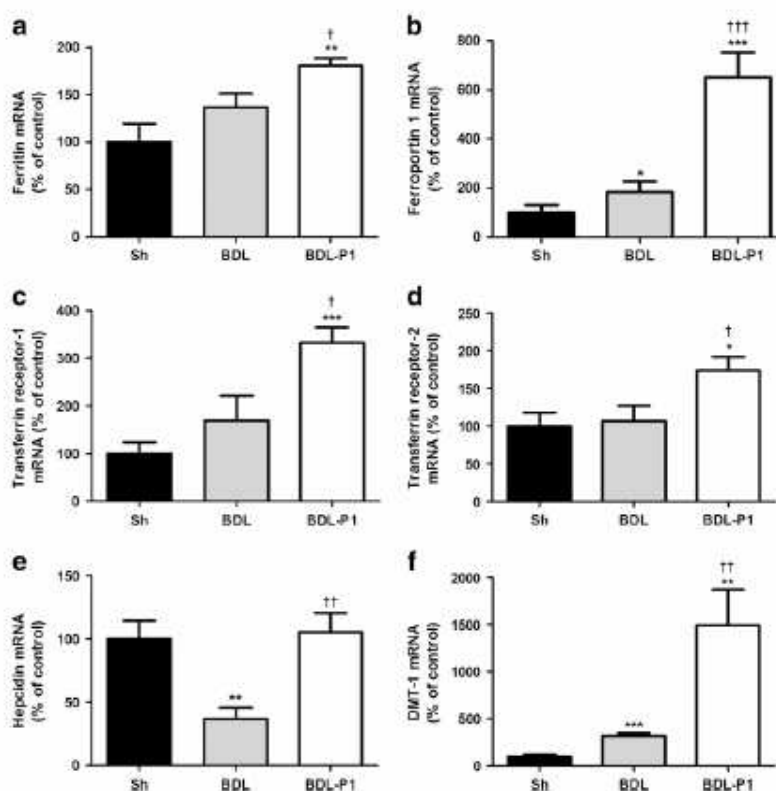
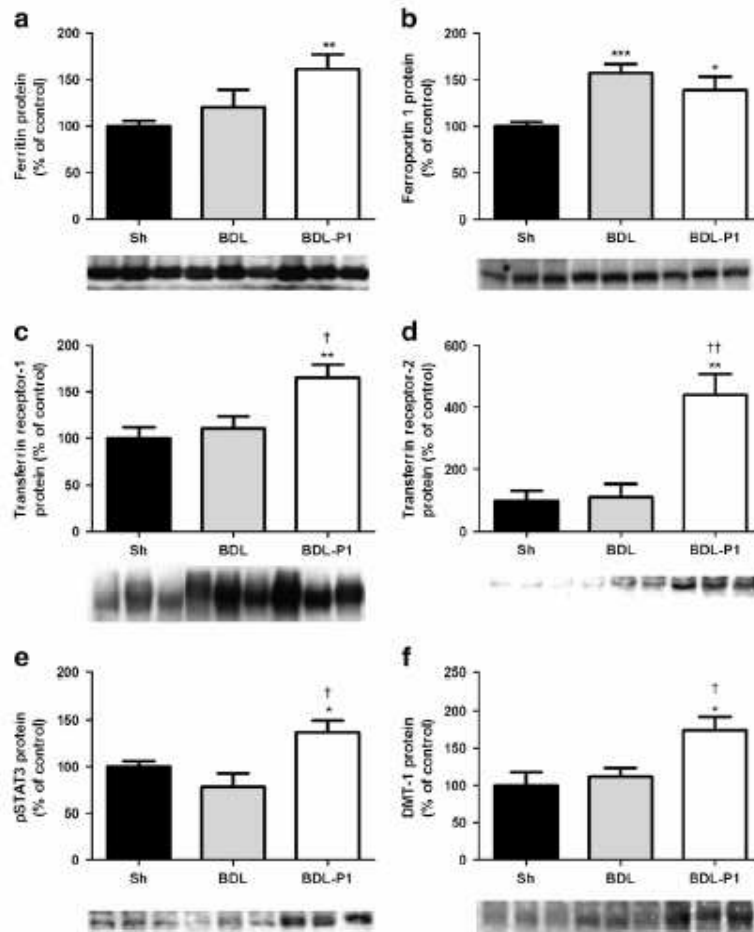


Fig. 1. mRNA expression of genes involved in iron homeostasis determined by qRT-PCR as described in Methods. Sh, sham-operated; BDL, bile duct-ligated; BDL-P1, bile duct-ligated with 1 mg/kg pravastatin treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ , in each group). Significantly different from control value (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). Significantly different from BDL value († $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , ††† $P < 0.001$ ).



