

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



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

Gabriela Karlasová (roz. Kolouchová)

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program: Lékařská farmakologie

Hradec Králové

2011

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

Autor: Mgr. Gabriela Kolouchová
Ústav farmakologie
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova v Praze

Školitel: Doc. MUDr. Stanislav Mičuda, Ph.D.
Ústav farmakologie
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova v Praze

Oponenti: Doc. MUDr. Ondřej Slanař, Ph.D.
Přednosta
Farmakologický ústav
1. Lékařská fakulta UK v Praze
Albertov 4
128 00 Praha 2

Doc. MUDr. Rostislav Večeřa, Ph.D.
Ústav farmakologie
Lékařská fakulta Univerzity Palackého
Hněvotínská 3
775 15 Olomouc

Obhajoba disertační práce se uskuteční před komisí pro obhajoby disertačních prací DSP Lékařská farmakologie dne 13. 12. 2011 ve 13:00 v zasedací místnosti děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT 0021620820 a grantů GA UK 122 408/2008C, SVV-2010-260907 a SVV-2011-262901.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Prof. MUDr. Vladimír Geršl, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská farmakologie

Obsah

Obsah	3
Seznam použitých zkratk	4
1 Souhrn	5
2 Summary	6
3 Úvod do problematiky	7
3.1 Metabolizmus železa	7
3.2 Metabolizmus cholesterolu	7
3.3 Farmakoterapie cholestázy	7
3.4 Statiny	8
4 Cíle disertační práce	8
5 Materiál a metodika	9
5.1 Chemikálie	9
5.2 Pokusná zvířata	9
5.3 In vivo studie	9
5.4 Analytické metody	9
5.5 RT-PCR	10
5.6 Western blot	10
5.7 Histologické vyšetření jater	11
5.8 Statistická analýza	11
6 Výsledky	11
6.1 Hodnocení celkové toxicity	11
6.1.1 Mortalita	11
6.1.2 Změny tělesné hmotnosti	11
6.1.3 Změny hmotnosti jater	11
6.2 Histologické vyšetření jater	11
6.3 Expresí indikátorů proliferace a fibrogenéze	12
6.4 Biochemické vyšetření plazmy	12
Tabulka 1: Biochemické vyšetření plazmy	12
6.5 Metabolizmus žlučových kyselin	12
6.5.1 Tok žluči	12
6.5.2 Expresí genů zapojených do homeostázy žlučových kyselin	13
Tabulka 2: Expresí vybraných genů zapojených do homeostázy žlučových kyselin a bilirubinu	13
6.6 Metabolizmus cholesterolu	14
6.6.1 Biliární exkrece cholesterolu	14
6.6.2 Obsah cholesterolu a triglyceridů v játrech	14
6.6.3 Expresí genů zapojených do homeostázy cholesterolu	14
Tabulka 3: Expresí vybraných genů zapojených do homeostázy cholesterolu	15
6.7 Metabolizmus železa	15
6.7.1 Koncentrace železa v plazmě	15
6.7.2 Obsah železa v játrech	15
6.7.3 Expresí genů zapojených do homeostázy železa	15
Tabulka 4: Expresí vybraných genů zapojených do homeostázy železa	16
6.7.4 Expresí HO-1 a obsah IL-6 na úrovni proteinu	16
6.8 Expresí vybraných nukleárních receptorů	17
Tabulka 5: Relativní expresí vybraných nukleárních receptorů na úrovni mRNA	17
6.9 Permeabilita hematobiliární bariéry	17
6.9.1 Koncentrace melibiózy a rhamnózy v plazmě	18
6.9.2 Biliární exkrece melibiózy a rhamnózy	18
6.9.3 Poměr biliární exkrece melibiózy a rhamnózy	18
7 Diskuse	18
7.1 Hodnocení celkové toxicity	19
7.2 Metabolizmus žlučových kyselin	19
7.3 Metabolizmus bilirubinu	20
7.4 Hematobiliární bariéra	20
7.5 Metabolizmus cholesterolu	21
7.6 Metabolizmus železa	22
8 Závěry	22
9 Použitá literatura	24
10 Přehled přednáškové a publikační činnosti	29
10.1 10.1 Původní práce publikované v odborných časopisech	29
10.2 10.2 Posterová sdělení	29
10.3 Odborné přednášky	30

Seznam použitých zkratk

ABC	ATP binding cassette
ACAT 2	acyl-CoA cholesterol acyltransferáza
ASBT	apical sodium-dependent bile acid transporter
BSEP	bile salt export pump
CAR	constitutive androstane receptor
CYP7A1	cholesterol-7 α -hydroxyláza
CYP8B1	sterol-12 α -hydroxyláza
DMT-1	divalent metal transporter 1
FGF15	fibroblast growth factor 15
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FXR	farnesoid X receptor
Gp130	signalizační podjednotka receptoru pro IL-6
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A
HNF	hepatocyte nuclear factor
HO-1	hemoxygenáza 1
IL-6	interleukin 6
IRE	iron responsive element
IRP	iron regulatory protein
Keap2	Kelch-like ECH-associated protein 2
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
LRH-1	liver receptor homolog 1
LXR	liver X receptor
MDR	multidrug resistance protein
MRP	multidrug resistance-associated protein
Nrf2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NTCP	Na ⁺ /taurocholate cotransporter
OATP	organic anion transporter
OST	organic solute transporter
PBC	primární biliární cirhóza
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PXR	pregnane X receptor
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SHP-1	small heterodimer partner
α -SMA	α -smooth muscle actin
SR	scavenger receptor
SREBP-2	sterol regulatory element-binding protein 2
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBA	total bile acids
TfR	transferinový receptor
TGF- β 1	transforming growth factor β 1
UDCA	ursodeoxycholová kyselina
UGT	UDP-glukuronosyltransferáza

1 Souhrn

Studium potenciálního významu pravastatinu v prevenci cholestatického poškození jater.

