

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

**Změna exprese transportních proteinů během
obstrukční cholestázy u potkanů I**

**Alteration of transport proteins expression during
obstructive cholestasis in rats I**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Eva Doleželová, Ph.D.

Vypracovala:

Jana Šindelářová

Hradec Králové 2013

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“,

datum:

podpis:

.....

Jana Šindelářová

„Na tomto místě chci poděkovat PharmDr. Evě Doleželové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při tvorbě této diplomové práce. Děkuji i mé rodině za trpělivost a podporu při studiu.“

Abstrakt

Jana Šindelářová

Změna exprese transportních proteinů během obstrukční cholestázy u potkanů I

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce:

Cílem diplomové práce bylo potvrzení cholestatického poškození jater navozeného podvazem žlučovodu v trvání 28 dnů pomocí biochemické analýzy séra a analýzy exprese jaterních transportérů pro uptake látek Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2 a Oat2 na úrovni mRNA i proteinu u potkanů.

Metody:

Potkani kmene Wistar (n = 6, v každé skupině; 280 – 320g) byli rozděleni do dvou skupin: kontrolní skupina sham-operovaných potkanů (Sham) a skupina s podvazem žlučovodu trvajícím 28 dní (BDO). Biochemická analýza séra byla provedena pomocí Cobas Integra® 800. Změny v expresi mRNA a proteinů byly hodnoceny qRT-PCR a Western blot analýzou.

Výsledky:

Hladina žlučových kyselin byla zvýšená u BDO skupiny zvířat na 454 %, hladina celkového bilirubinu na 4111 % a hladina konjugovaného bilirubinu na 7313 % v porovnání s kontrolní skupinou. Aktivita ALP byla zvýšena na 238 %, aktivita GMT na 2826 %, aktivita ALT na 1200 % a aktivita AST na 1387 % oproti kontrolní skupině. U BDO skupiny zvířat bylo pozorováno snížení hladiny mRNA u Ntcp transportéru na 51 % a Oatp1a4 proteinu na 38 %. Změny hladiny Oatp1a1, Oatp1b2 a Oat2 mRNA nebyly pozorovány. Expese proteinu byla významně snížena u Oatp1a1 na 25 %, Oatp1a4 na 31 % a Ntcp na 79 % oproti Sham skupině zvířat. Změna expese proteinu nebyla u Oatp1b2 a Oat2 pozorována.

Závěr:

Výsledky biochemické analýzy potvrdily poškození jater v důsledku obstrukční cholestázy. Z výsledků analýzy mRNA a proteinu vyplývá, že při biliární cirhóze dochází ke snížení exprese bazolaterálních transportérů pro uptake ve snaze zabránit hromadění potenciálně toxických látek jako jsou žlučové kyseliny a bilirubin v játrech.

Abstract

Jana Šindelářová

Alteration of transport proteins expression during obstructive cholestasis in rats I

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background:

The purpose of the diploma thesis was the confirmation of liver cholestatic damage induced by bile duct obstruction lastnig for 28 days by biochemical analysis and analysis of mRNA and protein expression of liver uptake transporters in rats (Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2, Oat2).

Methods:

Wistar rats (n = 6, in each group; 280 – 320g) were dividend in two groups: control group of sham-operated animals (Sham) and group with bile duct obstruction lastnig for 28 days (BDO). Biochemical analysis of serum was performed by Cobas Integra ® 800. Changes of mRNA and protein expression of transport proteins were evaluated by qRT-PCR and Western blot.

Results:

In BDO group, level of bile acids increased to 454%, level of total bilirubin to 4111% and level of conjugated bilirubin to 7313% as compared to control group. In comparison to control group, activity of ALP was elevated to 238%, activity of GMT to 2826%, activity of ALT to 1200% and activity of AST to 1378%. As compared to Sham group BDO group showed decreased mRNA levels of Ntcp to 51% and of Oatp1a4 to 38%. No signifiant changes were found in Oatp1a1, Oatp1b2 and Oat2 mRNA levels. Protein levels decreased for Oatp1a1 to 25%, for Oatp1a4 to 31% and for Ntcp to 79%. No changes in Oatp1b2 and Oat2 protein expression were observed.

Conclusion:

The results of biochemical analysis confirmed liver damage caused by obstructive cholestasis. The results of mRNA and protein analysis showed reduced expression of basolateral uptake transporters during biliary cirrhosis in an effort to prevent accumulation of potentially toxic compounds such as bile acids or bilirubin in the liver.

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	6
Obsah	8
1. ÚVOD	10
1.1. Historie.....	11
2. TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1. Játra	14
2.1.1. Morfologická struktura.....	14
2.1.2. Funkce jater	15
2.1.2.1. Tvorba žluči	16
2.1.2.2. Metabolismus základních živin.....	16
2.1.2.3. Vychytávání, transformace a sekrece látek	16
2.2. Transportní systémy v játrech.....	17
2.2.1. SLC transportéry	18
2.2.2. ABC transportéry	20
2.3. Cholestáza	22
2.3.1. Obstrukční cholestáza	22
2.3.2. Intrahepatální cholestáza	23
2.3.2.1. Primární biliární cirhóza (PBC)	24
2.3.2.2. Primární sklerózující cholangitida (PSC).....	24
2.3.2.3. Cholestáza při sepsi.....	24
2.3.2.4. Alkoholická cholestáza	24
2.3.2.5. Léčivý navozená cholestáza.....	25
2.3.2.6. Intrahepatální těhotenská cholestáza.....	26
2.3.3. Farmakoterapie.....	26
2.3.3.1. Ursodeoxycholová kyselina (UDCA)	26
2.3.3.2. Rifampicin.....	26
2.3.3.3. Další agonisté jaderných receptorů	27
2.4. Transportní systémy a cholestáza.....	27
2.4.1. Změny v expresi SLC transportérů	28
2.4.2. Změny v expresi ABC transportérů	28
3. ZADÁNÍ PRÁCE - CÍLE PRÁCE.....	30
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1. Metodika	33
4.1.1. Chemikálie	33
4.1.2. Pokusná zvířata	33
4.1.3. Biochemická analýza	34
4.1.4. qRT-PCR.....	34

4.1.5.	Western blot	35
4.1.6.	Statistická analýza	36
4.2.	Výsledky.....	36
4.2.1.	Biochemická analýza	36
4.2.2.	qRT-PCR.....	37
4.2.3.	Western blot	39
5.	DISKUZE	41
6.	ZÁVĚR	44
	Seznam použitých zkratek	46
	Seznam použité literatury	48

1. ÚVOD

1.1. Historie

Játra patří mezi orgány nezbytné pro život. Jsou metabolicky neaktivnější tkání v těle, podílí se na metabolismu cukrů, tuků i proteinů (1). V játrech probíhá vychytávání, biotransformace a vylučování endogenních i exogenních látek (2a). Sekreční funkce jater spočívá v tvorbě žluče a jejím secernování do střeva. Žluč má význam pro emulgaci tuků a zároveň tvoří exkreceční cestu pro řadu látek tělu vlastních i xenobiotik (1).

Umístění jater v pravé horní části dutiny břišní bylo známo již Homérovi (8. a 7. století př. n. l.), který je považoval za orgán vitality, jehož poškození je smrtelné. Přestože již filosofové před Sokratem znali konkrétní údaje o struktuře i funkci jater, až Hippokratova škola (5. a 4. století př. n. l.) položila vědecké základy pro pochopení onemocnění jater. Velkým mezníkem v dějinách hepatologie byly poznatky Galéna z Pergamonu (131–201), které byly základem hepatologického myšlení po další tisíciletí. V následujícím období omezilo vědecký rozvoj náboženské myšlení, a proto k dalšímu pokroku na poli hepatologie došlo až v renesanci, konkrétně zásluhou Leonarda da Vinci (1452–1519). Anatomii da Vinci studoval už na lidském těle, popsal cévní zásobení jater i biliární strom. Další poznatky přineslo v 19. století praktické využívání mikroskopu. Francis Kiernan popsal strukturu jaterního lalůčku, Claude Bernard objevil v játrech glykogen. Terapeutické postupy ovšem byly stále velmi omezené a často drastické – pouštění žilou, používání pijavek, klyzmata či pouštění krve přímo z jater. Začal být doporučován zákaz požívání alkoholu, omezení kávy a koření. Teprve začátkem 20. století byl objasněn původ žlučnickových kamenů ve stáze žluči. Dále došlo ke zlepšení poznání metabolických pochodů v játrech a také k rozvoji celé řady diagnostických metod (2b) (3a).

Poruchy tvorby nebo vylučování žluče jsou označovány jako cholestáza. Těchto onemocnění v posledních desítkách let výrazně přibývá. Zároveň došlo k pokroku v pochopení mechanismu tvorby žluče, molekulární podstaty onemocnění i v jeho terapii. Při cholestáze dochází ke kumulaci složek žluče v játrech i mimo ně (2c). Bilirubin a žlučové kyseliny pomocí aktivace jaderných receptorů vyvolávají adaptivní odpověď organismu, která má za úkol chránit hepatocyty před hromaděním těchto toxických látek. Tyto změny zahrnují především regulaci exprese jaterních transportérů (4). Právě nukleární receptory se stávají cílem vývoje nových látek, které budou

schopné stimulovat jejich aktivací kompenzatorní mechanismy při cholestáze cestou alternativních exkretčních drah (2c).

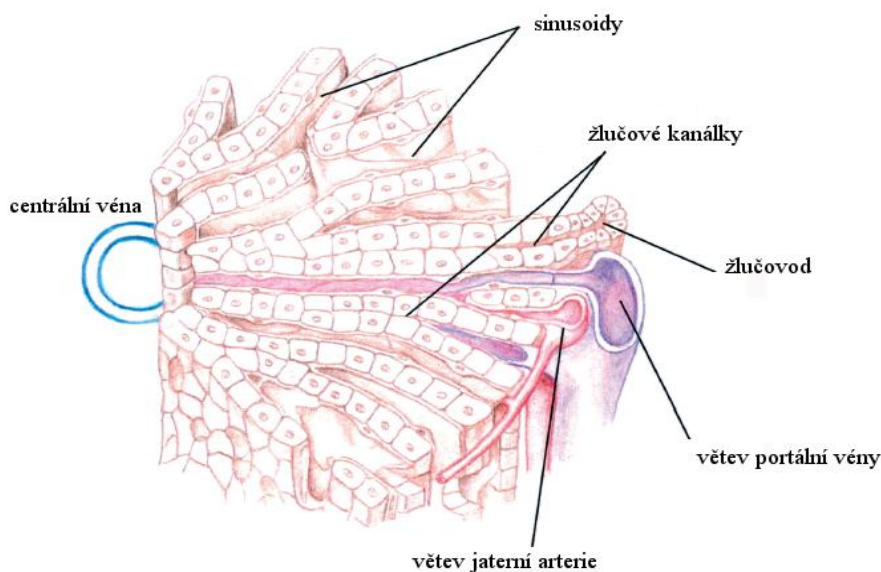
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Játra

Játra jsou největším a nejtěžším orgánem lidského těla. Jejich hmotnost tvoří přibližně 1/50 hmotnosti dospělého člověka, tj. 1300–1500 g u žen a 1500–1800 g u mužů. Mají hladký lesklý povrch červenohnědé barvy. Uložena jsou intraperitoneálně, těsně pod bránicí, z větší části vpravo. Jejich důležitost spočívá v metabolické, exkreční a detoxikační činnosti (3b) (5).