**Fig. 2.** Protein expression of ferritin (a), ferroportin 1 (b), TIR-1 (c), TIR-2 (d), pSTAT3 (in the nuclear fraction) (e), and DMT-1 (f) in the liver determined by Western blot as described in the methods section. Sh, sham-operated; BDL, bile duct-ligated; BDL-P1, bile duct-ligated with 1 mg/kg pravastatin treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 6, in each group). Significantly different from control value (\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001). Significantly different from BDL value († $P$  < 0.05, †† $P$  < 0.01).

pravastatin to cholestatic rats did not influence these changes but increased total iron-binding capacity (Fig. 4c). Importantly, while hepcidin liver production and plasma levels were reduced in BDL rats, pravastatin administration led to increased hepcidin plasma levels in cholestatic animals (Fig. 4e, f). Hepatic iron concentration was decreased in the BDL animals when compared with the sham-operated rats, and pravastatin prevented this reduction (Fig. 5a). When the liver iron concentration was recalculated to liver weight, the whole liver content of iron still showed a tendency towards reduction in the BDL animals (Fig. 5b). Pravastatin raised the whole liver iron content above control, and untreated BDL values.

#### Biochemical parameters

The influence of cholestasis and pravastatin administration on liver function, as evaluated by serum biochemical tests, is summarised in Table 1. The BDL in untreated animals caused an elevation in serum concentrations of bilirubin, conjugated bilirubin, and ALT when compared to the sham-operated group. The administration of pravastatin to BDL animals resulted in a decrease of conjugated and total bilirubin plasma concentrations as compared with the BDL

group. Increased total bile acid concentration in plasma due to bile duct ligation was alleviated with pravastatin treatment.