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 disertační 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 několika 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 žlučového (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.

Hypercholesterolémie 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 reductázy, 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 reductáza), 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 feroportinu 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 poškození 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.

2 Summary

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

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.

3 Úvod do problematiky

Obstrukční cholestáza je stav charakterizovaný částečnou nebo úplnou zástavou toku žluče v důsledku obstrukce žlučových cest. Dochází k jaterní a následně k systémové kumulaci toxických látek typu žlučových kyselin a bilirubinu, které mohou v závislosti na intenzitě a době trvání cholestázy vyvolat vážné poškození jater a v návaznosti na to i celého organismu (Mareček, 2007). 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 a enzymů zejména v játrech a ledvinách. Iniciátorem těchto změn jsou kumulující se žlučové kyseliny, které prostřednictvím nukleárních receptorů/transkripčních faktorů redukují v játrech uptake žlučových kyselin na bazolaterální membráně hepatocytů, a to snížením exprese jejich hlavních transportních proteinů NTCP, OATP1A1 a OATP1B2 (Lee a Boyer, 2000; Zollner *et al*, 2006). Na kanalikulární membráně hepatocytů se snižuje exprese MRP2, hlavního transportního proteinu pro anionty, 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 α/β), které zajišťují transport kumulujících se žlučových kyselin a bilirubinu zpět do systémové cirkulace a mohou tak být eliminovány ledvinami (Roma *et al*, 2008). Potlačena je rovněž syntéza žlučových kyselin a naopak je aktivována hydroxylace a konjugace žlučových kyselin se sulfátem nebo glukuronidem, čímž je zvýšena rozpustnost látek ve vodě a usnadněna jejich potenciální eliminace močí (Roma *et al*, 2008). V ledvinách je exkrece toxických aniontů prostřednictvím pasivní glomerulární filtrace dále podpořena zvýšením aktivní tubulární exkrece pomocí indukovaných MRP2 a MRP4 transportérů (Donner a Keppler, 2001; Soroka *et al*, 2001; Tanaka *et al*, 2002). Současně dochází ke snížení reabsorpce žlučových kyselin v proximálním tubulu v důsledku downregulace ASBT (Zollner *et al*, 2006). Mimoto se zvyšuje exprese ASBT a OST α/β uptake transportérů v cholangiocytech, což napomáhá reabsorpci žlučových kyselin z neprůchodných žlučových kanálků zpět do jater. Enterohepatální cirkulace žlučových kyselin je potlačena snížením exprese ASBT ve střevě s následným snížením jejich absorpce.

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 a enzymů, což představuje potenciálně významný terapeutický přístup (Borch *et al*, 1998).

3.1 Metabolismus železa

V souvislosti s rozvíjejícím se oxidativním poškozením jater v důsledku kumulace žlučových kyselin během cholestázy je recentně diskutována role železa jako jednoho z hlavních kofaktorů geneze kyslíkových radikálů během oxidačního stresu. Možnou příčinnou souvislost naznačil Otagawa a kol., kteří prokázali příznivý vliv diety deficientní na železo na rozvoj cholestatického poškození jater. Výrazný zásah do homeostázy železa byl skutečně recentně potvrzen s důležitým zjištěním, že cholestáza vede k poklesu syntézy ústřední molekuly v regulaci obratu železa v organismu, hepcidinu. Jak se daná skutečnost ale odráží na zapojených molekulárních mechanismech, jakož i na koncentracích železa samotného, doposud známo není.

3.2 Metabolismus cholesterolu

Kromě žlučových kyselin a bilirubinu představuje jednu ze základních komponent žluče i cholesterol. I pro tuto látku jsou játra ústředním orgánem v regulaci homeostázy a nepřekvapí proto skutečnost, že kumulace cholesterolu a následná hypercholesterolemie patří k typickým příznakům obstrukční cholestázy (Ehrmann a Hůlek, 2010, kapitola 3.4.4). Paradoxní skutečností je, že i navzdory důležitosti cholesterolu v procesu tvorby žluče (např. jako prekurzoru syntézy žlučových kyselin) jsou známy pouze dílčí informace ohledně změn v jeho jednotlivých jaterních homeostatických mechanismech. Campbell a spol. (2004) popsali, že hepatocyty reagují na cholestázu paradoxním zvýšením exprese HMG-CoA reduktázy a LDL receptorů a snížením exprese exportních transportérů Abca1, Abcg5 a Abcg8, což napomáhá kumulaci cholesterolu v játrech. Ačkoliv mechanismy, jak k této paradoxní reakci dochází popsány nejsou, podezření na zvýšenou syntézu cholesterolu a její příčinnou souvislost k patofyziologii cholestázy naznačuje velmi slibné terapeutické možnosti.

3.3 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 proto 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, dochází tak 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 cholangiocytmů 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).

V terapii cholestatických onemocnění byla zkoušena řada postupů a látek, ale je nutné konstatovat, že s příznivou klinickou odpovědí a akceptovatelnou mírou incidence nežádoucích účinků bylo u cholestázy použito pouze několik léčiv: kyselina ursodeoxycholová (UDCA) (Corpechot *et al*, 2005), rifampicin (Marschall *et al*, 2005), fenobarbital (Bachs *et al*, 1989), bezafibrát (Nakamuta *et al*, 2010) a S-adenosyl-L-methionin (Mareček, 2007). Velké naděje se vkládají zejména do léčiv, která vykazují současně několik příznivých výše popsaných anticholestatických mechanismů. Po několika preklinických a klinických studiích se zdá, že k takovýmto nadějným léčivům by mohli patřit rovněž hypolipidemika blokujícími syntézu cholesterolu, statiny.

