

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**  
**Ústav farmakologie**

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

**The iron disposition regulates liver homeostasis of cholesterol and bile acids**

**Dizertační práce**

**Mgr. Alena Prašnická**

Školitel: prof. MUDr. Stanislav Mičuda, Ph.D.  
Doktorský studijní program: Lékařská farmakologie

Hradec Králové 2019

**Prohlášení:**

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

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

**Hradec Králové, 2019**

**Mgr. Alena Prašnická**

## Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří mi pomohli během mého doktorského studia a přispěli tak i k této mojí práci. Můj největší dík patří Prof. MUDr. Stanislavu Mičudovi, PhD za jeho vstřícný a přátelský přístup během mého studia. Děkuji mu za cenné rady, konzultace a poznámky, kterými mě navedl správným směrem. A v neposlední řadě mu patří velký dík za jeho podporu v mém kariérním růstu.

Jmenovitě bych ráda poděkovala členkám našeho výzkumného týmu - PharmDr. Evě Doležalové, PhD, Bc. Jitce Hájkové, Ing. Hance Laštůvkové a MUDr. Jolaně Cermanové, PhD., které mi po celou dobu předávaly své zkušenosti a znalosti jak z oblasti vědy taky metodiky. Děkuji jim za jejich podporu na akademické půdě i mimo ni. Další komu bych chtěla poděkovat jsou Dagmar Ježková a Kateřina Sildbergová, které se s péčí staraly o má laboratorní zvířata.

Závěrem mi dovolu poděkovat mým rodičům. Díky nim jsem vždy věřila, že nic není nemožné.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>7</b>
<b>Souhrn</b> .....	<b>10</b>
<b>Summary</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>14</b>
1.1 Žluč a její význam.....	14
1.1.1 Tvorba a sekrece žluče .....	14
1.1.2 Žlučové kyseliny.....	17
1.1.3 Vlastnosti ŽK a význam v tvorbě žluče .....	18
1.2 Syntéza žlučových kyselin.....	22
1.3 Transport žlučových kyselin.....	27
1.3.1 Apikální transportéry hepatocytů.....	27
1.3.2 Bazolaterální transportéry.....	31
1.3.3 Enterohepatální cirkulace žlučových kyselin .....	34
1.4 Regulace syntézy a transportu ŽK .....	37
1.4.1 Regulace syntézy žlučových kyselin.....	37
1.4.1.1 FXR regulace v játrech .....	38
1.4.1.2 FXR regulace ve střevě.....	39
1.4.1.3 VDR regulace v játrech .....	41
1.4.1.4 VDR regulace ve střevě .....	43
1.4.1.5 PXR a CAR regulace .....	43
1.4.1.6 Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 regulace- Nrf2 (NFE2L2).....	43
1.4.1.7 Liver X receptor regulace – LXR (NR1H3) .....	44
1.4.2 Posttranskripční regulace .....	45
1.4.2.1 Posttranskripční regulace CYP7A1/Cyp7a1 .....	45
1.4.2.2 Regulace přes miRNA/microRNA.....	45
1.5 Železo (Fe).....	46
1.5.1 Absorpce železa ze střeva.....	48
1.5.2 Cirkulace železa v krvi.....	50
1.5.3 Hepcidin (HAMP).....	52
1.5.4 Hepcidin a jeho role v regulaci železa .....	53
1.5.5 Regulace koncentrace železa v buňce .....	55
1.5.6 Změny dispozice železa v organismu .....	57
1.5.6.1 Nedostatek železa (sideropenie).....	57



1.5.6.2 Nadbytek železa .....	59
1.5.7 Železo a homeostáza žlučových kyselin .....	62
<b>2. Cíl práce.....</b>	<b>63</b>
<b>3. Metody.....</b>	<b>64</b>
3.1 Chemikálie .....	64
3.2 Pokusná zvířata .....	64
3.3. <i>In vivo</i> studie .....	65
3.4 <i>In vivo</i> studie s aplikací <sup>3</sup> H- taurocholové kyseliny .....	66
3.5 Biochemické analýzy .....	66
3.6 LC-MS analýza .....	66
3.7 RT-PCR.....	67
3.8 Western blot.....	70
3.9 Reportérový test - buněčné kultury a konstrukty DNA.....	72
3.10 Histologie jater.....	73
3.10 Imunohistochemické vyšetření Mrp2, Bsep a Mdr2 transportérů.....	73
3.11 Statistické vyhodnocení.....	74
<b>4. Výsledky část 1. Homeostáza ŽK během deplece železa (ID) .....</b>	<b>75</b>
4.1 ID dieta vedla ke změnám hematologických a biochemických parametrů .....	75
4.2. Choleretický účinek ID.....	76
4.2.1 Tok žluče, ŽK a glutathionu .....	76
4.2.2 Biliární sekrece fosfolipidů a cholesterolu .....	77
4.2.3 Obsah glutathionu v játrech.....	77
4.3 ID nepodmínilo vzestup biliární sekrece <sup>3</sup> H-taurocholové kyseliny.....	78
4.4 ID způsobuje změny v genové expresi vybraných molekul .....	80
4.4.1 ID zvyšuje genovou expresi molekul zodpovědných za produkci žluče .....	80
4.4.2 Změny genové exprese relevantních molekul v ileu.....	82
4.5 Western blot a imunohistochemické (IHC) analýzy v játrech.....	83
4.5.1 ID indukuje enzymy a transportéry zodpovědné za metabolismus cholesterolu v játrech .....	83
4.5.2 IHC analýza apikálních transportérů Bsep a Mdr2.....	84
4.6 LC-MS detekce ŽK v plazmě a ve žluči .....	85
4.7 ID indukuje mRNA CYP7A1 v lidských HepaRG i HepG2 buňkách.....	87
4.8 Změny v expresi pERK a pJNK kinázy .....	89
<b>4. Výsledky část 2. - Homeostáza ŽK během nadbytku železa (IO) .....</b>	<b>91</b>
4.9 Přetížení železem (IO) způsobuje jeho masivní depozici v potkaních h játrech .....	91

4.9.1 Histologické vyšetření jater .....	91
4.9.2 Jaterní homeostáza železa během IO .....	92
4.10 Přetížení železem vedlo k mírnému poškození jater a k oxidačnímu stresu .....	94
4.10.1 Biochemické vyšetření plazmy .....	94
4.10.2 Oxidační stres v játrech .....	95
4.10.3 Zvýšená exprese zánětlivých indikátorů .....	95
4.11 IO redukuje tok žluče v důsledku snížení biliární sekrece ŽK .....	97
4.11.1 Tok žluče a koncentrace ŽK ve žluči .....	97
4.11.2 Biliární sekrece hlavních složek žluče .....	97
4.12 Působení IO na jaterní expresi molekul odpovědných za obrat ŽK a cholesterolu .	98
4.12.1 PCR analýza transportérů a enzymů odpovědných za metabolismus ŽK.....	98
4.12.2 WB analýza transportérů a enzymů zodpovědných za jaterní obrat žlučových komponent .....	99
4.12.3 Western blot a PCR analýza Mrp2 a Bsep .....	101
4.12.4 Imunohistochemie kanikulárních transportérů Bsep a Mrp2.....	102
4.13 IO mění střevní obrat ŽK.....	103
<b>5. Diskuse.....</b>	<b>105</b>
<b>Závěr.....</b>	<b>113</b>
<b>Podíl studenta na vědecké práci .....</b>	<b>115</b>
<b>Použitá literatura .....</b>	<b>116</b>
<b>Příloha 1 .....</b>	<b>123</b>
<b>Příloha 2 .....</b>	<b>136</b>

## Seznam použitých zkratek

ASBT	Apical sodium-dependent bile salt transporter
BADF	Na žlučových kyselinách závislý tok žluče
BAIF	Na žlučových kyselinách nezávislý tok žluče
BARE-I/II	Bile acid response elements I a II
BMPs	Bone morphogenetic proteins
BSEP/Bsep	Bile Salt Export Pump
CA	Kys. cholová
CAR	Constitutive androstane receptor
CCK	Cholecystokinin
CDCA	Kys. chenodeoxycholová
CYBRD1	Duodenal cytochrom b-like ferrireductasa
CYP27A1	Sterol 27-hydroxylasa
CYP7A1	Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylasa
CYP8B1	Sterol 12 $\alpha$ -hydroxylasa
DCA	Kys. deoxycholová
DMT1	Divalent metal transporter 1
ERK1/2	c-Raf/mitogen-activated extracellular kinase 1/2
Fe	Železo
FGF19/Fgf15	Fibroblast growth faktoru 19/15 (lidský FGF19, u hlodavců Fgf15)
FGFR4	Fibroblast growth factor receptor 4
FPN	Ferroportin
Ftl	Ferritin
FXR	Farnesoid X receptor
G	Glycin
GCA	Kys. glykocholová
GCDCA	Kys. glykochenodeoxycholová
GSH	Glutathion
GSH	Redukovaný glutathion
GSSH	Oxidovaný glutathion

Hamp	Hepcidin
HCP1	Heme carrier protein 1
HDCA	Kys. hyodeoxycholová
HJV	Heamojuvelin
HNF-1 $\alpha$	Hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$
HNF4 $\alpha$	Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$
ID	Iron depletion
IO	Iron overload
IREs	Iron-responsive elements
IRP1/IRP2	Iron-regulatory proteins 1/2
LCA	Kys. lithocholová
LRH-1	Liver homolog receptor 1
LXRE	LXR response element
LXR $\alpha$	Liver X receptorem $\alpha$
MDR1/Mdr1	Multidrug resistance protein 1
MDR3/Mdr2	Multidrug resistance protein 3/2
MRP2/Mrp2	Multidrug resistance-associated protein 2
MRP3/Mrp3	Multidrug resistance associated protein 3
MRP4/Mrp4	Multidrug resistance associated protein 4
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
Nrf2	Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 regulace
NTCP/Ntcp	Sodium-taurocholate cotransporting polypeptide
OATP/Oatp	Organic anion transporting polypeptides
OST $\alpha$ /OST $\beta$	Organic solute transporter alpha a beta
PXR	Pregnanový X receptor
RAR	Retinoic acid receptor
RXR	Retinoid X receptor
S	Sekretin
T	Taurin
T/G-DCA	Kys. tauro/glycin deoxycholová

T/G-LCA	Kys. tauro/glycin lithocholová
TCA	Kys. taurocholová
TCDC	Kys. taurochenodeoxycholová
Tf	Transferrin
Tgf- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
Trf1/2	Transferrinový receptor 1/2
UDCA	Kys. ursodeoxycholová
VDR	Vitamin D3 receptor
ŽK	Žlučové kyseliny
$\alpha/\beta$ -MCA	Kys. $\alpha/\beta$ -muricholová

**Poznámka**

*V textu mohou být proteiny označeny velkými nebo malými písmeny v návaznosti na současná doporučení, která používají velká písmena u lidských genů/proteinů a malá písmena u zvířecích ekvivalentů.*

## Souhrn

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

První posuzovanou oblastí bylo hodnocení vlivu nedostatku železa (ID) za použití vhodného potkaního modelu, kdy byl ID navozen specifickou dietou. Prokázán byl výrazný indukční vliv deplece železa jak na klasickou, tak i v alternativní cestu syntézy žlučových kyselin z cholesterolu. Společně s indukcí biliární sekrece cholesterolu proto u ID skupiny docházelo k statisticky významnému poklesu plasmatických koncentrací cholesterolu. Následný choleretický efekt v důsledku zvýšené biliární sekrece žlučových kyselin byl zprostředkován jejich zvýšenou jaterní dispozicí, bez ovlivnění exprese odpovídajících transportérů, což bylo ověřeno kinetickou studií s  $^3\text{H}$ -taurocholátem. Klinická relevance tohoto zjištění byla poté potvrzena za použití HepaRG lidských jaterních buněk, kde byla detekována upregulace CYP7A1 za podmínek ID. Luciferázové reportérové testy rovněž ukázaly, že ID-zprostředkovaná aktivace CYP7A1 promotoru, je za podmínek použití chelátorů železa indukována nezávisle na aktivaci farnesoidního X (FXR), pregnanového X (PXR) nebo jaterního X (LXR $\alpha$ ) receptoru.

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

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

## Summary

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

The first assessed field was the evaluation of iron deficiency (ID) using a suitable rat model, where ID was induced by a specific diet. This has demonstrated a significant inducing effect on both classical and alternative pathways for BA synthesis from cholesterol. Together with the induction of cholesterol biliary secretion in ID group it led to statistically significant decrease of plasma cholesterol concentrations. The subsequent BA-dependent choleric effect was induced by their increased liver disposition, without affecting the expression of corresponding transporters, as verified by the kinetic study with  $^3\text{H}$ -taurocholate. The clinical relevance of this finding was then confirmed using human hepatic HepaRG cells, which showed the upregulation of CYP7A1 in the ID conditions. Results employing a luciferase reporter gene assay suggested that the transcriptional activation of the CYP7A1 promoter, under conditions of using iron-chelators, is independent of farnesoid X (FXR), pregnane X (PXR) or liver X (LXR $\alpha$ ) receptors activation.

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



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

# 1. Úvod

## 1.1 Žluč a její význam

Játra jsou jedním z nejdůležitějších orgánů, který je odpovědný za látkovou výměnu, endokrinní funkce a exkreci endogenních i exogenních látek z organismu. Základní a životně důležitou funkcí jater je i tvorba a sekrece žluče. Žluč zabezpečuje několik funkcí:

- emulgaci a vstřebávání tuků a v nich rozpustných vitamínů
- exkreci potenciálně škodlivých endogenních i exogenních látek a léčiv
- eliminaci cholesterolu
- stimulaci imunitního systému ve střevě, exkreci globulinu A (IgA) a zánětlivých cytokinů
- je základní složkou enterohepatické cirkulace
- přísun hormonů potřebných pro správný vývoj a funkci střeva (Boyer, 2013).

### 1.1.1 Tvorba a sekrece žluče

Denně je do střeva dodáno asi 0,75 litru žluče. Přibližně 75 % tohoto objemu tvoří hepatocyty prostřednictvím sekrece osmoticky aktivních látek do žlučových kanáleků, které následně atrahují vodu. Zbylý objem je doplněn sekretinem-indukovanou sekrecí ve žlučových cestách, která je stimulována přijatou potravou. Sekrece žluče z hepatocytů do žlučových kanáleků má dvě složky s přibližně rovnocenným podílem na vznikající žluči: a) na žlučových kyselinách závislý tok žluče (BADF - bile acids dependent flow), kde hlavní osmoticky aktivní složkou jsou žlučové kyseliny a jejich konjugáty a b) na žlučových kyselinách nezávislý tok žluče (BAIF – bile acids independent flow), kde hlavní sekretovanou složkou je glutathion, bikarbonát a konjugovaný bilirubin (Esteller, 2008; Kuntz and Kuntz, 2008). Kromě těchto komponent se do žluči dostává řada dalších látek, jakými jsou např. cholesterol, fosfolipidy (především fosfatidylcholin), aminokyseliny, steroidní látky, vitamíny aj. Vzájemný podíl jednotlivých komponent žluče uvádí Obr. 1 (Kuntz and Kuntz, 2008). Detailní složení lidské žluče uvádí Tabulka 1 (Boyer, 2013)

## Tabulka 1. Složení žluče

### Voda ( 95%)

#### Elektrolyty

Na	141–165 mEq/L
K	2.7–6.7 mEq/L
Cl	77–117 mEq/L
HCO <sub>3</sub>	12–55 mEq/L
Ca	2.5–6.4 mEq/L
Mg	1.5–3 mEq/L
SO <sub>4</sub>	4–5 mEq/L
PO <sub>4</sub>	1–2 mEq/L

#### Organické složky/ionty

Soli žlučových kyselin	3–45 mmol/
Bilirubin	1–2 mmol/L
Cholesterol	97–310 mg/dL
Fosfatidylcholin	140–810 mg/dL

#### Peptidy a Aminokyseliny

GSH	3–5 mmol/L
GSSG	0–5 mmol/L

#### Těžké kovy

Fe	< 1mg/L
----	---------

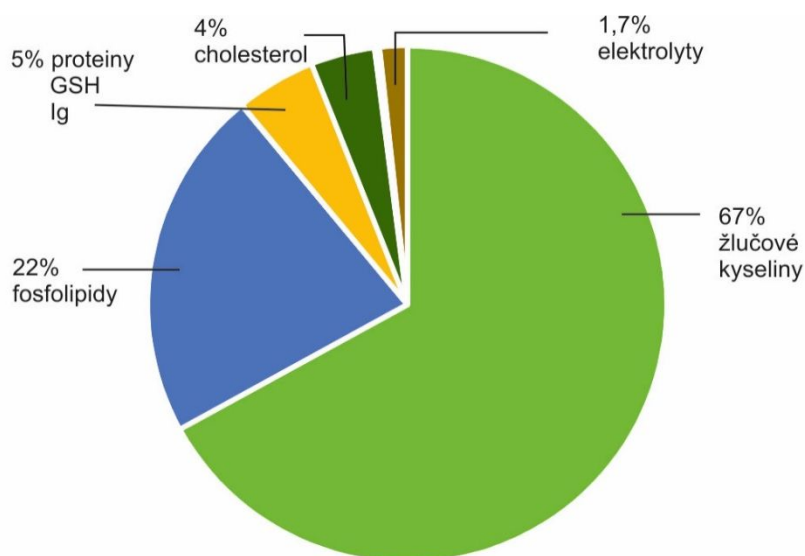
#### Nukleotidy

ATP	0.1–6 μmol/L
ADP	0.1–5 μmol/L
AMP	0.06–5 μ mol/L

<b>Vitamíny</b>	4-200 μg/L
-----------------	------------

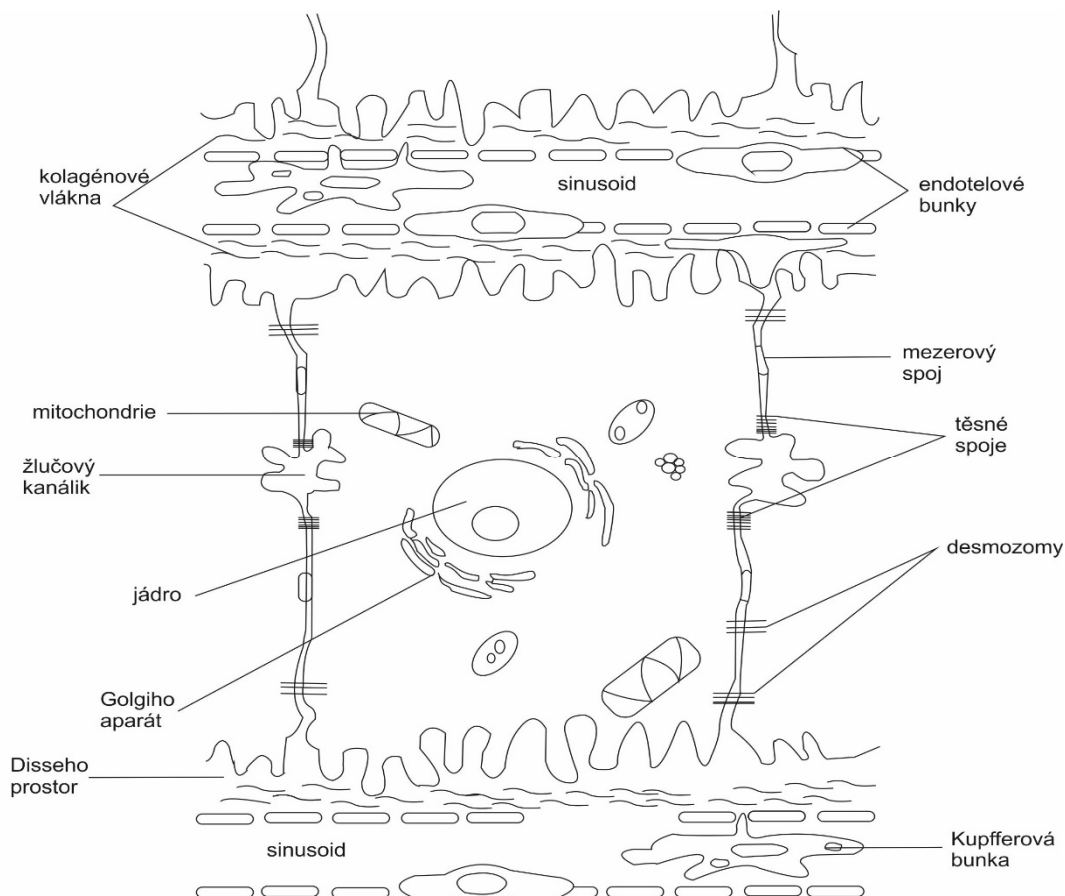
---

Převzato od Boyer (2013)



Obr. 1: Složení žluče. Procentuální složení jednotlivých komponent žluče. Převzato a upraveno dle Kuntz and Kuntz (2008)

Základním morfologickým předpokladem tvorby žluče je polarizovaný charakter hepatocytů, na kterých lze rozlišit dva „póly“: basolaterální (sinusoidální) a apikální (kanalikulární). Membrána basolaterálního pólu má přímý kontakt se sinusoidálními subendoteliálními prostory. Apikální membrána hepatocytu je vždy v těsném spojení (tight junction) s apikální membránou hepatocytů druhého a vytváří tak lumen žlučového kanálku, kam je sekretována žluč (Obr. 2). Těsné spoje představují hlavní bariéru mezi krví a kanalikulárními prostory a určují paracelulární prostup vody do žluče. Významnou funkcí těsných spojů je také zabránění difúze žlučových kyselin a látek o velké molekulové hmotnosti ze žluče, a zároveň směrem do žluči umožňují průchod malých iontů (Boyer, 2013). Basolaterální a kanalikulární membrány hepatocytů jsou pokryté množstvím mikroklků, které zvětšují jejich absorpční i sekreční plochu. Tyto membrány se liší především skladbou transportních proteinů, které pak zabezpečují zásadní funkce ve vychytávání a uvolňování látek z a do krve a v sekreci látek do vznikající žluče (Boyer, 2013).



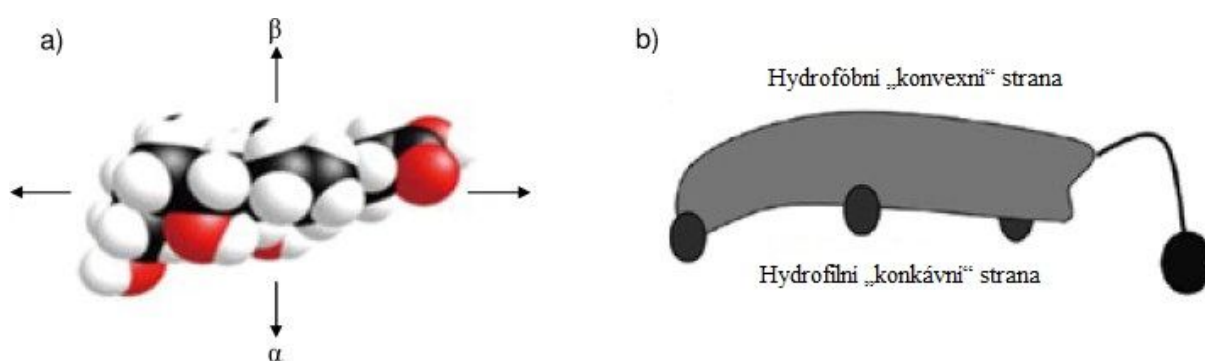
Obr. 2: Struktura hepatocytů. Připraveno podle Boyer (2013)

### 1.1.2 Žlučové kyseliny

Základní složkou žluče určující většinu jejích funkcí jsou žlučové kyseliny (ŽK). Tyto látky jsou přítomny v organismu v celkovém množství (bile acid pool) asi 3 g s distribucí převážně v enterohepatální cirkulaci, tj. v játrech (~ 1-2 %), střevě (~75-80 %) a žlučníku (~15-20 %). Menší množství ŽK (~1 %) se nachází i v plazmě a v moči (Chiang, 2017a). Z množství vyloučeného do žluče a následně dopraveného do tenkého střeva se v terminálním ileu reabsorbují asi 90-95 % ŽK, které jsou z portální krve vychytávány do hepatocytů s podobnou účinností a opětovně použity pro sekreci do žluče; ŽK tedy podstupují intenzivní enterohepatální cirkulaci. Asi 0,2-0,6 g žlučových kyselin je vyloučených stolicí a přibližně 0,5 mg močí. Pro zachování celkového obsahu žlučových kyselin je tato ztráta doplněna *de novo* syntézou z cholesterolu v hepatocytech (Chiang, 2013).

### 1.1.3 Vlastnosti ŽK a význam v tvorbě žluče

Žlučové kyseliny se skládají z pevné steroidní struktury s jednou až třemi hydroxylovými skupinami a z krátkých alkylových vedlejších řetězců, které se konjugují s aminokyselinami (taurin a glycin). Jedná se tedy o amfifilní látky, které mají specifické zakřivení tzv. „konkávně-konvexní“ strukturu. Kde „konkávni“ ( $\alpha$ ) strana je hydrofilní, zatímco „konvexní“ ( $\beta$ ) strana je hydrofóbní. Boční ( $\alpha$ ) strany hydrofilních skupin jsou konjugovány v hepatocytech s glycinem nebo taurinem v poměru 2:1 a následně shromažďovány ve žlučníku (Obr. 3) (Matsuoka and Yamamoto, 2017).

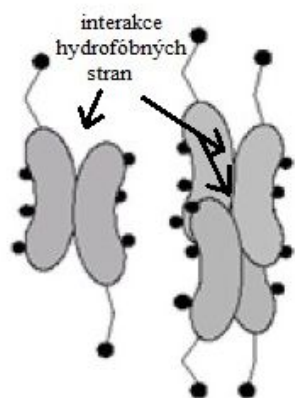


Obr. 3: a) prostorové znázornění kyseliny cholové, b) grafické znázornění zakřivení ŽK. Převzato a upraveno podle Natalini et al. (2014)

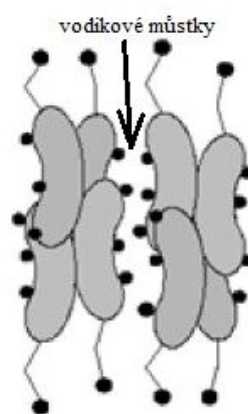
Konjugace s aminokyselinami mění acidobazické vlastnosti ŽK. Nekonjugované ŽK mají pKa mezi 5 až 6,5; (Carey and Small, 1972) to znamená, že po vstupu do duodena, kde pH kolísá v oblasti 3-5, jsou ŽK spíše ve formě protonované, tj. nenabitě, což snižuje jejich rozpustnost ve vodě. Konjugace s aminokyselinami snižuje pKa ŽK na 1-4; při pH střevního obsahu deprotonizují, získávají náboj a zvyšuje se jejich rozpustnost ve vodě a schopnost interagovat s potravou (Hofmann and Hagey, 2008).