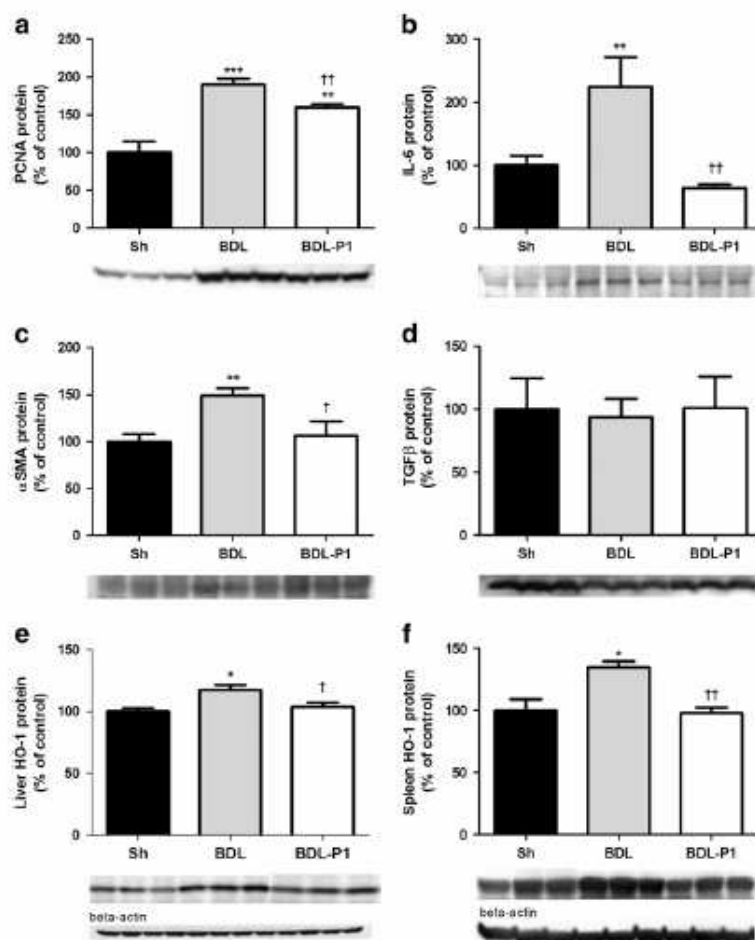
#### Liver histology

Histology revealed normal liver architecture after the sham operation in rats (Fig. 6). Bile duct ligation produced a significant proliferation of bile ducts with enlarged periportal areas, the distension of bile ducts, incipient fibrotic changes and occasional fatty degeneration of hepatocytes in periportal regions. Pravastatin administration attenuated cholestatic proliferation changes in liver parenchyma, as also documented by reduced PCNA expression (Fig. 3a).

#### Discussion

The results of this study demonstrate for the first time that obstructive cholestasis in rats increases liver expression of ferroportin 1 and the plasma concentration of iron, and decreases the concentration of iron in the liver with a tendency for reduction of overall hepatic iron content. The administration of pravastatin to BDL animals attenuated the morphological and biochemical hallmarks of cholestatic liver injury. The iron content in the liver was increased by





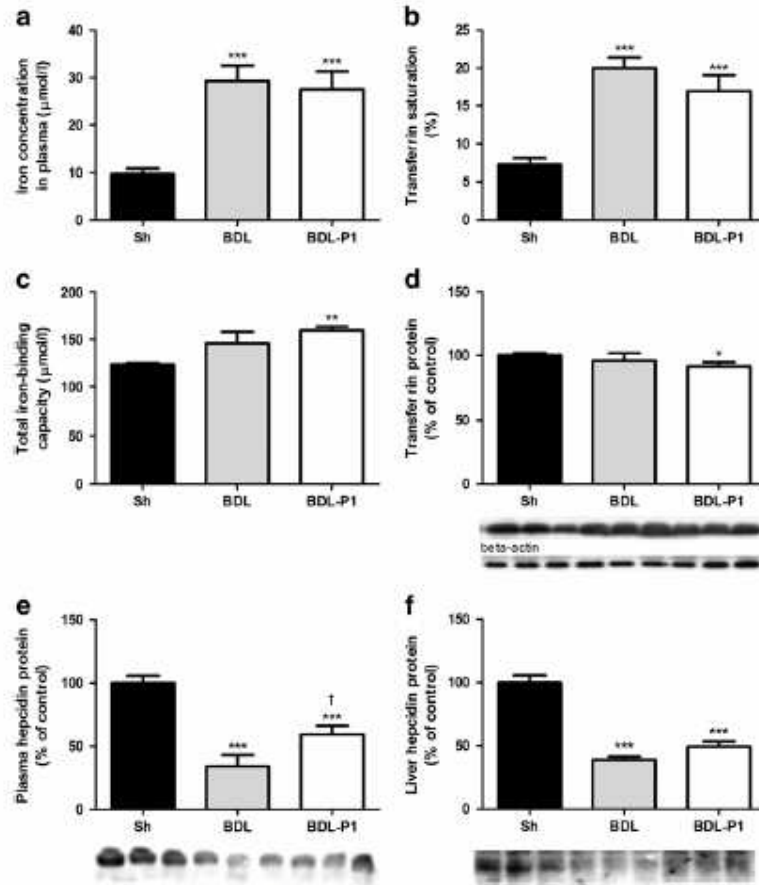
**Fig. 3.** Protein expression of PCNA (a), IL-6 (b),  $\alpha$ SMA (c), TGF $\beta$  (d), HO-1 (e) in the liver and HO-1 in the spleen (f) determined by Western blot as described in the methods section. Sh, sham-operated; BDL, bile duct-ligated; BDL-P1, bile duct-ligated with 1 mg/kg pravastatin treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 6, in each group). Significantly different from control value (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001). Significantly different from BDL value (†P < 0.05, ††P < 0.01).

pravastatin administration to cholestatic animals, together with the up-regulation of molecules responsible for hepatic iron uptake (TFR1, TFR2 and DMF-1), storage (ferritin), export (ferroportin 1) and regulation (hepcidin). Modulation of HO-1 expression by pravastatin was associated with the reduction of cholestatic hyperbilirubinemia.