3.4 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 (Gbelcová *et al*, 2008). Tyto vlivy jsou dávány do souvislosti s dalšími jejich účinky, které nejsou vázány na snížení plazmatických koncentrací cholesterolu, tzv. pleiotropními účinky statinů. Vyplynávají ze schopnosti statinů prostřednictvím inhibice HMG-CoA reduktázy potlačovat nejenom tvorbu cholesterolu, ale také dalších intermediárních produktů této dráhy, tzv. izoprenoidů jako např. farnesylpyrofosfátu a geranylgeranylpyrofosfátu. Izoprenoidy jsou nezbytné k posttranslační úpravě 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 (Kölbl *et al*, 2009).

Použití statinů u nemocných s cholestázou vyplynulo z častého výskytu hypercholesterolemie (75-95 % případů) s výrazným vzestupem LDL a zvýšeným rizikem kardiovaskulární morbidity a mortality (Balmer *et al*, 2008). 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). Nicméně vliv na jaterní onemocnění samotné nebyl doposud v klinické studii jednoznačně definován. Stávající data pocházejí z ojedinelých případů léčby nemocných s PBC, kde se přínosem 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). Naopak existuje řada preklinických studií, které demonstrovaly 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.

4 Cíle disertační 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 organizmu 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.

5 Materiál a metodika

5.1 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). Sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou (ovčí protilátka proti myšimu 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).

5.2 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 (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 je odvozena z maximální doporučené dávky léčiva v klinické praxi, která činí 80 mg. Pro naši studii jsme zvolili také dávku 5x vyšší, 5 mg/kg. Roztok pravastatinu byl aplikován 1x denně intraperitoneálně po dobu 7 dní, přičemž první aplikace byla uskutečněna 2 hodiny po operaci.

5.3 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 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 žlučovod (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 ztát 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.

5.4 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 (Tomsík *et al.*, 2008). Biochemické vyšetření plazmy bylo provedeno na přístroji Cobas Integra® 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 μ 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 μ 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 KH_2PO_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 μ l isopropanolu, vzorek byl promíchán a po uplynutí 10 minut byl obsah triacylglycerolů stanoven dle návodu kitu) a 200 μ 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 μ l temperované reagentie R1 (37°C) a přidáno 12 μ l vzorku. Po 3 minutách bylo do zkumavky přidáno 270 μ 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. Lucíí Novákovou, Ph.D.

5.5 RT-PCR

Analýzy genové exprese byly provedeny metodou qRT-PCR s použitím Applied Biosystems 7500 HT Fast Real-Time PCR systému (Foster City, USA) (Brackova *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 triplicátech bylo vloženo 30 ng cDNA. Cílená amplifikace templátu cDNA proběhla za použití TaqMan® Fast Universal PCR Master Mixu a Taq-Man® Gene Expression Assay mixu pro daný gen získaných od Applied Biosystems, HMG-CoA reduktáza byla získána od Generi-Biotech (Česká republika). Jako endogenní kontrola byl použit GAPDH. V případě exprese feritinu, ferroportinu, hepcidinu a transferin 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. Kvantifikace exprese byla provedena standardně z rozdílů C_t hodnot (threshold cycle-fluorescenční práh).

5.6 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) za použití homogenizátoru MagNA Lyser (Roche Diagnostics GmbH, Německo) 2 \times 50 s při 6000 rpm. Supernatant byl získán centrifugací získaných homogenátů (10 000 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 za použití MagNA Laseru (2 \times 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_2 , 1mM EDTA, 10 % glycerol a inhibitory proteáz za použití ultrazvuku. Supernatant byl získán druhou centrifugací (17 000 g, 4°C, 20 minut). Homogenáty, nukleární frakce, případně plazma (100 μ g proteinu na jamku) byly separovány v SDS-PAGE polyakrylamidovém gelu o koncentraci 6,25 % - 15 %. Poté byly proteiny přeneseny na nitrocelulózu 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. 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 β -aktin.

5.7 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).

5.8 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 $p<0,05$.

6 Výsledky

6.1 Hodnocení celkové toxicity

6.1.1 Mortalita

Celková mortalita zaznamenaná v naší studii činila 19 %. Největší měrou se na této hodnotě podílela skupina BDO-P5, tedy skupina zvířat s podvazem žlučovodu 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.

6.1.2 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, 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.

6.1.3 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 a neprodleně zamražena v tekutém dusíku. Hmotnost jater vztažená 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 navýšena 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.

6.2 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 snižené v porovnání s BDO i BDO-P5 skupinami, což potvrzuje také exprese PCNA a α -SMA.

6.3 Expresie indikátorů proliferace a fibrogeneze

Expresie PCNA stanovená v játrech metodou Western blot byla významně zvýšena u všech skupin zvířat, které prodělaly podvaz žlučového. Ve skupině BDO-P1 byl ale pozorován významný pokles o 31 % ($p < 0,01$) v expresi tohoto proliferčního indikátoru oproti BDO skupině. Obdobné změny nastaly také v expresi indikátoru fibrogeneze α -SMA, jehož exprese byla statisticky významně zvýšena pouze u skupin BDO a BDO-P5, nikoliv u skupiny BDO-P1, v porovnání se skupinou kontrolní. Expresie 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. Expresie TGF- β zůstala nezměněna.

6.4 Biochemické vyšetření plazmy

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 hypercholesterolemie. Aplikace vyšší dávky pravastatinu nezmírnila biliární obstrukci 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 bilirubinu, konjugovaného bilirubinu i žlučových kyselin. U všech zvířat s obstrukcí žlučového byla statisticky významně zvýšena koncentrace železa v plazmě.