2.1.1. Morfologická struktura

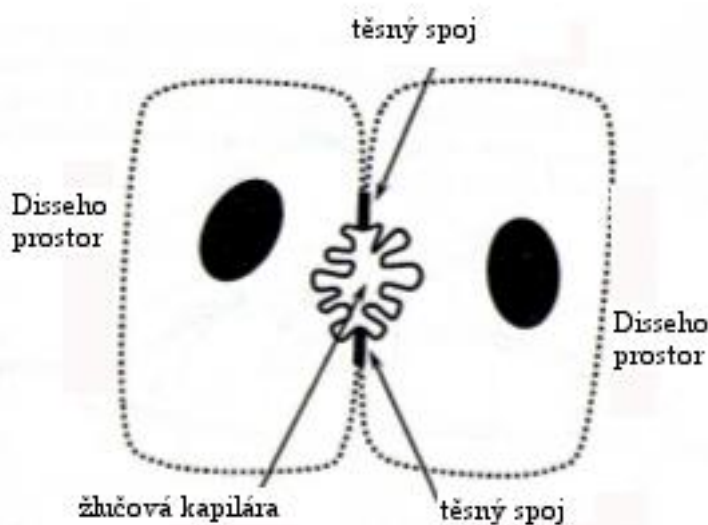
Tkáň jater je tvořena z jaterních buněk – **hepatocytů**. Tyto buňky měří průměrně 20–30 μm (6). Dvě řady těsně přiléhajících hepatocytů představují **jaterní trámce**, které se paprskovitě sbíhají k **centrální vėně**. Mezi jednotlivými trámci se vinou jaterní **sinusoidy**, což jsou krevní kapiláry, které přivádějí krev z jaterní arterie a portální vėny. Sinusoidy ústí do centrální vėny a mají díky velkým fenestracím značnou propustnost i pro velké molekuly bílkovin. Plazma protékající sinusoidy je filtrována do tzv. **Disseho prostoru**, který se nachází mezi endotelovými buňkami a hepatocyty, a je odváděna do lymfatických cív (Obr. 1) (5). V Disseho prostoru se dále vyskytují Itovy buňky (adipocyty), které skladují retinoidy. V endotelu jaterních sinusoid jsou roztroušeny buňky imunitního systému – Kupfferovy buňky. Jedná se o hvězdicovité makrofágy, které mají za úkol fagocytovat potenciálně toxické látky z portální krve a zabránit tak jejich průniku do systémového oběhu (2a).



Obr. 1. Schematické znázornění struktury jater. Převzato a upraveno z (2a).

Morfologickou jednotkou jater je lalůček centrální vény – lobulus venae centralis. Má tvar šestiúhelníku se zaoblenými hranami a je tvořen všemi trámci hepatocytů, které odvádí krev do jedné centrální žíly. V místě, kde se stýkají 3 jaterní lalůčky (portobiliární prostor), se nachází větve jaterní arterie, portální vény a interlobulární žlučovod (6).

Povrch hepatocytu je kryt membránou, která nevykazuje v celém svém průběhu stejné vlastnosti. Až 85 % buněčné membrány jaterních buněk tvoří bazolaterální (sinusoidální) membrána, která sousedí s Disseho prostorem a umožňuje transport látek mezi hepatocytem a sinusoidální krví. Na opačném pólu jaterní buňky se nachází značně menší plocha kanalikulární (apikální) membrány, která je exkreční a přímo tvoří stěnu žlučového kanálku (Obr. 2). Oba póly buňky mají membránu s mikroklky, které zvětšují příslušnou kontaktní plochu (5). Na rozhraní mezi bazolaterální a apikální částí membrány jsou umístěny těsné spoje („tight junctions“), jejichž funkcí je zabránit průniku komponent žluče zpět do krve (7).



Obr. 2. Rozdělení povrchové membrány hepatocytů. Převzato a upraveno z (5).

2.1.2. Funkce jater

Jaterní tkáň zajišťuje mnoho fyziologických funkcí. Jedná se o metabolismus základních živin (sacharidů, lipidů, proteinů), tvorbu a sekreci žluči, vychytávání, zpracování a exkreci látek, endokrinní, imunitní a zásobní funkci, podílí se na termoregulaci, hemokoagulaci, tvorbě i zániku červených krvinek (1) (5).

2.1.2.1. Tvorba žluči

Žluč je tvořena filtrací vody a malých elektrolytů z jaterních buněk jako odpověď na osmotický gradient vytvořený aktivními transportéry hepatocytu (7). Je tvořena zejména žlučovými kyselinami (kyselina cholová, chenodeoxycholová aj.), žlučovými barvivy (bilirubin, biliverdin) a dalšími látkami rozpuštěnými v alkalickém roztoku (8). Žluč má dvě významné funkce: podílí se na trávení a vstřebávání tuků a tvoří exkreční cestu pro látky, které nelze vyloučit ledvinami (2a).

2.1.2.2. Metabolismus základních živin

Játra mají glukostatickou funkci, tedy udržují hladinu glukózy v krvi ve fyziologických mezích. K tomu využívají procesy glukoneogeneze, glykogenolýzy (při nedostatku glukózy), glykolýzy, glykogeneze (při zvýšené glykémii) a skladování glykogenu (2a).

V játrech dochází k vychytávání, beta-oxidaci a transformaci mastných kyselin, vzniká zde většina fosfolipidů, dochází k tvorbě cholesterolu a lipoproteinů a také ke katabolismu LDL („low density lipoprotein“), VLDL („very low density lipoprotein“) a chylomikronových zbytků (3c).

Všechny plazmatické bílkoviny kromě imunoglobulinů a von Willebrandova faktoru jsou tvořeny játry, stejně jako mnoho transportních proteinů (transferin, transkobalamin, albumin, globulin vázající tyroxin, ceruloplasmin aj.) (2a).

2.1.2.3. Vychytávání, transformace a sekrece látek

Játra přeměňují velké množství látek endogenního (např. cholesterol, hormony, bilirubin, žlučové kyseliny) i exogenního původu (léčiva, toxiny). Tento proces probíhá jako sled dějů:

- vychytávání („uptake“) a transport látek z krve
- degradace nebo přeměna látek v jaterní buňce
- exkrece látek do žluče

Transport látek z krve se odehrává na bazolaterální membráně hepatocytů. Jedná se tedy o vychytávání látek ze sinusoidální krve (2a). Transportní proteiny pro uptake látek se řadí do rodiny **SLC** („Solute carriers“). Mnohé umožňují obousměrný transport látek, dle jejich momentálního koncentračního gradientu krev/hepatocyt (9).

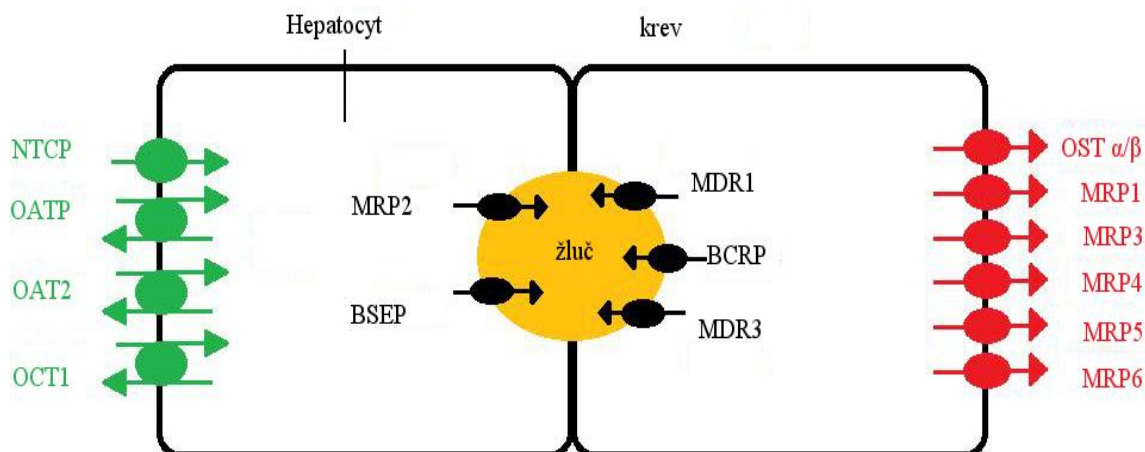
Metabolismus látek v játrech probíhá ve dvou fázích. Protože lipofilní, ve vodě nerozpustné látky, musí před vyloučením z organismu projít přeměnou na rozpustnější

metabolity, je první fáze tvořena reakcemi, jejichž účelem je poskytnout více polární sloučeniny (oxidace, redukce, hydrolýza). Nejvýznamnější roli v těchto procesech hraje enzymový systém cytochromu P450 (CYP) (2a). Na první fázi obvykle navazuje fáze druhá, při níž je mateřská látka nebo její metabolit konjugován nejčastěji s kyselinou glukuronovu, dále glutathionem, kyselinou octovou, nebo některými aminokyselinami (glycinem, taurinem, glutaminem aj.) (10).

Látky, které po metabolizaci opouští játra žlučí, jsou přenášeny aktivně, proti koncentračnímu gradientu na kanalikulární membráně jaterních buněk. Děje se tak pomocí jednosměrných ATP-dependentních transportérů z rodiny **ABC transportérů** („ATP binding cassette“) (9).

2.2. Transportní systémy v játrech

Játra jsou velmi dobře vybavena pro uptake látek z krve a eflux do žluče nebo zpět do krve (9). Hydrofobní molekuly mohou procházet z krve do hepatocytů prostou nebo usnadněnou difuzí. Na bazolaterální membráně hepatocytů se navíc vyskytuje řada transportních proteinů, které přenášejí polární látky i některé lipofilní molekuly. Polární látky poté mohou být přepraveny jednosměrným nebo obousměrným transportem bazolaterální membrány zpět do krve (Obr. 3). Transportéry umístěné na kanalikulární membráně jaterních buněk zajišťují exkreci látek do žluče (11). Udržují tak nízkou intracelulární koncentraci daných látek a vytváří gradient pro jejich uptake. Proto jsou jaterní transmembránové přenašeče určující pro clearance endogenních i exogenních látek (9). Přenos substrátů pomocí transportérů je buď aktivní (vyžadující energii) nebo facilitovaný (energií nevyžadující) (13). Exprese jaterních transportérů je ovlivňována množstvím faktorů, jako jsou např. léčiva, nebo patologické procesy jako zánět či cholestáza (12).



Obr. 3. Grafické znázornění umístění jaterních membránových transportérů. Převzato a upraveno z (13).