Cholestasis causes serious hepatic distress by a combination of direct toxicity of accumulating bile constituents, mainly bile acids, and the activation of inflammation. Iron may be involved in these reactions because of its contribution to the production of free radicals with consequent liver cell damage and cirrhosis (Arezzini et al., 2003; Galaris and Pantopoulos, 2008; Pietrangelo, 1996). However, data about the intrahepatic content of iron in obstructive cholestasis are inconclusive. Histological measurements by ferrocyanide stain showed increased stainable iron in BDL livers and the sequestration of iron, mainly in Kupfer cells (Huang et al., 2009). Other reports fail to demonstrate differences due to the highly variable results (Peretz et al., 2006). Our values were obtained by precise atomic absorption spectrometry and showed the decreased hepatic concentration of iron, as well as a tendency toward the reduction of overall liver iron content in BDL animals. Although there may be multiple reasons for these discrepancies, such as rat strain factors, dietary differences, and

variability in proliferative response in the liver, our data comply with the profound reduction in hepatic stainable iron seen in patients with PBC and biliary atresia (Huang et al., 2006). Moreover, these findings also correspond with the reduction in hepatic expression of the main iron regulatory molecule, hepcidin, which was also previously reported in rats and humans with obstructive cholestasis (Huang et al., 2009).

The secretion of hepcidin is triggered by multiple factors, including inflammation through the IL-6-Gp130-STAT3 regulatory pathway and increased liver iron concentration (Munoz et al., 2009; Pietrangelo, 2011). Although the secretion of IL-6 is increased during obstructive cholestasis, the expression of hepcidin is down-regulated. Huang et al. (2009) explained this contradiction in terms of the inhibitory influence of cumulating hydrophobic bile acids on the phosphorylation of regulatory STAT3 kinase, with a reduction in hepcidin transcription. We reproduced this mechanism. The predicted increase in ferroportin 1 expression was indeed verified for the first time in our study. Together with unchanged expression of uptake TR1/2 this may explain the reduction of hepatic iron concentrations in our BDL animals. Because hepcidin is a negative regulator, not only of iron release from hepatocytes and macrophage but particularly of iron absorption from the duodenum

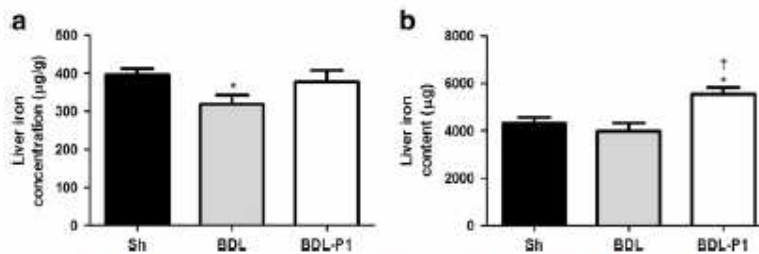


**Fig. 4.** Plasma iron concentration (a), transferrin saturation (b), total iron-binding capacity (c), plasma transferrin (d), and hepcidin (e) levels, and liver hepcidin protein content (f) in control and BDL animals. Sh, sham-operated; BDL, bile duct-ligated; BDL-P1, bile duct-ligated with 1 mg/kg pravastatin treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 6, in each group). Significantly different from control value (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001). Significantly different from BDL value ( $\dagger$ P < 0.05).

(Papanikolaou and Pantopoulos, 2005), the down-regulation of hepcidin may increase iron absorption during cholestasis. This hypothesis supports the observed marked increase of plasma iron concentration. In agreement, the increased duodenal expression of transporters mediating iron absorption, DMT-1 and ferroportin 1, was observed in cirrhosis (Stuart et al., 2004). Nevertheless, this eventuality necessitates further elucidation.