Tabulka 1: Biochemické vyšetření plazmy

	Sh	BDO	Sh-P5	BDO-P5	BDO-P1
Celkový bilirubin (μM)	$2,7 \pm 0,3$	$54 \pm 4,3$ ***	$3,5 \pm 1,3$	67 ± 12 ***	$28 \pm 4,0$ ** †
Konjug. bilirubin (μM)	$2,0 \pm 0$	$25 \pm 3,8$ ***	$<0,1^a$	40 ± 9 *** †	$12 \pm 2,1$ †
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 ($\mu\text{mol/l}$)	$9,8 \pm 1,1$	$29 \pm 3,2$ ***	$7,6 \pm 0,5$	$20 \pm 2,0$ *	$28 \pm 3,8$ ***
TBA ($\mu\text{mol/l}$)	$7,5 \pm 0,8$	$18 \pm 3,4$ **	$9,8 \pm 1,2$	$34 \pm 9,0$ **	$11 \pm 2,2$ †

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

^a pod mezí detekce.

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; TBA, celkové žlučové kyseliny.

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

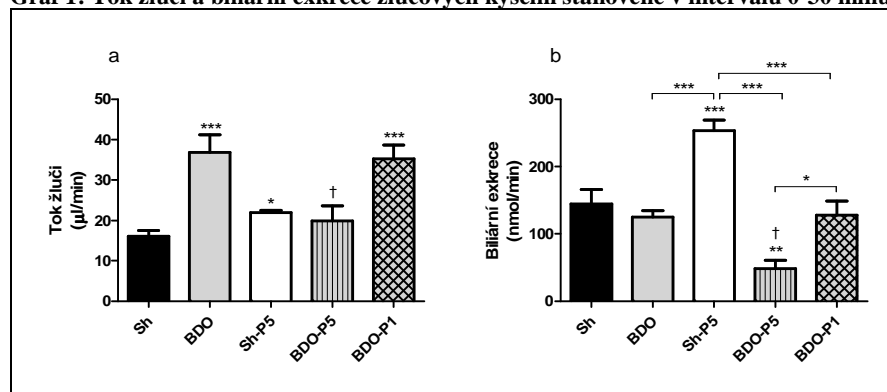
Signifikantní rozdíl oproti BDO († $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$).

6.5 Metabolismus žlučových kyselin

6.5.1 Tok žluči

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 minut), 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 (tabulka 2). Snížená exprese Bsep vysvětluje nejen snížený tok žluče ve skupině BDO-P5, ale také sníženou biliární exkreci a současně zvýšenou plazmatickou koncentraci žlučových kyselin (tabulka 1).

Graf 1: 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 († $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$).

6.5.2 Expres genů zapojených do homeostázy žlučových kyselin

Expres genů zapojených do homeostázy žlučových kyselin a bilirubinu byly stanoveny ve vzorcích jater na úrovni mRNA metodou RT-PCR. Změny pozorované ve skupině BDO byly v souladu s literárními údaji. Ve skupině BDO-P5 byla v porovnání s BDO snížena exprese Mrp2 a Bsep, zatímco ve skupině BDO-P1 byl pozorován pokles pouze v expresi Mrp2. 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.

Tabulka 2: Expres vybraných genů zapojených do homeostázy žlučových kyselin a bilirubinu

	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 ± 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 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

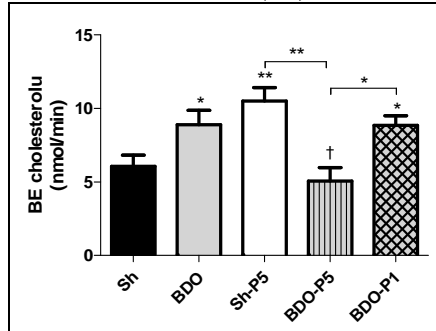
Signifikantní rozdíl oproti BDO († $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$).

6.6 Metabolismus cholesterolu

6.6.1 Biliární exkrece cholesterolu

Zvýšený tok žluče u Sh-P5, BDO a BDO-P1 (graf 1) byl pravděpodobně příčinou statisticky významně zvýšené biliární exkrece cholesterolu (graf 2). Ve skupině BDO-P5 byla významně snížena exprese Bsep a Mrp2 kanalikulárních transportních proteinů (tabulka 2), čemuž také odpovídá pokles toku žluči a tím i biliární exkrece cholesterolu.

Graf 2: 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 († $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$).

6.6.2 Obsah cholesterolu a triglyceridů v játrech

Obsah cholesterolu v játrech byl zvýšen pouze u skupiny BDO na 121 % 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.

6.6.3 Exprese genů zapojených do homeostázy cholesterolu

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. Exprese Mdr2 byla naopak zvýšena na 190 % ($p < 0,05$). Na membráně bazolaterální byla nalezena zvýšená exprese LDL-receptoru zajišťujícího vylučování 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. 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 3: Expres vybraných genů zapojených do homeostázy cholesterolu

	BDO	Sh-P5	BDO-P5	BDO-P1
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, potkání s obstrukcí žlučového; Sh-P5, potkání po sham operaci a aplikací pravastatinu v dávce 5 mg/kg/den; BDO-P1, potkání s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den; BDO-P5, potkání 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 († $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$).

6.7 Metabolismus železa

6.7.1 Koncentrace železa v plazmě

U všech tří skupin s navozenou obstrukční cholestázou (BDO, BDO-P5 a BDO-P1) byla naměřena zvýšená plazmatická koncentrace železa, čemuž odpovídala zvýšená saturace transferinu a celková vazebná kapacita železa. 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.

6.7.2 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. 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. Vzestup jaterního obsahu železa byl statisticky významný také v porovnání se skupinou BDO.

6.7.3 Expres genů zapojených do homeostázy železa

Expres vybraných genů majících důležitou úlohu v metabolismu železa byly stanoveny na úrovni mRNA metodou RT-PCR. Zvýšená expres TfR1 zajišťujícího vychytávání železa do hepatocytů, feritinu a ferroportinu 1 ve skupině BDO byla po podání pravastatinu ve skupinách BDO-P5 a BDO-P1 dále navýšena. V důsledku podvazu žlučového klesla expres hepcidinu na 37 % ($p<0,01$), aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg byla tato expres u BDO-P1 zvýšena o 187 % ($p<0,01$) oproti neléčené BDO skupině, čímž se prakticky rovnala hodnotě kontrolní skupiny Sh. Expres 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. Expres DMT-1 byla u podvázaných potkanů vlivem podávaného pravastatinu významně zvýšena, porovnáme-li ji s hodnotami expres nalezenými v experimentální skupině BDO.