Amfifilní charakter ŽK je důležitý i při tvorbě žluče. Po sekreci do žlučového kanálku vytváří ŽK primární nebo sekundární micely. Primární micely se tvoří natočením steroidní/hydrofóbní části k sobě, zatímco hydrofilní části směřují do vodní části žluče. Při zvyšující se koncentraci dochází k jejich agregaci a tvorbě sekundárních micel. Sekundární micely se spojují navzájem hydrofilními částmi řetězce primárních micel. Hydroxylové skupiny vytvářejí mezi sebou vodíkové vazby, a tím se stabilizují do sekundárních micel (Obr. 4) (Matsuoka and Yamamoto, 2017).

Agregace primárních micel

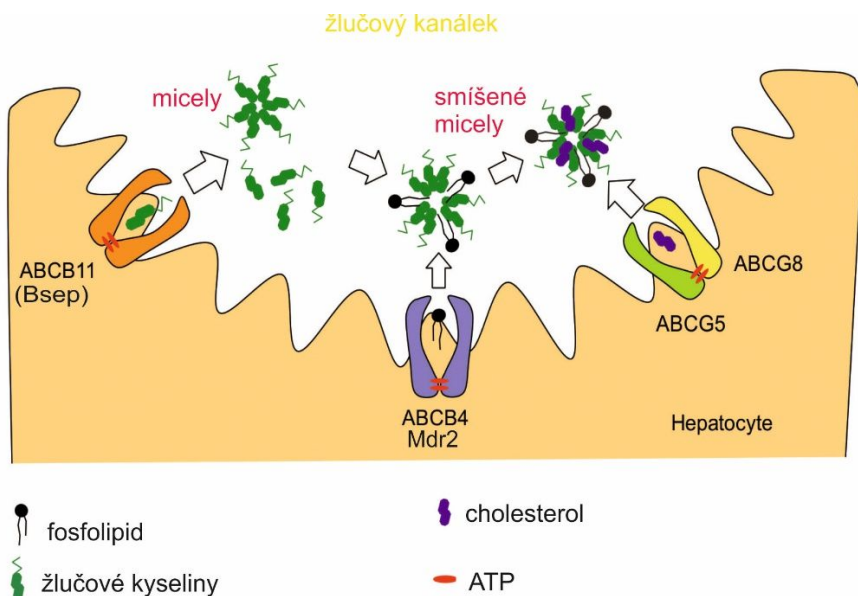


Agregace sekundárních micel



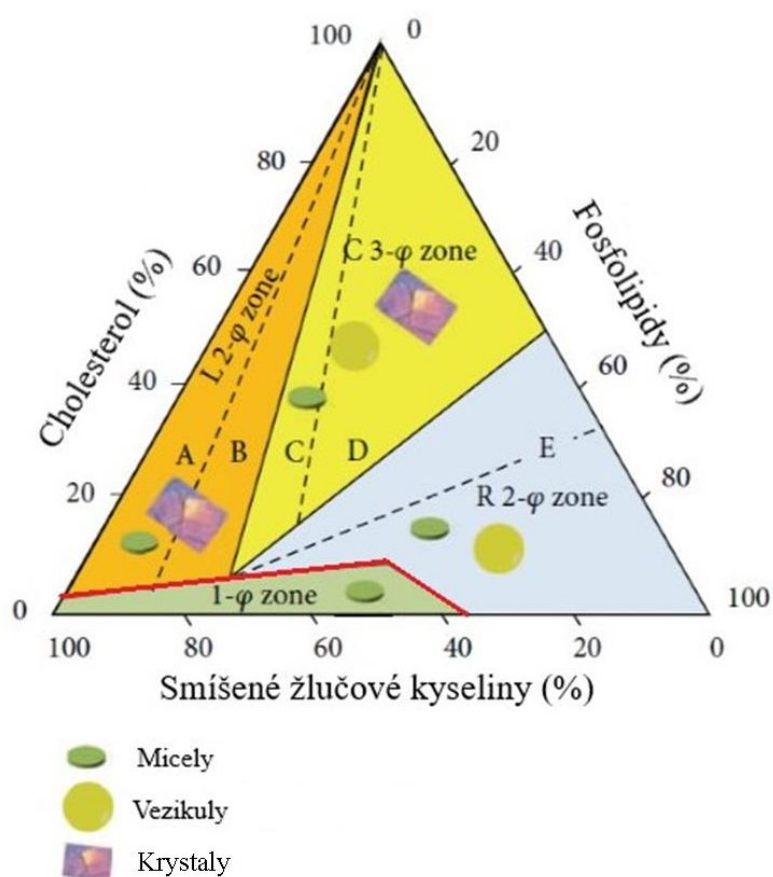
Obr. 4: Grafické znázornění vzniku primárních a sekundárních micel. Převzato a upraveno podle Natalini et al. (2014).

ŽK mají na biliární epitel silné detergentní účinky. Táto vlastnosť je využitá pro extrakci fosfatidylcholinu ze zevní lamely kanalikulární membrány a jeho inkorporaci do micel, které jsou tím stabilizovány a následně mohou akceptovat cholesterol a další ve vodě nerozpustné látky, vznikají „smíšené micely“ (Obr.5) (Morita and Terada, 2014).



Obr. 5: Tvorba smíšených micel ze žlučových kyselin-fosfolipidů-cholesterolu. Žlučové kyseliny jsou vylučované ABCB11 (Bsep) transportérem, fosfolipidy jsou vylučované ABCB4 (Mdr2) transportérem a následně inkorporované do primárních micel, které jsou doplněny cholesterolem vylučovaným ABCG5/8 transportérem do žlučového kanálku. Převzato a upraveno podle Morita and Terada (2014).

Tvorba smíšených micel je hlavní formou ŽK-zprostředkované „solubilizace“ lipidových složek ve žluči. V závislosti na inkorporaci lipidové složky se dělí micely na jednoduché (3 nm), které obsahují ŽK, fosfatidylcholin a nižší podíl cholesterol, smíšené (3-6 nm), které obsahují vyrovnaný podíl ŽK, fosfatidylcholinu a cholesterolu a na vezikuly, které mají v průměru 25-130 nm a vznikají při zvyšujícím se podílu fosfatidylcholinu a cholesterolu ve vztahu k ŽK (Reshetnyak, 2013). Při dalším zvyšování tohoto podílu mohou vzniknout krystalické struktury a následně žlučové kameny. Změny rozpustnosti v závislosti na přítomnosti hlavních komponent žluče uvádí Obr. 6 (Di Ciaula et al., 2013).



Obr. 6: Fázový diagram zastoupení ŽK-cholesterolu-fosfolipidů, ve kterém jsou uvedeny změny rozpustnosti v závislosti na podílu hlavních komponent žluče. Koncentrace tří biliárních lipidů (ŽK, cholesterolu a fosfolipidů) jsou uvedeny jako procenta na třech osách trojúhelníku. Různé zóny zaujímající oblasti uvnitř trojúhelníku, přičemž každá obsahuje různé nosiče cholesterolu. Jednofázová ( $\phi$ ) zóna pod saturační křivkou (označena červeně) obsahuje pouze micely a představuje žluč nenasyčenou cholesterolem. Nad saturační křivkou existují tři další zóny s přesyceností cholesterolu: pravá dvofázová (R2- $\phi$ ) zóna obsahující nasycené micely a vezikuly; centrální třífázová (C 3- $\phi$ ) zóna obsahující nasycené micely, vezikuly a pevné krystaly cholesterolu; a levá dvofázová (L 2- $\phi$ ) zóna obsahující nasycené micely a krystaly tuhého cholesterolu. Pokud se zvýší koncentrace žlučových kyselin dochází k vysrážení cholesterolu a jeho inkorporace s fosfolipidy do vezikul. Převzato z Di Ciaula et al. (2013).



Žlučové kyseliny tvoří micely až po dosažení tzv. kritické koncentrace pro tvorbu micel (CCM). CCM závisí na hydrofóbních vlastnostech žlučových kyselin ve vztahu k hydrofilním skupinám (Reshetnyak, 2013). Kyselina cholová (CA) má nejmenší kritickou micelární koncentraci ze všech žlučových kyselin, což jí umožňuje efektivní tvorbu micel z cholesterolu a fosfolipidů (fosfatydilcholin) a jejich vylučování do žluče a tím zlepšení absorpce cholesterolu v enterocytech. Z tohoto důvodu je hlodavcům CA přidávána do vysokocholesterolové diety k vystupňování hypercholesteremie (Chiang, 2017a).

## 1.2 Syntéza žlučových kyselin

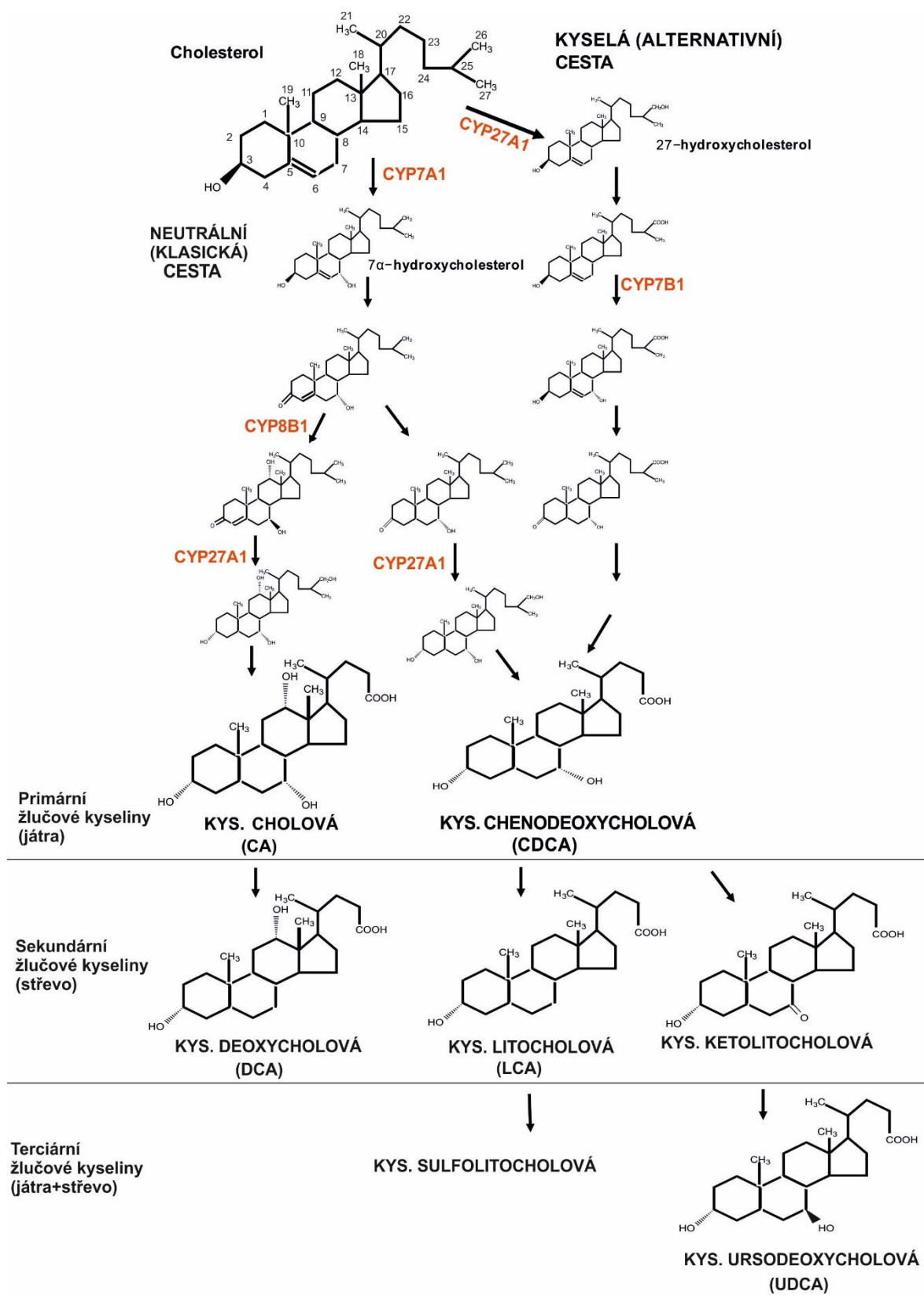
Žlučové kyseliny jsou specializované degradační produkty cholesterolu, které vznikají činností komplexu mikrozomálních, peroxyzomálních a mitochondriálních enzymů (Obr. 7) (Kuntz and Kuntz, 2008). Jsou to tedy látky steroidní povahy, které obsahují 24-27 uhlíku v řetězci (Chiang, 2017a) a dle posloupnosti v zapojení jednotlivých metabolických procesů se rozdělují na iniciálně syntetizované primární ŽK, které jsou střevní mikroflórou přeměněny na sekundární a následně po reabsorpci ze střeva a vstupu do jater na terciární ŽK (Kuntz and Kuntz, 2008). Pojítkem mezi nimi je řada intermediárních produktů, které však v séru nebo ve žluči dosahují pouze minimálních koncentrací.

Existují dvě hlavní cesty syntézy primárních ŽK, klasická neboli neutrální a alternativní neboli kyselá (Obr. 7). Hlavní primární ŽK klasické cesty je kyselina cholová, u alternativní je to kyselina chenodeoxycholová (CDCA) (Chiang, 2017).

Klasická cesta syntézy žlučových kyselin je řízena, rychlost určujícím mikrozomálním enzymem, cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylasou (CYP7A1), který mění cholesterol na  $7\alpha$ -hydroxycholesterol, a ten je následně konvertován na  $7\alpha$ -hydroxy-4cholesten-3-one (C4). C4 je prekurzorem pro CA a částečně i CDCA (Chiang, 2017a). Proto je někdy CYP7A1 vnímán jako enzym určující rychlost syntézy všech ŽK. Nicméně CDCA je tvořena i cestou alternativní viz níže (Obr. 7). Denní produkce CA i CDCA představuje 60-90 % celkově syntetizovaných ŽK (Kuntz and Kuntz, 2008) V posloupnosti klasické cesty jsou dále klíčové 2 enzymy: a) mikrozomální sterol  $12\alpha$ -hydroxylasa (CYP8B1), která je také odpovědná za dodržení stabilního poměru syntézy  $12\alpha$ -hydroxylových žlučových kyselin (CA a deoxycholová-DCA) a non- $12\alpha$ -hydroxylových žlučových kyselin (CDCA a litholová-LCA) a b) mitochondriální sterol  $27$ -hydroxylasa (CYP27A1), který katalyzuje oxidaci bočního řetězce, následovanou  $\beta$ -oxidací za vzniku 24 uhlíkatého řetězce (Chiang, 2017a).

Alternativní cesta syntézy žlučových kyselin je iniciována enzymem CYP27A1 a konečným produktem je CDCA. Jako marker alternativní cesty syntézy se označuje enzym oxysterol  $7\alpha$ -hydroxylasa (CYP7B1). V myších játrech je CDCA konvertovaná enzymem  $6\beta$ -hydroxylázou (Cyp2c70) na  $\alpha$ -muricholovou kyselinu ( $\alpha$ -MCA), kde  $7\alpha$ -OH skupina  $\alpha$ -MCA může být epimerizací převedena na  $7\beta$ -OH, čímž vzniká další primární žlučová kyselina, kyselina  $\beta$ -muricholová ( $\beta$ -MCA).

Žlučové kyseliny jsou následně konjugovány s glycinem a taurinem pomocí cytosolických enzymů bile acid:CoA synthasy (BACS) and bile acid:amino acid transferasy (BAAT), což významně zvyšuje jejich rozpustnost ve vodě. Tyto konjugáty jsou označovány jako soli ŽK (Chiang, 2017a) a hlavními z nich jsou: kys. glykocholová (GCA), kys. glykochenodeoxycholová (GCDCA), kys. taurocholová (TCA) a kys. taurochenodeoxycholová (TCDCA) (Kuntz and Kuntz, 2008). Primární žlučové kyseliny jsou pak sekretovány kanikulárními transportéry do žlučového kanálku, kde spolu s fosfatidylcholinem a cholesterolem tvoří smíšené micely a jsou pak deponované ve žlučníku (Chiang, 2017a) až do jejich vyloučení do duodena.



Obr. 7: Schéma znázorňující syntézu ŽK. Žlučové kyseliny jsou syntetizovány z cholesterolu v játrech dvěma cestami: klasickou (neutrální) cestou a alternativní (kyselou) cestou. Klíčové enzymy: cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylasa (CYP7A1), sterol 12 $\alpha$ -hydroxylasa (CYP8B1), sterol 27-hydroxylasa (CYP27A1), oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylasa (CYP7B1). Převzato od Zhou and Hylemon (2014) a přizpůsobeno podle Kuntz and Kuntz (2008)

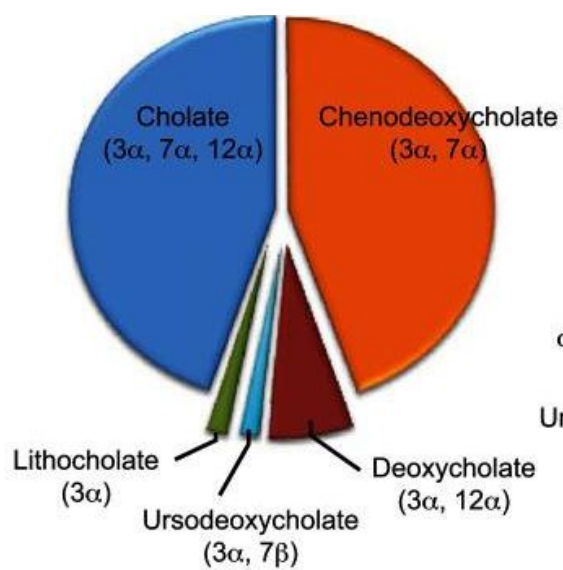
Prvním krokem v syntéze sekundárních ŽK je jejich dekonjugace hydroxylasou žlučových kyselin (BSH), produkovanou anaerobními střevními baktériemi v ileu a v tlustém střevě. Dekonjugace je nezbytná pro následnou  $7\alpha$ -dehydroxylaci CA a CDCA na DCA a LCA. Z CDCA kyseliny  $7\alpha$ -dehydrogenací a oxidací vzniká dále minoritní kyselina ketolitocholová. Sekundární kyseliny jsou absorbovány ze střeva a transportovány zpět do jater, kde jsou opětovně konjugovány s glycinem (G) a taurinem (T). Jejich konjugací vznikají další čtyři ŽK – T/G-DCA a T/G-LCA. Deoxycholová kyselina je konečný produkt, a není dále modifikována. Sekundární kyseliny představují 30-50 % celkového obsahu žlučových kyselin (Kuntz and Kuntz, 2008).

Dekonjugace a  $7\alpha$ -dehydroxylace ŽK zvyšuje jejich pKa a tím i hydrofobní vlastnosti, což jim umožňuje částečnou pasivní absorpci přes epitel tlustého střeva (Chiang, 2017a). LCA ve střevě aktivuje vitamin D3 receptor (VDR) a Pregnanový X receptor (PXR), což vede k indukci CYP3A4 v enterocytech a následné přeměně LCA na kyselinu hyodeoxycholovou (HDCA) (Chiang, 2003).

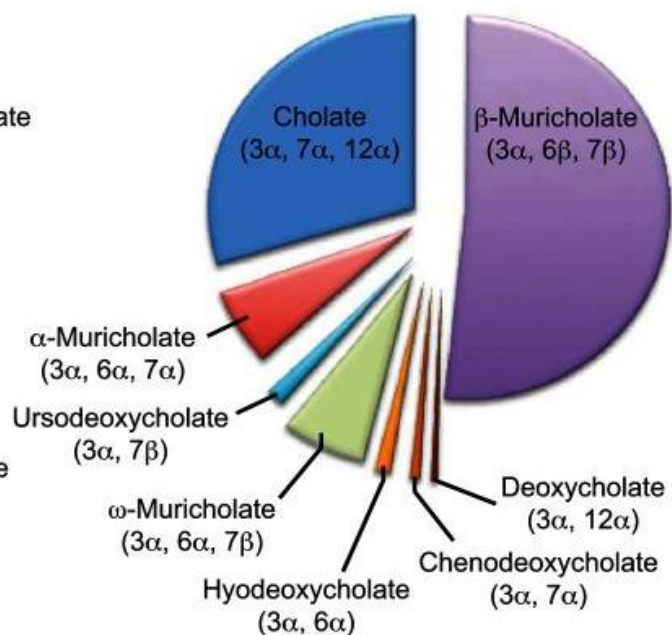
Dalším enzymatickým působením pak ze sekundárních ŽK vznikají terciární ŽK. Kyselina ketolitocholová je jak v játrech, tak ve střevě přeměněná na kyselinu ursodeoxycholovou (UDCA) (Kuntz and Kuntz, 2008).

Alternativní cesta syntézy ŽK *de novo* je hlavní cestou syntézy u novorozenců. U lidí je klasická cesta oproti alternativní cestě dominantní, ale u hlodavců obě cesty přispívají k syntéze žlučových kyselin stejným dílem (Chiang, 2017a). Podíl jednotlivých ŽK na celkovém obsahu u lidí a myši nabízí Obr. 8 (de Aguiar Vallim et al., 2013).

### Podíl žlučových kyselin u lidí



### Podíl žlučových kyselin u myši



Obr. 8: Grafické znázornění podílu ŽK u lidí a myši. Prevezato od de Aguiar Vallim et al. (2013).

## 1.3 Transport žlučových kyselin

Pro zajištění rozpustnosti ve vodě s následnou emulgující funkcí jsou ŽK v játrech, žlučovém systému a v tenkém střevě převážně ve formě konjugátů s taurinem a glycinem. V této formě však nejsou ŽK schopny prostupovat membránami pasivní difuzí a musí být přenášeny přes tyto bariéry za účasti transportních proteinů. K zajištění přítomnosti ŽK ve žluči a jejich následnou recyklaci ze střeva proto existuje komplexní systém transportních proteinů na apikálních a basolaterálních membránách hepatocytů a enterocytů (Boyer, 2013).

### 1.3.1 Apikální transportéry hepatocytů

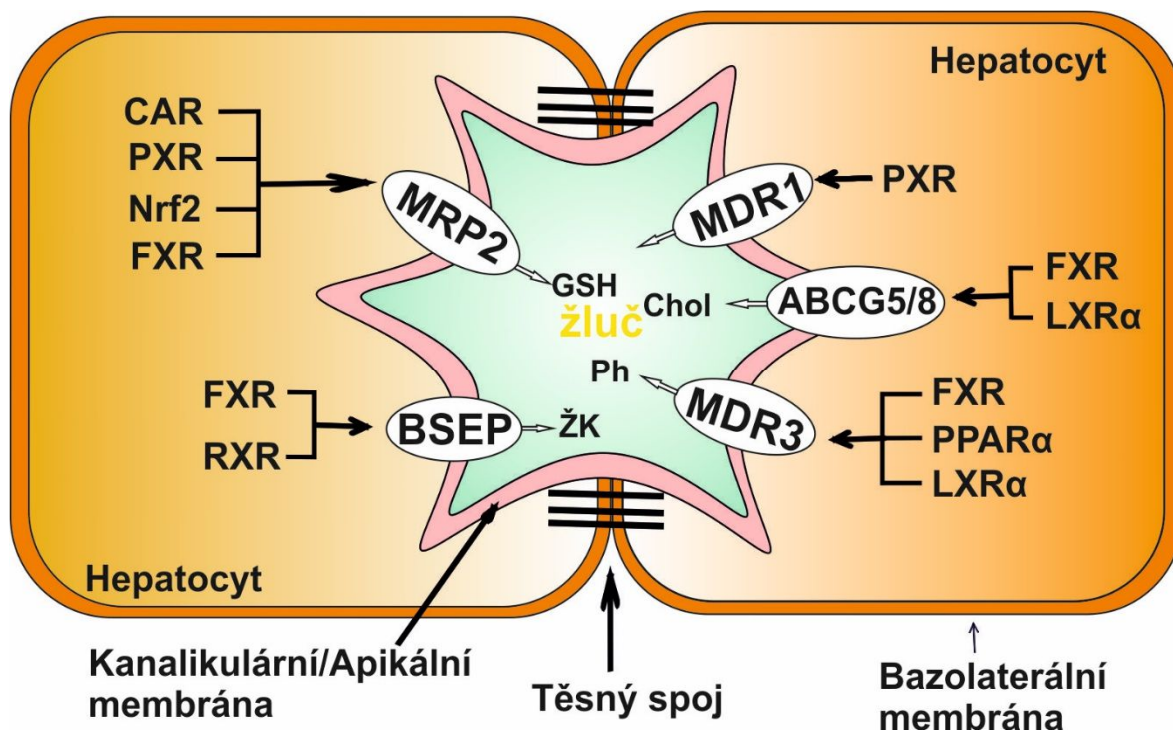
Společnou vlastností těchto transportních proteinů je schopnost přenášet jejich substráty proti významnému koncentračnímu gradientu. To je umožněno využitím energie z ATP. Tyto transportní proteiny se proto řadí do rodiny tzv. ABC (ATP-binding cassette). Pro samotnou tvorbu žluče a sekreci jejích hlavních komponent včetně eliminace xenobiotik je důležitých několik z nich. (Boyer, 2013). Obr. 9 znázorňuje umístění transportérů jejich regulaci a hlavní sekretované složky žluče.

#### **BSEP/Bsep<sup>1</sup> (*ABCB11/Abcb11*) - Bile Salt Export Pump**

Lidský BSEP je glykoprotein s molekulovou hmotností 140-170kDa, jehož gen *ABCB11* je lokalizován na 2q24 chromozomu (Alrefai and Gill, 2007). Jedná se o hlavní apikální efluxní transportér ŽK, který zprostředkuje BADF (Boyer, 2013). Je regulován na transkripční i posttranskripční úrovni a citlivě reaguje na měnící se systémové koncentrace ŽK (regulace viz dále) (Alrefai and Gill, 2007; Halilbasic et al., 2013). Během cholestatických onemocnění s kumulací ŽK je proto tendence k jeho up-regulaci pro urychlení eliminace ŽK do žluče. K jeho inhibici naopak dochází působením estrogenů nebo vlivem zánětu, což přispívá k poškození jater kumulujícími se ŽK. Úplná absence tohoto transportéru proto vede k retenci ŽK a k vzniku primární familiární intrahepatální cholestázy 2 spojené s nekrózou a apoptózou hepatocytů (Hofmann and Hagey, 2008).