2.2.1. SLC transportéry

Na bazolaterální membráně hepatocytů se nachází transportéry patřící do rodiny SLC, která zahrnuje přenašeče využívající facilitovaný a iontově spřažený sekundárně aktivní způsob transportu (14). Mnohé z těchto transportních proteinů umožňují obousměrný transport dle koncentračního gradientu daného substrátu a mohou tedy plnit funkci vychytávání ze sinusoidální krve i efluxu tamtéž (9). Přehled endogenních substrátů vybraných SLC přenašečů zobrazuje Tab. 1.

Jedním z rodiny SLC transportérů je **NTCP** („Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide“; SLC10A1), který je exprimován pouze v játrech (9). Tento protein kotransportuje žlučové kyseliny s Na⁺ ve stechiometrickém poměru 1:2 (15). Zajišťuje tak společně s OATP přenašeči většinu uptake žlučových kyselin ze sinusoidální krve. Nejvyšší afinitu má k di- a trihydroxy žlučovým kyselinám, jak u člověka, tak u potkana (16). U NTCP transportéru převažuje přenos konjugovaných žlučových kyselin (ve formě taurocholátu) nad nekonjugovanými kyselinami (17). Dalšími substráty tohoto transportéru jsou např. hormony štítné žlázy nebo estron-3-sulfát (11).

Významnou skupinou SLC transportérů jsou **OAT** („Organic anion transporters“; SLC22A) proteiny. Transport aniontů přes negativně nabitou membránu hepatocytů vyžaduje energii. OAT tento problém elegantně řeší výměnou intracelulárních aniontů za extracelulární anionty, např. sukcinát (18). **OAT2** (SLC22A7) je hlavním transportérem exprimovaným na bazolaterální membráně jaterních buněk, ostatní zástupci (OAT 1, 3, 4 a 5) mají větší význam v jiných tkáních, zejména v ledvinách

(19). OAT2 přenáší například prostaglandin E_2 a $F_{2\alpha}$. OAT transportéry mohou zajišťovat obousměrný transport látek (11).

Do skupiny SLC přenašečů patří také **OCT** („Organic cation transporters“; SLC22A) transportéry. Tyto transportéry jsou obousměrné a nejsou spřaženy s žádným volným zdrojem energie, přenos jejich substrátů závisí pouze na elektrochemickém gradientu na membráně. Obecně přenáší menší organické kationty (20). Hlavním transportérem této skupiny v jaterní tkáni je **OCT1** (11).

Další důležitou skupinou SLC transportérů jsou **OATP** („Organic anion transporting polypeptide“; SLCO) přenašeče. Některé OATP proteiny se vyskytují především nebo dokonce výhradně v játrech (např. Oatp1b2), jiné jsou exprimovány ve více tkáních (např. Oatp1a1, Oatp1a4). Představují na sodíku nezávislý způsob transportu látek různého původu. Tento děj probíhá zejména pomocí efluxu glutathionu, bikarbonátu a glutathion-S-konjugátů (21). OATP transportéry zajišťují obousměrný přenos organických aniontů, ale také některých kationtů, např. chinidinu, a neutrálních steroidů (11). Zatím je známo 11 zástupců OATP transportérů u člověka a 15 zástupců u hlodavců (22). Dělí se do šesti skupin (OATP1-6), z nichž každá obsahuje další podskupiny (OATP1A, 1B atd.). OATP transportéry vykazují širokou substrátovou specifitu (9). Přestože se lidské a hlodavčí OATP jaterní transportéry liší svou sekvencí aminokyselin, hlodavčí **Oatp1a1**, **Oatp1a4** a **Oatp1b2** zřejmě plní stejné funkce jako lidské OATP1B1 a OATP1B3 (23). Oatp1a1 a Oatp1b2 přenáší bromosulfoftalein, Oatp1a1 a Oatp1a4 jsou hlavní transportéry pro žlučové kyseliny, mezi jejich další substráty patří např. trijodtyronin a tyroxin (9).

Sekrece žlučových kyselin zpět do krve se může dít pomocí **OST α/β** („Organic solute transporter α/β “; SLC51) proteinu (16) (24). OST α/β je na sodíku nezávislý heterodimerní transportér (16). Protože jeho mechanismus přenosu látek je facilitovaná difuze, může zprostředkovat eflux i uptake svých substrátů v závislosti na daném elektrochemickém gradientu (25).

Tab. 1. Přehled endogenních substrátů vybraných transportérů z rodiny SLC (9) (11) (19).

Transportér	Substráty
NTCP	bromosulfoftalein, žlučové kyseliny, estron-3-sulfát, trijodtyronin, tyroxin
OAT2	prostaglandin E2, F2 α
OCT1	acetylcholin, progesteron
Oatp1a1	bromosulfoftalein, žlučové kyseliny, estron-3-sulfát, estron-1-sulfát, leukotrien C4, estradiol-17 β glukuronid, bilirubin glukuronid, trijodtyronin, tyroxin
Oatp1a4	žlučové kyseliny, estron-3-sulfát, estron-1-sulfát, estradiol-17 β glukuronid, trijodtyronin, tyroxin
Oatp1b2	bromosulfoftalein, taurocholát, estron-3-sulfát, estron-1-sulfát, leukotrien C4, bilirubin glukuronid, trijodtyronin, tyroxin

2.2.2. ABC transportéry

Exkrece metabolitů xenobiotik i endogenních látek do žluče se uskutečňuje především pomocí jednosměrných ATP-dependentních transportérů. Tyto efluxní pumpy patří do rodiny ABC přenašečů. Ačkoli se většina zástupců této skupiny nachází na kanalikulární membráně hepatocytů, mnoho ABC transportérů se nalézá i na membráně bazolaterální a pumpují své substráty zpět do plazmy (19). Přehled endogenních substrátů ABC transportérů se nachází v Tab. 2.

Do rodiny ABC transportérů patří podrodina MRP („Multidrug resistance-associated proteins“; ABCC) proteinů. V současné době je známo 9 přenašečů patřících do této skupiny. Přenáší mnoho organických anionických sloučenin, většinou vázaných na glutathion, kyselinu glukuronovu nebo sulfát (19). Nejvýznamnějším jaterním přenašečem MRP podrodiny je **MRP2** („Multidrug resistance-associated protein 2“; ABCC2) transportér. Je lokalizován na kanalikulární membráně hepatocytů a dále např. v ledvinách, tenkém střevě nebo močovém měchýři. Jeho endogenními substráty jsou amfifilní anionty, např. bilirubin-glukuronid nebo leukotrien C₄. V játrech se MRP2 přenašeč podílí na tvorbě žluče, která je nezávislá na sekreci žlučových kyselin (26).

MRP1 („Multidrug resistance-associated protein 1“; ABCC1) transportér se nachází na bazolaterální membráně hepatocytů a přenáší konjugáty s glutationem, např.

leukotrien C₄ (9). Dalším významným zástupcem rodiny MRP je **MRP3** („Multidrug resistance-associated protein 3“; ABCC3), který je exprimován také na bazolaterální membráně. Je zodpovědný za exkreci žlučových kyselin a dalších organických aniontů do sinusoidální krve (10). **MRP4** („Multidrug resistance-associated protein 4“; ABCC4) a **MRP5** („Multidrug resistance-associated protein 5“; ABCC5) jsou opět transportéry bazolaterální membrány. Mají podobné substráty, které zahrnují např. cyklické nukleotidy či konjugované žlučové kyseliny (10) (11). **Mrp6** („Multidrug resistance-associated protein 6“; ABCC6) protein je exprimován na bazolaterální i kanalikulární membráně hepatocytů a podílí se na exkreci organických aniontů (11).

BSEP („Bile salt export pump“; ABCB11) je ABC transportér lokalizovaný na kanalikulární membráně hepatocytů. Zajišťuje eflux konjugovaných monovalentních žlučových kyselin do žluče (15). Transport žlučových kyselin přes kanalikulární membránu je rozhodujícím krokem limitujícím rychlost enterohepatální cirkulace a generuje tok žluče (16). BSEP transportér se vyskytuje pouze v játrech (27).

Na kanalikulární membráně hepatocytů se dále nachází přenašeč **MDR1** (P-glykoprotein; ABCB1) (11). Tento transportér se vyskytuje v mnoha tkáních, kde plní ochrannou a exkreční funkci. Primárně přenáší kationické sloučeniny, avšak má širokou substrátovou specifitu (19). **MDR3** („Multidrug resistance protein 3“; ABCB4) transportér kanalikulární membrány funguje jako translokátor fosfolipidů (11).

BCRP („Breast cancer resistance protein“; ABCG2) protein je dalším z transportérů kanalikulární membrány a kromě jater se nachází v placentě nebo tlustém střevě. Do žluče přenáší zejména konjugované steroidy a xenobiotika (11).

Tab. 2. Přehled endogenních substrátů vybraných transportérů z rodiny ABC (9) (11).

Transportér	Substráty
MRP2	bilirubin glukuronid, leukotrien C ₄
MRP4	cAMP, cGMP, konjugáty žlučových kyselin
BSEP	konjugované a nekonjugované žlučové kyseliny
MDR1	steroidní hormony
MDR3	fosfolipidy
BCRP	estron sulfát, kyselina listová

2.3. Cholestáza

Cholestáza je definována jako porucha tvorby a vylučování žluče či jako neschopnost organismu dodat do duodena žluč v dostatečném množství a složení (2c). Může být také označena jako mechanická nebo funkční blokáda toku žluče v intrahepatálním nebo extrahepatálním žlučovodu s návratem žlučových kyselin do krve (3d). Cholestáza vede k hromadění komponent žluči v játrech (stáza žlučových kyselin, bilirubinostáza) a poté k jejich kumulaci v séru a k nízké sekreci žluče do střeva (2c). To má za následek dysfunkce CNS (pruritus, únava), ikterus nebo malabsorpci živin a vitaminů (A, D, E, K) vedoucí až k osteopenii (28). Biochemicky se cholestáza projeví zvýšením sérových hladin alkalické fosfatázy (ALP), γ -glutamyltransferázy (GMT), 5' nukleotidázy a cholesterolu (29). Dalšími markery jaterních funkcí jsou sérové hladiny alanin-aminotransferázy (ALT) a aspartát-aminotransferázy (AST) (30). Řada cholestatických změn je zpočátku vratná, při déletrvající cholestáze však onemocnění progreduje a dochází k ireverzibilnímu poškození jater až k jejich selhání (2c).

Cholestázu můžeme dělit na akutní (např. při sepsi) a chronickou (např. primární biliární cirhóza); na ikterickou a anikterickou apod. Podle lokalizace příčiny poruchy lze rozdělit cholestázu na **intrahepatální**, je-li příčina v játrech, a **extrahepatální**, pokud se příčina vyskytuje mimo játra, nejčastěji ve žlučovodu. Většinu výskytu cholestáz tvoří cholestázy extrahepatální, zejména maligní onemocnění s až 50 %, následuje cholelitiáza. Další častou příčinou cholestázy jsou septické stavy, iatrogenní cholestázy (5–10 %) a virové a autoimunitní hepatitidy (5–7 %) (2c). Vyskytnout se mohou i kombinované formy extrahepatální a intrahepatální cholestázy (29).