Tabulka 4: Expres vybraných genů zapojených do homeostázy železa

	BDO	Sh-P5	BDO-P5	BDO-P1
Ferroportin 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 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 5 mg/kg/den.

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

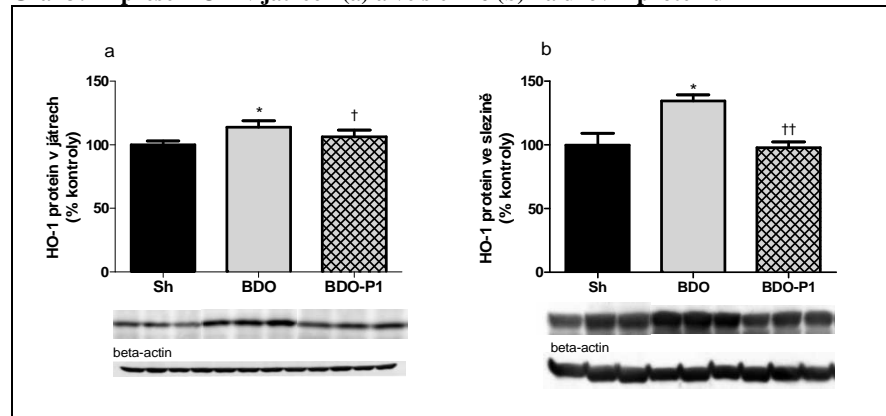
Signifikantní rozdíl oproti BDO († $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$).

6.7.4 Expres HO-1 a obsah IL-6 na úrovni proteinu

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 skupiny Sh, BDO a BDO-P1.

Expres 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 expres také ve slezině, orgánu s nejvyšší expresí HO-1. Expres HO-1 ve slezině byla u BDO rovněž signifikantně zvýšena na 130 % ($p=0,05$) v porovnání Sh. Ve skupině BDO-P1 byla expres HO-1 ve slezině snížena o 27 % ($p=0,01$) v porovnání s BDO.

Graf 3: Expres HO-1 v játrech (a) a ve slezině (b) na úrovni proteinu



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

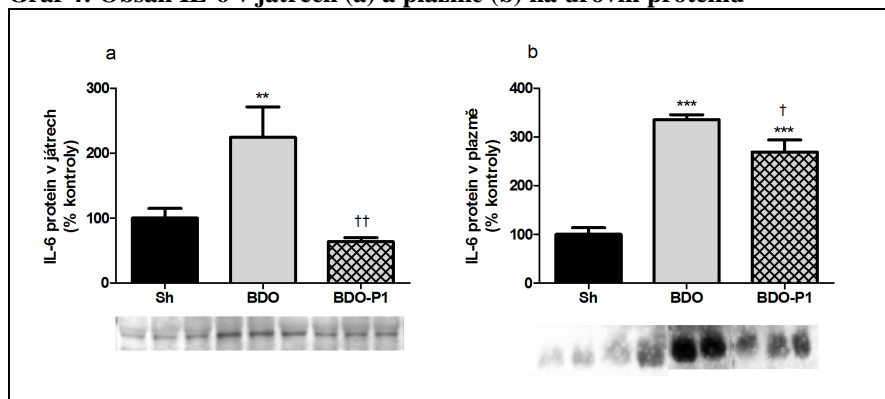
Sh, kontrolní skupina sham-operovaných zvířat; BDO, potkani s obstrukcí žlučového; BDO-P1, potkani s obstrukcí žlučového a aplikací pravastatinu v dávce 1 mg/kg/den.

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 fosforylací 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 expres 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 expres IL-6 snížena o 72 % ($p=0,01$) v játrech a o 20 % v plazmě v porovnání s BDO.

Graf 4: 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 († $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$).

6.8 Expres 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, HNF1 α 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 5: Relativní exprese vybraných nukleárních receptorů na úrovni mRNA

	BDO	Sh-P5	BDO-P5	BDO-P1
FXR	130 ± 26	140 ± 17	65 ± 9 * †	51 ± 6 * †
PXR	110 ± 15	140 ± 21	76 ± 10	94 ± 14
CAR	260 ± 54 *	240 ± 54 *	110 ± 25 †	96 ± 5 †
LXR- α	120 ± 11	144 ± 11	110 ± 11	160 ± 11 * †
SHP	540 ± 100 *	170 ± 48	180 ± 43 †	210 ± 42 †
SREBP-2	100 ± 11	130 ± 17	66 ± 7 ** †	72 ± 5 * †
PPAR- α	150 ± 20	190 ± 68	180 ± 9 ***	260 ± 21 *** ††
HNF1 α	140 ± 32	94 ± 14	63 ± 5 **	55 ± 8 ** †
LRH-1	120 ± 14	100 ± 18	43 ± 6 * †††	43 ± 4 * †††

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 († $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$).

6.9 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.

6.9.1 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 a rhamnózy zůstaly u skupin BDO, BDO-P5 a BDO-P1 v porovnání s kontrolními skupinami prakticky nezměněny.