---

<sup>1</sup> Velká písmena označují lidský gen/protein, malými písmeny s případným velkým počátečním písmenem je označován zvířecí gen/protein



Obr. 9: Grafické znázornění kanalikulárních/apikálních transportérů žluče a nukleárních receptorů, které ovlivňují jejich regulaci. Zkratky: MRP2, Multidrug resistance-associated protein 2; BSEP, Bile Salt Export Pump; MDR3, Multidrug resistance protein 3; MDR1 Multidrug resistance protein 1; Nrf2, Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2; CAR, Constitutive androstane receptor; PXR, Pregnane X receptor; FXR, Farnesoid X receptor; PPAR $\alpha$ , Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; LXR $\alpha$ , Liver X receptor  $\alpha$ ; RXR, Retinoid X receptor; ŽK, žlučové kyseliny; Ph, fosfolipidy; GSH, glutathion.

### MRP2/Mrp2 (*ABCC2/Abcc2*) - Multidrug resistance-associated protein 2

Je efluxní transportér, který na apikální membráně hepatocytů určuje BAIF a patří do rodiny ATP-dependentních transportérů (Boyer, 2013). Gen *ABCC2* pro MRP2 je lokalizovaný na 10q24 chromozomu (Alrefai and Gill, 2007). Při tvorbě žluče je MRP2 odpovědný za biliární sekreci glutathionu (GSH), bilirubinu a jeho konjugátů, konjugované žlučové kyseliny a záporně nabitě organické konjugáty resp mateřské látky typu metotrexátu nebo pravastatinu (Trauner and Boyer, 2003). Podobně jako u BSEP transportéru, tak i zde je významná transkripční i posttranskripční regulace (Li and Chiang, 2014). MRP2 je lokalizován na membráně hepatocytu ve formě vezikuly, která je napojena na mikrotubuly a v závislosti na choleretickém nebo cholestatickém podnětu se inkorporuje do kanalikulární/apikální membrány. Mutací *ABCC2* genu vzniká Dubin-Johnsonův syndrom, který je charakterizován poškozením kanalikulárního transportu jak endogenních, tak exogenních amfipatických sloučenin (Trauner and Boyer, 2003).



### **MDR3/Mdr2 (*ABCB4/Abcb4*) - Multidrug resistance protein 3/2**

Jedná se o flipázu z rodiny ATP-dependentních transportérů. Jeho molekulová hmotnost je u myši a potkanů 150 kDa (Mdr2), u lidí pak 170 kDa (MDR3) (Boyer, 2013). Hlavním úkolem transportéru je transport fosfolipidů, zejména fosfatidylcholinu, z vnitřní do vnější vrstvy kanalikulární membrány s následnou extrakcí ŽK do žluče a vznikem smíšených micel. Dysfunkce tohoto genu vede k absenci sekrece fosfolipidů, které tak nemohou stabilizovat ŽK v micelách, což se projeví jejich toxicitou s možným rozvojem biliární cirhózy a jaterního karcinomu. Stejný mechanismus přispívá také k tvorbě žlučových kamenů (Morita and Terada, 2014). Mutace genu vede k vzniku familiární intrahepatální cholestázy 3. typu. Myši kmeny s mutovaným *Abcb4* genem se používají jako zvířecí model Primární sklerozující cholangitidy (Li and Chiang, 2014).

### **ATP8B1/Atp8b1**

ATP8B1 se nachází na kanalikulární membráně a je flipasou, která je zodpovědná za udržování aminofosfolipidů na vnitřní dvojvrstvě kanalikulární membrány. Tento transportér je exprimován, kromě jater, také v tenkém střevě, děloze a slinivce břišní. Jedná se spíše o ATPázu nežli o ABC transportér. Jeho hlavní funkcí je vyvažování asymetrie kanalikulární lipidové membrány způsobené MDR3. Geneticky podmíněná defice vede k Familiární intrahepatální cholestáze 1 (FIC1) (Boyer, 2013).

### **AE2/Ae2 (*SLC4A2/Slca2*) - Chloride/bicarbonate exchanger ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ )**

Jedná se o druhý nejdůležitější systém pro BAIF, a s tím souvisí i jeho hlavní funkce - udržení pH v buňce. Je lokalizován na kanalikulární membráně hepatocytů a v epitelu žlučového kanálku. Může se nacházet i v buňce ve formě vezikul. Ty jsou propojeny s cytoskeletem buňky, a to konkrétně s mikrotubuly. Při zvýšení pH dochází k translokaci a inkorporaci AE2 do kanalikulární membrány, což vede k bikarbonátové choleréze. Ta přispívá k BAIF. Choleréza může být stimulována i hormonem glukagonem, který na AE2 působí přes cAMP (Alvaro et al., 1995; Boyer, 2013).

### **ABCG5/8 (*Abcg5/8*)**

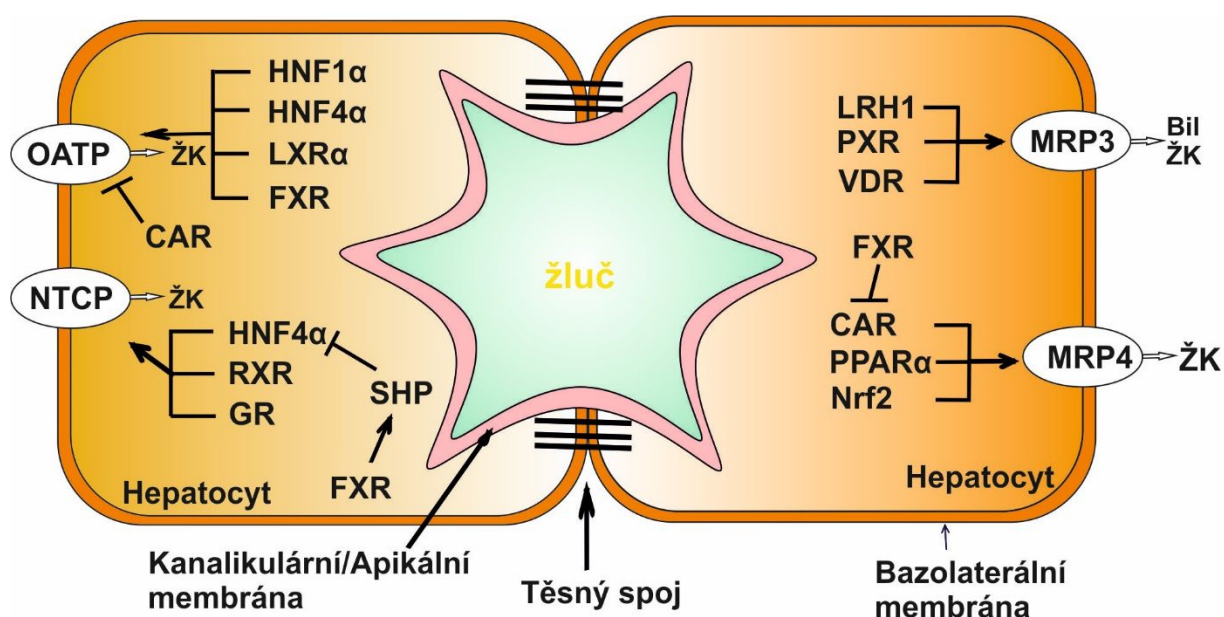
Představují další zástupce ATP-dependentních transportérů lokalizovaných na kanalikulární membráně hepatocytů a enteroцитů. Oba jsou kódovány na stejném 2p21 chromozómu a jsou mezi sebou odděleni jen 140 bazemi. Pokud je exprimován pouze ABCG5 (sterolin-1) nebo ABCG8 (sterolin-2) je transportér nefunkční. Jedná se tedy o heterodimerní transportér/y, jejichž heterodimerizace probíhá v endoplazmatickém retikulu. Odtud jsou následně transportovány do Golgiho aparátu, a pak jsou přeseseny a inkorporovány do apikální membrány hepatocytů. ABCG5/8 exkretují cholesterol a rostlinné steroly do žluče. Při jejich poškození dochází k značnému snížení eliminace cholesterolu, ale bez změny exkrece fosfolipidů a ŽK. Sekrece cholesterolu se výrazně zvyšuje se sekrecí ŽK. Primárně jsou regulované transkripčně nukleárním jaterním/liver X receptorem  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) (Yu et al., 2014), farnesoid X receptorem (FXR) (Li and Chiang, 2014) a receptory pro thyreoidní hormony, jejichž aktivace expresi ABCG5/G8 stimuluje. ABCG5/8 transportéry jsou regulovány i posttranskripčně. Jejich množství v kanalikulární membráně se zvětšuje při vysokotukové a sacharóзовé dietě (Yu et al., 2014).

### **MDR1/Mdr1 (*ABCB1/Abcb1a+b*) - Multidrug resistance protein 1**

MDR1 původně označovaný jako P-glykoprotein se nachází v řadě orgánů. V hepatocytech je tento apikální transportér zodpovědný za biliární sekreci sloučenin a léčiv s hydrofobními vlastnostmi, z nichž mnohé jsou organické kationy, toxiny, hydrofobní peptidy, hormony, léčiva apod. Tento transportér také sekretuje ŽK, ale s minimálně pět-krát menší aktivitou než BSEP. V případě jaterního poškození je Mdr1 indukován, patrně v důsledku rozvíjejícího se oxidačního stresu. U myši tato změna exprese usnadňuje sekreci ŽK jako součást adaptivní odpovědi na cholestázu (Boyer, 2013).

### 1.3.2 Bazolaterální transportéry

Jsou to transportéry lokalizované na membráně komunikující s jaterními sinusoidy a mezibuněčným prostorem. Pohyb látek zde probíhá oběma směry a dle jednotlivých podmínek ho buď zprostředkovávají ABC transportéry (Mrp3 a Mrp4) nebo transportéry z SLC (soluble carrier) rodiny, které pro transport nevyužívají energii ATP, ale hnací silou je buď koncentrační gradient substrátů, nebo symport/antiport látek s významným koncentračním gradientem mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem (např. Na<sup>+</sup>) (Boyer, 2013). Obr. 10 znázorňuje umístění transportérů, jejich regulaci a hlavní sekretované složky žluče.



Obr. 10: Grafické znázornění bazolaterálních transportérů žluče a nukleárních receptorů, které ovlivňují jejich regulaci. Zkratky: MRP3/4, Multidrug resistance-associated protein 3/4; OATP, Organic anion transporting polypeptides; NTCP, Sodium-taurocholate cotransporting polypeptide; Nrf2, Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2; CAR, Constitutive androstane receptor; PXR, Pregnane X receptor; FXR, Farnesoid X receptor; PPAR $\alpha$ , Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; LRH1 $\alpha$ , Liver receptor homolog-1 $\alpha$ ; HNF4 $\alpha$ , Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ; SHP, Small heterodimer partner; GR, glucocortikoid receptor; ŽK, žlučové kyseliny; Bil., bilirubin.

#### MRP3/Mrp3 (*ABCC3/Abcc3*) - Multidrug resistance associated protein 3

MRP3 je další z rodiny ATP-dependentních transportérů, který se však nachází na bazolaterální membráně hepatocytů a cholangiocytů a svojí strukturou a funkcí je podobný MRP2. Identická je i jeho velká molekulová hmotnost (170 kDa). Gen pro *ABCC3* se nachází na 17q21.3 chromozomu. Primární funkcí MRP3 je export látek konjugovaných s glukuronidy

(Borst et al., 2007; Boyer, 2013) jako např. bilirubinu, estradiolu, leukotrienů a množství léčiv. Minoritně se podílí i na exportu konjugovaných žlučových kyselin. Lidský MRP3 má ke ŽK menší afinitu než potkaní Mrp3. Na rozdíl od MRP2, MRP3 netransportuje glutathion nebo látky s ním konjugované. Funkce MRP3 spočívá v efluxu hydrofilních konjugovaných metabolitů z hepatocytů do krve, což umožňuje jejich následnou exkreci v ledvinách. Mimoto je MRP3 typickým „kompenzačním“ transportérem tj. za fyziologické situace je jeho zastoupení nízké a zvyšuje při intracelulární kumulaci bilirubinu a ŽK během cholestázy jako součást protektivní odpovědi hepatocytů za účelem snížení intracelulární koncentrace potenciálně toxických metabolitů. MRP3/Mrp3 je regulován transkripčně nukleárním liver homolog receptorem 1 (LRH1) a celý tento proces je závislý na TNF- $\alpha$  signalizaci. Tento proces je také spojený s aktivací JNK/SAPK signalizační kaskády, k jejíž aktivaci dochází i během stresu (Boyer, 2013). Na indukci MRP3 se podílí i nukleární receptor PXR (pregnane X receptor); role CAR (constitutive androstane receptor) receptoru zůstává prozatím diskutabilní (Borst et al., 2007).

#### **MRP4/Mrp4 (*ABCC4/Abcc4*) - Multidrug resistance associated protein 4**

Gen pro *ABCC4* se nachází na 13q32 chromozomu (Klaassen and Aleksunes, 2010). Tento ATP-dependetní transportér je zodpovědný za eflux konjugovaných ŽK a sulfátových konjugátů prostaglandinů z hepatocytů do krve. Podobně jako u MRP3/Mrp3 i MRP4/Mrp4 je exprimován v játrech v malém množství na bazolaterální membráně a v proximálních tubulech ledvin na apikální membráně. Exprese MRP4/Mrp4 stoupá během cholestázy a právě jemu je připisován kompenzační eflux ŽK (Borst et al., 2007; Boyer, 2013).

#### **NTCP/Ntcp (*SLC10A1/Slc10a1*) - Sodium-taurocholate cotransporting polypeptide**

Gen pro *SLC10A1* je lokalizovaný na 14q24.1 chromozomu (Klaassen and Aleksunes, 2010) a jedná se o první identifikovaný polypeptidový transportér z velké rodiny *SLC10*. V hepatocytech se nachází na bazolaterální membráně, kde jeho hlavní funkcí je přesun konjugovaných žlučových kyselin ze sinusoidální krve zpět do hepatocytů, což představuje až 90 % vychytávaných ŽK. Transport je „poháněný“ ATP-dependetní sodíkovou pumpou tvz.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP sou udržující gradient pro  $\text{Na}^+$ . Zastoupení NTCP se za fyziologických

podmínek mění v závislosti na příjmu potravy a s tím spojeným vyplavováním ŽK do střeva a jejich reabsorpci do portální krve (Boyer, 2013). Indukce RXR/RAR (Retinoid X receptor/Retinoic acid receptor) nukleárních receptorů vede k navázání na promotor transportéru a jeho následné transkripci. Represe Ntcp je nepřímo zprostředkovaná i aktivací Fxr, která indukuje Shp, který blokuje navázání HFE/RAR a HNF4 $\alpha$  (Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ) komplexu na promotor Ntcp (Alrefai and Gill, 2007; Li and Chiang, 2014). Podobným mechanismem reguluje expresi NTCP i endotoxin a interleukin IL-1 $\beta$ . Inzerce Ntcp do membrány může být urychlená cyklickým adenosinmonofosfátem cAMP (Alrefai and Gill, 2007).

### **OATP/Oatp (*SLCO/Slco*) - Organic anion transporting polypeptides**

Na rozdíl od konjugovaných žlučových kyselin, nekonjugované ŽK jsou vychytávány ze sinusoidální krve mechanismem na Na<sup>+</sup> nezávislém. Tato superrodina transportérů zprostředkuje obousměrný transport negativně nabitých organických amfipatických nebo anionických látek včetně steroidních hormonů, nebo konjugátů s glukuronovou kyselinou a řady léčiv. Energie pro transport je získávána z koncentračního gradientu nebo výměnou za redukovaný glutathion či bikarbonát. V lidských játrech byly identifikovány zejména čtyři OATP1A2 (SLCO1A2), OATP1B1 (SLCO1B1), OATP1B3 (SLCO1B3), OATP2B1 (SLCO2B1) (Boyer, 2013; Oswald, 2018). Mezi nimi existuje značný překryv ve spektru substrátů daný výraznou homologií sekvencí aminokyselin v primární struktuře. Široké spektrum substrátů ve spojení s genetickými polymorfismy predisponuje k riziku výrazné variability ve funkci těchto transportérů. Např. inhibice OATP1B1 transportéru v bazolaterální membráně hepatocytů při léčbě statiny (např. simvastatinem, pravastatinem) vede k jejich zvýšené koncentraci v plazmě a zvyšuje riziko vzniku rhabdomyolýzy. OATP1B1 a OATP1B3 jsou transaktivované hepatic nuclear factor 1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha$ ), HNF4 $\alpha$ , FXR a LXR $\alpha$ . OATP1B3 je inhibovaný CAR receptorem (Murray and Zhou, 2017; Oswald, 2018).

### 1.3.3 Enterohepatální cirkulace žlučových kyselin

Žluč a ŽK jsou zadržovány ve žlučníku. K vyprázdnění žlučníku dochází reflexně nebo hormonálně vlivem cholecystokininu (CCK) a sekretinu (S). CCK je secernován epitelovými buňkami sliznice horního úseku duodena a do žlučníku se dostává krevní cestou. Vlivem CCK dochází ke zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  iontů ve svalových buňkách a ke kontrakci žlučníku. Současně CCK uvolňuje Oddiho svěrač a zvyšuje sekreci pankreatických enzymů. Sekrece CCK je aktivovaná přítomností mastných kyselin a aminokyselin v potravě. Sekretin potencuje účinky CCK a zvyšuje produkci žluče v hepatocytech. V slinivce břišní se váže na příslušné receptory a zvyšuje koncentraci cAMP. Tím se zvýší produkce a sekrece  $\text{HCO}_3^-$  a vody, které pak mění pH žluče na alkalické. Změna pH je rozhodující pro vznik micel (Trojan S., 2003)

ŽK mohou být absorbované ze střeva aktivním nebo pasivním transportem. Dominující aktivní reabsorpce probíhá v ileu za účasti specifických transportérů (Chiang, 2017b) a umožňuje vychytání hydrofilních konjugovaných ŽK a jejich přesun do portální cirkulace. Minoritní podíl ŽK, který unikne aktivní reabsorpci, je při kontaktu se střevním mikrobiomem dekonjugován. Tím se zvýší lipofilita a umožní se jejich reabsorpce pasivní difuzí v tlustém střevě (Kuntz and Kuntz, 2008). Celkově je tak ze střevního obsahu reabsorbováno přibližně 95 % všech žlučových kyselin a pouze 5 % je vyloučených stolicí a nahrazených *de novo* syntézou v játrech. To představuje přibližně 0,5 g produkce ŽK na den (Li and Chiang, 2014). ŽK jsou s portální cirkulace intenzivně vychytávány do hepatocytů činností NTCP a OATP transportérů. Následně jsou tyto ŽK opětovně použity pro sekreci do žluče. Celý proces je označován jako enterohepatální cirkulace (Boyer, 2013).

#### ASBT (SLC10A2) - Apical sodium-dependent bile salt transporter

ASBT podobně jako NTCP patří do rodiny SLC10 genů/transportérů. Jedná se o 48kDa glykoprotein, jehož gen je lokalizován u lidí na 13q33 chromozomu (Balakrishnan and Polli, 2006) (Alrefai and Gill, 2007) a u hlodavců na chromozomu 16q12 (Alrefai and Gill, 2007). ASBT se nachází na apikální membráně enterocytů a zprostředkovává reabsorpci konjugovaných i nekonjugovaných ŽK z ilea. V enterocytech jsou ŽK vázané na ileal bile acid binding protein (iBAPB), který transportuje ŽK k bazolaterální membráně enterocytů a jejich následné „předání“, bazolaterálním transportérům (Balakrishnan and Polli, 2006).

## OST $\alpha$ /OST $\beta$ - Organic solute transporter alpha a beta

Je heterodimerní transportér umístěný na bazolaterální membráně enterocytů, který zabezpečuje sekreci ŽK z enterocytů do intersticia a následně do portálního oběhu. Pro správnou funkci transportéru se vyžaduje přítomnost obou podjednotek ( $\alpha$  i  $\beta$ ) (Boyer, 2013). Za jeho indukci ve střevě je zodpovědný FXR (Li and Chiang, 2014).

Detailnější přehled transportérů ŽK, jejich regulace a některé substráty jsou uvedeny v Tabulce 2.

**Tabulka 2. Přehled regulace transportérů pro ŽK**

Transportéry	Substráty	Transkripční regulace přes nukleární receptory	Posttranskripční regulace
<b>Kanalikulární transportéry</b>			
BSEP ( <i>ABCB11</i> )	monovalentní konjugované/amidované ŽK, taxol	↑FXR, ↑RXR	↑cAMP (urychluje inzerci do membrány), ↓miR-33a
MRP2 ( <i>ABCC2</i> )	ŽK, GSH, bilirubin glukuronid, paclitaxel, metotrexát, doxorubicin jen u myši	↑FXR, ↑PXR, ↑CAR, ↑Nrf2	↓miR-133a
MDR1 ( <i>ABCB1</i> )	polyhydroxylované ŽK, lipofilní kationtová léčiva	↑PXR	
MDR3 ( <i>ABCB4</i> )	fosfolipidy	↑FXR, ↑PPAR $\alpha$ , ↑LXR $\alpha$	
ABCG5/8	cholesterol, rostlinné steroly	↑LXR $\alpha$ , ↑FXR	↓miR-33a
<b>Bazolaterální transportéry</b>			
MRP3 ( <i>ABCC3</i> )	bilirubin, estradiol, leukotrieny, morfin glukuronid, acetaminofen	↑PXR, ↑LRH1, ↑VDR	stres ↑TNF $\alpha$ signalizaci a aktivuje, LRH1
MRP4 ( <i>ABCC4</i> )	konjugované ŽK, prostaglandiny	↑CAR, ↑Nrf2, ↑PPAR $\alpha$ , ↓FXR*	miR-124a, miR-125a, miR-125b, miR143, miR-506 (všechny ↓)

NTCP ( <i>SLC10A1</i> )	ŽK, statiny, bromsulfalein, thyroidní hormony	↑RXR, ↑HNF4α, ↑GR, ↓FXR, ↓SHP	↑cAMP (urychluje inzerce do membrány), ↓endotoxin, ↓interleukin IL1-β
OATP1B1 ( <i>SLCO1B1</i> )	17β-glukuronyl estradiol, ŽK, bilirubin, ACEI, repaglinid	↑HNF1α, ↑HNF4α, ↑FXR, ↑LXRα, ↓CAR	
OATP1B3 ( <i>SLCO1B1</i> )	17β-glukuronyl estradiol, ŽK, digoxin, ouabain, cholecystokin-8, bromsulfalein	↑HNF1α, ↑HNF4α, ↑FXR, ↑LXRα, ↓CAR	

---

### Transportéry ve střevě

---

OSTα/β ( <i>SLC51A/B</i> )	ŽK	↑FXR
ASBT ( <i>SLC10A1</i> )	ŽK	↓FXR

---

\*FXR zablokuje CAR, který Mrp4 upreguluje (Halilbasic et al., 2013) Zkratky: TNFα, tumor necrosis factor α; cAMP, cyklický adenosinmonofosfát; Nrf2, Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2; CAR, Constitutive androstane receptor; PXR, Pregnane X receptor; FXR, Farnesoid X receptor; PPARα, Peroxisome proliferator-activated receptor α; LRH1α, Liver receptor homolog-1α; HNF4α, Hepatocyte nuclear factor 4α; SHP, Small heterodimer partner; GR, glucocortikoid receptor; VDR, vitamin D receptor; ŽK, žlučové kyseliny.



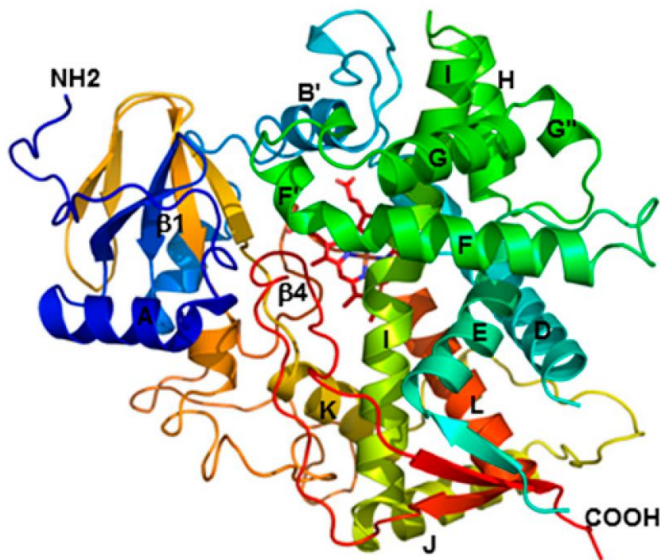
## 1.4 Regulace syntézy a transportu ŽK

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

### 1.4.1 Regulace syntézy žlučových kyselin

#### Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylasa – CYP7A1/Cyp7a1

Enzym lokalizovaný na vnitřní straně membrány endoplazmatického retikula. CYP7A1/Cyp7a1 (Obr. 11) patří do velké rodiny cytochromů P450 (CYP) a v klasické cestě syntézy ŽK udává rychlost jejich tvorby z cholesterolu (Tempel et al., 2014).



Obr. 11: Struktura CYP7A1. Barevné znázornění struktury CYP7A1, modrá barva reprezentuje N-terminus a červená barva reprezentuje C-terminus. Převzato od Tempel et al. (2014)

CYP7a1/Cyp7a1 je regulován hlavně na úrovni transkripce. Analýzou promotorové sekvence CYP7A1 bylo zjištěno, že má dvě vysoce konzervované sekvence, které se označují jako bile acid response elements (BARE-I a BARE-II). BARE-I obsahuje repetitivní úseky

oddělené 4 bázemi (DR4), které váží transkripční faktory a stimulují transkripci genu CYP7A1 např. LXR $\alpha$ , COUP-TFII. BARE-II obsahuje překrývající se DR1 a DR5 motivy, které váží HNF4 $\alpha$  a RXR $\alpha$  a obsahuje také vazebné místo pro NR5A2 sirotčí nukleární receptory (např. LRH1). Transkripční faktory, které se váží na BARE-I a BARE-II navzájem interagují a synergicky ovlivňují regulaci transkripce CYP7A1 (Chiang, 2004). Přehled regulace CYP7A1 poskytuje Tabulka 3.