2.3.1. Obstrukční cholestáza

Obstrukční cholestázu způsobuje mechanická překážka v toku žluče. Z tohoto důvodu je odtok žluče redukován a vzniká její stáza. V závislosti na umístění překážky tato stáza ovlivňuje celá játra, nebo pouze jejich část. Tok žluče může být přerušen intraluminální překážkou (např. cholelitiáza), onemocněním stěn žlučovodu nebo kompresí (3d). Obstrukční cholestáza trvající 28 dnů se u experimentálních zvířat již označuje jako sekundární biliární cirhóza (31). Při obstrukční cholestáze často zpočátku chybí žloutenka, která se vyskytne až později (3d). Důležitým rysem cholestázy u člověka i experimentálních zvířat je zánět. Mezi projevy zánětu při obstrukční

cholestáze patří edém a fibróza portobiliárního prostoru, proliferace buněk epitelu žlučových a infiltrace neutrofilů do portobiliárního prostoru (32). I v případech totální obstrukce žlučových nedochází k úplnému zastavení sekrece žluče díky reziduální funkci hepatocytů. Těsné spoje totiž do jisté míry zajišťují jakousi intrahepatální cirkulaci žlučových kyselin (3d). Vybrané příčiny obstrukční cholestázy jsou zobrazeny v Tab. 3.

Tab. 3. Vybrané příčiny obstrukční cholestázy (3d).

Obstrukce v oblasti Vaterovy papily	
- zánět	- cysta
- cholelitiáza	- parazit
- zjizvení	- adenom
- duodenální divertikly	
Obstrukce v oblasti žlučového	
- cholelitiáza	- duodenální divertikl
- pooperační zúžení	- parazit
- karcinom pankreasu	- krvácení do žlučových cest
- pankreatitida	- neprůchodnost žlučníku
- cysty	- papilomatóza

Obstrukce žlučového kamenu (**cholelitiáza**) je jedním z nejčastějších onemocnění gastrointestinálního traktu. Většina žlučových kamenů je tvořena cholesterolem, existují ale i tzv. „pigmentové kaménky“, které obsahují sloučeniny bilirubinu (33). Příčinou cholelitiázy může být např. nadměrný obsah cholesterolu nebo bilirubinu ve žluči, hypomotilita žlučníku či dysbalance promotorů (např. IgG, IgM a haptoglobin) a inhibitorů (např. IgA a apolipoprotein A-1) krystalizace (34).

2.3.2. Intrahepatální cholestáza

Intrahepatální cholestáza může mít mnoho příčin. Primárně se jedná o poruchu metabolismu nebo transportu žlučových kyselin s různým místem působení. Příčina vyvolání intrahepatální cholestázy není známá, ve výskytu tohoto onemocnění je značná interindividuální variabilita (3d). Přehled vybraných příčin intrahepatální cholestázy zobrazuje Tab. 4.

Tab. 4. Hlavní příčiny intrahepatální cholestázy u dospělých (2c).

- primární biliární cirhóza
- primární a sekundární sklerózující cholangitida
- cholestáza při sepsi
- alkoholická cholestáza
- polékové a toxické cholestázy
- intrahepatální cholestáza těhotných
- cholestáza při celkové parenterální výživě
- cholestatické formy infekčních hepatitid
- cholestáza při infiltraci nádorovými buňkami
- dědičné cholestatické syndromy

2.3.2.1. Primární biliární cirhóza (PBC)

PBC je chronické autoimunitní onemocnění jater. Cílem autoprotilátek jsou buňky interlobulárních žlučovodů, které takto podléhají apoptóze a následně se rozvíjí cholestáza. Bez léčby vede PBC zpravidla k cirhóze nebo selhání jater po 10–20 letech (35).

2.3.2.2. Primární sklerózující cholangitida (PSC)

PSC je chronické a progresivní zánětlivé onemocnění, vedoucí k obliteraci žlučovodu a tedy k cholestáze. Příčina PSC je stále neznámá, nicméně její vznik je asociován s ulcerózní kolitidou, Crohnovou nemocí i autoimunitní hepatitidou. Na PSC je tedy nahlíženo jako na autoimunitní poruchu (36).

2.3.2.3. Cholestáza při sepsi

Intrahepatální cholestáza často doprovází sepsi (1–34 %). Bývá způsobena bakteriálními endotoxiny gramnegativních bakterií, které pomocí indukce prozánětlivých působků (IL-1, IL-6, TNF- α) snižují expresi jaterních transportérů žlučových kyselin a bilirubinu. Jedná se o sníženou expresi MRP2, ale i NTCP a BSEP proteinu (2c).

2.3.2.4. Alkoholická cholestáza

Při alkoholem navozené cholestáze se setkáváme s podobnou etiologií, neboť bývá doprovázena endotoxémií, velmi často střevního původu. Ta spolu s alkoholem

vede k aktivaci Kupfferových buněk a tím opět ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů. Alkohol sám navíc může inhibovat transportéry žlučových kyselin na kanalikulární membráně (2c).

2.3.2.5. Léčivý navozená cholestáza

Řada léčiv může vyvolat poškození jater, zejména žlučvodů. Právě cholestáza je mnohdy projevem hepatotoxicity některých léčivých látek. Izolovaná cholestáza se v těchto případech vyskytuje relativně vzácně, např. u jedinců citlivých na steroidní hormony. Daleko častěji se objevuje cholestáza kombinovaná s hepatitidou (37). Poléková cholestáza může mít akutní i chronický průběh. Akutní cholestázu může vyvolat např. kyselina klavulánová či erytromycin, chronický průběh je častější u chlorpromazinu. Kombinovaná cholestáza s hepatitidou je projevem hepatotoxicity např. fenytoinu nebo sulfonamidů (38). Vybrané léčivé látky spojené s výskytem cholestázy se nachází v Tab. 5.

Tab. 5. Vybraná léčiva podílející se na poškození žlučvodů (37).

Léčivo	Akutní poškození žlučvodů	Chronické poškození žlučvodů
Allopurinol	+	-
Amitryptilin	+	+
Ampicilin	+	+
Ciprofloxacin	+	-
Disufiram	+	-
Fenofibrát	-	+
Glibenklamid	+	-
Ibuprofen	-	+
Imipramin	-	+
Karbamazepin	+	+
Kyselina klavulánová	+	-
Sulindak	+	-
Tiklopidin	+	-

2.3.2.6. Intrahepatální těhotenská cholestáza

Během těhotenství jsou funkce jater ovlivněny zvýšenými sérovými hladinami estrogeneru a progesteronu, což je spojeno s mnoha fyziologickými změnami, které mohou imitovat poruchu jater, avšak zvýšená hladina žlučových kyselin a bilirubinu v krvi je vždy patologická. Intrahepatální těhotenská cholestáza („Intrahepatic cholestasis of pregnancy“, ICP) je nejčastější jaterní onemocnění vyskytující se výhradně u těhotných (39). Objevuje se v průběhu druhého nebo třetího trimestru (40). Příčina ICP je stále neznámá, patogeneze může být spojena s abnormalitami v metabolismu a dispozici pohlavních hormonů a žlučových kyselin podmíněnými genetickou predispozicí (39). Hlavním symptomem ICP je úporný pruritus, který se zhoršuje v noci a mizí spontánně během pár dní po porodu. Je často generalizovaný, ale převažuje na dlaních a chodidlech. Rizikem pro plod je předčasný porod i intrauterinní smrt (40).

2.3.3. Farmakoterapie

2.3.3.1. Ursodeoxycholová kyselina (UDCA)

UDCA je hydrofilní žlučová kyselina, která se fyziologicky nachází ve žluči jen v minimálním množství. Její příznivý efekt byl prokázán např. u PBC, PSC, ICP nebo polékových cholestáz. Hlavní mechanismus účinku UDCA spočívá ve zvýšení obsahu hydrofilních žlučových kyselin ve žluči. Následně dochází k menšímu poškození epitelu žlučových cest, ke snížení retence žlučových kyselin v hepatocytech a k inhibici apoptózy. UDCA dále zvyšuje expresi transportérů BSEP, MDR3 a MRP2 (2c). Důležitým mechanismem účinku je také agonistické působení na nukleární receptory PXR („Pregnane X receptor“) a FXR („Farnesoid X receptor“). Aktivace těchto receptorů snižuje tvorbu žlučových kyselin, indukuje jejich hydroxylaci a konjugaci, stimuluje export alternativních žlučových kyselin a v neposlední řadě redukuje import žlučových kyselin do hepatocytů (41). Vzhledem k často celoživotní léčbě je výhodné, že podávání UDCA nemá závažné vedlejší účinky (2c).

2.3.3.2. Rifampicin

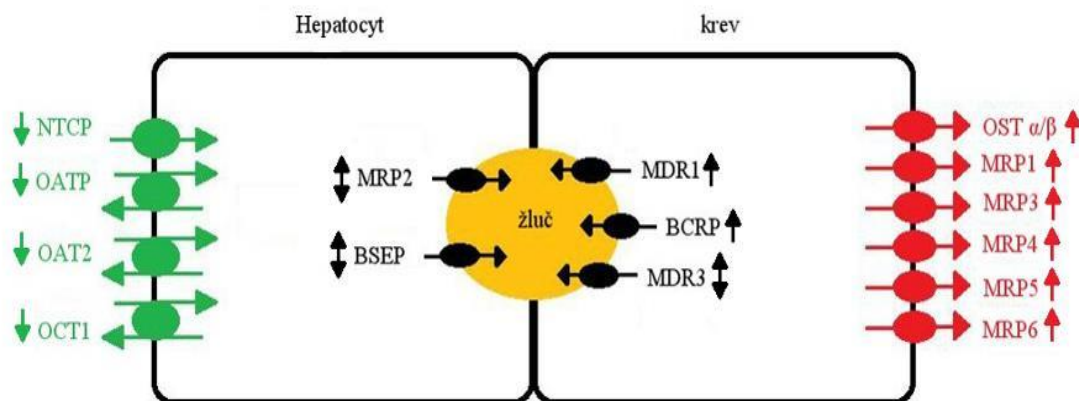
Rifampicin vystupuje jako agonista jaderného receptoru PXR a tím zvyšuje expresi MRP2 transportéru. Dále blokuje syntézu žlučových kyselin inhibicí CYP7A1 a zvyšuje exkreci konjugovaných žlučových kyselin močí. Léčba Rifampicinem je většinou dobře snášena, ovšem při dlouhodobé léčbě existuje riziko hepatotoxicity (2c).

2.3.3.3. Další agonisté jaderných receptorů

Využití agonistů jaderných receptorů v léčbě cholestázy se jeví jako velmi perspektivní. Atorvastatin je agonistou PXR receptoru, a proto se kromě své obvyklé indikace dá použít i v terapii cholestázy. Stejně tak fibráty, které jsou agonisté PPAR- α receptoru („Peroxisome proliferator-activated receptor α “). Fibráty snižují cholestatickou zánětlivou reakci a působí cholereticky díky zvýšení exprese MDR3 proteinu (2c). Protože všechny důležité transportní kroky v enterohepatální cirkulaci žlučových kyselin podléhají regulaci FXR receptoru, byli vyvinuti jeho silní agonisté, např. kyselina 6-ethylchenodeoxycholová, jakožto potenciální léčiva (42).