6.9.2 Biliární exkrece melibiózy a rhamnózy

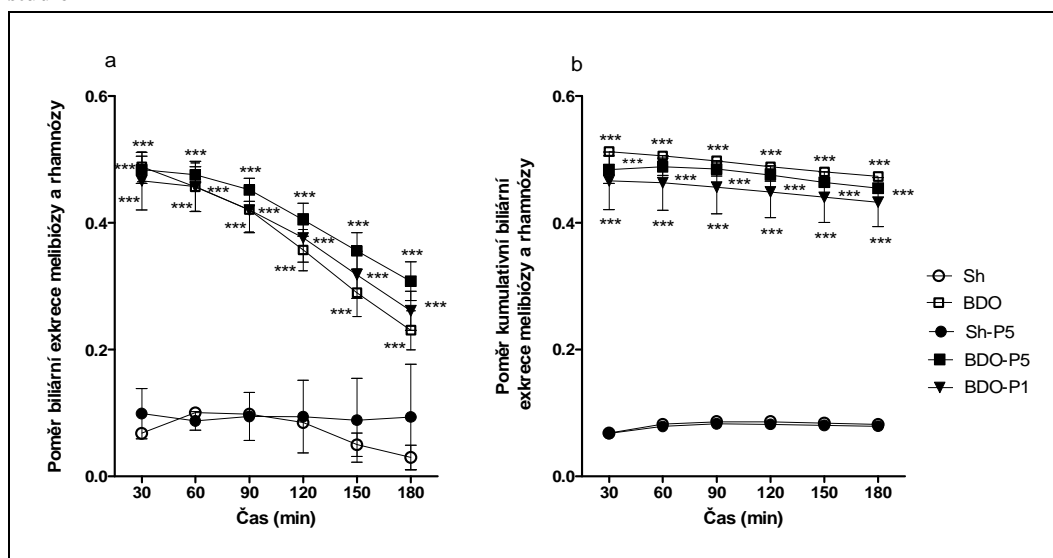
I přes skutečnost, že eliminace melibiózy a rhamnózy žlučí je neporovnatelně nižší než exkrece ledvinami, změny biliární exkrece obou cukrů velmi dobře popisují stav dané bariéry. Biliární exkrece melibiózy a rhamnózy byla u všech skupin s navozeným cholestatickým postižením (BDO, BDO-P5 a BDO-P1) zvýšena především v prvních intervalech kinetické studie trvající 180 minut. Od 90. minuty studie byly rozdíly v biliární exkreci obou cukrů mezi kontrolními a experimentálními skupinami statisticky nevýznamné.

Kumulativní biliární exkrece melibiózy a rhamnózy přepočítaná na % podané dávky 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.

6.9.3 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 1 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 5: Poměr biliární exkrece (a) a kumulativní biliární exkrece (b) 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.

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

7 Diskuse

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 Oatp1 a Oatp2 (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 Sigiyama, 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 potvrzuje naše výsledky. 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.

7.1 Hodnocení celkové toxicity

Nejzávažnější cholestatické poškození nejen jater, ale i celého organismu, bylo pozorováno ve skupině BDO-P5. Byla zde zaznamenána zvýšená mortalita spojená se stagnací tělesné hmotnosti v průběhu celé studie. Naopak hmotnost jater přepočítaná na tělesnou hmotnost byla v této skupině nejvyšší. Tento nálezh byl v souladu s histologickým vyšetřením jater a zvýšenou expresí proliferačního markeru PCNA a markeru fibrogenyze α -SMA. Cholestatické poškození bylo u těchto zvířat umocněno významně zvýšenou plazmatickou koncentrací bilirubinu, konjugovaného bilirubinu a žlučových kyselin (tabulka 1). Z těchto výsledků je tedy patrné, že vyšší aplikovaná dávka pravastatinu působila na potkaní organismus 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. 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 organismu.

7.2 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 Oatp1, 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.

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 nejspíše ochranou zcela neprůchodných žlučovodů před dalším hromaděním žlučových kyselin a před narůstajícím biliárním tlakem (Zhu *et al*, 2011). Nicméně, ve skupině BDO-P5 byla 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- α a naopak down-regulací LRH-1. Expese 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.

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 (Dikkers *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 žlučovéhoodu ke zvýšení tvorby žluče navzdory snížené expresi odpovědných transportérů. 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 μM , což naznačuje výraznou kumulaci farmaka po podání vyšší dávky. Tomu odpovídají i námi pozorované zvýšené plazmatické koncentrace pravastatinu během cholestázy. 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.

7.3 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 protoporphyrinu, 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 α -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 difúzí a tím rychle vstupovat do hepatocytů, kde nadměrnou aktivací HO-1 mohou způsobit hyperbilirubinémii 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.

7.4 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.*, 2003a; 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. Problematicnost dané metodiky spočívající v její nedostatečné citlivosti nás proto vedla k originálnímu pokusu využít za tímto účelem 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 normálních okolností 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 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.

7.5 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 vystylajícím 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 nálezn 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 α 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 zvýšenou expresi Bsep transportéru tok žluči a tím i exkreci cholesterolu do žluči, což je součást 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.

7.6 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 modulovat 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 progrese onemocnění (Fargion *et al*, 2010). 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 žlučového 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.

Dalším pozitivním nálezem byla normalizovaná exprese hepcidinu po podání nižší dávky pravastatinu, která naznačuje, že v této experimentální skupině byl snížen inhibiční vliv žlučových kyselin na IL-6 zprostředkovanou regulaci hepcidinu. Tomu také nasvědčuje plazmatická koncentrace žlučových kyselin, která byla ve skupině BDO-P1 významně snížena v porovnání s BDO i BDO-P5. Tuto teorii dále potvrzuje námi pozorovaná snížená koncentrace jaterního a plazmatického IL-6 ve skupině BDO-P1 v porovnání s BDO svědčící o sníženém toxickém působení žlučových kyselin.

Úskalím získaných dat ovšem je, že pozorovaná exprese hepcidinu u skupin BDO-P5 a BDO-P1 nemůže vysvětlit výrazné zvýšení exprese jaterního feroportinu 1. Existence tzv. hepcidin-independentního mechanismu (Oates *et al*, 2007) ve střevě naznačuje podobnou možnost i v játrech, nicméně je potřeba dalšího výzkumu.