**Tabulka 3. Přehled regulace CYP7A1**

	Transkripční regulace	Posttranskripční regulace
<b>downregulace</b>	FXR, SHP, PXR, VDR, Nrf2, FGF19/15, ERK1/2, JNK1/2	ZFP36L1, miR-422a, miR-122a
<b>upregulace</b>	LXR $\alpha$ *, LRH1, HNF4 $\alpha$	

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

#### 1.4.1.1 FXR regulace v játrech

Farnesoidní X receptor (FXR, *NR1H4*), „sirotčí“ nukleární receptor (orphan nuclear receptor), byl původně identifikován u myši a potkanů (Matsubara et al., 2013) a je značně exprimován v játrech a ve střevě (Li and Chiang, 2014). Tento receptor má centrální roli v regulaci homeostázy ŽK, jelikož plní roli „senzoru“ bránícího kumulaci ŽK, které představují jeho hlavní agonisty. Kromě ŽK bylo v roli ligandů FXR identifikováno několik alkaloidů, aromatických látek, mastných kyselin a steroidů. Ze ŽK jako agonisté FXR působí z primárních žlučových kyselin CA a CDCA a ze sekundárních DCA a LCA. Jejich amfifilní struktura jim umožňuje se svojí hydrofobní stranou navázat na FXR ligand vážící doménu a hydrofilní konkávní strana následně určuje jejich afinitu k FXR v pořadí CDCA > DCA > LCA > CA (Matsubara et al., 2013).

Po navázání ligandu na FXR dochází v hepatocytech k tvorbě heterodimeru s RXR a v tomto komplexu se váže na promotorové úseky genů, což vyústí v aktivaci exprese řady genů, především však efluxních transportérů zodpovědných za tok žluče (BSEP, MRP2,

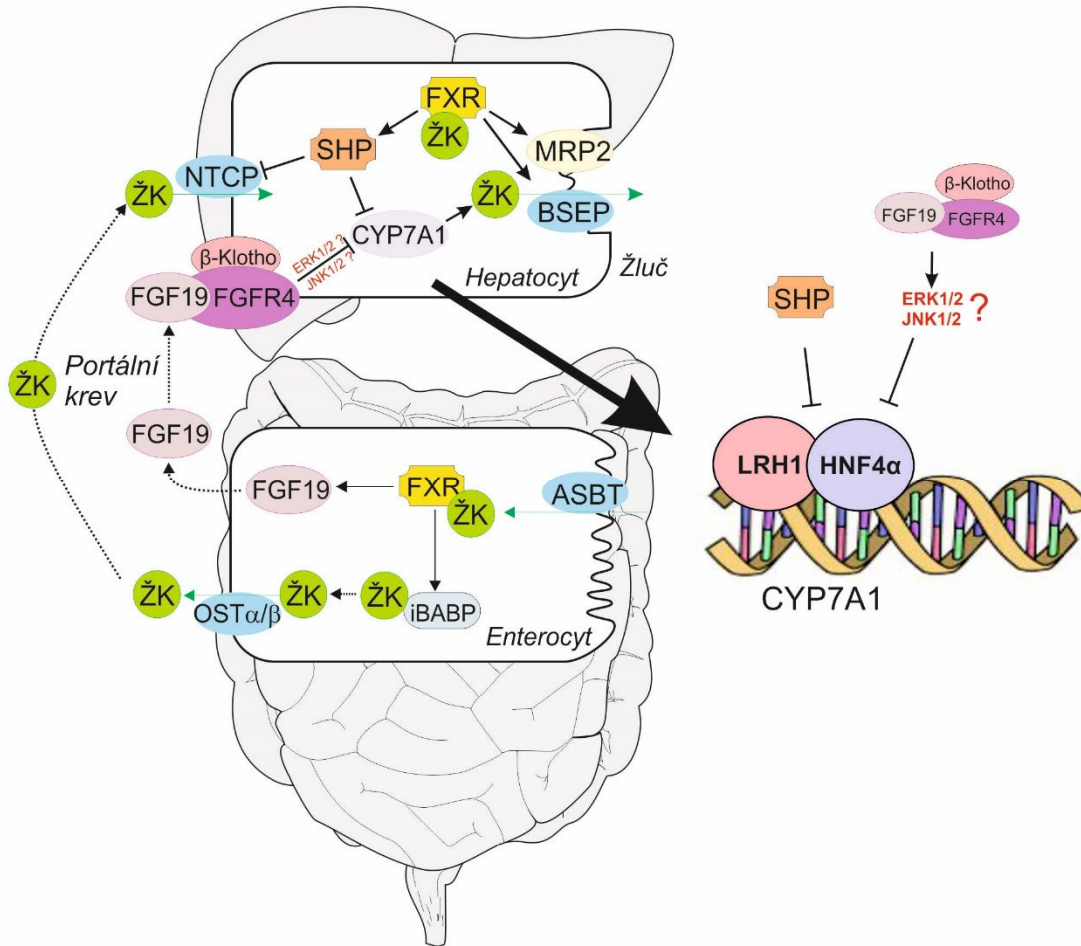
MDR2) a přenos ŽK zpátky do krve (OST $\alpha/\beta$  a MRP4). Indukována je rovněž exprese dalšího sirotčího receptoru, small heterodimer partner (SHP/NR0B2), který zabezpečuje represivní vliv FXR na transkripci enzymů syntetizujících ŽK, a na transportéry vychytávající ŽK z portální cirkulace do hepatocytů (Shapiro et al., 2018). Klíčová je především represe CYP7A1. Promotor genu CYP7A1 obsahuje AGGTCA-repetitivní úseky, které se označují jako „bile acid response element“ (BARE). Na BARE se vážou liver-related homolog-1 (LRH1) a/nebo hepatocyte nuclear factor (HNF4 $\alpha$ ) a spouštějí transkripci genu CYP7A1. Po aktivaci SHP dochází k jeho vazbě na LRH1 a HNF4 $\alpha$ , komplex pak působí jako korepresor promotoru genu CYP7A1 a celý proces vyústí v inhibici transkripce CYP7A1 (Obr. 12). FXR prostřednictvím snížení syntézy a zvýšeného exportu ŽK působí jako hlavní ochranný mechanismus hepatocytů před toxickým vlivem ŽK během cholestatických onemocnění (Li and Chiang, 2014).

#### 1.4.1.2 FXR regulace ve střevě

FXR je rovněž významně zastoupen v enterocytech ilea a plní zde podobně protektivní roli před kumulací ŽK. Během absorpce ŽK aktivují FXR a indukují transkripci a následně uvolnění fibroblast growth faktoru 19 (lidský FGF19, u hlodavců Fgf15) do portální cirkulace. V játrech se následně FGF19 váže na fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) lokalizovaný na bazolaterální membráně hepatocytů. Aktivovaný FGF4 vytváří komplex s dalším speciálním transmembránovým proteinem  $\beta$ -Klotho, což je spojeno s aktivací intracelulárních signalizačních kaskád ERK1/2 a JNK1/2 (Li and Chiang, 2014; Qi et al., 2015). Tyto kinázy následně inaktivují HNF4 $\alpha$ , což zabrání transaktivaci CYP7A1 (Qi et al., 2015).

Pokusy provedené s ligandem RXR, který vytváří heterodimer s FXR a dále indukuje expresi FGF19/Fgf15 ve střevě, potvrdily, že pro aktivaci FGF19/Fgf15 je tvorba heterodimeru RXR/FXR nezbytně nutná. Ve studii, kde byly použity knockoutované myši FXR<sup>-/-</sup>, kterým byl intraperitoneálně podáván vitamín A, jako ligand RXR, nedošlo k indukci exprese Fgf15, přestože vitamín A indukoval RXR. Další zajímavou informací je, že střevní cesta regulace je důležitější u hlodavců, protože během obstrukční cholestázy indukované u potkanů podvazem žlučovodu, není střevní FXR aktivován v důsledku absence ŽK v ileu a Fgf15 není v játrech tvořen. Za této situace může exprese Cyp7a1 dokonce stoupnout, a to navzdory výraznému vzestupu jaterních koncentrací ŽK. U lidí dominuje naopak jaterní

aktivace FXR, která zde mimo přímých účinků zvyšuje i tvorbu FGF19 (Obr. 12) (Schmidt et al., 2010).

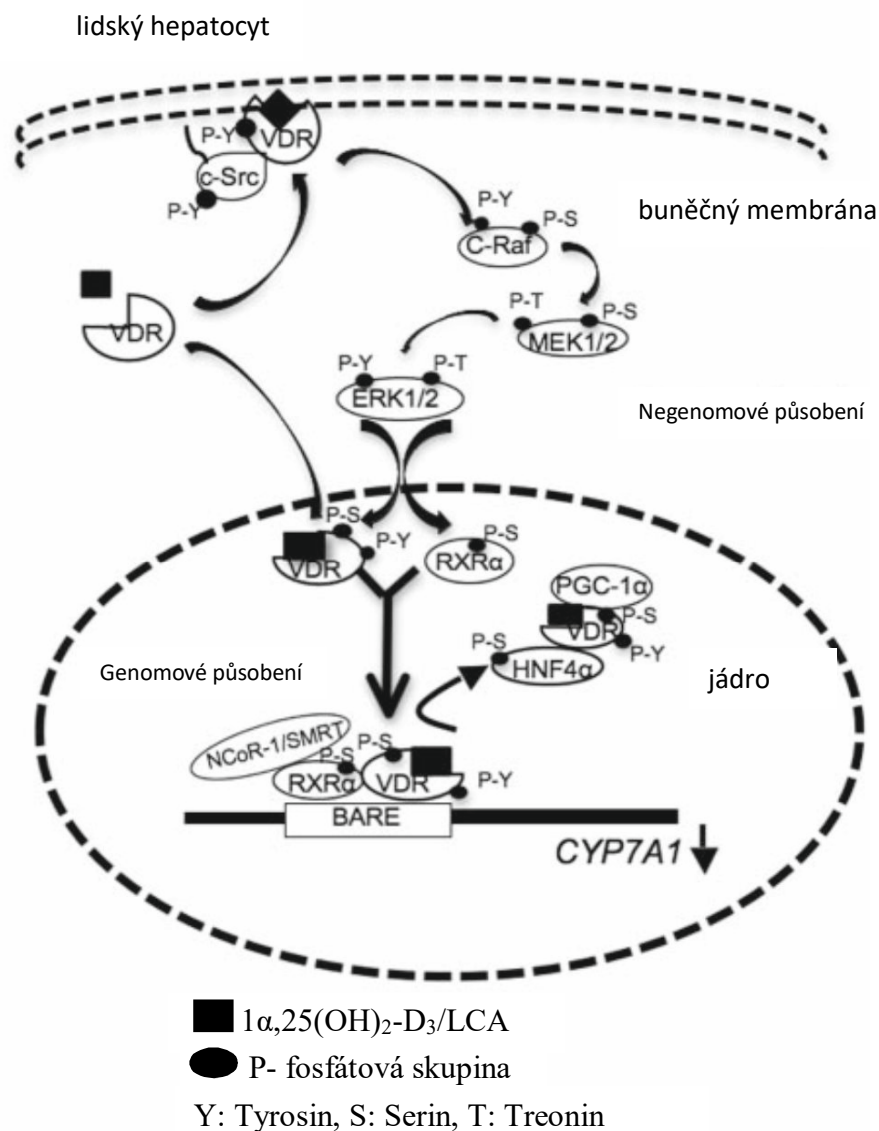


Obr. 12: Grafický popis regulace exprese CYP7A1 přes FXR a střevo. Zkratky: ŽK, žlučové kyseliny; FXR, Farnesoid X receptor; LRH1, Liver receptor homolog 1; HNF4 $\alpha$ , Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ; SHP, Small heterodimer partner; FGF19, fibroblast growth faktor 19; ASBT, Apical sodium-dependent bile salt transporter OST $\alpha/\beta$ , Organic solute transporter  $\alpha/\beta$ ; iBABP, ileal bile acid binding protein; FGFR, fibroblast growth faktor receptor 4; CYP7A1, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylasa; MRP2, Multidrug resistance-associated protein 2; BSEP, bile salt export pump.

### 1.4.1.3 VDR regulace v játrech

Tento receptor je exprimovaný ve většině tkání a buňkách organismu. Zajímavostí je, že není exprimován v myších játrech (Han et al., 2010; Schmidt et al., 2010). Agonisté VDR, kyselina lichočlová a  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$ , indukují translokaci VDR do plazmatické membrány i do jádra. Receptor vytváří v jádře heterodimer s  $RXR\alpha$  (VDR/  $RXR\alpha$ ), který se naváže na BARE promotorovu oblast genu *CYP7A1*, kde zablokuje navázání  $HNF4\alpha$ , a tím brání aktivaci transkripce genu *CYP7A1*. Rychlá odpověď VDR po aktivaci  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem  $D_3$  může být zprostředkovaná translokací VDR do plazmatické membrány z cytosolu a vzniká tzv. membránově vázaný VDR. Experiment provedený na lidských hepatocytech prokázal, že po navázání ligandů na membránový VDR dochází k jeho fosforylaci a následné interakci s c-Src. Tím se aktivuje c-Raf/mitogen-activated extracellular kinase 1/2 (ERK1/2). Aktivovaný ERK1/2 vede k fosforylaci jaderného VDR,  $RXR\alpha$  a  $HNF4\alpha$  a fosforylovaný  $HNF4\alpha$  má menší schopnost transaktivační aktivity (Obr. 13) (Han et al., 2010). VDR ligandy nemají žádný účinek na expresi *CYP27A1* (Geyer et al., 2006; Han et al., 2010).

LCA je vysoce hydrofobní a toxická kyselina, která vzniká působením střevních bakterií z CDCA, a která vystupuje jako endogenní ligand vitamin D receptoru (VDR, *NR1H1*) a pregnanového X receptoru (PXR, *NR1H2*). Tyto dva senzory aktivují cytochrom *CYP3A4* a sulfotransferázu *2A1*, které se mohou podílet na detoxifikaci léčiv a ŽK v játrech a ve střevě. CDCA ani CA nejsou ligandy VDR (Han et al., 2010)



Obr. 13: Ilustrace genomové a negenomové inhibice transkripce CYP7A1 na lidských hepatocytech prostřednictvím aktivace signální kaskády VDR. VDR agonisté,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$  a LCA, stimulují nitrobuňčnou translokaci VDR do plazmatické membrány a do jádra. VDR ligandy indukují fosforylaci tyrosinu (Y) na VDR a tím se aktivuje c-Src. VDR interaguje s c-Src v plazmatické membráně. Táto interakce, pravděpodobně přes aktivaci Shc/Grb2/Sos komplexu a Ras, vede k aktivaci c-Raf a následně ke spuštění ERK1/2 signalizace. VDR se dostává do jádra translokací po navázání na heat shock protein 70, nezávisle na tyrosin-kinázovou signalizaci. ERK1/2 je translokován do jádra a následně fosforyluje serin/treoninové zbytky na jaderných VDR, RXR $\alpha$  a HNF4 $\alpha$ . Fosforylovaný VDR/RXR $\alpha$  váže korepresory NCoR-1 nebo SMRT a ty z BARE promotoru CYP7A1 vytěsni HNF4 $\alpha$ /VDR/PGC-1 $\alpha$  nebo SRC-1 komplex a tím je gen inaktivován. NCoR-1/SMRT se vážou na RXR $\alpha$ , který vytváří dimer s ligandem aktivovaným VDR. VDR vytváří interakce s HNF4 $\alpha$  a tím zabrání dimerizace HNF4 $\alpha$  a jeho navázání na BARE. Převzato a upraveno podle Han et al. (2010)

#### 1.4.1.4 VDR regulace ve střevě

Ke zjištění, zda a do jaké míry může střevní VDR regulovat expresi *Fgf15* a následně i expresi *Cyp7a1* v játrech, byla provedena řada studií na myších *VDR<sup>-/-</sup>* knockoutech. Bylo prokázáno, že podobně jako RXR a FXR i VDR má své vazebné místo na promotoru *Fgf15*. Myším byl intraperitoneálně podán  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ , který u kontrolní skupiny zvířat (*VDR<sup>+/+</sup>*) vedl k indukci *Fgf15* ve střevech a následné represi exprese jaterního enzymu *Cyp7a1*. Tento účinek byl doprovázen i poklesem exprese střevních transportérů, zatímco exprese *iBAPB* byla nezměněná. Na to, aby byla potvrzená teorie, že VDR reguluje expresi *Cyp7a1* v játrech, přes indukci *Fgf15*, byly provedeny další experimenty u *Fxr<sup>-/-</sup>* myši. Těm byl také podáván intraperitoneálně  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ , což vedlo k indukci exprese *Fgf15* ve střevech, která byla v porovnání ke kontrolní skupině *FXR<sup>+/+</sup>* myši zanedbatelná. Z toho vyplývá, že pro indukci *Fgf15* a následnou represi *Cyp7a1*, vyžaduje VDR přítomnost FXR (Schmidt et al., 2010).

#### 1.4.1.5 PXR a CAR regulace

Tyto dva nukleární receptory představují hlavní „xenosenzory“ pro obranu organismu před kumulujícími se xenobiotiky. Jejich aktivace je spojena s dimerizací s RXR a následnou indukci enzymů 1. (CYP450) a 2. fáze (konjugační reakce) biotransformace, ale rovněž transportních proteinů jako např. MDR1, MRP2 nebo OATP1B1 (Wang et al., 2013).

Aktivace PXR jeho ligandem, rifampicinem, vede k represi exprese lidského genu CYP7A1. K této represi dochází na základě inhibice HNF4 $\alpha$  a koaktivatoru peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ). PXR má své vazebné místo i na promotoru střevního FGF19/*Fgf15*, jehož expresi indukuje (Li and Chiang, 2014).

Žlučové kyseliny nemají vliv na indukci nebo inhibici CAR, ale bylo prokázáno, že jeho aktivace způsobuje represi genu pro CYP7A1. Významnější úlohu však sehrává v detoxifikaci ŽK během cholestázy, kde indukuje biotransformační enzymy a podporuje tak vznik polárních metabolitů ŽK (Li and Chiang, 2014).

#### 1.4.1.6 Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 regulace- Nrf2 (NFE2L2)

Jedná se o nukleární faktor, který sehraává klíčovou roli v reakci na rozvoj oxidačního stresu, jelikož při jeho aktivaci je indukovaná exprese anti-oxidačních enzymů, zejména NAD(P)H:quinone oxidoreductasy 1 (NQO1), superoxid dismutasy (SOD), glutathion peroxidasy, heme oxygenasy-1 (Ho-1) atd. Všechny mají ve svém promotoru sekvenci „antioxidant response element“ (ARE). Na ARE se pak váže Nrf2 a spouští transkripci příslušných genu. Důležité je také zmínit, že indukci transkripce Ho-1 vede k inhibici NFκB signalizace a také se snižuje exprese TNF, interferonů a interleukinů. Exprese Nrf2 může být indukována léčivy, arzenem, mastnými kyselinami a oxidačním stresem apod. (Ahmed et al., 2017).

S ohledem na homeostázu ŽK, Nrf2 moduluje jejich syntézu. Studie provedené na HepG2 buněčné linii, která byla transfekovaná Nrf2 a pak inkubována s kyselinou arachidonovou (AA) prokázala, že se stoupající koncentrací AA došlo k indukci Nrf2. Táto indukce byla provázena inhibicí exprese CYP7A1 jak na úrovni transkripce, tak i na úrovni proteinu. Při následné transfekci HepG2 s Nrf2-siRNA byla potlačena exprese Nrf2 a vliv AA na CYP7A1 byl omezen (Zhang et al., 2017).

#### **1.4.1.7 Liver X receptor regulace – LXR (NR1H3)**

Liver X receptor patří do rodiny „sirotčích“ (orphan) nukleárních receptorů. Savci mají dvě izoformy LXR, a to LXRα a LXRβ. Exprese LXRα je největší v játrech, zatímco LXRβ je exprimován v tkáních celého organismu. Hlavní funkcí LXR je regulace metabolismu cholesterolu prostřednictvím ligandu oxysterolů, které se kumulují při zvýšených intracelulárních koncentracích cholesterolu. Aktivovaný LXR se váže na RXR, vytváří heterodimer a indukují expresi proteinů, zodpovědných za eliminaci cholesterolu (Peet et al., 1998) např. Cyp7a1, Abcg1, nebo Abcg5/8. Tento efekt je patrný hlavně u hlodavců, a je u nich zodpovědný za významnou rezistenci proti indukci hypercholesterolemie během vysokotukových diet. Lidé jsou k tomuto efektu rezistentní, jelikož vykazují absenci LXRE (LXR response element) v promotoru genu pro *CYP7A1* (Goodwin et al., 2003).



## 1.4.2 Posttranskripční regulace

### 1.4.2.1 Posttranskripční regulace CYP7A1/Cyp7a1

Syntéza ŽK může být regulována i posttranskripčně opět částečně přes FXR. Aktivací FXR dochází k rychlé indukci transkripce jaterního *Zfp36l*. Translací vzniká protein ZFP36L1, který je taky označován i jako TIS11b, BRF1 nebo RNF162B. Jedná se o „RNA-binding protein“ (RBP), který se váže v 3'-UTR na adenylát-uridylát bohaté sekvence (AU-rich) mRNA, a to především cytokininů imunitních buněk. Vazba RBP na AU-rich vede pak k degradaci mRNA (Newman et al., 2016)

Tarling et al. (2017) provedli experiment *in vivo* i *in vitro*, které prokázaly, že lidská i myší 3'-UTR sekvence *Cyp7a1* mRNA obsahuje AU-rich sekvence. Použití syntetického agonisty GSK2324 vedlo k indukci FXR a následně i velice rychlé transkripci ZFP36L1. Ten se pak navázal na mRNA CYP7A1 což vyústilo k její rapidní degradaci (Tarling et al., 2017).

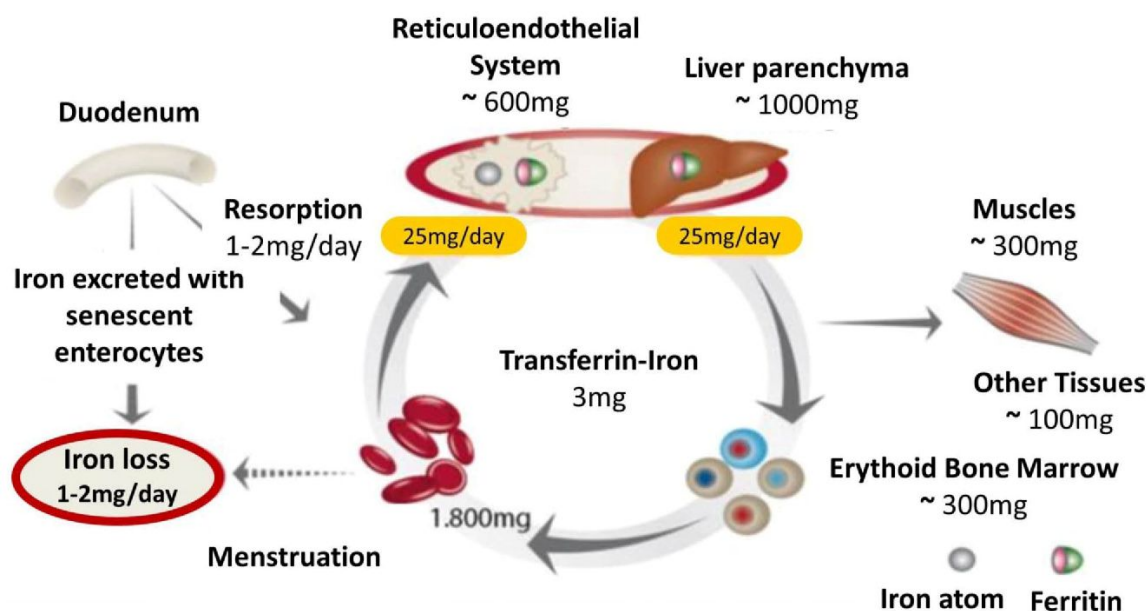
### 1.4.2.2 Regulace přes miRNA/microRNA

Jedná se se o řetězce složení přibližně s 19-22 nukleotidu nekódující části RNA. Geny, které je kódují v DNA jsou častokrát delší nežli finální miRNA. Prvotně vznikají primární miRNA (pre-miRNA) přepisem pomocí RNA-polymerázy II. Další úpravou vznikají „zralé“ miRNA, které se váží na 3'-UTR příslušné mRNA a inhibují tak jejich translaci na proteiny. (Connerty et al., 2015). Mezi miRNA které můžou inhibovat syntézu ŽK přes CYP7A1 patří miR-422a, miR-122a (Song et al., 2010) a miR-33a. miR-33a může ovlivnit i sekreci žluče inhibicí translace mRNA transporterů BSEP a ABCG5/8 (Li et al., 2013).

## 1.5 Železo (Fe)

Železo patří mezi tzv. živototvorné neboli biogenní prvky a sehrává důležitou roli v buněčném dýchání, v regulaci genové exprese, proliferaci buněk a v imunitě. Celkový obsah železa v organismu je asi 50 mg/kg. Z toho přibližně 65 % se nachází v hemoglobinu červených krvinek (1,8 g), a dalších 10 % je v myoglobinu svalových vláken, v enzymech a cytochromech (400 mg). Zbytek železa je uložen v játrech (1 g), v retikuloendotelovém systému (600 mg) a v kostní dřeni (300 mg) (Munoz et al., 2009; Ludwig et al., 2015).

Z potravy, která obsahuje asi 15-20 mg železa/den se v tenkém střevě denně vstřebá cca 1-2 mg, což umožňuje doplnit ztráty železa v důsledku jeho obratu (vyučování močí, potem, rozpadem červených krvinek) v organismu. U lidí a obecně u savců neexistuje mechanismus pro exkreci železa z organismu, proto je vysoce vyvinuta regulace absorpce Fe ze střeva (Obr. 14) (Munoz et al., 2009; Anderson et al., 2012). Makrofágy jsou schopné recyklovat až 20-25 mg železa jako důsledek fagocytózy červených krvinek (Ludwig et al., 2015).