2.4. Transportní systémy a cholestáza

Mnoho zvířecích i lidských experimentálních modelů cholestázy vykazuje podobné rysy adaptivní odpovědi zahrnující změny v expresi transportérů. Tato odpověď má za úkol chránit hepatocyty před hromaděním toxických komponent žluči (bilirubin, žlučové kyseliny). Adaptivní změny zahrnují down-regulaci bazolaterálních přenašečů pro uptake a up-regulaci bazolaterálních efluxních transportérů (Obr. 4.). Tímto způsobem udržují hepatocyty intracelulární koncentraci vnitřních metabolitů na bezpečné, nízké úrovni (4). Adaptivní změny jsou koordinovány nukleárními receptory (zejména PXR, FXR), které jsou aktivovány žlučovými kyselinami či bilirubinem (43). Změny v regulaci transportérů doprovází i represe enzymů syntézy žlučových kyselin (CYP7A1, CYP8B1) a indukce enzymů (např. CYP3A4, CYP2B6, sulfotransferáza), které žlučové kyseliny transformují na metabolity, které se následně vyloučí ledvinami (hydroxylace, sulfatace a glukuronidace) (4). Tato adaptivní odpověď není omezena pouze na tkáň jater, ale objevuje se i v epitelu střev a ledvin. Adaptivní změny jsou bohužel příliš slabé, aby plně zabránily cholestatickému poškození jater. Toto může být částečně způsobeno faktem, že poškození jater cholestázou snižuje expresi a funkci jaderných receptorů. Adaptivní odpověď může být posílena některými léčivy cílenými na nukleární receptory (např. kyselina 6-ethylchenodeoxycholová, rifampicin) (43).



Obr. 4. Změny exprese jaterních transportérů. Převzato a upraveno z (13).

2.4.1. Změny v expresi SLC transportérů

Adaptační změny v expresi transportních systémů hepatocytů při obstrukční cholestáze byly rozsáhle studovány pomocí modelu CBDL („Common bile duct ligation“; podvaz žlučovéhoodu) na potkaních (44). Tento model je používán jako model sekundární biliární cirhózy, kdy po 28 dnech nastane nevratné poškození jater (31). Důležitým obranným krokem je down-regulace transportéru NTCP jako prevence uptake žlučových kyselin do hepatocytu. Kumulace žlučových kyselin aktivuje FXR receptor a následně vede k represí NTCP přenašeče (43). Transkripce transportérů *Oatp1a1*, *Oatp1a4* a *Oatp1b2* byla při mnoha experimentech na zvířecích modelech cholestázy také snížena, z obdobného důvodu (4) (45). Lidské OATP transportéry jsou při cholestáze exprimovány odlišně. Zatímco exprese OATP1B1 přenašeče je při PSC snížena, exprese OATP1B3 transportéru je zvýšenou hladinou žlučových kyselin indukována, patrně z důvodu udržení jaterního odsunu xenobiotik během cholestázy. Obdobně exprese OATP1A2 přenašeče zůstává nezměněna nebo zvýšena při PSC (15). Žlučové kyseliny pomocí FXR jaderného receptoru dále indukují i expresi OST α/β přenašeče (15) (43).

2.4.2. Změny v expresi ABC transportérů

Expres hlavního transportéru pro žlučové kyseliny do žluče, BSEP, je při obstrukci žlučových cest zachována a může omezit rozsah jaterního poškození. Na druhou stranu zvýšený tok žluče při totální obstrukci žlučovéhoodu může poruchu ještě zhoršit (13) (43). Expres transportérů MRP3/Mrp3 a MRP4/Mrp4 je zvýšena a umožňuje eflux žlučových kyselin z cholestatických hepatocytů (13) (43). MRP2 je

transportérem, u něhož byla prokázána down-regulace u všech forem cholestázy (26). Snížená sekrece organických aniontů na kanalikulární membráně pravděpodobně způsobuje kompenzační zvýšení exprese MRP3 přenašeče na bazolaterální membráně, který je transportuje zpět do krve (26). MDR1 přenašeč je při cholestatických onemocněních indukován, což bylo potvrzeno i na zvířecích modelech (17).

3. ZADÁNÍ PRÁCE - CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo potvrzení cholestatického poškození jater u potkanů s podvazem žlučovodu v trvání 28 dnů pomocí biochemické analýzy séra a analýzy exprese transportních proteinů pro uptake látek v hepatocytech (Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2 a Oat2) na úrovni mRNA a proteinu.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Metodika

4.1.1. Chemikálie

Primární králičí polyklonální protilátky anti-Oatp1a4 a anti-Oatp1a1 zaměřené na detekci Oatp1a4 (75 kDa) a Oatp1a1 (80 kDa) byly získány od Millipore (Billerica, MA, USA), anti-Oat2 zaměřená na detekci Oat2 proteinu byla zakoupena od LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA, USA) a anti-Ntcp pro detekci Ntcp (51 kDa) byla zakoupena od Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA). Primární kozí polyklonální protilátka anti-Oatp1b2 pro detekci Oatp1b2 (85 kDa) byla pořízena od Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA). Jako endogenní kontrola pro Western blot byla zakoupena myší polyklonální protilátka β -actin (42 – 45 kDa) od Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Křenovou peroxidázou značená sekundární protilátka (oslí protilátka proti králičímu IgG a ovčí protilátka proti myšimu IgG) byla zakoupena od GE Healthcare (Praha, ČR). Sekundární křenovou peroxidázou značená králičí protilátka proti kozímu IgG byla získána z Pierce Biotechnology (Rockford, USA). Provozní materiál a ostatní chemikálie byly zakoupeny od firem Bio-Rad Laboratories (Herkules, CA, USA) a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.1.2. Pokusná zvířata

Pro experiment byli použiti potkani kmene Wistar (SPF, Anlab, Praha, Česká republika) o počáteční hmotnosti 280-320 g. Potkani byli rozděleni do dvou skupin:

- **Sham** (kontrolní skupina sham-operovaných zvířat; n = 6)
- **BDO** (zvířata s obstrukcí žlučovodu v trvání 28 dnů; n = 6)

Podstatou *in vivo* experimentu bylo navození obstrukční cholestázy v trvání 28 dnů (sekundární biliární cirhózy) u laboratorních potkanů, u kterých bylo cholestatické poškození jater navozeno obstrukcí žlučovodu implantovanou zaslepenou sondou vyvedenou do podkoží břišní stěny (BDO skupina). Kontrolní skupina zvířat prodělala pouze sham operaci bez obstrukce (skupina Sham) za stejných podmínek. Zvířata byla v průběhu operace v celkové anestézii, která byla indukována podáním pentobarbitalu jednorázově v dávce 50 mg/kg i.p. Zvířata byla po skončení experimentu usmrcena exsanguinací, játra byla okamžitě vyjmuta, zchlazena tekutým dusíkem a uložena při -80 °C.

Během experimentu byla zvířata ustájena v Centrálním viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (světelný režim 12 hod světlo + 12 hod tma,

teplota vzduchu 22 ± 2 °C). Všechny experimenty byly schváleny etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a provedeny v souladu s pokyny danými vyhláškou č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

4.1.3. Biochemická analýza

Koncentrace bilirubinu a aktivita ALT, AST, ALP a GMT v séru byla měřena na Gerontologické a metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové pomocí Cobas Integra[®] 800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) podle instrukcí výrobce. Vzorky séra byly získány ze vzorků krve, odebraných z břišní aorty pokusných zvířat, které se nechaly 30 minut odstát, aby mohlo dojít ke koagulaci krve a oddělení séra. Vzorky se dále centrifugovaly (3000 rpm, 10 min) a následně byly zamraženy při -80 °C. Za použití komerčního kitu (Diazyme, Poway, USA) byla spektrofotometricky stanovena koncentrace žlučových kyselin. Postup byl následující: do plastové zkumavky bylo nejprve napipetováno 810 μ l reagentie R1 (37 °C) a 12 μ l vzorku. Po třech minutách bylo ke směsi přidáno 270 μ l reagentie R2, směs byla promíchána a ihned změřena její absorbance.

4.1.4. qRT-PCR

Genová exprese Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2 a Oat2 mRNA byla stanovena metodou qRT-PCR pomocí Applied Biosystems 7500 HT Fast Real-Time PCR systému (Foster City, USA). RNA byla izolována ze vzorků jater za použití TRI reagentu (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) na přístroji QIAcube (QIAGEN, USA). Měřením absorbance při 260 nm za použití NanoDrop ND-1000 spektrofotometru (BioTech a.s., ČR) byla stanovena přesná koncentrace RNA a také čistota RNA poměrem absorbance při 260 a 280 nm. RNA byla poté přepsána do cDNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcriptin KITu (Applied Biosystems, Foster City, USA). Reakční směs obsahovala 50 ng analyzované DNA. Amplifikace každého vzorku byla provedena v triplikátech pomocí TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mixu a Taq-Man[®] Gene Expression Assay mixu pro Ntcp (Slc10a1, Rn00566894_ml), Oatp1a1 (Slco1a1, Rn00755148_ml), Oatp1a4 (Slco1a4, Rn00756233_ml), Oatp1b2 (Slco1b2, Rn00668623_m1) a Oat2 (Slc22a7, Rn00585513_m1), vše zakoupeno od Applied Biosystems (Foster City, USA). Použitý teplotní profil ve „fast“ modu byl: 95 °C a 3 min; 40 cyklů: 95 °C a 7 s, 60 °C a 25 s. Pro normalizaci byly vybrány 2 referenční geny za použití geNorm (46), GAPDH (4352338E, Applied Biosystems, Foster City,

USA) a Ywhaz (GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, ČR). Expze každého vzorku byla vypočítána podle již dříve popsáního postupu (47). Nejdříve byla data normalizována geometrickým průměrem expze GAPDH („Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase“) a Ywhaz („Tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide“). Následně byla stanovena relativní expze genů mezi kontrolní a cholestatickou skupinou porovnáním normalizovaných dat.

4.1.5. Western blot

Vzorky jater byly připraveny podle již dříve publikovaného postupu (45). Nejdříve byla játra (200 mg) homogenizována ve vychlazeném pufru (1 ml) 10 mmol/l Tris–HCl, 250 mmol/l sukrosa, pH 7.6, který obsahoval inhibitory proteáz: 0.5m g/ml leupeptinu, 0.5m g/ml pepstatinu a 2m g/ml aprotininu pomocí homogenizátoru MagNA Lyser (Roche Diagnostics GmbH, Německo) 2 × 15 s při 6500 rpm. Centrifugací homogenátů (3000 g, 4 °C, 10 min) byl získán supernatant, ve kterém byla určena koncentrace celkového proteinu BCA metodou (BCA Protein Assay kit, Pierce, Rockford, IL, USA) a vzorky byly uskladněny při teplotě -80 °C.