8 Závěry

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, Cyp7a4 a Cyp8b1, v důsledku snížené exprese nukleárních receptorů FXR/SHP a LRH-1 a aktivace PPAR- α 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 α - Acet-2 a zvýšením jeho efluxu prostřednictvím aktivace LXR α - 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 feroportinu-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 poškození 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.

9 Použitá literatura

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) BEILKE, L.D. – ALEKSUNES, L.M. – HOLLAND, R.D. – BESSELS, 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.
- 7) BETTERS, J.L. – YU, L. NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Letters*, 2010, vol. 584, no. 13, s. 2740–2747.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) CAMPBELL, K.M. – SABL, G.E. – BEZERRA, J.A. Transcriptional reprogramming in murine liver defines the physiologic consequences of biliary obstruction. *Journal of Hepatology*, 2004, vol. 40, no. 1, s. 14–23.
- 11) 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.
- 12) CLEARFIELD, M.B. Statins: balancing benefits, efficacy and safety. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2002, vol. 3, no. 5, s. 469–477.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) DOLD, S.; LASCHKE, M.W.; LAVASANI, S.; MENGER, M.D.; JEPPSSON, B.; THORLACIUS, H. Simvastatin protects against cholestasis-induced liver injury. *Br J Pharmacol*. 2009, vol. 156, no. 3, s. 466-474.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) FARGION, S.; VALENTI, L.; FRACANZANI, A.L. Beyond hereditary hemochromatosis: New insights into the relationship between iron overload and chronic liver diseases. *Dig Liver Dis*. 2010, vol. 43, no. 2, s. 89-95.
- 20) 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.
- 21) 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.
 - 22) GBELCOVA, H. – LENICEK, M. – ZELENKA, J. – KNEJZLIK, Z. – DVORAKOVA, G. – ZADINOVA, M. – POUCKOVA, P. – KUDLA, M. – BALAZ, P. – RUMML, 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.
 - 23) 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.
 - 24) HABEOS, I.G. – ZIROS, P.G. – CHARTOUMPEKIS, D. – PSYROGIANNIS, A. – KYRIAZOPOULOU, V. – PAPAVALASSIOU, A.G. Simvastatin activates Keap1/Nrf2 signaling in rat liver. *Journal of Molecular Medicine*, 2008, vol. 86, no. 11, s. 1279–1285.
 - 25) HATANAKA, T. Clinical pharmacokinetics of pravastatin: mechanisms of pharmacokinetic events. *Clinical Pharmacokinetics*, 2000, vol. 39, no. 6, s. 397–412.
 - 26) 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.
 - 27) 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.
 - 28) 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.
 - 29) 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.
 - 30) 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.
 - 31) 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.
 - 32) 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.
 - 33) KÖLBEL, F. Co všechno (ne)víme o statinech. *Cor et Vasa*, 2009, roč. 51, č. 4, s. 306.
 - 34) 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.
 - 35) 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.
 - 36) 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.
 - 37) 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.
 - 38) 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.
 - 39) 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.
 - 40) 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.

- 41) MAREČEK, Z. Farmakoterapie jaterní cholestázy. *Remedia*, 2007, roč. 17, č. 4, s. 316–322.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 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.
- 49) NOVOTNÝ, J. Poruchy metabolismu železa I. Regulace homeostázy železa. *Vnitřní Lékařství*, 2005, roč. 51, č. 6, s. 681–689.
- 50) 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.
- 51) OTOGAWA, K. – OGAWA, T. – SHIGA, R. – NAKATANI, K. – IKEDA, K. – NAKAJIMA, Y. – KAWADA, N. Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2008, vol. 294, no. 2, s. R311–20.
- 52) 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.
- 53) 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.
- 54) 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.
- 55) ROSENSON, R.S. Statins: can the new generation make an impression. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 2004, vol. 9, no. 2, s. 269–279.
- 56) 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.
- 57) 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.
- 58) 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.
- 59) SLĀTIS, 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.

- 60) 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.
- 61) 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.
- 62) 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.
- 63) SVOBODA, M. – VYSKOČIL, J. – NOVÁKOVÁ, J. Statiny v onkologii. *Klinická Farmakologie a Farmacie*, 2005, roč. 19, č. 3, s. 155–159.
- 64) 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.
- 65) 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.
- 66) 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.
- 67) 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.
- 68) 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.
- 69) 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.
- 70) 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.
- 71) 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.
- 72) 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.
- 73) 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.
- 74) WILLIAMS, D. – FEELY, J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics*, 2002, vol. 41, no. 5, s. 343–370.
- 75) YAMAZAKI, M. – AKIYAMA, S. – NIINUMA, 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.
- 76) YAMAZAKI, M. – KOBAYASHI, K. – SUGIYAMA, Y. Primary active transport of pravastatin across the liver canalicular membrane in normal and mutant Eisai hyperbilirubinemic rats. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 1996, vol. 17, no. 8, s. 645–659.
- 77) YEH, K.Y. – YEH, M. – GLASS, J. Hepcidin 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.

- 78) 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.
- 79) 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.
- 80) ZOLLNER, G. – TRAUNER, M. Molecular mechanisms of cholestasis. *Wiener Medizinischen Wochenschrift*, 2006, vol. 156, no. 13–14, s. 380–385.
- 81) 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.
- 82) 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.