Obr.14: Obsah a denní obrat železa v organismu. Převzato od Ludwig et al. (2015)

Železo může působit na organismus toxicky. Za fyziologických podmínek je železo přítomné ve formě  $\text{Fe}^{3+}$  komplexů, ale pro transmembránový transport je nezbytná jeho redukce. A právě redoxní vlastnosti železa jsou zodpovědné za vznik volných hydroxylových radikálů, v jejichž vzniku spočívá jeho toxicita. Železo působí tedy jako preoxidant, který katalyzuje tvorbu reaktivního kyslíku. Nejznámější je Fentonová reakce, která vede k tvorbě hydroxylových radikálů:



Redukce kyslíku o jeden elektron působením  $\text{Fe}^{2+}$  vytváří superoxidové anionty  $\text{O}_2^{\bullet-}$ :



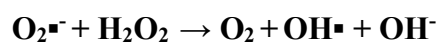
Tyto superoxidové anionty můžou být rozptýleny dvěma způsoby: neenzymaticky podle rovnice:



Nebo enzymaticky mohou superoxid dismutasy (SODs) redukovat zbylé nestabilní  $\text{Fe}^{3+}$  ionty, což vede k tvorbě kyslíku a  $\text{Fe}^{2+}$ :



Všechny uvedené reakce jsou známe jako Haber-Weissova reakce. Výsledek reakcí se může shrnout to jedné rovnice:



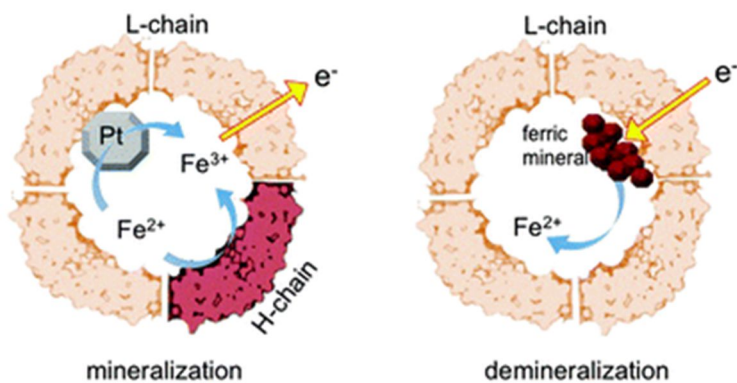
V buňkách se mohou nacházet i jiné látky, které vystupují jako redukční činidla např. askorbát a GSH, a které mohou redukovat  $\text{Fe}^{3+}$  podobným způsobem, jaký je uveden v reakci 4. To znamená, že i molekuly, které vystupují v organismu jako antioxidanty mohou vystupovat jako preoxidanty v přítomnosti dostatečné koncentrace nestabilního železa (Lawen and Lane, 2013).

### 1.5.1 Absorpce železa ze střeva

Železo se z potravy vstřebává zejména v duodenu tenkého střeva. V přijímané potravě se nachází dva typy železa, hemové železo ( $\text{Fe}^{2+}$ ), představuje asi 10 % a nehemové železo tzn. ve formě iontů ( $\text{Fe}^{3+}$ ), asi 90 % (Munoz et al., 2009).

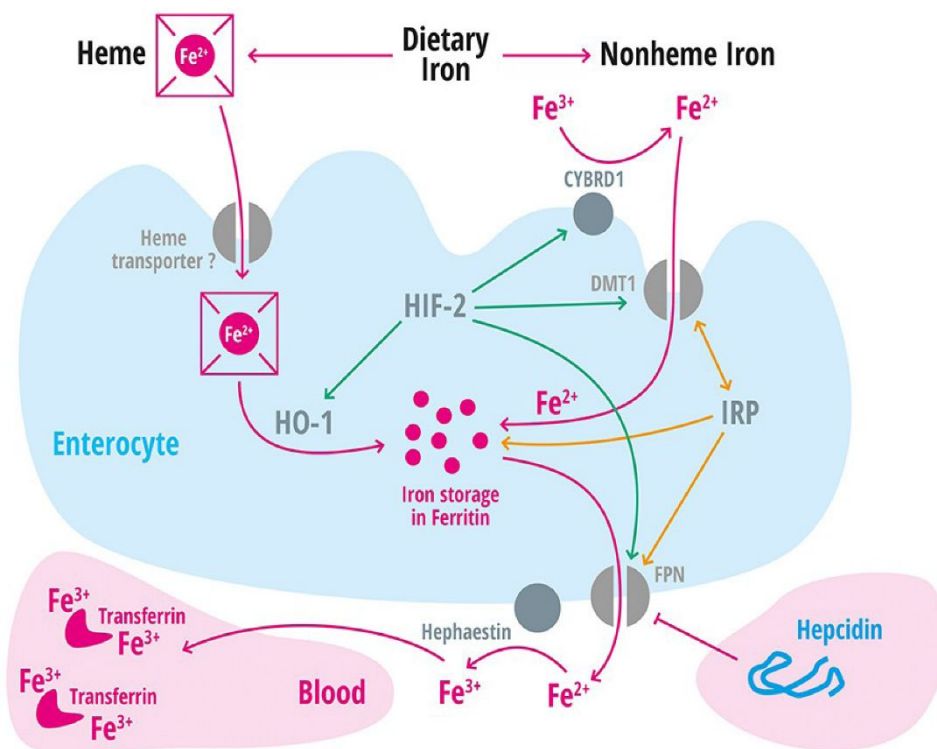
Rostlinná strava je bohatá především na nehemové železo, které je těžko absorbovatelné, a proto musí být nejdříve redukováno na  $\text{Fe}^{2+}$ , CYBRD1 (duodenal cytochrom b-like ferrireductase) enzymem vázaným na apikální membráně (Munoz et al., 2009) duodenálních enterocytů (Ludwig et al., 2015). Následně je železo transportováno přes kartáčový lem střeva pomocí divalent metal transporteru 1 (DMT1, SLC11A2 nebo NRAMP2) do nitra enterocytů. DMT1 transportuje také zinek, měď a kobalt (Munoz et al., 2009).

Živočišná potrava naopak obsahuje především hemové železo. Hemové železo je také vychytáváno ve střevě prostřednictvím transportéru heme carrier protein 1 (HCP1), avšak přesný proces transportu není znám. Hemové železo je pak uvolňované v enterocytech působením hem oxygenasy (HMOX1). Oba druhy železa mohou být uchovávány v enterocytech ve formě ferritinu (FTL) nebo mohou být bazolaterálním transportérem ferroportinem (SLC40A1) transportovány do krevní cirkulace (Munoz et al., 2009). Ferroportin (FPN) je transmembránový protein, který zprostředkovává eflux železa z makrofágů, enterocytů a hepatocytů do plazmy (Arezes and Nemeth, 2015; Reichert et al., 2017). Ferritin je tvořen dvěma podjednotkami H-ferritin (FTH1, tz. heavy) a L-ferritin (FTL, tvz. light). To umožňuje tvorbu široké škály isoformů ferritinu, které jsou specifické pro různé tkáně v těle. Po vazbě železnatých iontů na ferritin dochází k oxidaci  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$  za pomoci vnitřní ferroxidázové aktivity FTH1. Touto oxidací se zabrání vzniku Fentonovy reakce. Zatímco FTL postrádá ferroxidázovou aktivitu, umožňuje transfer elektronu v obálce proteinu (Obr. 15) (Lawen and Lane, 2013; Carmona et al., 2014).



Obr. 15: Schematické znázornění přenosu elektronů přes podjednotky L-řetězce během mineralizaci železa a demineralizaci ferritinu. Převzato od Carmona et al. (2014).

Železo se uvolňuje z ferritinu jeho degradací, která je ale neúplná a vede ke vzniku hemosiderinu. Ten byl identifikován především v lysozomech a retikuloendoteliálních makrofázích. Hemosiderin dokáže vázat železo také, ale jeho uvolňování je mnohem složitější než u ferritinu. Malé množství ferritinu může být transportováno do jádra, kde se předpokládá jeho protektivní účinek vůči poškození DNA (Lawen and Lane, 2013). Pokud železo není uschováno ve ferritinu (hepatocyty, kosti apod.) pak je transportováno do plazmy. Tento transport je závislý na oxidaci železa hephaestinem (Hp-multi-copper oxidase protein). Hephaestin je na membránu vázaná vícesložková ferroxidáza, podobná plazmovému ceruloplasminu, která oxiduje  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$ , a tím umožní navázání železa na transferrin (Tf) v plazmě (Obr. 16) (Munoz et al., 2009; Anderson et al., 2012). Největší vazební sílu má železo na Tf při pH 7,4 (Lawen and Lane, 2013).



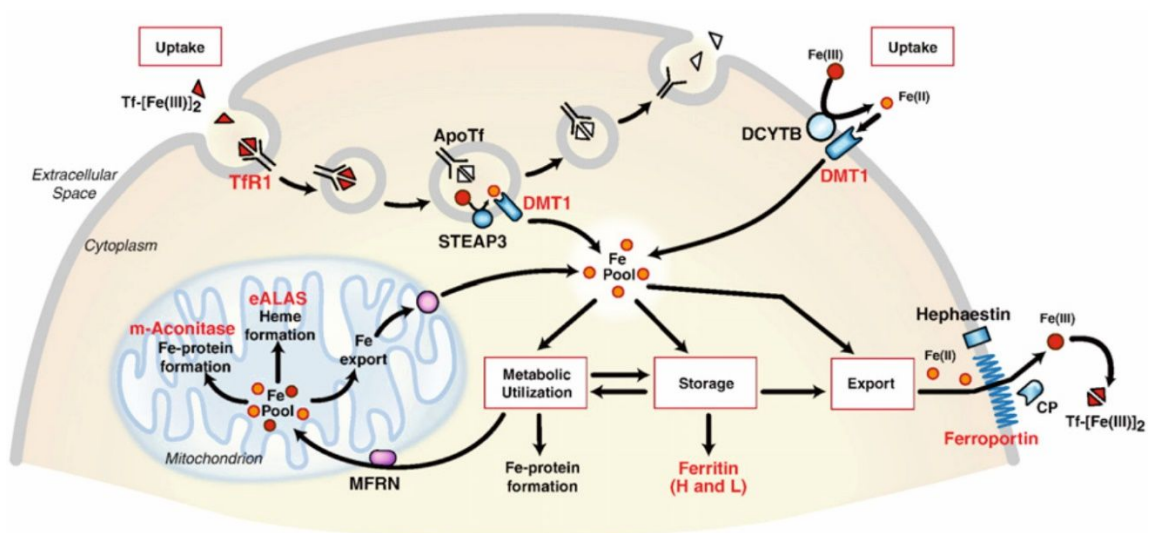
Obr. 16: Absorpce železa ve střevě. Absorpce hemového železa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) není zcela prozkoumána a pravděpodobně je zprostředkována transportérem hemu. Intracelulárně se železo uvolňuje z hemu enzymem hemoxygenázou-1 (HO-1). Nehemové železo ( $\text{Fe}^{3+}$ ) je redukováno membránovou reduktázou CYBRD1 (DCYTB) pro transport do střevního enterocyty divalentním transportérem kovů (DMT1). V enterocyty může být železo skladováno ve feritinu nebo exportováno do krevního oběhu ferroportinem (FPN, SLC40A1). Expresi FPN je kontrolována hepcidinem. Hephaestin, multicopper oxidasa je nutná pro inkorporaci dvou  $\text{Fe}^{3+}$  do jedné molekuly transferrinu (Tf). Hypoxií indukovatelný faktor 2 (HIF-2) kontroluje expresi mRNA CYBRD1, DMT1, FPN a Ho-1 (znázorněno zeleně); proteiny regulující železo (IRP) kontrolují expresi DMT1, feritinu a FPN post-transkripčně (znázorněno oranžově). Převzato od Steinbicker and Muckenthaler (2013).

### 1.5.2 Cirkulace železa v krvi

Transferrin je glykoprotein, který na sebe váže dvě molekuly  $\text{Fe}^{3+}$  (Tf-Fe). Touto vazbou se stává železo rozpustným v plazmě a také se snižuje riziko potenciálního vzniku volných radikálů (Ludwig et al., 2015). Tf-Fe je z plazmy vychytáván pomocí speciálních receptorů na membránách buněk, tzv. transferrinové receptory (Tfr). Lidský organizmus má dva typy receptorů, kterými je železo vychytávané z plazmy: transferrinový receptor 1 (Trf1), který sa nachází ve všech buňkách a transferrin receptor 2 (Trf2), který se nachází výlučně v hepatocytech, buňkách duodena a v erytroidních buňkách (Hofer et al., 2008; Lawen and Lane, 2013). Tf-Fe se tedy váže na Tfr a dochází ke vzniku komplexu, který je formou klathrinového váčku přenášen endocytózou do endosomů buňky. V endosomech dochází

k poklesu pH (5,3-5,6) prostřednictvím ATP-protonové pumpy. Díky poklesu pH se komplex rozpadá a železité ionty se mění prostřednictvím feroreduktázy (six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-3, Steap3) na železnaté ionty a následně jsou DMT1 transportérem exportovány do cytosolu buňky. Komplex Tf-Tfr je recyklován zpátky do plasmatické membrány a následně disociován alkalickým prostředím extracelulárního prostoru. V hepatocytech může být Tf-Fe vychytáván nezávisle na Tfr1 endocytózou. To je pravděpodobně zprostředkováno vazbou Tf-Fe na nespecifické Tfr s nízkou afinitou a pak také pinocytózou Tf-Fe (Obr.17) (Lawen and Lane, 2013).

Tfr2 se dělí na dva typy Trf2- $\alpha$  a Trf2- $\beta$ . Zatímco Trf2- $\alpha$  je membránově vázaný protein, Trf2- $\beta$  postrádá transmembránovou doménu, kterou má Trf2- $\alpha$ , což pravděpodobně vede k vzniku solubilní formy receptoru. Trf2 má nižší afinitu k Tf než Trf1 a jeho hlavní úlohou Trf2 není vychytávání železa, ale působí jako senzor koncentrace železa v těle a podle toho řídí produkci hepcidinu (Hamp). Tento fakt je podporován zjištěním, že zatímco exprese Tfr1 je zvýšena při nedostatku železa, tak exprese Tfr2 není buněčným obsahem železa ovlivněna. Expresse Tfr2 je regulována i buněčným cyklem, kde jeho koncentrace je nejvyšší v G1-fázi (Lawen and Lane, 2013).



Obr. 17: Vychytávání železa z plazmy do buňky. Převzato od Anderson et al. (2012)

### 1.5.3 Hepcidin (HAMP)

Hepcidin je hlavním regulátorem koncentrace železa v organismu. Poprvé byl identifikován jako antimikrobiální peptid a podle toho byl původně pojmenován jako LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide). Až studie na knouckoutovaných myších prokázala jeho vliv na homeostázu železa. Hepcidin je kódovaný genem *HAMP*, který se nachází na chromozomu 19q3. Exprimován je především v hepatocytech, ale jeho exprese byla prokázána v mnohem menší míře i v jiných buňkách jako jsou makrofágy, adipocyty, lymfocyty a ledviny (Reichert et al., 2017).

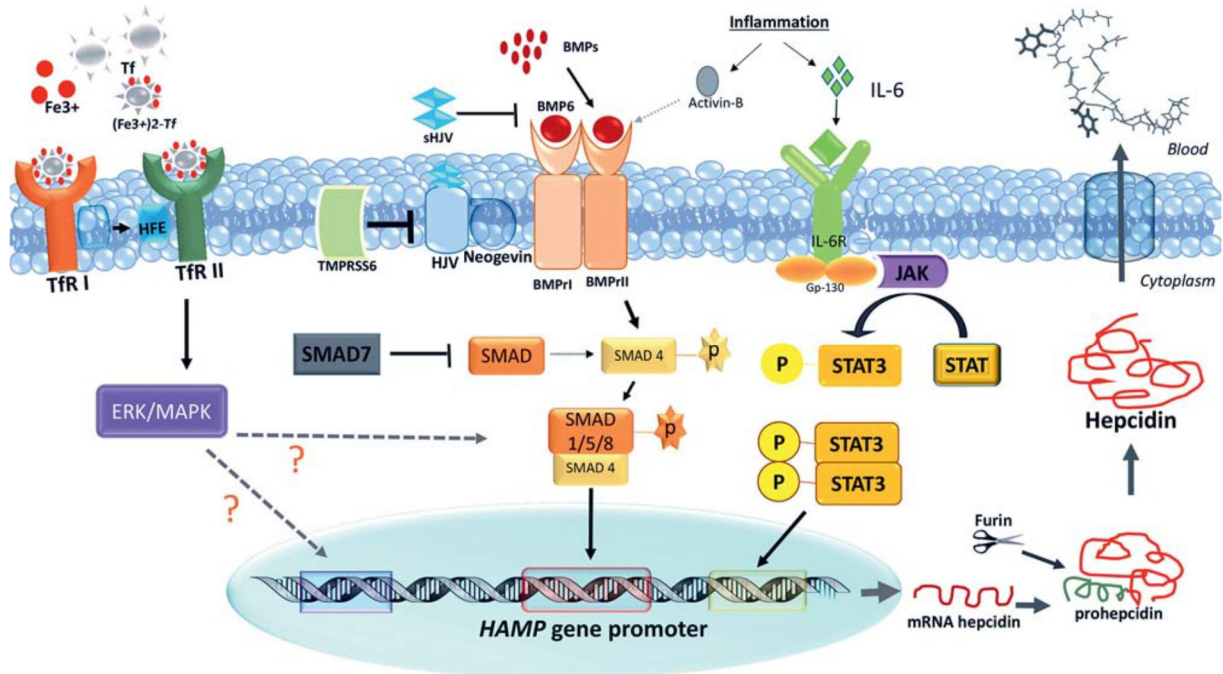
Exprese Hepcidinu může být regulována třemi signalizačními kaskádami: a) bone morphogenetic proteins (BMPs), b) JAK (Janus kinase)/STAT (signal transducer and activator of transcription) kinasami (Kroot et al., 2011; Reichert et al., 2017) a c) HFE (hemochromatosis iron protein)/TfR2 (Kroot et al., 2011).

BMPs je skupina cytokinů, do které patří také transforming growth factor  $\beta$  (Tgf- $\beta$ ). Aktivace BMP signalizace vyžaduje interakci koreceptoru heamojuvelinu (HJV) na povrchu buňky. Po navázání cytokininů (zejména BMP6) na receptor BMP dochází k aktivaci HJV a následné fosforylaci, což má za následek aktivaci signalizační kaskády. Tím dochází k vazbě threonin/serin kinasy typu I a II a receptorový komplex fosforyluje regulační SMAD (R-SMAD) a následně SMAD1/5/8. Takto vzniklý transkripční komplex dále váže SMAD4, proniká do jádra a spouští transkripci *HAMP* genu. SMAD6 a SMAD7 vystupují jako supresory transkripce *HAMP* genu v játrech. JAK/STAT signalizační kaskáda je aktivovaná navázáním IL-6 na cytoplasmatický receptor IL-6R, což je situace, ke které typicky dochází během zánětu. IL-6R je tvořen dvěma podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$ , které po vazbě IL-6 dimerizují a umožní vazbu dvou glykoproteinů gp130 a jejich homodimerizaci. Dimer gp130 získává autofosforylační schopnost a tímto způsobem aktivuje fosforylací cytoplazmatický JAK1, a ten následně STAT3. Fosforylovaný komplex STAT3 vstupuje do jádra a spouští transkripci hepcidinu v hepatocytech (Obr. 18) (Reichert et al., 2017).

Třetí signalizační kaskáda regulace je přes TfR1 a 2 receptory. Na TfR1 se nachází HFE a po vazbě Tf-Fe komplexu na receptor TfR1 dochází k přemístění HFE na TfR2. Interakce TfR2-HFE aktivuje transkripci přes BMP, ale přesný proces nebyl popsán. Byla prokázána i aktivace signalizační kaskády ERK1/2 přes TfR2 a/nebo HFE. Nicméně studie provedené na myších po podání různých dávek železa neprokázaly změny ERK1/2 signalizační kaskády.



Proto se dá předpokládat, že signalizační kaskáda ERK1/2 nemá žádný vliv na regulaci homeostázy železa (Obr. 18) (Kroot et al., 2011)



Obr. 18: Na obrázku jsou zobrazené tři signalizační kaskády regulace exprese *HAMP* genu. Převzato od Reichert et al. (2017)

### 1.5.4 Hepcidin a jeho role v regulaci železa

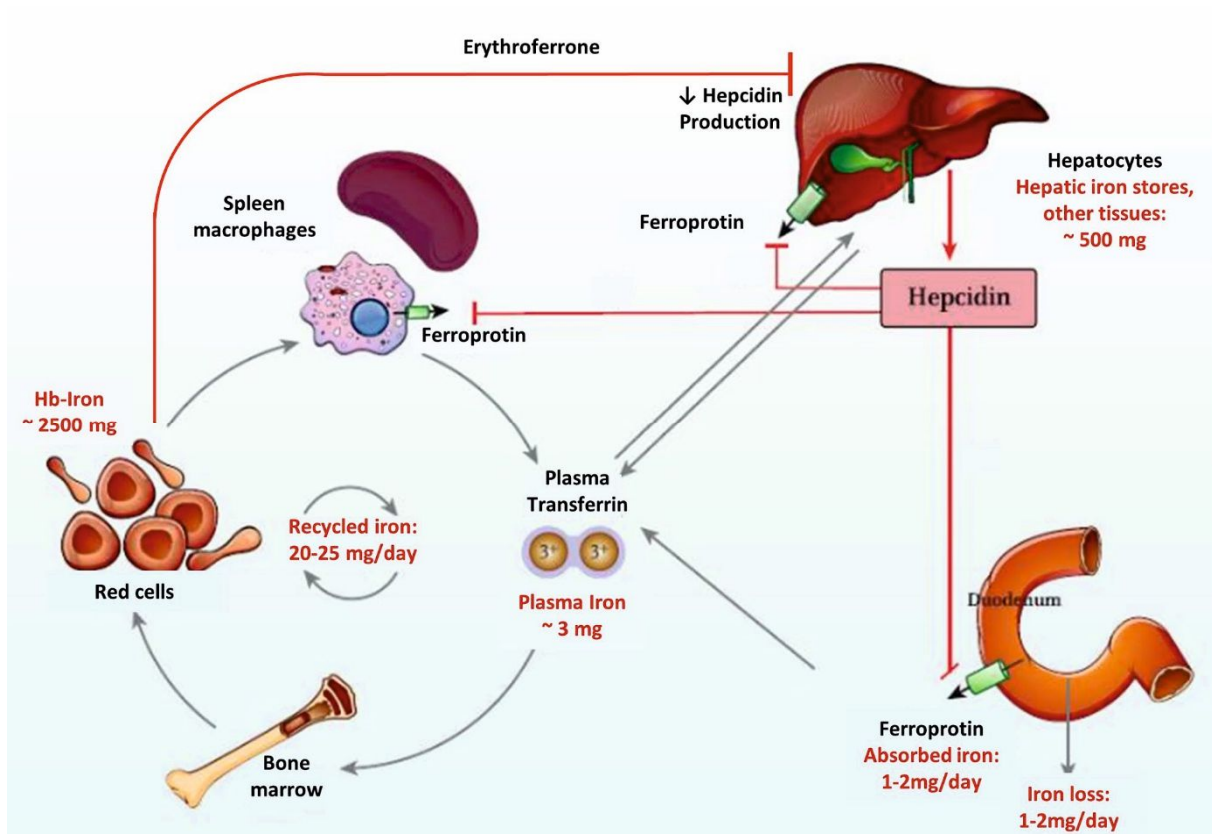
Za fyziologických podmínek se v organismu vyskytuje ve formě prohepcidinu. Prohepcidin je působením enzymu furinu aktivován na hepcidin. V organismu najdeme tři izoformy hepcidinu jejichž sérová koncentrace je za fyziologických podmínek nízká, ale vlivem patologické změny (např. sepse) se jejich koncentrace zvyšuje (Reichert et al., 2017).

Mezi izomorfy hepcidinu patří Hepcidin-25, který je nejvíc studován a pak dvě menší izoformy Hepcidin-20 a -22. Přesná funkce Hepcidinu-20 a -22 není známa. Některé práce naznačují, že Hepcidin-20 má v kyselém prostředí (pH 5.0) antimikrobiální a antimykotické vlastnosti, ale na rozdíl od Hepcidinu-25 nemá žádnou schopnost vázat FPN (Addo et al., 2016).

Koncentrace hepcidinu se zvyšuje také během hypoxie, zánětu, poškození endoplasmatického retikula a především při zvýšení koncentrací železa v séru. Při zánětu

dochází především k produkci interleukinů (IL) a to IL-1, IL-6 a IL-22. Ty zvyšují expresi *HAMP* genu přes vazbu na IL-R a spuštěním signální kaskády SMAD/STAT3, čímž se snižuje koncentrace železa v plazmě. Exprese *HAMP* a následné snížení koncentrace hepcidinu bylo pozorováno i po podání vitamínu D (Reichert et al., 2017).

Hepcidin reguluje koncentraci železa v organismu prostřednictvím efluxu železa z buněk. Tato regulace probíhá na třech úrovních: absorpce v duodenu, recyklace z makrofágů sleziny a jater, a uvolňováním železa ze zásob v hepatocytech (Obr. 19). Hepcidin se váže na jediný efluxní transportér pro železo FPN, a touto vazbou dochází k ubiquitinaci a mění se konformace FPN. Komplex ferroportin-hepcidin je endocytózou přenášen do lysozomů, kde je degradován a tím se zabrání exportu železa z buňky. Tímto způsobem se nekontroluje jen koncentrace železa v organismu, ale současně železo reguluje expresi hepcidinu (Arezes and Nemeth, 2015).



Obr. 19: Regulace koncentrace železa v organismu působením hepcidinu. Převzato od Ludwig et al. (2015).