Inkubace homogenátů (100 µg proteinu na jamku) se vzorkovým pufrem (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) probíhala při pokojové teplotě po dobu 30 minut a následovala separace v SDS-PAGE polyakrylamidovém gelu o koncentraci 7,5 %. Poté, co byly proteiny přeneseny na polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu (GE Healthcare, Praha, ČR), byla membrána po dobu jedné hodiny blokována laktoglobuliny v 5 % roztoku odtučněného mléka v TRIS pufru (0,05 % Tween 20) (TBST). Membrány byly inkubovány s primární protilátkou v následujících koncentracích: anti-Oatp1a1 a anti-Oatp1a4 při 1 : 5000, anti-Oatp1b2 při 1:1000, anti-Oat2 při 1:2500 a anti-Ntcp při 1 : 300. Po vymytí membrány v roztoku TBST byla membrána inkubována se sekundární protilátkou opět jednu hodinu v následujících koncentracích: oslí protilátka proti králičímu IgG 1 : 5000 pro anti-Oatp1a1 a anti-Oatp1a4, 1:3000 pro anti-Ntcp a anti-Oat2, králičí protilátka proti kozímu IgG při koncentraci 1 : 5000 pro anti-Oatp1b2. Membrána byla poté vymyta v TBST a byla provedena detekce přidáním chemiluminiscenčního činidla (ECL kit, Amerham-Pharmacia, Buckinghamshire, Velká Británie). Expozicí filmu získaný obraz (Hyperfilm, Amerham-Pharmacia, Buckinghamshire, Velká Británie) byl kalibrovaným denzitometrem ScanMaker i900 (UMAX, Praha, ČR) naskenován a kvantifikován s použitím softwaru QuantityOne

(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Jako endogenní kontrola byl stanoven β -actin (koncentrace 1 : 5000, koncentrace sekundární ovčí protilátky proti myšímu IgG 1 : 8000).

4.1.6. Statistická analýza

Experimentální data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro 6 zvířat v každé skupině. Statistické hodnocení výsledků bylo provedeno nepárovým t-testem pomocí GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, Kalifornie, USA). Za statisticky významnou byla považována hodnota $p < 0,05$.

4.2. Výsledky

4.2.1. Biochemická analýza

Výsledky biochemické analýzy séra u kontrolní (Sham) i experimentální (BDO) skupiny zvířat shrnuje tabulka 6. Všechny sledované parametry byly u zvířat s obstrukcí žlučovodu statisticky významně zvýšeny oproti kontrolní skupině. Nejvýraznější nárůst sérových hladin byl zaznamenán u žlučových kyselin a bilirubinu. Hladina žlučových kyselin vzrostla u BDO skupiny zvířat na 454 %, hladina celkového bilirubinu na 4111 % a hladina konjugovaného bilirubinu na 7313 % v porovnání s kontrolní skupinou. Další specifické markery cholestázy byly v séru BDO zvířat v porovnání s kontrolní skupinou také významně zvýšeny – aktivita alkalické fosfatázy (ALP) na 238 % a γ -glutamyltransferázy (GMT) na 2826 %. Markery jaterních funkcí měly v séru pokusné skupiny zvířat rovněž zvýšenou aktivitu – aktivita alanin-aminotransferázy (ALT) byla zvýšena na 1200 % a aspartát-aminotransferázy (AST) na 1387 % v porovnání s kontrolní skupinou.

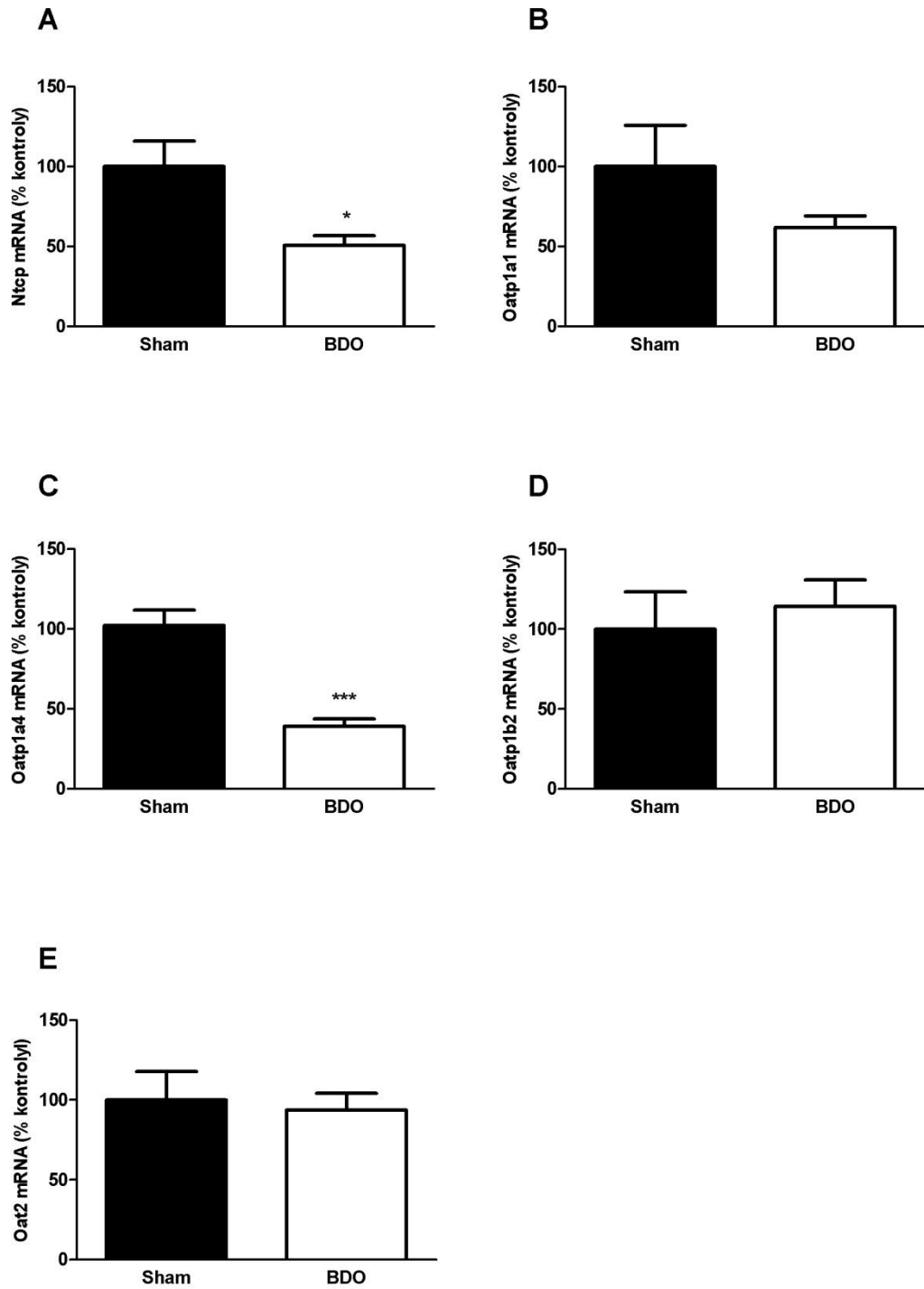
Tab. 6. Biochemická analýza séra.

	Sham	BDO
Bilirubin (μmol/l)	1,8 ± 0,31	74 ± 14***
Konj. bilirubin (μmol/l)	0,67 ± 0,33	49 ± 11**
Žlučové kyseliny (μmol/l)	5,5 ± 0,65	25 ± 5,2***
ALT (μkat/l)	1,0 ± 0,30	12 ± 3,5*
AST (μkat/l)	3,1 ± 0,60	43 ± 14*
ALP (μkat/l)	1,3 ± 0,16	3,1 ± 0,42**
GMT (μkat/l)	0,023 ± 0,013	0,65 ± 0,20*

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr hodnot ± SEM (n = 6 v každé skupině); Sham, kontrolní skupina zvířat; BDO, skupina zvířat s obstrukcí žlučovodu; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

4.2.2. qRT-PCR

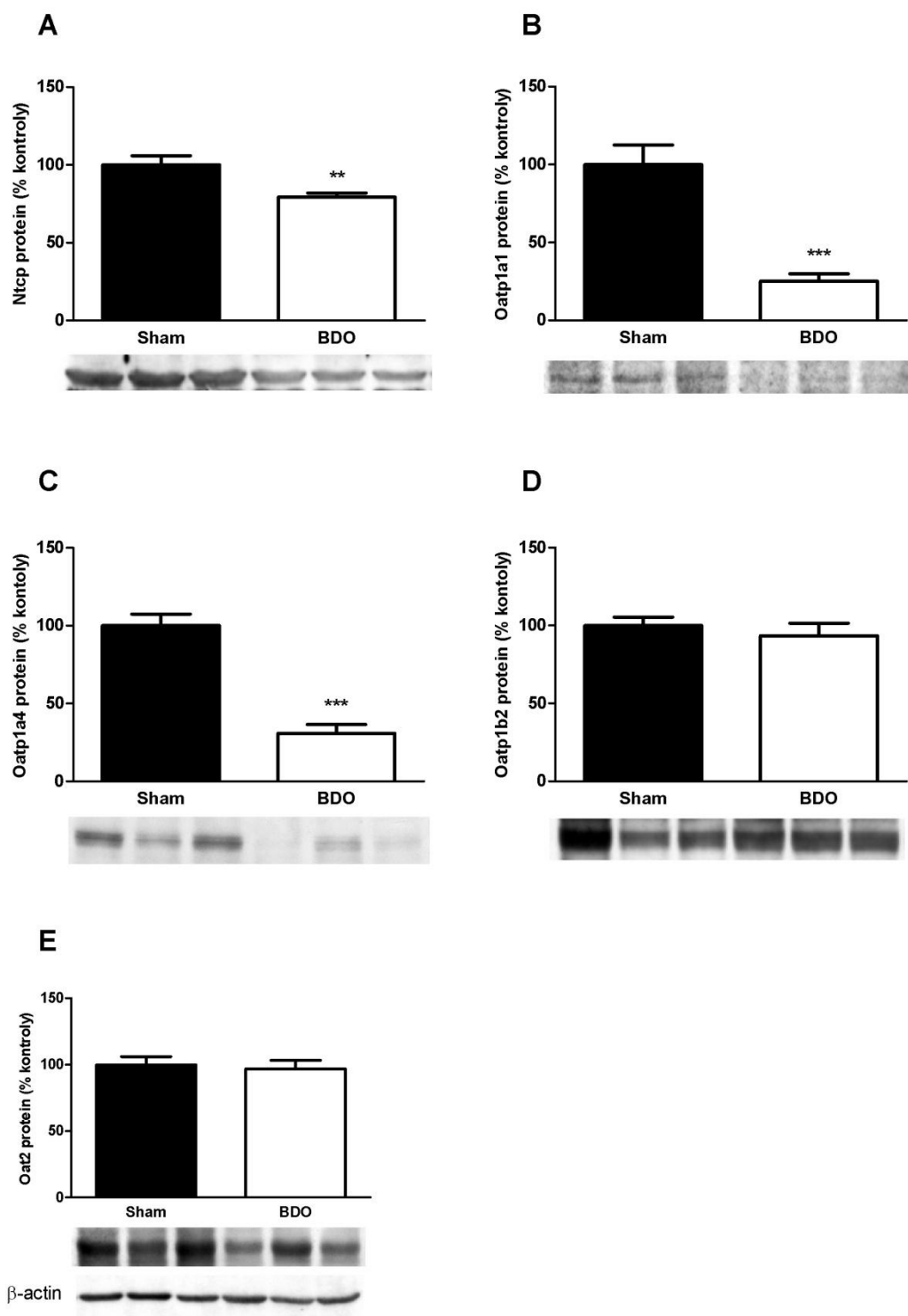
Výsledky PCR analýzy RNA zobrazuje obrázek 5. Statisticky významné snížení hladiny mRNA na 51 % u BDO skupiny zvířat bylo zjištěno u Ntcp transportéru. Současně byla významně snížena také hladina Oatp1a4 mRNA na 38 % u BDO zvířat. U ostatních bazolaterálních přenašečů – Oatp1a1, Oatp1b2 a Oat2 – nebyla prokázána signifikantní změna hladiny mRNA u BDO skupiny zvířat oproti Sham skupině.