The attenuation of cholestatic liver injury by statins has been demonstrated for several members of the group, and is currently ascribed

to the ability of these agents to mitigate inflammatory and fibrotic responses in the liver (Awad and Kamel, 2010; Demirbilek et al., 2007; Dold et al., 2009; Trebicka et al., 2010). Our results in terms of improved morphological and biochemical responses, together with decreased  $\alpha$ -SMA and PCNA levels, also confirm this mechanism for pravastatin for the first time, and provide the preclinical evidence for the formerly seen positive effect of pravastatin in patients with primary biliary cirrhosis (Kurihara et al., 1993). Importantly, pravastatin in this study renders such improvements within the dose of



**Fig. 5.** Liver iron concentration (a) and content (b). Sh, sham-operated; BDL, bile duct-ligated; BDL-P1, bile duct-ligated with 1 mg/kg pravastatin treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 6, in each group). Significantly different from control value (\*P < 0.05). Significantly different from BDL value ( $\dagger$ P < 0.05).

Please cite this article as: Kolouchova G, et al, Modification of hepatic iron metabolism induced by pravastatin during obstructive cholestasis in rats, Life Sci (2011), doi:10.1016/j.lfs.2011.08.014



**Table 1**

Serum liver biochemical tests in sham-operated and bile duct-ligated rats with and without pravastatin treatment.

	Sh	BDL	BDL-P1
Total bilirubin ( $\mu\text{mol/l}$ )	$3.0 \pm 0$	$32 \pm 2.4^{**}$	$22 \pm 2.8^{*†}$
Conjugated bilirubin ( $\mu\text{mol/l}$ )	$2.0 \pm 0$	$17 \pm 2.9^{**}$	$8.0 \pm 2.3^{*†}$
ALT ( $\mu\text{kat/l}$ )	$0.6 \pm 0.03$	$1.2 \pm 0.2^{**}$	$2.9 \pm 1.1$
Plasma TBA ( $\mu\text{mol/l}$ )	$7.5 \pm 1.0$	$19 \pm 1.7^{**}$	$11 \pm 2.2^{†}$

Values are means  $\pm$  SEM (n=6 in each group). Sh, sham-operated; BDL, bile duct ligated; BDL-P1, bile duct-ligated with 1 mg/kg pravastatin treatment.

Significantly different from control value ( $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ).

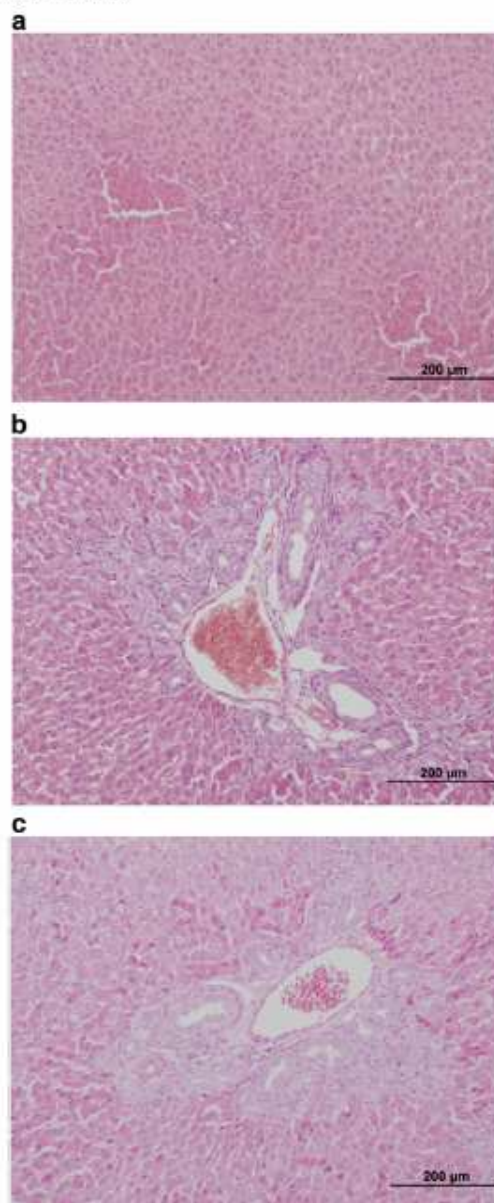
Significantly different from BDL value ( $^{†}P < 0.05$ ).

1 mg/kg, which corresponds with the maximum recommended dose in humans.