10 Přehled přednáškové a publikační činnosti

10.1 Původní práce publikované v odborných časopisech

- 1) 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 [accepted] [IF 2,451].
- 2) 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 [IF 2,317].
- 3) LOTKOVA, H. – STANKOVA, P. – ROUSAR, T. – KUCERA, O. – KOHOUTEK, L. – MICUDA, S. – BRČAKOVA, E. – KOLOUCHOVA, G. – CERVINKOVA, Z. Deteriorating effect of fluvastatin on the cholestatic liver injury induced by bile duct ligation in rats. *General Physiology and Biophysics*, 2011, vol. 30, no. 1, s. 66–74 [IF 0,697].
- 4) 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 [IF 1,810].
- 5) FUKSA, L. – BRČAKOVA, E. – KOLOUCHOVA, G. – HIRSOVA, P. – HROCH, M. – CERMANOVA, J. – STAUD, F. – MICUDA, S. Dexamethasone reduces methotrexate biliary elimination and potentiates its hepatotoxicity in rats. *Toxicology*, 2010, vol. 267, no. 1-3, s. 165–171 [IF 3,241].
- 6) CERMANOVA, J. – FUKSA, L. – BRČAKOVA, E. – HROCH, M. – KUCERA, O. – KOLOUCHOVA, G. – HIRSOVA, P. – MALAKOVA, J. – MARTINKOVA, J. – CERVINKOVA, Z. – MICUDA, S. Up-regulation of renal Mdr1 and Mrp2 transporters during amiodarone pretreatment in rats. *Pharmacological Research*, 2010, vol. 61, no. 2, s. 129–135 [IF 3,287].
- 7) PROCHAZKA, E. – SOUKUP, T. – HROCH, M. – FUKSA, L. – BRČAKOVA, E. – CERMANOVA, J. – KOLOUCHOVA, G. – URBAN, K. – MOKRY, J. – MICUDA, S. Methotrexate released in vitro from bone cement inhibits human stem cell proliferation in S/G2 phase. *International Orthopaedics*, 2010, vol. 34, no. 1, s. 137–142 [IF 1,825].
- 8) FUKSA, L. – BRČAKOVA, E. – CERMANOVA, J. – HROCH, M. – CHLADEK, J. – KOLOUCHOVA, G. – MALAKOVA, J. – MARTINKOVA, J. – STAUD, F. – MICUDA, S. Amiodarone modulates pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rats. *Biopharmaceutical & Drug Disposition*, 2008, vol. 29, no. 5, s. 289–299 [IF 1,542].

10.2 Posterová sdělení

- 1) Kolouchova G., Hirsova P, Brčakova E, Cermanova J, Fuksa L, Lotkova H, Mokry J, Hyspler M, Slanarova M, Micuda S. Pravastatin modulates differentially liver cholesterol homeostasis in control and bile duct-obstructed rats. Prague Hepatology Meeting, Praha, 16-18.9.2010. Abstrakt uveřejněn v: Čes a Slov Gastroent a Hepatol. 2010; 101.
- 2) Kolouchová G., Hiršová P, Brčáková E, Cermanová J, Fuksa L, Laštůvková H, Mokřý J, Mičuda S. Influence of different statins on the liver injury caused by chronic extrahepatic cholestatis in rats. Farmakologické dny, Hradec Králové, 15.-17.9.2010. Abstrakt uveřejněn v: Acta Medica 2010, vol. 5, No. 3: 17
- 3) Kolouchová G., Brčáková E, Hiršová P, Fuksa L, Cermanová J, Hroch M, Mokřý J, Šišpera L, Mičuda S. Vliv pravastatinu na poškození jater v průběhu chronické extrahepatální cholestázy u potkanů. Farmakologické dny, Bratislava, 2.-4.9.2009. Abstrakt uveřejněn v: Sborník abstrakt: 59. Farmakologické dni, Bratislava, září 2010.
- 4) Kolouchová G., Hiršová P, Brčáková E, Laštůvková H, Fuksa L, Cermanová J, Mokřý J, Mičuda S. Vliv pravastatinu na homeostázu železa v průběhu chronické extrahepatální cholestázy u potkanů. XXXIX. Májové hepatologické dny, Karlovy Vary, 10.-13.5.2011. Abstrakt uveřejněn v: Čes a Slov Gastroent a Hepatol 2011; 65.

- 5) Kolouchová G, Hiršová P, Brčáková E, Laštůvková H, Fuksa L, Cermanová J, Mokřý J, Šispera L, Tomsík P, Mičuda S. Vliv pravastatinu na poškození jater v průběhu chronické extrahepatální cholestázy u potkanů. XXXVIII. Májové hepatologické dny, Karlovy Vary, 12.-14.5.2010. Abstrakt uveřejněn v: Čes a Slov Gastroent a Hepatol 2010; 64 (6): S28.
- 6) Kolouchová G, Hiršová P, Brčáková E, Fuksa L, Cermanová J, Hroch M, Cládek J, Mokřý J, Martinkova J, Mičuda S. Protizánětlivé látky modulují endotoxinem indukované poškození jater u potkanů. XXXVII. Májové hepatologické dny, Karlovy Vary, 13.-15.5.2009. Abstrakt uveřejněn v: Čes a Slov Gastroent a Hepatol 2009; 63(3): 153.
- 7) Kolouchová G, Brčáková E, Fuksa L, Cermanová J, Hájková J, Hroch M, Chládek J, Štaud F, Mičuda S: Změny eliminace metotrexátu a vzestup regulačních cytokinů v séru potkanů po aplikaci endotoxinu. XXXVI. Májové hepatologické dny, Karlovy Vary, 14.-16.5.2008. Abstrakt uveřejněn v: Čes a Slov Gastroent a Hepatol 2008; 62 (2).

10.3 Odborné přednášky

- 1) Kolouchová G, Hiršová P, Brčáková E, Laštůvková H, Fuksa L, Cermanová J, Mokřý J, Šispera L, Tomšík P, Mičuda S. Pravastatin zhoršuje jaterní poškození způsobené chronickou extrahepatální cholestázou u potkanů. Květinův den-nultý ročník mezioborového semináře mladých farmakologů a toxikologů, Brno, 3.6.2010).
- 2) Kolouchová G, Brčáková E, Hiršová P, Fuksa L, Cermanová J, Mokřý J, Slanarová M, Hyspler R, Mičuda S. Studium potenciálního terapeutického významu pravastatinu v terapii jaterního poškození. XV. Vědecká konference, Hradec Králové, 26.1.2011.