### 1.5.5 Regulace koncentrace železa v buňce

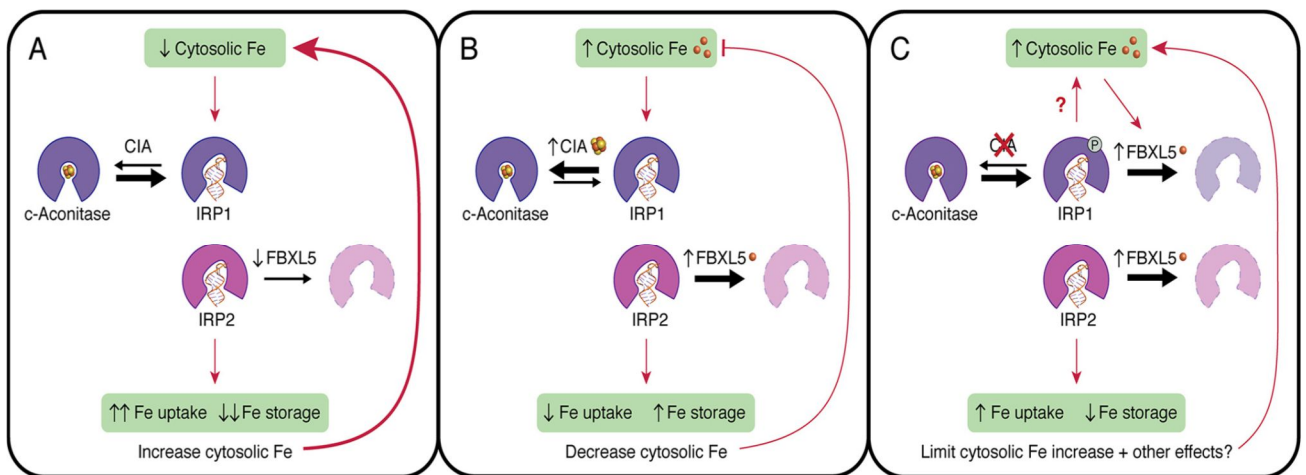
Obrat železa v buňkách je zajištěn souhrou mechanismů, které zodpovídají za vychytávání, příjem, uchovávání a export železa. Tato regulace probíhá na transkripční i post-transkripční úrovni a kromě hepcidinu se na ní podílí i speciální regulační proteiny tzv. iron-regulatory proteins 1 a 2 (IRP1 a IRP2, známé i jako ACO1 a IREB2). IRP jsou cytosolické proteiny, které se vážou na iron-responsive elements (IREs) na 5' nebo 3' konci netranslatované části mRNA (UTR–untranslated region) kódující proteiny potřebné pro vychytávání železa (Tfr1, DMT1), jeho uchování (ferritin-Ftl) a export (ferroportin) (Anderson et al., 2012). Kanonické IRE sestávají přibližně z 30 nukleotidů dlouhé struktury a terminální hexanukleotidové smyčky CAGUG(N)/CAGAG(N) a nepárového cytosinu na 5' konci vlákna. Z biochemické studie vyplynulo, že první (C14) a pátý (G18) nukleotid mohou vytvořit dvojici koncových smyček a AGU/AGA pseudo-trojsmyčku, která je nezbytná pro vazbu s IRP. Nekanonické IRE mají delší terminální smyčku (CAGUGUCA) a v oblasti nepárového cytosinu se nacházejí jiné nukleotidy, ačkoliv jsou stále schopné navázat IRP1 nebo IRP2. (Liang et al., 2017).

Pokud dochází k poklesu koncentrace železa v buňce, IRP se naváže s vysokou afinitou na 5' UTR konec IREs mRNA Ftl a ferroportinu, a tím dojde k jejich degradaci a zabrání se tak translaci. Na mRNA Trf1 a DMT1 se váže IRP na 3' UTR konec a tím dochází k stabilizaci a zabrání se tak degradaci mRNA, která je následovaná translací. Naopak při vysoké koncentraci železa v organismu dochází k opačnému efektu - obsah aktivních IRP klesá, neváží se na IREs mRNA Ftl a ferroportinu, což vede k translaci proteinů a u Trf1 naopak k degradaci mRNA. IRE se nacházejí i na mRNA, které kódují proteiny s různou funkcí např.: pro buněčnou proliferaci, pro cytoskeletální dynamiku (MRCK $\alpha$ ), pro buněčný cyklus (CDC14A) apod. (Anderson et al., 2012).

Koncentrace IRP1 a IRP2 jsou regulované množstvím železa v buňce. IRP1 ve své cytosolické apoproteinové formě může vázat tzv. klastry železa se sírou (4Fe–4S) (Anderson et al., 2012). Pro inzerci 4Fe–4S do IRP1 je vyžadována specifická cytosolická signalizace přes tzv. CIA („the cytosolic iron-sulfur assembly pathway“). Podstatou regulace je, že pokud je dostatečná nebo zvýšená koncentrace železa v buňce, IRP1 naváže 4Fe–4S kluster a vytváří tzv. aconitasu, což zabrání další vazbě na příslušné mRNA. Naopak nedostatek železa v buňce neumožní vazbu klusteru na IRP1 a protein se váže na mRNA (Outten, 2017).

IRP1 sehrává adaptační úlohu v závislosti na dostupnosti kyslíku, přítomnosti reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) (Anderson et al., 2012). Důsledkem hypoxie a následním návratem do normální koncentrace O<sub>2</sub> je produkce ROS. Železo k produkci ROS přispívá Fentonovou reakcí. ROS i RNS se dokáží navázat na aconitázu. Touto vazbou dochází k rozpadu klustů (4Fe–4S) s následnou inaktivací aconitasy (Schneider and Leibold, 2003).

IRP2 na rozdíl od IRP1 nevytváří cluster a s rostoucí koncentrací železa v buňce je degradován enzymem FBXL5 E3 ligasou. FBXL5 urychluje ubiquitinaci a tím degradaci IRP2 (Obr 20). Tento enzym také degraduje IRP1 na železe závislým způsobem. Nedostatek železa degradaci brání a uvolní IRP2 pro vazbu na mRNA (Outten, 2017).



Obr. 20: Vztah mezi IRP1, IRP2, CIA a FBXL5. A) Nízká cytosolická koncentrace Fe snižuje inkorporaci (4Fe–4S) klusteru do IRP1, čím se zvyšuje vazebnost na mRNA. FBXL5 je při depleci železa degradován a tím se snižuje i ubiquitinace IRP2. Celý proces vyústí k zvýšenému vychytávání a uchovávání železa v buňkách. B) Při dostatečné nebo zvýšené cytosolické koncentraci Fe se aktivuje CIA a dochází k inserci (4Fe–4S) do IRP1, což brání vazbě IRP1 na mRNA. Železo se rovněž naváže na FBXL5 a tím ho stabilizuje s následnou degradací IRP2. To vyústí ve snížené vychytávání a uchovávání železa v buňkách a celkově ke snížení koncentrace Fe v cytosolu buňky. C) Inhibicí CIA se narušuje tvorba a inserce (4Fe–4S) cluster do IRP1, což zvyšuje aktivitu IRP1 a pravděpodobně vede k nárůstu cytosolového Fe a stabilizaci FBXL5. Převzato od Outten (2017).

## 1.5.6 Změny dispozice železa v organismu

Důležitá role železa v řadě fyziologických funkcí se projevuje při změnách jeho obsahu v organismu, kdy obě možné situace, jak jeho nedostatek, tak i nadbytek, mohou indukovat poškození organismu v závislosti na stupni takto změněné dispozice.

### 1.5.6.1 Nedostatek železa (sideropenie)

Různý stupeň nedostatku železa je světově nejčastější nutriční poruchou a ve vyspělých zemích postihuje 2-20 % populace (Killip et al., 2007). Tento značný výskyt je dán širokým spektrem fyziologických a hlavně patologických situací, které jsou provázeny nedostatkem železa jak sumarizuje Tabulka 4. Klinické příznaky se pak rozvíjejí podle stupně deficitu. V mírnějších formách, kdy ještě nejsou vyčerpány zásoby železa, nejsou příznaky vyvinuty a změny se odehrávají převážně na úrovni metabolických/biochemických pochodů – klesá plazmatická hladina hepcidinu a ferritinu a naopak stoupá koncentrace transferrinu a jeho vazebná kapacita pro železo; hladiny železa jsou ve fyziologických mezích. S dalším prohloubením nedostatku železa se však rozvíjí deficit erytropoézy a finálně mikrocytární hypochromní anémie, kde již klesá i plazmatická hladina železa. Diagnóza se za této situace opírá o typické klinické příznaky (Tabulka 4.) a hematologické a biochemické vyšetření krve (Camaschella, 2017). U dospělého muže se za anémii považuje, pokud klesne koncentrace hemoglobinu pod 130 g/l, zatím co u žen je to pod 120 g/l a v těhotenství je tato koncentrace nižší než 110 g/l (Killip et al., 2007). Následná léčba spočívá podávání enterálních nebo intravenózních léčivých přípravků s železem společně s řešením případné vyvolávající patologie (Camaschella, 2017).

**Tabulka 4. Hlavní příčiny nedostatku železa/ anemie z nedostatku železa**

Typ příčiny	Stav	Příčina
zvýšené požadavky	dětství, dospívání	rychlý růst
	podávání léčiv stimuluji- cí erytropoetin	akutní expanze erytroidní hmoty

	těhotenství (2 a 3 trimestr)	expanze mateřské a fetální erytroidní hmoty
snížení příjem	Malnutrice	nedostatek Fe v potravě
	vegetariáni, vegani	snížení biologicky dostupného železa
snížená absorpce ze střeva	gastrektomie, duodenální bypass, bariatrická chirurgie, celiakální sprue, zánětlivá onemocnění střev	snížení absorpční plochy
chronická ztráta krve	benigní, maligní léze	GIT
	atrofická gastritida	↑ pH
	infekce <i>Helicobacter pylori</i>	↑ pH
	pravidelní dárci krve	ztráta krve
	refrakterní anémie z nedostatku železa	↑ vysoká koncentrace hepcidinu ( <i>TMPRSS6</i> mutace)
	chronické onemocnění ledvin	krvácení, snížená exkrece hepcidinu
	léčiva: salicyláty, glukokortikoidy, NSAID, inhibitory protonové pumpy	indukce ztrát, menší vstřebání
krvácení z dělohy, hematurie, intravaskulární hemolýza (např. paroxysmální noční hemoglobinurie)	ztráty krve	
zánět	chronická onemocnění ledvin, zánětlivá onemocnění střev, obezita	↑ prozánětlivé cytokiny, ↑ hepcidin
	chronické srdeční selhání	neznáma patogeneze
akutní ztráta krve	operace	post-operační anémie (průvodní ID)

Převzato od Camaschella (2017).

### 1.5.6.2 Nadbytek železa

Organismus je k nadměrné kumulaci železa predisponován absencí exkreční cesty pro tento prvek. K nadbytku pak dochází v důsledku situací spojených s jeho nadměrným příjmem v dietě nebo častěji poruchou odpovědných homeostatických mechanismů (Tabulka 5.) (Munoz et al., 2009)

**Tabulka 5. Hlavní příčiny kumulace železa v játrech**

Nemoc	mutace genu	genotyp
<b>Hereditární hemochromatóza</b>		
1. typ – dospělí	HFE	C282Y/C282Y, V282Y/H63D
2A. typ (HFE2A) – dětská	Hemojuvelin	
2B. typ (HFE2B) - dětská	Hepcidin	
3. typ - dospělí	Transferrin receptor 2	
4. typ - dospělí	Ferroportin	
<b>Hemosideróza sekundární k systémovému onemocnění</b>		
transfuze		
chronická anemie		
poruchy erytrocytů (hemolýza, neefektivní erytropoéza)		
<b>Hemosideróza související s cirhózou</b>		
různé hemosiderózy		
neonatální hemochromatóza		
hemosideróza spojená s chronickými virovými hepatitidami, ztukovatění jater		
dietní přetížení železem, dysmetabolický syndrom s nadbytkem železa (DIOS)		
<b>Thalasemie</b>	globin	

Převzato od Batts (2007) a Cao and Galanello (2010).

Železo se hromadí především v játrech (v parenchymových i neparenchymových buňkách), ale i v dalších tkáních např. v srdci. Nebezpečí této situace pramení ze schopnosti železa aktivovat vznik ROS s následným postupným poškozením tkáně jater, které může končit cirhózou. Včasná diagnóza a léčba může tomuto poškození zabránit. Za nejcitlivější indikátor možné kumulace železa v organismu lze označit zvýšení plazmatických hladin feritinu; zvyšování koncentrace železa v plazmě a zvýšení saturace transferinu nad 55 % již znamená překročení zásobní kapacity buněk. Postižení jater s nadměrnou kumulací lze prokázat biopticky s následnou histologickou vizualizací. Základní léčba spočívá, zejména u geneticky podmíněného nadbytku, v pravidelných odběrech krve. Léčba desferrioxaminem se provádí jen zcela výjimečně tam, kde nemocný netoleruje krevní odběry (hemolytické anémie, dyserythropoetické syndromy), neboť lék je málo účinný a velmi nákladný. U negenetických příčin je nutné léčit vyvolávající onemocnění (Aigner et al., 2015).

Klinicky nejdůležitější jsou v tomto ohledu hereditární hemochromatózy, thalasemie a dysmetabolický syndrom s nadbytkem železa.

### **Hereditární hemochromatóza (HH)**

Je to skupina geneticky podmíněných onemocnění, které vyústí do zvýšeného ukládání železa do jater a jiných orgánů (sleziny, srdce, břišní slinivky). Jednotlivé typy HH se liší dle postižení molekul zapojených do obratu železa v organismu. První typ je způsoben mutací *HFE* genu. HFE tvoří na membráně buněk komplex s Trf2, který dokáže navázat Tf-Fe. Mutace *HFE* genu vede k abnormálnímu HFE proteinu, který narušuje funkci TFR2 na hepatocytech, což se projeví sníženou syntézou hepcidinu a následně zvýšenou střevní absorpcí železa. Druhý typ má dvě podskupiny. Buď vzniká mutací hemojuvelinového genu (*HFE2A*) nebo *HAMP* genu kódujícího hepcidin (*HFE2B*). Třetí typ je spojení s mutací *TFR2* genu a čtvrtý typ s mutací genu pro ferroportin. Rozvoj HH je doprovázen pigmentací kůže, jaterní cirhózou až hepatocelulárním karcinomem, arytmiemi atd. (Kawabata, 2018).

Kumulace Fe v játrech vede jednak k zvýšené apoptóze hepatocytů, ale taky k porušení funkce lyzozomů s následnou aktivací Itových buněk přes TGFβ. Tím se tyto buňky mění v myofibroblasty s produkcí kolagenu I, III a IV typu; postupně dochází k rozvoji jaterní fibrózy (Hůlek, 2018)



## **Thalasemie**

Je autosomální recesivní onemocnění, u kterého dochází k poškození syntézy jednoho nebo více řetězců hemoglobinu. Hemoglobin je složen z železa, hemu a 4 globulinových řetězců: dvou  $\alpha$  a dvou jiných řetězců. Složení globulinových řetězců určuje pak typ hemoglobinu. Fetalní hemoglobin (HbF) obsahuje dva  $\alpha$  a dvě  $\gamma$  řetězce. Hemoglobin dospělého člověka (HbA) má dva  $\alpha$  a dva  $\beta$  řetězce (Muncie and Campbell, 2009; Cao and Galanello, 2010). Dle typu poruchy lze pak rozeznávat:

### **Alfa-talasemie**

Dochází k deficitu až absenci syntézy  $\alpha$ -řetězců co vede k přebytku dvou  $\beta$  řetězců. Syntéza  $\alpha$ -řetězců je kontrolována dvěma geny na každém chromozomu 16. Delece jednoho genu vede ke vzniku nositele, bez fenotypického projevu. Další delece genu můžou vést k vzniku mikrocytární anemie, hemolýze a splenomegalie (Muncie and Campbell, 2009).

### **Beta-Talasemia**

Dochází k deficitu nebo absenci syntézy  $\beta$  řetězců což vede k přebytku  $\alpha$ -řetězců. Syntéza řetězců je kontrolována genem na každém chromozomu 11. Na nich může docházet k víc než 200 bodovým mutacím nebo delecí obou genů. Mutace na jednu genu vyústí do mikrocitózy a mírné anémie. Anémie jsou způsobené vážnoucí inkorporací Fe do „poškozeného“ hemoglobinu; železo se pak se nadměrně hromadí v organismu. (Muncie and Campbell, 2009; Cao and Galanello, 2010)

Nemocným se podávají pravidelně transfuze. To však může vyústit do přetížení organismu železem, a to v důsledku rychlého obrátu Fe v organismu. V závislosti na terapii chelátorem železa (Cao and Galanello, 2010), např. desferrioxaminem, deferasiroxem, deferipronem (Kawabata, 2018), pak ne-/dochází k rozvoji komplikací jako: růstová retardace, perikarditida, jaterní fibróza, cizhóza, diabetes mellitus a k infekčním onemocněním (hepatitida B a C). Toto onemocnění může být doprovázeno i vznikem mírné formy žloutenky se sklonem k tvorbě žlučových kamenů (Cao and Galanello, 2010).

## **Dysmetabolický syndrom s nadbytkem železa (DIOS-Dysmetabolic Iron Overload Syndrome)**

Poškození metabolismu u DIOS je výsledkem vícero faktorů např. nadměrným příjmem potravy a genetickými faktory. Na rozdíl od HH je pro DIOS typická mírná saturace železem se zvýšenou hladinou ferritinu v séru. Pro nemocné s DIOS je charakteristická centrální obezita, zvýšený krevní tlak a zvýšení cholesterolu, triglyceridů, glukózy a inzulinu v séru. Předpokládá se, že DIOS se rozvíjí v souvislosti se změnami v jaterní a viscerální tukové tkáni. Bylo prokázáno, že obezita mění distribuci železa v makrofázích viscerální tukové tkáně s přesměrováním železa do jater. Dochází ke zvýšené expresi *Hamp* a snížené expresi *Trf1* jako indikátorů kumulace železa. U pacientů se zvýšenou koncentrací železa v játrech byla zaznamenána i zvýšená fibróza (Deugnier et al., 2017).

### **1.5.7 Železo a homeostáza žlučových kyselin**

Podezření, že by mohl existovat vztah mezi obsahem železa v organizmu a homeostázou ŽK vyplynulo ze zjištění, že zvýšené hladiny železa v séru jsou obvykle spojeny s hypercholesterolémií (Brunet et al., 1999; Silva et al., 2015), zatímco nízké hladiny vedou k poklesu sérových hladin cholesterolu (Kamei et al., 2010). Provedené molekulární analýzy ukázaly, že by tento efekt mohl být podmíněn změnami exprese CYP7A1, který určuje rychlost konverze cholesterolu na ŽK. Během nedostatku železa byla exprese CYP7A1 zvýšená, zatímco přetížení organizmu železem expresi CYP7A1 snižuje bez vztahu k příčině tohoto přetížení. Dopady na homeostázu ŽK, ani zapojené mechanismy však v době zahájení tohoto projektu, nebyly známy.

## 2. Cíl práce

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

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

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

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

## 3. Metody

### 3.1 Chemikálie

Radioaktivně značená  $^3\text{H}$ -taurocholová kyselina a Ecolite (+)<sup>TM</sup> scintilační roztok byl získán od MGP (Česká republika). Primární a sekundární protilátky (myší, králičí a kozí) byly získány od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Abcam (Cambridge, MA, USA) a Millipore (Billerica, MA, USA), Cell Signaling (Dellaertweg, Leiden, Netherlands). Standardy pro ŽK byly zakoupeny od firmy Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA; murideoxycholová,  $\alpha$ -muricholová,  $\beta$ -muricholová, glykochenodeoxycholová, tauroursodeoxycholová, taurochenodeoxycholová, tauro- $\alpha$ -muricholová, a tauro- $\beta$ -muricholová kyselina), nebo od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA; lithocholová, ursodeoxycholová, chenodeoxycholová, deoxycholová, cholová, glykolithocholová, glykoursodeoxycholová, glykocholová, glykodeoxycholová, taurocholová, taurodeoxycholová, hyodeoxycholová a hyocholová kyselina).

Deuteriem vnitřně značené standardy byly získány od Santa Cruz Biotechnology (d5-taurocholová, d5-glykocholová, d4-glykochenodeoxycholová a d4-taurochenodeoxycholová kyselina) nebo od společnosti Sigma-Aldrich (d4-chenodeoxycholová, d4-lithocholová, d4-cholová, d4-ursodeoxycholová a d4-deoxycholová kyselina). Octan amonný a kyselina mravenčí (obě použité pro LC-MS analýzu) byly nakoupeny u Sigma-Aldrich; acetonitril (použitý pro LC-MS analýzu) byl získán od Merck (Darmstadt, Germany); menthanol (použitý pro LC-MS analýzu) byl získán od Biosolve BV (Valkenswaard, Netherlands). Všechny ostatní chemikálie byly nejvyšší analytické jakosti a byly získány od Sigma-Aldrich (St. Louis, CA, USA) nebo Biorad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

### 3.2 Pokusná zvířata

Ve studii byli použiti potkaní samci kmene Wistar (Velaz, Praha, Česká republika) o výchozí hmotnosti  $250 \pm 20$  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.

Zvířata byla rozdělena do čtyř skupin

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

Zvířata byla krmena a aplikována ve stejné době a během studie nebyly mezi skupinami zaznamenány změny příjmu potravy.

### 3.3. *In vivo* studie

V celkové anestezii i.p. podáním pentobarbitalu (50 mg/kg) byl potkanům zakanylován ductus choledochus pro sběr žluče, a. carotis externa pro odběr krve a v. jugularis pro aplikaci fyziologického roztoku (6 ml/kg/h, náhrada ztrát perspirací a odběry, vybrané skupiny s kontrolní dietou a dietou s deplecí železa touto cestou obdržely rovněž radioaktivně značenou <sup>3</sup>H-taurocholovou kyselinu). Žluč byla sbírána do předvážených mikrozkušavek ve 30 min intervalech, vzorky krve byly odebírány uprostřed těchto sběrných intervalů. *In vivo* studie byla ukončena po 120 min usmrcením zvířat exsanguinačním odběrem z břišní aorty. U zvířat ve studii s přetížením železem, byl před tímto odběrem ještě proveden odběr portální krve. Okamžitě po usmrcení byla vyjmuta a zvážena játra a střeva pro následné PCR, Western blot, LC-MS, HPLC, histologické a imunohistochemické analýzy. Vzorky plazmy a žluči byly do doby analýzy uchovávány při -80°C. Zvířata s i. p. aplikací fyziologického roztoku a železa byla na 24 hod po 7. dávce umístěna do metabolických klecí pro sběr stolice. Stolica byla po dobu 72 hod sušena při pokojové teplotě a následně z ní byly izolovány a stanoveny ŽK již popsanou metodou (Yu et al., 2000).

### 3.4 *In vivo* studie s aplikací <sup>3</sup>H- taurocholové kyseliny

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

### 3.5 Biochemické analýzy

Biochemické vyšetření plazmy (koncentrace: glukózy, triacylglycerolů (TAG), cholesterolu, bilirubinu a železa, aktivita AST a ALT) bylo provedeno na analyzátoru Modular PP (Roche, Basel, Switzerland). Na stanovení fosfolipidů a cholesterolu byly použity komerčně dostupné kity (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Cat. No. MAK049; Cayman Chemical, Michigan, USA, Cat. No.10007640). Koncentrace redukovaného (GSH) a oxidovaného glutathionu (GSSH) v játrech byly stanoveny pomocí HPLC analýzy dříve popsanou metodou (Hirsova et al., 2013). Pro stanovení <sup>3</sup>H-taurocholátu byl každý vzorek plazmy (25  $\mu$ L) a žluče (5  $\mu$ L) smíchán s 5 mL Ecolite scintilačním roztokem a inkubován 3 hod ve tmě (na potlačení luminiscenčního šumu). Poté byly vzorky analyzovány na Tri-Carb (Canberra Packard) podle návodu výrobce. Hematologické parametry byly analyzovány ve studii s nedostatkem železa bezprostředně po odběru krve na analyzátoru Sysmex XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan) podle doporučení výrobce. Jaterní koncentrace železa byla stanovena atomovou absorpční spektroskopií (Evenson, 1988). Saturační index cholesterolu (CSI) ve žluči byl vypočítán jako poměr skutečného molárního procenta cholesterolu ve žluči k maximálnímu rozpustnému molárnímu procentu cholesterolu při dané koncentraci žlučových kyselin a fosfolipidů (Metzger et al., 1972). Maximální rozpustnost cholesterolu byla vypočítána podle Carey (1978).

### 3.6 LC-MS analýza

Pro stanovení koncentrace jednotlivých žlučových kyselin bylo použito 50  $\mu$ L plazmy. Ta byla precipitována 160 ml acetonitrilu (obsahoval směs deuterium značených standardů) s následnou centrifugací při 15000g po dobu 10 min při pokojové teplotě. Supernatant byl

odpařen při 60 °C pod proudem dusíku, a exsikát pak rozpuštěn v 50 µL 40% methanolu a inkubován po dobu 1 hod při -20 °C. Po 10 min centrifugaci při 15000g (10 °C) se na LC-MS analýzu použilo 10 µL. Vzorky žluče byly ředěné 500x destilovanou vodou a pak se postupovalo stejně jako u plazmy. Vzorky byly separovány pomocí HPLC systému (Dionex Ultimate 3000, Dionex Softron GmbH, Germany) vybaveného Pinnacle DB C18 kolonou (100 × 2,1 mm, 3 µm, Restek, USA) a vhodnou předkolonou. Mobilní fáze byla složena z vody, methanolu, octanu amonného a kyseliny mravenčí, průtok byl 0,3 mL/min, s teplotou 55 °C uvnitř kolony. Koncentrace octanu amonného a kyseliny mravenčí byla po celou dobu 0,005 M a 0,012 % (v/v), s následovnou koncentrací (v/v) methanolu: 0-2,5 min 40 %; 2,5-3,5 min 40-57 %; 3,5-9,5 min 57-59 %; 9,5-10,0 min 59-70 %; 10,0-14,0 min 70-72 %; 14,0-16,0 min 72-76 %. Kolona byla následně promyta 95% methanolem po dobu 9 min a stabilizovaná 40% methanolem po dobu 5 min (octan amonný a kyselina mravenčí byly přítomny v obou krocích). ŽK byly detekovány v triplikátech na quadropolovém hmotnostním spektrometru (TSQ Quantum Access Max vybaveného H-ESI II sondou, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) pracujícím v SRM modu. Monitorované tranzice byly 375.3 → 375.3 pro monohydroxy, 391.3 → 391.3 pro dihydroxy a 407.3 → 407.3 pro trihydroxy ŽK. Glycin konjugované mono-, di-, trihydroxy ŽK byly detekované při 432.3 → 432.3 (432.3 → 74.1), 448.3 → 448.3 (448.3 → 74.1) a 464.3 → 464.3 (464.3 → 74.1). Taurin konjugované mono-, di-, trihydroxy ŽK byly detekované při 482.3 → 482.3 (482.3 → 124.1), 498.3 → 498.3 (498.3 → 124.1) a 514.3 → 514.3 (514.3 → 124.1). Vnitřní standard obsahoval 4-5 atomů deuteria, což zvyšovalo *m/z* o 4-5. Všechny přechody byly monitorovány od 1 do 18 minuty, aby se tak umožnila i detekce nespécifických ŽK, které se nenacházejí ve směsi standardů. Kyseliny tauro- $\alpha$ -muricholovou a tauro- $\beta$ -muricholovou se nepodařilo oddělit, proto vytváří jeden integrovaný vrchol. Dále jsme vypočítali poměr CA/CDCA ve žluči pro stanovení aktivity CYP8B1 jako rychlost určujícího enzymu v klasické cestě syntézy ŽK (Porez et al., 2012). Protože koncentrace CA a CDCA ve žluči našich zvířat byla pod hranicí detekčního limitu, bylo počítáno s poměrem jejich taurinem konjugovaných forem TCA/TCDCa.