Obr. 5. Grafické znázornění výsledků qRT-PCR analýzy Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2 a Oat2 transporérů. Sham, kontrolní skupina zvířat; BDO, skupina zvířat s obstrukcí žlučovodu; data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM (n = 6 v každé skupině); * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

4.2.3. Western blot

Výsledky exprese vybraných bazolaterálních přenašečů stanovených metodou Western blotu souhrnně zobrazuje obrázek 6. K nejvýznamnějšímu snížení exprese proteinu u zvířat s obstrukcí žlučového došlo u transportéru Oatp1a1 a to až na 25 % oproti kontrolní skupině. Exprese Oatp1a4 proteinu byla u BDO skupiny snížena na 31 % a exprese Ntcp proteinu snížena na 79 % oproti Sham skupině zvířat. Změna exprese Oatp1b2 a Oat2 proteinů nebyla prokázána.



Obr. 6. Grafické znázornění výsledků Western blot analýzy Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2 a Oat2 transportérů. Sham, kontrolní skupina zvířat; BDO, skupina zvířat s obstrukcí žlučovodu; data jsou vyjádřena jako \pm SEM ($n = 6$ v každé skupině); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Reprezentativní obrázky Western blotu jsou zobrazeny pod příslušnými grafy s denzitometrickou analýzou dat (kontrola = 100 %).

5. DISKUZE

Mezi důležité funkce jater patří tvorba a sekrece žluči. Ta má v organismu dvě základní funkce: představuje exkreční cestu pro látky, které nemohou být vyloučeny ledvinami, a má podíl na trávení a vstřebávání tuků (2c).

Sekrece žluči závisí za fyziologických podmínek na funkci membránových přenašečů a na strukturální a funkční integritě hepatobiliárního systému.

Jako cholestáza je označován stav, kdy dochází ke stagnaci toku žluče. Obstrukční cholestáza je obvykle způsobena obstrukcí na úrovni extrahepatálních žlučových cest (29). Nárůst cholestatických onemocnění v posledních letech doprovází také rozvoj poznatků týkajících se mechanismu tvorby žluče či molekulární patobiochemie cholestázy (2c). Experimentální zvířecí modely umožňují pochopení patofyziologických mechanismů, které se na cholestáze podílejí, a implementaci těchto poznatků do klinické roviny (29).

Na základě poznatků z těchto studií byla popsána adaptivní odpověď organismu na cholestázu, která zahrnuje změny v expresi jaterních transportérů. Tato odpověď chrání hepatocyty před hromaděním toxických látek – žlučových kyselin a bilirubinu. Adaptivní změny zahrnují down-regulaci přenašečů bazolaterální membrány pro uptake, up-regulaci transportérů apikální membrány a up-regulaci efluxních přenašečů na bazolaterální membráně (4) (44).

Mezi nejvýznamnější jaterní transportéry pro uptake látek patří NTCP protein. Tento Na^+ -dependentní protein přenáší do hepatocytů mimo jiné konjugované a nekonjugované žlučové kyseliny. Je lokalizován na bazolaterální membráně hepatocytů. Tamtéž jsou umístěny i OAT2 transportéry, které mohou zajišťovat obousměrný přenos substrátů, například prostaglandinů. Další skupinou transportérů bazolaterální membrány jsou OCT transportéry, které přenáší malé organické kationty (11). V neposlední řadě patří mezi transportéry pro uptake skupina OATP proteinů. Spektrum jejich substrátů je široké, zahrnuje také žlučové kyseliny a bilirubin (9).

Diplomová práce byla zaměřena na ověření cholestatického poškození jater potkanů s podvazem žlučovodu v trvání 28 dnů pomocí biochemické analýzy séra a sledováním změn exprese jaterních transportérů pro uptake – Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2 a Oat2.

Výsledky biochemické analýzy séra zvířat s obstrukcí žlučovodu potvrdily, že byla navozena biliární cirhóza. Všechny sledované parametry – hladiny bilirubinu, žlučových kyselin a aktivita ALT, AST, ALP a GMT byly statisticky významně

zvýšeny. Zvýšení aktivity jaterních enzymů ALT, AST a ALP je citlivým markerem jaterního poškození (31). Zvýšená aktivita GMT rovněž poukazuje na poškození jater, navíc je doprovázena zvýšenou aktivitou ALP (48). Nejpoužívanějším biochemickým testem pro určení cholestázy je stanovení aktivity ALP v séru. Za fyziologických podmínek je tento enzym vychytáván hepatocyty a sekretován do žluče, a proto obstrukce žlučového vede ke zvýšení aktivity ALP v krvi. ALP je spolu s GMT jedním z nejcitlivějších markerů cholestázy (49).

V této práci byla pozorována snížená exprese Ntcp na úrovni mRNA i proteinu. Mezi hlavní substráty tohoto transportéru patří žlučové kyseliny, které se při obstrukční cholestáze hromadí v hepatocytech a aktivují FXR receptor, což následně vede k snížení exprese Ntcp přenašeče (43) (50). Tato změna je součástí anticholestatické obranné reakce organismu.

Podobně jako u Ntcp proteinu byla pozorována snížená exprese také Oatp1a4 transportéru na úrovni mRNA i proteinu. Oatp1a4 rovněž vychytává žlučové kyseliny do hepatocytů a snížení jeho exprese je taktéž součástí obranné reakce organismu na hromadění toxických látek v játrech při cholestáze (4) (13).

Výsledky Western blot analýzy dále prokázaly snížení exprese Oatp1a1 transportéru. Na úrovni mRNA byla pozorována tendence ke snížené expresi. Substrátem tohoto přenašeče je kromě žlučových kyselin také bilirubin, který se při cholestáze spolupodílí na poškození hepatocytů a snížení exprese Oatp1a1 představuje snahu tomuto poškození zabránit (4) (51).

Expresí dalších přenašečů – Oat2 a Oatp1b2 – zůstala ve skupině zvířat s podvazem žlučového beze změny, což by mohlo být způsobeno faktem, že transportéry umožňují obousměrný přenos substrátů, a proto se při cholestáze mohl projevit kromě uptake také eflux žlučových kyselin z hepatocytů. Dalším důvodem může být snaha kompenzovat sníženou expresi Oatp1a1 transportéru (52).

6. ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce bylo potvrdit cholestatické poškození jater u potkanů s podvazem žlučovodu biochemickou analýzou séra a analýzou exprese jaterních transportních proteinů pro uptake látek (Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2 a Oat2) na úrovni mRNA i proteinu pomocí metod qRT-PCR a Western blot.

Zvýšení všech sledovaných biochemických parametrů séra (bilirubin, žlučové kyseliny, ALT, AST, ALT, GMT) prokázalo poškození hepatocytů způsobené obstrukční cholestázou.

Výsledky qRT-PCR a Western blot analýzy potvrdily snížení exprese transportních proteinů Ntcp, Oatp1a1 a Oatp1a4 u zvířat s podvazem žlučovodu. Tyto změny odpovídají cholestatickému poškození jater. Změny v expresi Oatp1b2 ani Oat2 transportéru nebyly potvrzeny.

Závěrem lze konstatovat, že při obstrukční cholestáze u potkanů dochází ke snížení exprese jaterních transportérů pro uptake – Ntcp, Oatp1a1 a Oatp1a4 ve snaze zabránit poškození hepatocytů způsobenému hromaděním toxických látek typu žlučových kyselin a bilirubinu.

Seznam použitých zkratek

ABC	„ATP binding cassette“ - transportéry vážící ATP
ALP	„Alkaline phosphatase“ – jaterní enzym
ALT	„Alanine aminotransferase“ – jaterní transamináza
AST	„Aspartate aminotransferase“ – jaterní transamináza
ATP	„Adenosine triphosphate“ - nukleotid
BCRP	„Breast cancer resistance protein“ – transportér
BSEP	„Bile salt export pump“ – transportér
cAMP	„Cyclic adenosine monophosphate“ – cyklický nukleotid
cGMP	„Cyclic guanosine monophosphate“ – cyklický nukleotid
CYP	Isoformy cytochromu P450
FXR	„Farnesoid X receptor“ – nukleární receptor
GMT	„ γ -glutamyl transferase“ – jaterní enzym
ICP	„Intrahepatic cholestasis of pregnancy“
Ig	Imunoglobulin
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
MDR	„Multidrug resistance proteins“ – podrodina ABC transportérů
MRP	„Multidrug resistance-associated proteins“ – podrodina ABC transportérů
NTCP	„Na ⁺ -taurocholate cotransporting polypeptide“ – polypeptid transportující organické anionty
OAT	„Organic anion transporter“ – transportéry organických aniontů
OATP	„Organic anion transporting polypeptide“ – polypeptidy transportující organické anionty
OCT	„Organic cation transporter“ – transportéry organických kationtů
OST α/β	„Organic solute transporter α/β “ – transportéry organických aniontů
PBC	Primární biliární cirhóza
PPAR	„Peroxisome proliferator-activated receptor“ – nukleární receptor
PSC	Primární sklerotizující cholangitida
PXR	„Pregnane X receptor“ – nukleární receptor
qRT-PCR	„Quantitative reverse transcriptase – polymerase chain reaction“
SLC	„Solute carrier“ – rodina transportních proteinů

TNF- α	„Tumor necrosis factor α “
UDCA	„Ursodeoxycholic acid“ – Ursodeoxycholová kyselina

Poznámka

Zkratky jaterních transportérů a biotransformačních enzymů jsou uvedeny velkými písmeny, pokud se jedná o přenašeče lidské, a malými písmeny, pokud jde o zvířecí analogy.