Pravastatin increased overall liver iron content in cholestatic animals which corresponded to marked up-regulation of DMT-1 and TR1/2 receptors despite a modest increase in ferroportin 1 protein. Although the attenuation of liver injury and the prolongation of survival in cholestatic rats can be attained by the reduction of iron load (Otogawa et al., 2008; Peretz et al., 2006), our results suggest a more complex mechanism of pravastatin influence on iron liver homeostasis. Firstly, pravastatin mitigates an inflammatory response, as documented by a decrease in IL-6 expression and restoration of hepcidin expression through the reduction of bile acid concentration and consequently increased phosphorylation of regulatory STAT3. The association of the protective effect of pravastatin with these pleiotropic (non lipid-lowering) mechanisms also indirectly suggests the absence of change in any parameter measured in the study with pravastatin-treated control animals (unpublished observation). Secondly, pravastatin prevented induction of HO-1, the rate-limiting enzyme for iron release from heme and bilirubin synthesis. In agreement, bilirubin concentrations were reduced in pravastatin-treated BDL animals. The positive consequence of HO-1 suppression during cholestasis comes from the recently-reported reduction of hepatic injuries and mortality in BDL animals after the inhibition of HO-1 (Scheingraber et al., 2009). Furthermore, Froh et al. (2007) pointed out that hepatic enzyme release,  $\alpha$ SMA and TGF- $\beta$  production and histopathological worsening were all accentuated in rats with bile duct ligation receiving cobalt protoporphyrin, a HO-1 inducer. Finally, pravastatin may in fact reduce free iron intrahepatic concentration as a result of its sequestration to up-regulated ferritin. This mechanism may be supported by a simultaneous increase in the expression of TR1 and DMT-1, which are typically up-regulated through cytosolic IRP1 (iron response protein 1) in the absence of iron (Munoz et al., 2009). IRP1 may also be a cause of discrepancy between ferroportin 1 mRNA and protein expression. While ferroportin 1 protein is directly inactivated by raising hepcidin in BDL-pravastatin group, its mRNA expression may be stimulated by IRP1 as exemplified in enterocytes (Munoz et al., 2009). Further clarification is necessary, however, because under physiological circumstances the iron transporters and ferritin are inversely regulated by IRPs. Nevertheless, the possibility of the direct interaction of drugs with response elements for IRP has been recently reported for some agents (Canzoneri and Oyeler, 2008).

## Conclusions

We have demonstrated a significant increase in plasma iron concentration after bile duct ligation in rats. This was accompanied by the up-regulation of hepatic exporting ferroportin 1 and the reduction of hepatic iron concentration. The observed protective effect of pravastatin on inflammatory, biochemical and histological markers of cholestatic liver injury was associated with modulation of heme catabolism and increased sequestration of iron in the liver in a metabolically inactive form by binding to ferritin.



**Fig. 6.** BDL-induced histological changes in the livers seven days after surgery. Sham-operated animals showed physiological liver architecture, while cholestasis induced periportal bile duct proliferation and sporadic hepatocellular degeneration. Pravastatin reduced the intensity of proliferation. a, sham-operated; b, bile duct-ligated; c, bile duct-ligated with 1 mg/kg pravastatin treatment.

## Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from Charles University no. 122408 and no. SVV-2011-262901, and the Ministry of Education of the Czech Republic no. MSM 0021620820.

Please cite this article as: Kolouchova G, et al. Modification of hepatic iron metabolism induced by pravastatin during obstructive cholestasis in rats. *Life Sci* (2011), doi:10.1016/j.lfs.2011.08.014