### 3.7 RT-PCR

Genová exprese (mRNA) byla stanovena kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí po předchozí reverzní transkripci (qRT-PCR) na 7500 HT Fast-Real-Time PCR Systému od Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA). Na izolaci mRNA bylo použito 20-30 mg tkáně jater a 30-40 mg tkáně ilea za použití TRI reagentu

(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Izolovaná mRNA byla přepsána do cDNA použitím High Capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies). Každý vzorek byl analyzován v duplikátu a pro analýzu exprese bylo použito 10 ng cDNA vzorku. Amplifikace byla provedena za použití TaqMan Fast Universal PCR Master Mixu a Taq-Man Gene Expression Assay kitů (Life Technologies). Seznam použitých genových sad uvádí Tabulka 6. Jako vnitřní kontrola byl použit GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) nebo RLP0 gen pro normalizaci výsledků exprese genu z tkáně jater zvířat a lidských buněk. Podmínky PCR byly následující: 95°C po dobu 20 s, 40 cyklů: 95°C po dobu 3 s, 60°C po dobu 30 s. Relativní exprese byla vypočítaná dle zavedené metody (Hirsova et al., 2013).

**Tabulka 6: Seznam použitých genových sad**

<b>Symbol genu</b>	<b>Antigen</b>	<b>Life Technologies kat. číslo</b>
<i>Slc10a1</i>	Ntcp	Rn00566894_m1
<i>Slco1a1</i>	Oatp1a1	Rn00755148_m1
<i>Slco1a4</i>	Oatp1a4	Rn00756233_m1
<i>Slco1b2</i>	Oatp1b2	Rn00668623_m1
<i>Srebf1</i>	Sreb1	Rn01495769_m1
<i>Srebf2</i>	Sreb2	Rn01502638_m1
<i>Scarb1</i>	Sr-b1	Rn0058588_m1
<i>Abcc3</i>	Mrp3	Rn01452854_m1
<i>Abcc4</i>	Mrp4	Rn01465702_m1
<i>Abcb11</i>	Bsep	Rn00582179_m1
<i>Abcc2</i>	Mrp2	Rn00563231_m1
<i>Abcb1a</i>	Mdr1a	Rn00591394_m1
<i>Abcb1b</i>	Mdr1b	Rn00561753_m1
<i>Abca1</i>		Rn007110172_m1
<i>Slc10a2</i>	Asbt	Rn00691576_m1
<i>Abcb4</i>	Mdr2	Rn00562185_m1
<i>Abcg5</i>		Rn00587092_m1
<i>Abcg8</i>		Rn00590367_m1



<b>Symbol genu</b>	<b>Antigen</b>	<b>Life Technologies kat. číslo</b>
<i>Aqp8</i>		Rn00569732_m1
<i>Hmgcr</i>		Rn00565598_m1
<i>Ldlr</i>		Rn00598442_m1
<i>Slc4a2</i>	Ae2	Rn00566910_m1
<i>Cyp7a1</i>		Rn00564065_m1
<i>Cyp8b1</i>		Rn0144502_m1
<i>Cyp27a1</i>		Rn00710298_m1
<i>Fgf15</i>	Fgf19	Rn005907081_m1
<i>NrOb2</i>	Shp	Rn00589173_m1
<i>Nr1h4</i>	Fxr	Rn00572658_m1
<i>Nr1h3</i>	Lxr	Rn00581185_m1
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>		Rn99999017_m1
<i>IL-6</i>		Rn99999011_m1
<i>Nos2</i>		Rn00561646_m1
<i>Acta2</i>	$\alpha$ -Asma	Rn01759928_g1
<i>Tgf-<math>\beta</math>1</i>		Rn00572010_m1
<i>Nqo1</i>		Rn00566528_m1
<i>Cftr</i>		Rn01455979_m1
<i>Hmox1</i>	Ho-1	Rn01536933_m1
<i>Hamp</i>	Hepcidin	Rn00584987_m1
<i>Trfc</i>		Rn01474701_m1
<i>Slco40a1</i>	Ferroportin	Rn00591187_m1
<i>Ftl</i>	Ftl1	Rn00821072_g1
<i>Slc51a</i>	Osta	Rn01763289_m1
<i>Slc51b</i>	Ost $\beta$	Rn01767005_m1
<i>Gapdh</i>		4352338E

### 3.8 Western blot

K přípravě vzorku bylo použito přibližně 200 mg tkáně jater nebo střeva, které byly homogenizovány ve vychlazeném pufru (1 ml) (25 mM TRIS.HCl (pH=7,6), 0,1 % (w/w) TRITON-X) obsahujícím 0,5 µg/ml leupeptinu, 50 µg/ml benzamidinu a 10 µl/ml inhibitorů fosfatas (Thermo Scientific Prague, Czech Republic) za použití homogenizátoru MagNA Lyser (Roche Diagnostics GmbH, Německo) 2 × 15 s při 6500 rpm. Supernatant byl získán centrifugací při 10000g/10 min/t 4°C a následně sedimentován při 100 000g / 20 min/t 4°C. Po odstranění supernatantu se získané pelety re-suspendovaly puftrem obsahujícím 50 mM HEPES (pH= 7.4), 0.1 KCl, 3 mM MgCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol a inhibitory fosfatas a proteas (aprotinin, leptin, benzamid). Buněčný lyzát s HepaRG buněk byl připraven homogenizací v Sample pufru.

Koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena BCA metodou (BCA Protein Assay kit, Pierce, Rockford, IL, USA). Vzorky byly poté naředěny na koncentraci 25 µg proteinu/jamka a rozdělené do aliquotů (15 µL). Všechny vzorky byly do doby analýzy uloženy při -80°C. Homogenát proteinů byl separován SDS-PAGE elektroforézou na 5% polyakrylamidovém gelu (pro proteiny o velké molekulové hmotnosti 100-250 kDa), 6,25% (pro proteiny o střední molekulové hmotnosti 50-100 kDa) a 10% (pro proteiny o malé molekulové hmotnosti 25-50 kDa) a následně přenesen na PVDF membránu (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Membrány s přenesenými proteiny byly 1 hod blokovány v 5% roztoku odtučněného mléka v TRIS pufru (0,05 % Tween 20) (TBS-T), následně inkubovány 1 hod s primárními protilátkami (přesné ředění použitých protilátek viz Tabulka 7). Po inkubaci s primární protilátkou byly membrány 4x (10 min) promyty v TBS-T roztoku a pak 1 hod inkubovány se sekundární protilátkou v optimalizovaném ředění. Po vymytí membrány (4x; 10min) v TBS-T roztoku byla provedena detekce přidáním chemiluminiscenčního činidla (West Femto, Thermofisher) s následnou expozicí velkoformátových rentgenových filmů. Pruhy získané na rentgenových filmech byly naskenovány do počítače (ScanMaker i900, UMAX, Praha, ČR) a kvantifikovány za použití softwaru QuantityOne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Získané hodnoty byly normalizovány ke dvěma vnitřním kontrolám Gapdh a β-actinu.

**Tabulka 7: Seznam použitých protilátek a jejich ředění.**

<b>Protein</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Ředění primární protilátky</b>	<b>Ředění sekundární protilátky</b>
Abcg5	Abcam (ab45279)	1:1000	1:2000
Abcg8	Thermo Fisher (PA1-16798)	1:1000	1:2000
Abca1	Novus	1:1000	1:2000
Cyp7a1	Thermo Fisher (PA5-15216)	1:1000	1:2000
Cyp8b1	Thermo Fisher (PA5-37088)	1:1000	1:2000
Cyp27a1	Thermo Fisher (PA5-27946)	1:1000	1:2000
Lxra	Abcam	1:2000	1:4000
HmgCR	Abcam (ab98018)	1:1000	1:2000
Ldlr	Thermo Fisher (PA5-20752)	1:1000	1:1000
Sr-b1	Novus (NB400-104)	1:2000	1:4000
Srebp2	Abcam (ab30682)	1:1000	1:2000
Ntcp	Santa Cruz (sc98485)	1:3000	1:6000
Oatp1	Chemicon	1:5000	1:5000
Oatp2	Millipore (AB3572P)	1:5000	1:5000
Mrp3	Alexis (ALX801-019-C250)	1:1000	1:2000
Mrp4	Abcam (ab77184)	1:2000	1:4000
Mrp2	Alexis (ALX801-037-C125)	1:500	1:1000
Bsep	Abcam (ab71793)	1:1000	1:2000
Mdr1	Signet Laboratories (8710)	1:1000	1:3000
Mdr2	Abcam (ab71792)	1:2000	1:4000
Ireb2 (IRP2)	Abcam (ab181153)	1:1000	1:3000
NFκB p65	Abcam (ab16502)	1:1000	1:2000
Hmox1	Sigma (H4535)	1:1000	1:3000
Osta	Biorbyt (orb185685)	1:250	1:2000
Ostβ	Bioss (bs2128R)	1:250	1:2000
Asbt	Biorbyt (orb6549)	1:500	1:2000
Gapdh	GE-HealthCare (NA9340)	1:8000	1:10 000
β-actin	Sigma (AC-74)	1:2000	1:4000

### 3.9 Reportérový test - buněčné kultury a konstrukty DNA

HepaRG™ (GIBCO®) buněčná linie a medium byly získány od Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). HepaRG buněčná linie byla kultivovaná ve Williamsově E mediu (WME) s obsahem 10% FBS, 1% glutaminu, 1% Pen/Strep, 5µg/µl inzulinu a 50µM hydrokortizonu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Původní koncentrace železa v médiu (WME) byla 0,25 µM. Pro indukci diferenciace buněčné linie byla provedena inkubace ve dvou krocích dle zavedené metody (Gripon et al., 2002; Hyrsova et al., 2016). HepaRG buňky byly nejdříve nasazeny s nízkou denzitou ( $2,6 \times 10^4$  buněk/cm<sup>2</sup>) a byly kultivovány po dobu dvou týdnů. Po dobu dalších dvou týdnů pak byly kultivovány ve stejném mediu s přidavkem 1,5% DMSO (nutné pro diferenciaci HepaRG buněk) a finálně byly HepaRG buňky 24 hodin kultivovány v různých koncentracích (1 a 10 µM – imitovaly nízké a normální hladiny železa) s citrátem amonno-železitým (Sigma-Aldrich) a s chelátory železa deferoxaminem a deferasiroxem (10 µM), které indukovaly depleci železa. Po inkubaci byly buňky promyty PBS a byl přidán TRI-reagent pro izolaci mRNA, která byla použita na qRT-PCR analýzu. Jako endogenní kontrola posloužil RLP0 gen. Proteiny pro Western blot analýzu byly izolované použitím RIPA pufru s inhibitory proteas a fosfatas (ROCHE) po 48 hodinové inkubaci s citrátem amonno-železitým (1 a 10 µM).

*Reportérový test.* Plazmidy lidských receptorů pSG5-hPXR, pSG5-FXR and pSG5-LXRα byly poskytnuty jako dar od Dr. S. Kliewer (University of Texas, Dallas, TX, USA) a Dr. Makoto Makishima (Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan). Promotor CYP7A1-luc (-1887/+24) luciferázového reportérového genu byl darován Dr. J. Chiangem (Northeastern Ohio Universities College of Medicine). HepG2 buněčná linie (buněčná linie lidského karcinomu jater) byla získána od European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). Buňky byly kultivovány v Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) s 10% FBS doplněným o 1 % neesenciálních aminokyselin. Transfekce plazmidů značených luciferasou byly prováděny pomocí Lipofectamine 3000 reagentu (ThermoFisher Scientific), jak bylo popsáno v předešlé studii (Rulcova et al., 2010). HepG2 buňky byly nasazeny do 48 jamkového plata a transfekovány s CYP7A1A-luc promotorem (-1887/+24) spřaženým s luciferasovým reportérovým genem (150 ng/jamku) (Chiang et al., 2000) a s expresním plazmidem pro FXR, PXR, LXRα (100 ng/jamku), nebo s kontrolním plasmidem *Renilla reniformis* luciferasy (pRL-TK) (30 ng/jamku), po dobu 24 hod. Takto připravené buněčné

kultury byly následně inkubovány s chelátory železa deferoxaminem nebo deferasiroxem (10  $\mu\text{M}$ ), CDCA (FXR ligand, 20  $\mu\text{M}$ ), rifampicinem (PXR ligand, 10 M), GW3965 (LXR $\alpha$  ligand, 20 M) nebo DMSO (0,1%) jako vehikulem na 24/48 hod. Po inkubaci byly buňky lyzovány a byla změřena luciferázová aktivita použitím Dual Luciferase Assay Kit (Promega, Hercules, CA). Výsledky jsou vyjádřeny jako násobná změna světelné aktivity luciferázy normalizované ke kontrolní *Renilla* luciferázové aktivitě každého vzorku vzhledem k vehikulu (DMSO 0,1%). Všechny testy se uskutečnily v médiu bez antibiotik.

### **3.10 Histologie jater**

Po ukončení *in vivo* studie byla část jater fixovaná v 10% formalínu a zalita do parafinových bločků. Z každého vzorku bylo získáno 5 řezů o síle 4-5  $\mu\text{m}$ . Pro detekci morfologických změn byly řezy obarvené hematoxylin – eosinem, pro detekci přítomnosti železa v tkáni pruskou modří. Obarvené řezy byly vyhodnocené stejnou osobou s použitím BX-51 světelného mikroskopu (Olympus) při stonásobném zvětšení.

### **3.10 Imunohistochemické vyšetření Mrp2, Bsep a Mdr2**

#### **transportérů**

Játra fixovaná v kryokonzervačním mediu byla nakrájena příčným řezem na krystatu na 7 $\mu\text{m}$  plátky a položena na želatinou obalená podložní sklička. Z každého vzorku jater bylo na imunohistochemickou analýzu použito pět sklíček. Sklička s řezy jaterní tkáně byla nejdříve inkubována s anti-avidin a anti-biotin blokačními roztoky (Vector Laboratories, USA), a poté inkubována s primární a následně se sekundární protilátkou (Jackson ImmunoResearch, USA) (ředění 1:100 v BSA) a s ExtraAvidin red fluorochrome CY3 (Sigma Chemical, USA) (ředění 1:300 v BSA) pro detekci Mdr2, Bsep a Mrp2. Pro kontrastní barvení buněčných jader bylo použito fluorescenční barvivo DAPI (Invitrogen, Czech Republic). Primární protilátky anti-Mdr2 (ředění 1: 50, 1 h při pokojové teplotě), anti-ABCB11 (Bsep, ředění 1:50, 1 h při pokojové teplotě) byly zakoupeny z Thermo Scientific (USA) a anti-Mrp2 (ředění 1:20, 1 h při pokojové teplotě) byla zakoupena u Enzo Life Sciences, U.S.A. Fotodokumentace a obrázky byly pořízeny na mikroskopu Olympus AX70, kamerou Digital VDS Vosskuhler (GmbH, Germany). Obrázky byly analyzovány softwarem NIS Laboratory Imaging, Czech Republic.

### 3.11 Statistické vyhodnocení

Pro studii s deplecí železa bylo pro statistické hodnocení použito 7 zvířat na skupinu a pro studii s přetížením železa bylo použito 6 zvířat na skupinu. Kinetika žlučové eliminace ŽK, glutathionu a  $^3\text{H}$ -taurocholátu byla vypočítána z analýz jejich koncentrace v plazmě a žluči, podle kinetiky prvního řádu. Žlučová sekrece byla vypočítána jako násobek toku žluče v daných intervalech a žlučových koncentrací testovaných látek v identických intervalech. Žlučová clearance ( $\text{CL}_{\text{BILE}}$ ) byla vypočítána jako poměr žlučové sekrece (BE) a plazmatické koncentrace dané složky, měřené ve vzorku plazmy odebraném uprostřed hodnoceného intervalu sběru žluče. Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SD (standartní odchylka). Pro zjištění statistické významnosti byl použit nepárový t-test, anebo jednofaktorová ANOVA s Newman-Keuls post-hoc testem. Časová závislost kumulativní žlučové sekrece byla hodnocena dvoufaktorovou ANOVA s Dunn post-hoc testem. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při  $p < 0,05$ . Analýza výsledků byla provedena GraphPad Prism 6.0 softwarem (San Diego, USA).

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

### 4.1 ID dieta vedla ke změnám hematologických a biochemických parametrů

Deplece železa u zvířat byla ve studii navozena speciální dietou, jak již bylo popsáno (Kamei et al., 2010). Serologického vyšetření potvrdilo pokles koncentrace železa (Tabulka 8.), vyšetření hematologické redukci hematokritu a snížení koncentrace hemoglobinu. Rozvoj deplece železa v játrech byl rovněž potvrzen downregulací mRNA exprese hepcidinu (*Hamp*) ( $100 \pm 7.1\%$  vs.  $0.6 \pm 0.2\%$  kontrola a ID potkani;  $p < 0.001$ ). Tyto změny byly doprovázeny sníženou koncentrací cholesterolu v séru (Tabulka 8), a nezměněnou koncentrací cholesterolu v játrech ( $5.5 \pm 0,6 \mu\text{mol/g}$  vs.  $6.4 \pm 0.8 \mu\text{mol/g}$  kontrola a ID potkani).

**Tabulka 8. Vliv deplece železa na obsah železa v játrech a biochemické a hematologické vyšetření plazmy.**

Parameter	Chow diet	ID
<i>Játra</i>		
Fe ( $\mu\text{mol/g}$ tkáň)	$464 \pm 131$	$227 \pm 69^{**}$
<i>Plazma</i>		
Fe ( $\mu\text{mol/L}$ )	$21 \pm 1.8$	$15 \pm 0.7^{**}$
ALT ( $\mu\text{kat/L}$ )	$0.7 \pm 0.06$	$1.2 \pm 0.2$
AST ( $\mu\text{kat/L}$ )	$2.6 \pm 0.4$	$3.1 \pm 0.8$
Cholesterol ( $\text{mmol/L}$ )	$1.8 \pm 0.06$	$1.4 \pm 0.09^{**}$
TAG ( $\text{mmol/L}$ )	$0.9 \pm 0.76$	$0.15 \pm 0.03$
Erythrocyty ( $10^{12}/\text{L}$ )	$8.9 \pm 0.15$	$8.8 \pm 0.15$
Hemoglobin ( $\text{g/L}$ )	$166 \pm 2.5$	$146 \pm 3.1^{***}$
Hematokrit	$0.48 \pm 0.007$	$0.42 \pm 0.008^{**}$
WBC počet ( $10^9/\text{L}$ )	$6.4 \pm 0.5$	$6.1 \pm 0.6$
Neutrofilly (proporčně)	$0.18 \pm 0.003$	$0.09 \pm 0.03$

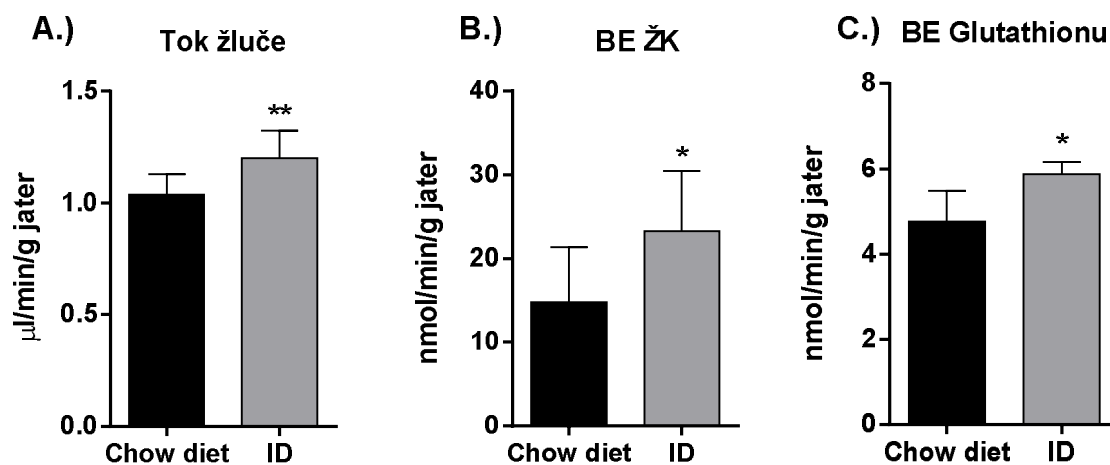
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, ( $n = 7$  pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## 4.2. Choleretický účinek ID

### 4.2.1 Tok žluče, ŽK a glutathionu

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

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



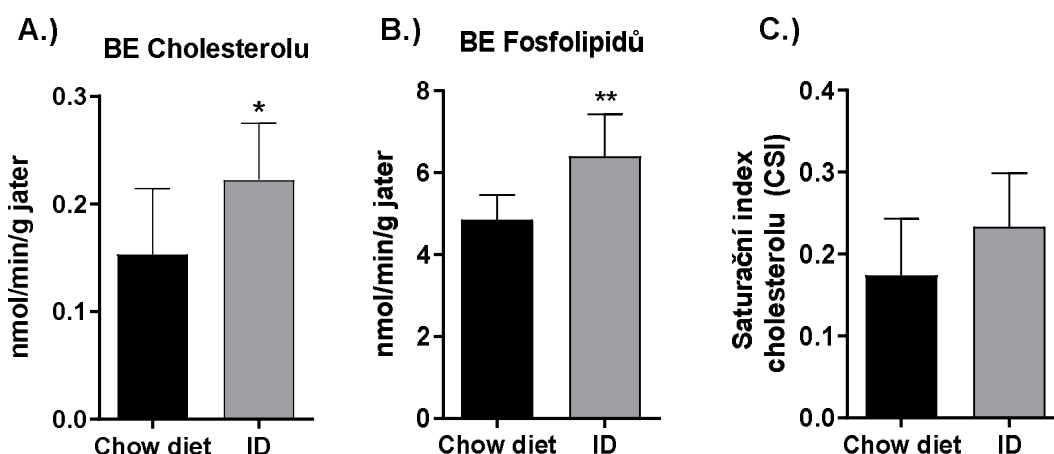
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, ( $n = 7$  pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa; BE, biliární sekrece; ŽK, žlučové kyseliny



#### 4.2.2 Biliární sekrece fosfolipidů a cholesterolu

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

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

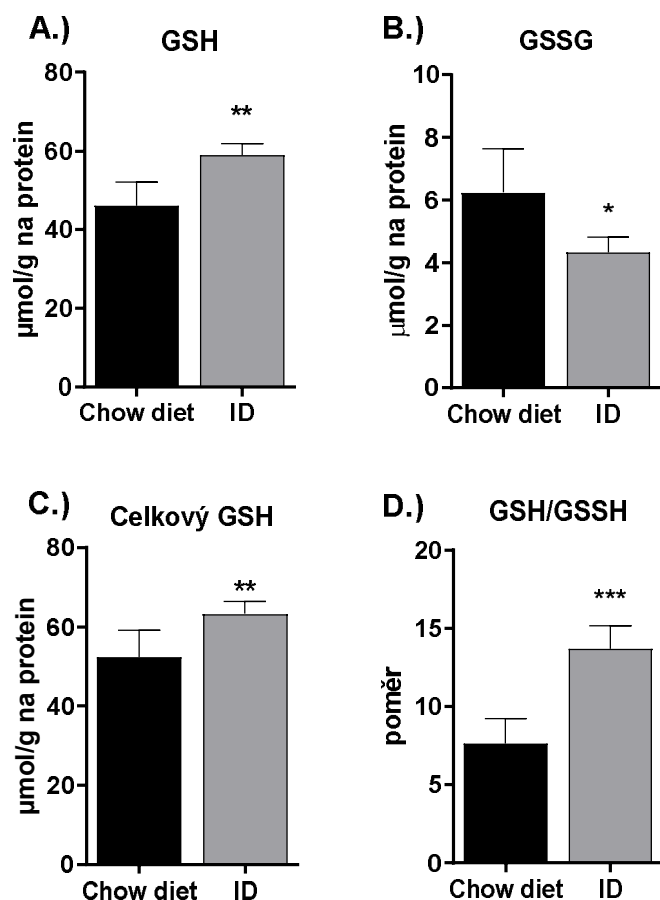


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, ( $n = 7$  pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa; BE, biliární sekrece

#### 4.2.3 Obsah glutathionu v játrech

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

Graf 3: Koncentrace různých forem glutathionu v játrech.