Seznam použité literatury

- (1) ROKYTA, R. Fyziologie trávení a vstřebávání. *Fyziologie: pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech*. 1. vyd. Praha: ISV Nakladatelství, 2000, s. 129-148.
- (2a) EHRMANN, J. a P. HŮLEK. Funkce jater. *Hepatologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2010, s. 25-36.
- (2b) EHRMANN, J. a P. HŮLEK. Historie. *Hepatologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2010, s. 3-15.
- (2c) EHRMANN, J. a P. HŮLEK. Jaterní symptomy. *Hepatologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2010, s. 139-227.
- (3a) KUNTZ, E. a H.-D. KUNTZ. History of Hepatology. *Hepatology*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2008, s. 2-13.
- (3b) KUNTZ, E. a H.-D. KUNTZ. Morphology of the Liver. *Hepatology*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2008, s. 16-33.
- (3c) KUNTZ, E. a H.-D. KUNTZ. Biochemistry and Functions of the Liver. *Hepatology*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2008, s. 35-76.
- (3d) KUNTZ, E. a H.-D. KUNTZ. Cholestasis. *Hepatology*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2008, s. 235-250.
- (4) ROMA, M. G., CROCENZI, F. A. a E. A. SÁNCHEZ POZZI. Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clin Sci*. 2008, roč. 114, s. 567-588.
- (5) ŠVÍGLEROVÁ, J. a J. SLAVÍKOVÁ. Játra. *Fyziologie gastrointestinálního traktu*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2008, s. 51-65.

- (6) KONRÁDOVÁ, V., J. UHLÍK a L. VAJNER. Trávicí systém. *Funkční Histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská, s.r.o., 2000, s. 153-186.
- (7) TRAUNER, M., P. J. MEIER a J. L. BOYER. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med*. 1998, roč. 339, s. 1217-1227.
- (8) GANONG, W. F. Řízení funkcí trávicího ústrojí. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vyd. Praha: Galén, 2005, s. 485-518.
- (9) FABER, K. N., M. MÜLLER a P. L. N. JANSEN. Drug transport proteins in the liver. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003, roč. 55, s. 107-124.
- (10) ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J., K. A. HOFFMASTER, K. NEZASA, M. N. TALLMAN a K. L. R. BROUWER. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *Eur J Pharm Sci*. 2006, roč. 27, s. 447-486.
- (11) CHANDRA, P. a K. L. R. BROUWER. The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res*. 2004, roč. 21, s. 719-735.
- (12) ITO, K., SUZUKI, H., HORIE, T. a Y. SUGIYAMA. Apical/Basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. *Pharm Res*. 2005, roč. 22, s. 1559-1577.
- (13) ZOLLNER, G. A TRAUNER M. Molecular mechanisms of cholestasis. *Wien Med Wochenschr*. 2006, roč. 156, s. 380-385.
- (14) BRUNTON, L. L., LAZO, J. S. a K. PARKER. Membrane transporters and drug response. *Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics*. 11. vyd. USA: The McGraw-Hill Companies, 2005, s. 41-70.

- (15) ALREFAI, W. A. a R. K. GILL. Bile acid transporters : structure, function, regulation and patophysiological implications. *Pharm Res.* 2007, roč. 24, s. 1803-1823.
- (16) KOSTERS, A. a S. J. KARPEN. Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica.* 2008, roč. 38, s. 1043-1071.
- (17) TRAUNER, M. a J. L. BOYER. Bile salt transporters: molecular characterization, function and regulation. *Physiol Rev.* 2003, roč. 83, s. 633-671.
- (18) BURCKHARDT, G. Drug transport by Organic anion transporters (OATs). *Pharmacol Ther.* 2012, roč. 136, s. 106-130.
- (19) FUNK, C. The role of hepatic transporters in drug elimination. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008. roč. 4, s. 363-379.
- (20) SHU, Y. Research progress in the organic cation transporters. *Journal of Central South University. Medical Sciences.* 2011, roč. 36, s. 913-926.
- (21) HAGENBUCH, B. a P. J. MEIER. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Arch.* 2004, roč. 447, s. 653-665.
- (22) GONG, L., ARANIBAR, N., HAN, Y., ZHANG, Y., LECUREUX, L., BHASKARAN, V., KHANDELWAL, P., KLAASSEN, C. D. a L. D. LEHMAN-MCKEEMAN. Characterization of organic anion-transporting polypeptide (Oatp) 1a1 and 1a4 null mice revers altered transport function and urinary metabolomic profiles. *Toxicol sci.* 2011, roč. 122, s. 587-597.
- (23) IUSUF, D., VAN DE STEEG, E. a A. H. SCHINKEL. Functions of OATP1A and 1B transporters in vivo: insight from mouse models. *Trends Pharmacol Sci.* 2012, roč. 33, s. 100-108.

- (24) CHRISTIAN, W. V., HINKLE, P. M. a N. BALLATORI. β -Subunit of the Ost α -Ost β organic solute transporter is required not only for heterodimerization and trafficking but also for function. *J Biol Chem.* 2012, roč. 287, s. 21233-21245.
- (25) BALLATORI, N., FANG, F., CRISTIAN, W. V., LI, N. a C. L. HAMMOND. Ost α -Ost β is required for bile acid and conjugated steroid disposition in the intestine, kidney and liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008, roč. 295, s. 179-186.
- (26) FUKSA, L., MIČUDA, S., CERMANOVÁ, J., BRČÁKOVÁ, E. a F. ŠTAUD. Fyziologická funkce MRP2. *Československá fyziologie.* 2006, roč. 55, s. 57-65.
- (27) KUBITZ, R., et al. The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2012, roč. 36, s. 1-18.
- (28) MAREČEK, Z. Farmakoterapie jaterní cholestázy. *Remedia.* 2007, roč. 17, s. 316-322.
- (29) RODRIGUEZ-GARAY, E. A. Cholestasis: human disease and experimental models. *Ann Hepatol.* 2003, roč. 2, s. 150-158.
- (30) OZER, J., RATNER, M., SHAW, M., BAILEY, W., a S. SCHOMAKER. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology.* 2008, roč. 245, s. 194-205.
- (31) VIEIRA, E. K., BONA, S., DI NASO, F. C., PORAWSKI, M., TIEPPO, J. a N. P. MARRONI. Quercetin treatment ameliorates systemic oxidative stress in cirrhotic rats. *ISRN Gastroenterol.* 2011, roč. 2011, s. 1-6 .
- (32) ALER, M. A., ARIAS, J. L., GARCÍA-DOMÍNGUEZ, J., ARIAS, J. I., DURÁN, M. a J. ARIAS. Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2008, roč. 1., čl. 6.

- (33) STOKES, C. S., KRAWCZYK, M. a F. LAMMERT. Gallstones: environment, lifestyle and genes. *Digest Dis.* 2011, roč. 29, s. 191-202.
- (34) VAN ERPECUM, K. J. Pathogenesis of cholesterol and pigment gallstones: an update. *Clin Res in Hepatol Gastroenterol.* 2011, roč. 35, s. 281-287.
- (35) POUPON, R. Primary biliary cirrhosis: a 2010 update. *J Hepatol.* 2010, roč. 52, s. 745-758.
- (36) PONSIOEN, C. Y. Recent insights in primary sclerosing cholangitis. *J Dig Dis.* 2012, roč. 13, s. 337-341.
- (37) GEUBEL, A. P. a C. L. SEMPOUX. Drug and toxin-induced bile duct disorders. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000, roč. 15., s. 1232-1238.
- (38) KAPLOWITZ, N. Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug saf.* 2001, roč. 24, s. 483-490.
- (39) KONDRACKIENÉ, J. a L. KUPČINKAS. Liver diseases unique to pregnancy. *Medicina.* 2008, roč. 44, s. 337-345.
- (40) BACQ, Y. Liver diseases unique to pregnancy: a 2010 update. *Clin Res in Hepatol Gastroenterol.* 2011, roč. 35, s. 182-193.
- (41) HIRSCHFIELD, G. M., HEATHCOTE, E. J. a M. E. GERSHWIN. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology.* 2010, roč. 139, s. 1481-1496.
- (42) BOYER, J. L. New perspectives for the treatment of cholestasis: lessons from basic science applied clinically. *J Hepatol.* 2007, roč. 46, s. 365-371.
- (43) WAGNER, M., ZOLLNER, G. a M. TRAUNER. New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *J Hepatol.* 2009, roč. 51, s. 565-580.

- (44) LEE, J. a J. L. BOYER. Molecular alterations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders. *Semin Liver Dis.* 2000, roč. 20, s. 373-384.
- (45) BRČAKOVÁ, E., FUKSA, L., ČERMANOVÁ, J., KOLOUCHOVÁ, G., HROCH, M., HIRSOVÁ, P., MARTINKOVÁ, J., STAUD, F. a S. MICUDA. Alteration of methotrexate biliary and renal elimination during extrahepatic and intrahepatic cholestasis in rats. *Biol Pharm Bull.* 2009, roč. 32, s. 1978-85.
- (46) VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. a F. SPELEMAN. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002, roč. 3, s. 1-12.
- (47) RADILOVÁ, H., LIBRA, A., HOLASOVÁ, S., SAFAROVÁ, M., VISKOVÁ, A., KUNC, F. a M. BUNCEK. COX-1 is coupled with mPGES-1 and ABCC4 in human cervix cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 2009, roč. 330, s. 131-140.
- (48) MARKS, V., CANTOR, T., MESKO, D., PULLMANN, R. a G. NOSKOVÁ. Blood plasma serum. *Differential diagnosis by laboratory medicine: a Quit reference for physicians.* 2. vyd.: Springer-Verlag, 2002, s. 40-369.
- (49) TALWAR, G. P. a L. M. SRIVASTAVA. The liver and biliary system. *Textbook of biochemistry and human body.* 3. vyd.: PHI Learning Pvt. Ltd., 2006, s. 253-275.
- (50) GEIGER, A., ZOLLNER, G., DIETRICH, CH. D., WAGNER, M., FICKERT, P., DENK, H., VAN ROOIJEN, N., MATERN, S., GARTUNG, C. a M. TRAUNER. Cytokine-independent repression of rodent Ntcp in obstructive cholestasis. *Hepatology.* 2005, roč. 41, s. 470-477.
- (51) SLITT, A. L., ALLEN, K., MORRONE, J., ALEKSUNES, L. M., CHEN, C., MAHER, J. M., MANAUTOU, J. E., CHERRINGTON, N. J. a C. D.

KLAASSEN. Regulation of transporter expression in mouse liver, kidney, and intestine during extrahepatic cholestasis. *Biochim Biophys Acta*. 2007, roč. 1768, s. 637-647.

- (52) GEIGER, A., DIETRICH, CH. D., TRAUNER, M. a C. GARTUNG. Extrahepatic cholestasis downregulates Oatp1 by TNF- α signalling without affecting Oatp2 and Oatp4 expression and sodium- independent bile salt uptake in rat liver. *Liver Int*. 2007, roč. 27, s. 1056-1065.