## References

- Aksu B, Umit H, Kanter M, Guzel A, Aktas C, Givlek S, et al. Effects of methylene blue in reducing cholestatic oxidative stress and hepatic damage after bile duct ligation in rats. *Acta Histochem* 2010;112:259–69.
- Arezzini B, Lunghi B, Lungarella G, Gardi C. Iron overload enhances the development of experimental liver cirrhosis in mice. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:486–95.
- Awad AS, Kamel R. Effect of rosuvastatin on cholestasis-induced hepatic injury in rat livers. *J Biochem Mol Toxicol* 2010;24:89–94.
- Barbeito AC, Garringer HJ, Baraihar MA, Gao X, Arredondo M, Nunez MT, et al. Abnormal iron metabolism and oxidative stress in mice expressing a mutant form of the ferritin light polypeptide gene. *J Neurochem* 2009;109:1067–78.
- Brckova E, Fuksa L, Cermanova J, Kolouchova G, Hroch M, Hirsova P, et al. Alteration of methotrexate biliary and renal elimination during extrahepatic and intrahepatic cholestasis in rats. *Biol Pharm Bull* 2009;32:1978–85.
- Campaneri JC, Oyeleke AK. Interaction of anthracyclines with iron responsive element mRNAs. *Nucleic Acids Res* 2008;36:6825–34.
- De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin regulation: ironing out the details. *J Clin Invest* 2007;117:1755–8.
- Demirbilek S, Tas E, Gur unluoglu K, Akin M, Aksoy RT, Emre MH, et al. Fluvastatin reduced liver injury in rat model of extrahepatic cholestasis. *Pediatr Surg Int* 2007;23:155–62.
- Dold S, Laschke MW, Lavasani S, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Simvastatin protects against cholestasis-induced liver injury. *Br J Pharmacol* 2009;156:466–74.
- Froh M, Conzelmann I, Walbrun P, Netter S, Wiest R, Wheeler MD, et al. Heme oxygenase-1 overexpression increases liver injury after bile duct ligation in rats. *World J Gastroenterol* 2007;13:3478–86.
- Galaris D, Pantopoulos K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008;45:1–23.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources. National Academy Press, Washington, D.C., 1996.
- Huang YH, Chuang JH, Yang YL, Huang CC, Wu CL, Chen CL. Cholestasis downregulate hepcidin expression through inhibiting IL-6-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Lab Invest* 2009;89:1128–39.
- Huang YH, Yu-Hsieh H, Huang CC, Shin-Mu VT, Tai MH, Chen CL, et al. Liver hepcidin and stainable iron expression in biliary atresia. *Pediatr Res* 2006;59:662–6.
- Kurihara T, Aki moto M, Abe K, Ishiguro H, Niimi A, Maeda A, et al. Experimental use of pravastatin in patients with primary biliary cirrhosis associated with hypercholesterolemia. *Clin Ther* 1993;15:890–8.
- Micuda S, Fuksa L, Mundlova L, Osterreicher J, Mokry J, Cermanova J, et al. Morphological and functional changes in p-glycoprotein during dexamethasone-induced hepatomegaly. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:296–303.
- Muchova L, Wong RJ, Hsu M, Morioka I, Vittek L, Zelenka J, et al. Statin treatment increases formation of carbon monoxide and bilirubin in mice: a novel mechanism of in vivo antioxidant protection. *Can J Physiol Pharmacol* 2007;85:800–10.
- Munoz M, Villar I, Garcia-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* 2009;15:4617–26.
- Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, et al. Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;294:R311–20.
- Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;202:199–211.
- Peretz G, Link G, Pappo O, Bruck R, Ackerman Z. Effect of hepatic iron concentration reduction on hepatic fibrosis and damage in rats with cholestatic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:240–5.
- Peterson SJ, Frishman WH, Abraham NG. Targeting heme oxygenase: therapeutic implications for diseases of the cardiovascular system. *Cardiol Rev* 2009;17:99–111.
- Pietrangelo A. Hepcidin in human iron disorders: therapeutic implications. *J Hepatol* 2011;54:173–81.
- Pietrangelo A. Metab, oxidative stress, and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1996;16:13–30.
- Scheingraher S, Bauer M, Bauer I, Bardens D, Abel K, Horn AK, et al. Inhibition of hemoxygenase-1 improves survival after liver resection in jaundiced rats. *Eur Surg Res* 2009;42:157–67.
- Stuart KA, Anderson CJ, Frazer DM, Murphy TL, Powell LW, Fletcher LM, et al. Increased duodenal expression of divalent metal transporter 1 and iron-regulated gene 1 in cirrhosis. *Hepatology* 2004;39:482–9.
- Trebicka J, Hennenberg M, Odenthal M, Shiv K, Klein S, Granzow M, et al. Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2010;53:702–12.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poyppe B, Van Roy N, De Paeppe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
- Yeh KY, Yeh M, Glass J. Hepcidin regulation of ferroportin 1 expression in the liver and intestine of the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G385–94.