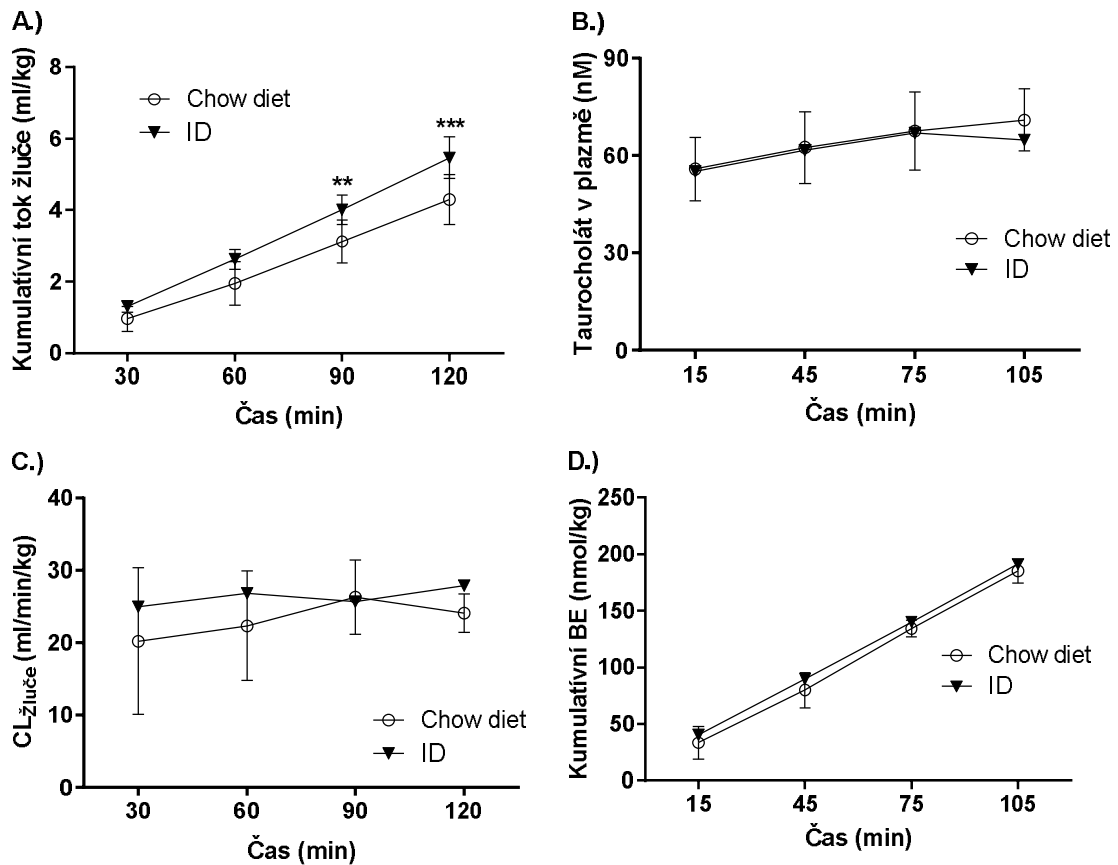
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, ( $n = 7$  pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa; GSH, redukovaný glutathion; GSSG, oxidovaný glutathion

### 4.3 ID nepodmínilo vzestup biliární sekrece $^3\text{H}$ -taurocholové kyseliny

Dalším krokem bylo zjistit, jestli zvýšení biliární sekrece ŽK u ID skupiny bylo způsobeno jejich zvýšenou dispozicí v důsledku zvýšené syntézy nebo indukci transportních proteinů v játrech. Za tímto účelem byla použita další skupina kontrolních a ID potkanů. Nová ID skupina reprodukovala nárůst kumulativní produkce žluče (Graf 4A). Po zahájení kontinuální nitrožilní infuze s nárazovou dávkou  $^3\text{H}$ -taurocholátu bylo dosaženo ustálených plazmatických koncentrací během 45 min (Graf 4B). Poté byla žlučová clearance stabilní během celé doby trvání experimentu (Graf 4C). Ani jeden ze sledovaných

farmakokinetických parametrů  $^3\text{H}$ -taurocholátu nebyl v ID skupině změněn v porovnání s kontrolní skupinou (Graf 4D). Tyto výsledky potvrzují, že ID nestimuluje sekreci žluče prostřednictvím upregulace kanalikulárních transportérů ŽK.

Graf 4: Koncentrace  $^3\text{H}$ -taurocholátu (A) v žluči, (B) plazmě, (C) její clearance do žluče a (D) sekrece do žluče.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, ( $n = 7$  pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa. BE, biliární sekrece; CL, clearance.

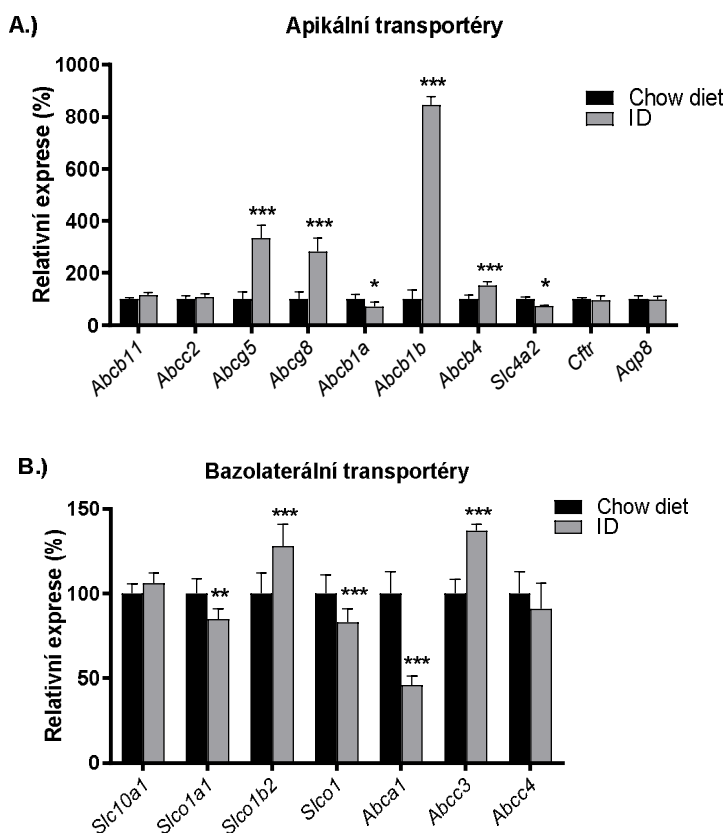
## 4.4 ID způsobuje změny v genové expresi vybraných molekul

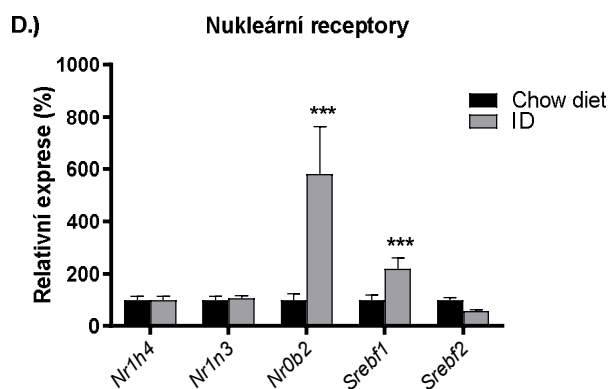
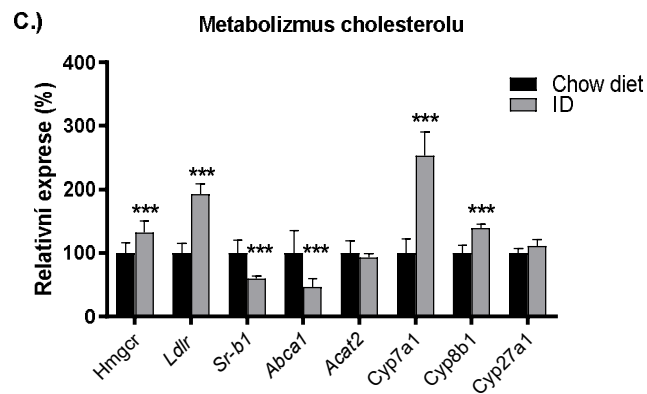
Za účelem identifikace mechanismů zodpovědných za pozorovaný choleretický a metabolický účinek ID, byla studována exprese mRNA relevantních jaterních enzymů a transportérů společně s vybranými regulačními transkripčními faktory (Graf 5).

### 4.4.1 ID zvyšuje genovou expresi molekul zodpovědných za produkci žluče

Analýza exprese až 30 různých mRNA ze vzorků jater prokázala u ID skupiny signifikantní nárůst genové exprese enzymů zodpovědných za syntézu ŽK (*Cyp7a1*, *Cyp8b1*), sekreci fosfolipidů (*Abcb4*), cholesterolu (*Abcg5/8*) a metabolismus lipidů (*Srbf1*, sterol regulatory element-binding transcription factor 1, *Nr0b2/Shp*, small heterodimer partner) a sníženou expresi mRNA *Abca1* (cholesterol efflux regulatory protein) a *Slc4a2* (anion exchanger 2) (Graf 5A-D).

Graf 5: Změny genové exprese enzymů, transportních proteinů a regulujících nukleárních receptorů u ID potkanů.



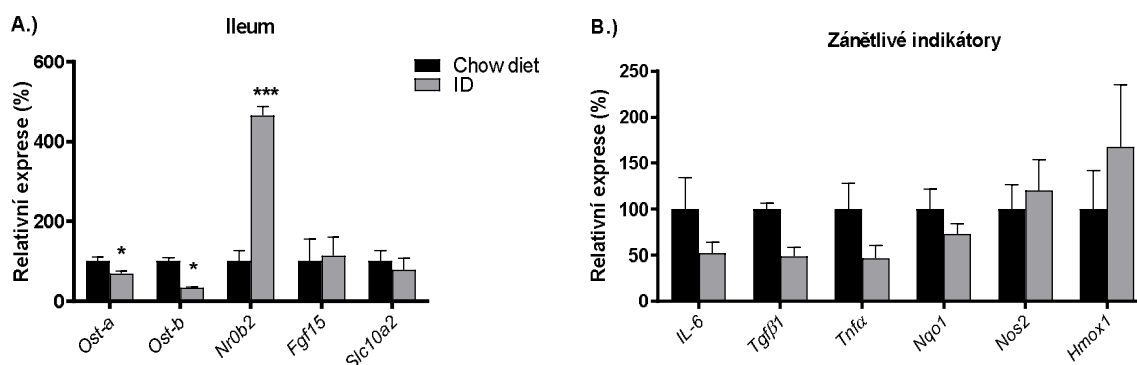


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, (n = 7 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa.

#### 4.4.2 Změny genové exprese relevantních molekul v ileu

Dále byla analyzována exprese mRNA molekul zapojených do reabsorpce ŽK v ileu, která prokázala sníženou genovou expresi *Osta*/ $\beta$ , heterodimerního transportéru důležitého pro reabsorpci ŽK a zvýšení *Nr0b2* (Graf 6A). Jaterní exprese genů aktivovaných během zánětu zůstala beze změny (Graf 6B).

Graf 6: Změny genové exprese, transportních proteinů a zánětlivých indikátorů u ID potkanů.



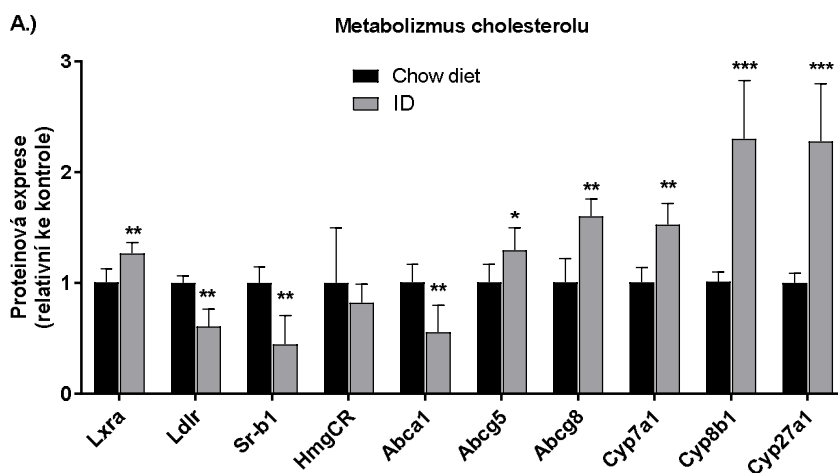
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, (n = 7 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa.

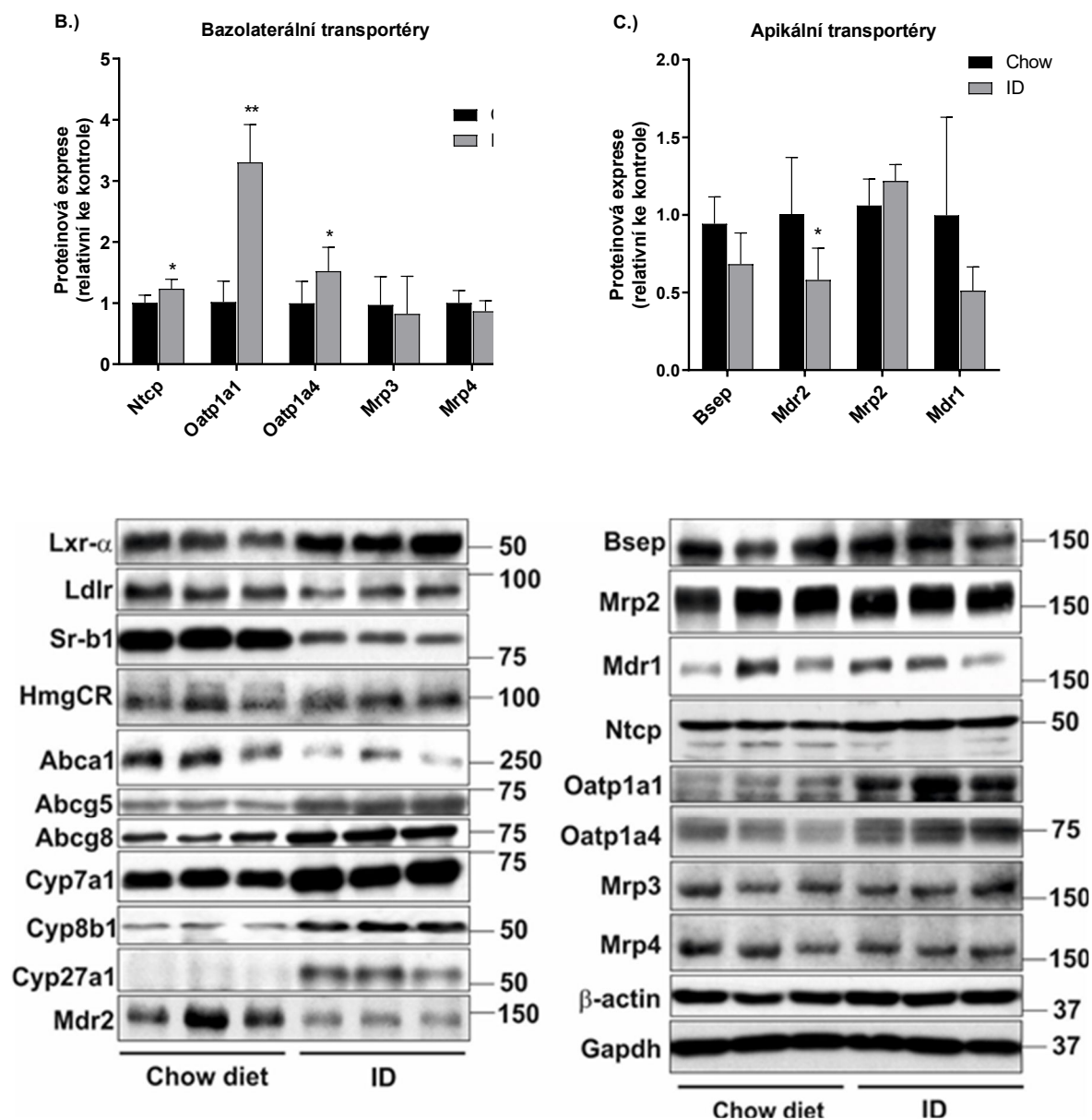
## 4.5 Western blot a imunohistochemické (IHC) analýzy v játrech

### 4.5.1 ID indukuje enzymy a transportéry zodpovědné za metabolismus cholesterolu v játrech

Western blot analýza vybraných jaterních proteinů zodpovědných za tvorbu žluče prokázala u ID skupiny v porovnání s kontrolní skupinou upregulaci: Cyp7a1 (rychlost určující enzym syntézy ŽK z cholesterolu), Cyp8b1 (enzym důležitý pro klasickou cestu syntézy ŽK), Cyp27a1 (enzym důležitý pro alternativní cestu syntézy ŽK), Abcg5/8 transportéru (hlavní kanalikulární transportér cholesterolu) a LXR $\alpha$  (Graf 7A). Hlavní basolaterální transportéry zodpovědné za vychytávání ŽK a léčiv z portální krve, tj. Ntcp a Oatp1a1a/Oatp1a4 byly ID rovněž upregulovány (Graf 7B). Naopak ID redukovalo proteinovou expresi basolaterálních transportérů zodpovědných za vychytávání a eflux cholesterolu do a z jater, a to Ldl-receptoru, Sr-b1 (Scavenger receptor b1) a Abca1 (Graf 7A). Rovněž exprese Mdr2, hlavního kanalikulárního efluxního transportéru pro biliární sekreci fosfadytilcholinu, byla redukována (Graf 7C). Naopak rychlost určující apikální transportér pro exkreci ŽK, Bsep, zůstal u ID skupiny beze změny, což se shoduje s nezměněnou biliární exkrecí  $^3\text{H}$ -taurocholatu (Graf 4C). Podobný výsledek lze pozorovat i v nezměněné proteinové expresi dalšího apikálního transportéru, Mrp2, což bylo v kontrastu se zvýšenou biliární sekrecí glutathionu (Graf 1C) a indikuje to zvýšenou dispozici GSH jako hlavní příčinu tohoto zvýšení.

Graf 7: Změny exprese enzymů, transportních proteinů a regulujících nukleárních receptorů u ID potkanů.





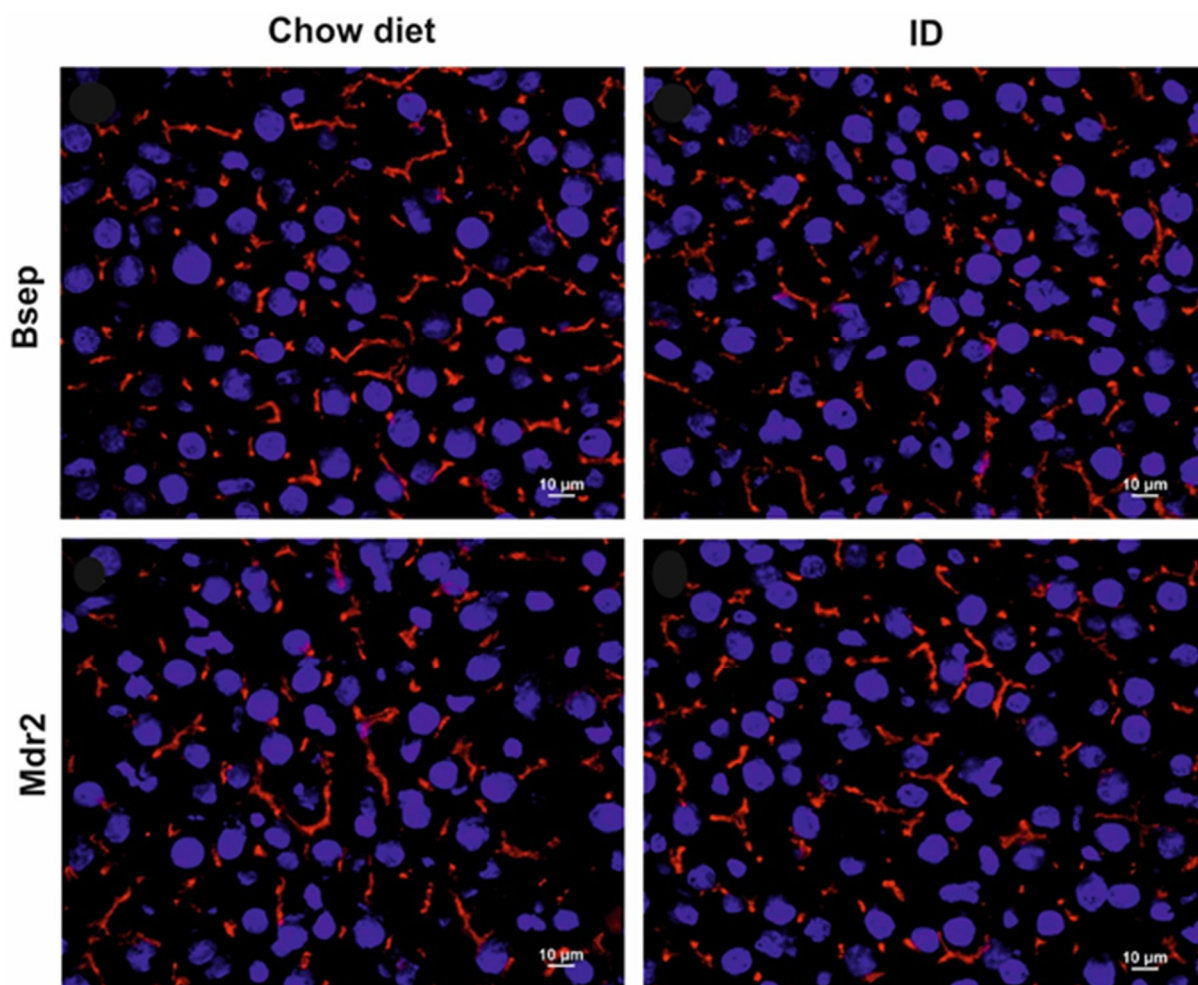
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa.

#### 4.5.2 IHC analýza apikálních transportérů Bsep a Mdr2

Na potvrzení nezměněné exprese Bsep a Mdr2 a jejich lokalizace převážně na kanalikulární membráně hepatocytů bylo provedeno imunohistochemické stanovení na řezech jater. Fluorescenční detekce skutečně prokázala značnou expresi Mdr2 a Bsep na kanalikulárních membránách hepatocytů, a současně potvrdila absenci změn v intenzitě nebo lokalizaci exprese transportérů vlivem ID (Graf 8). Toto zjištění vylučuje podíl transportérů na zvýšené biliární exkreci ŽK a fosfolipidů.



Graf 8: Imunohistochemická analýza apikálních transportérů.



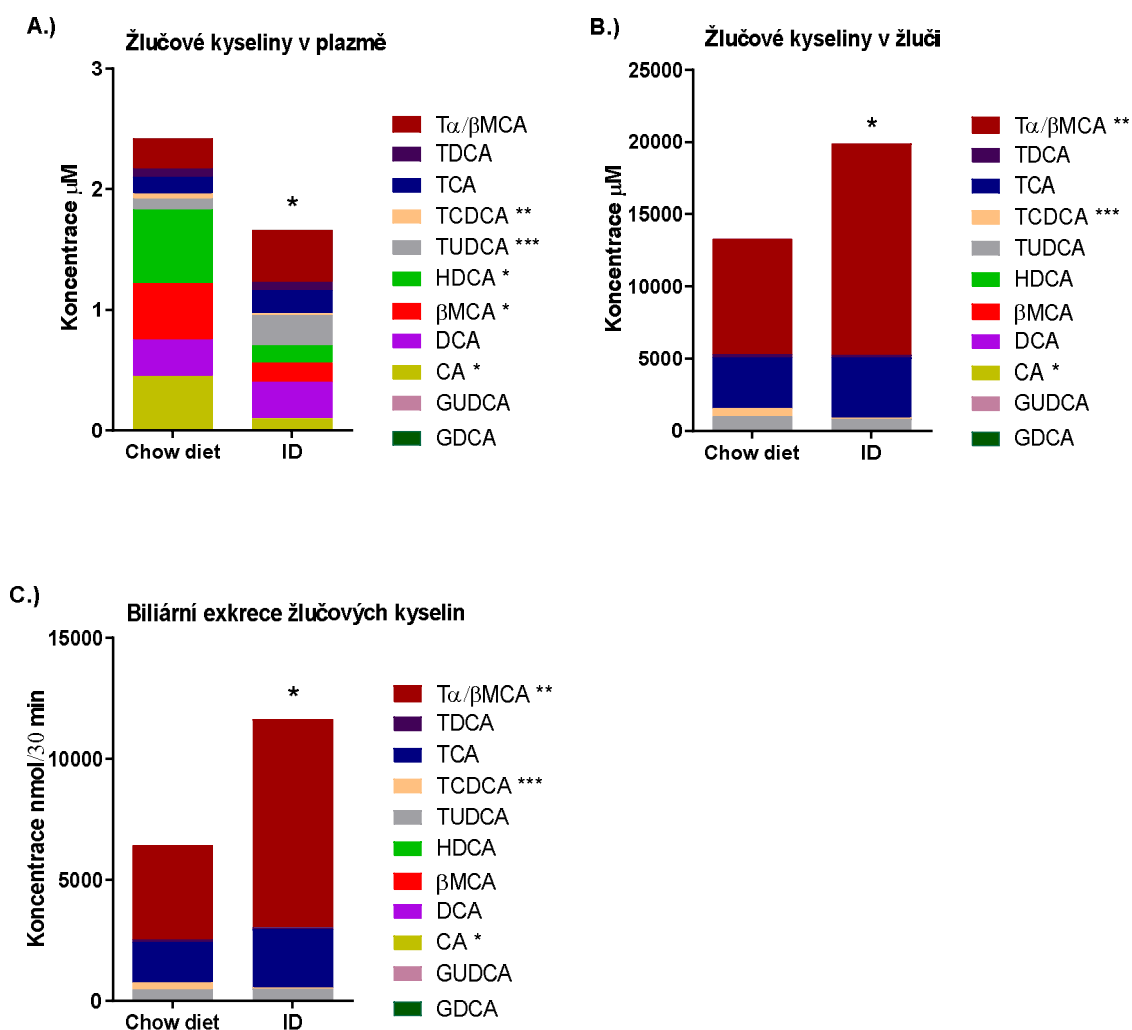
N = 7 pro každou skupinu; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa; Mdr2, Multidrug resistance protein 2; Bsep, Bile Salt Export Pump.

#### 4.6 LC-MS detekce ŽK v plazmě a ve žluči

Pomocí LC-MS metody bylo stanoveno 24 nekonjugovaných a konjugovaných ŽK v plazmě a ve žluči. Celková koncentrace ŽK byla vypočítána jako suma koncentrací jednotlivých ŽK. Deplece železa navozená u potkanů dietou vedla ke snížení celkových koncentrací ŽK v plazmě (Graf 9A), a naopak k jejich zvýšení ve žluči (Graf 9B). Většina ŽK se vyskytovala v koncentracích pod detekčním limitem metody ( $0,02 \mu\text{M}$ ), proto bylo kvantifikováno 9 ŽK v plazmě a 8 ŽK ve žluči. ID vedl k signifikantní redukci koncentrace tauro-chenodeoxycholové, hyodeoxycholové,  $\beta$ -muricholové a cholové kyseliny v plazmě (Graf 9A) a k redukci biliární koncentrace tauro-chenodeoxycholové a cholové kyseliny. Nicméně biliární poměr CA/CDCA se zvýšil z  $6,8 \pm 1,9$  u kontrolní skupiny na  $36,2 \pm 16,1$  (p

< 0.001) u ID potkanů, co koresponduje s upregulací enzymu Cyp8b1. Důležitým zjištěním je i značné zvýšení žlučové koncentrace tauro- $\alpha/\beta$ -muricholových kyselin u ID potkanů (Graf 9B), které bylo doprovázeno zvýšením její biliární sekrece (Graf 9C). Všechny uvedené výsledky poukazují na důležitou roli železa v regulaci syntézy ŽK u potkanů.

Graf 9: Koncentrace individuálních ŽK v (A) plazmě, (B) žluči a jejich (C) sekrece do žluče.

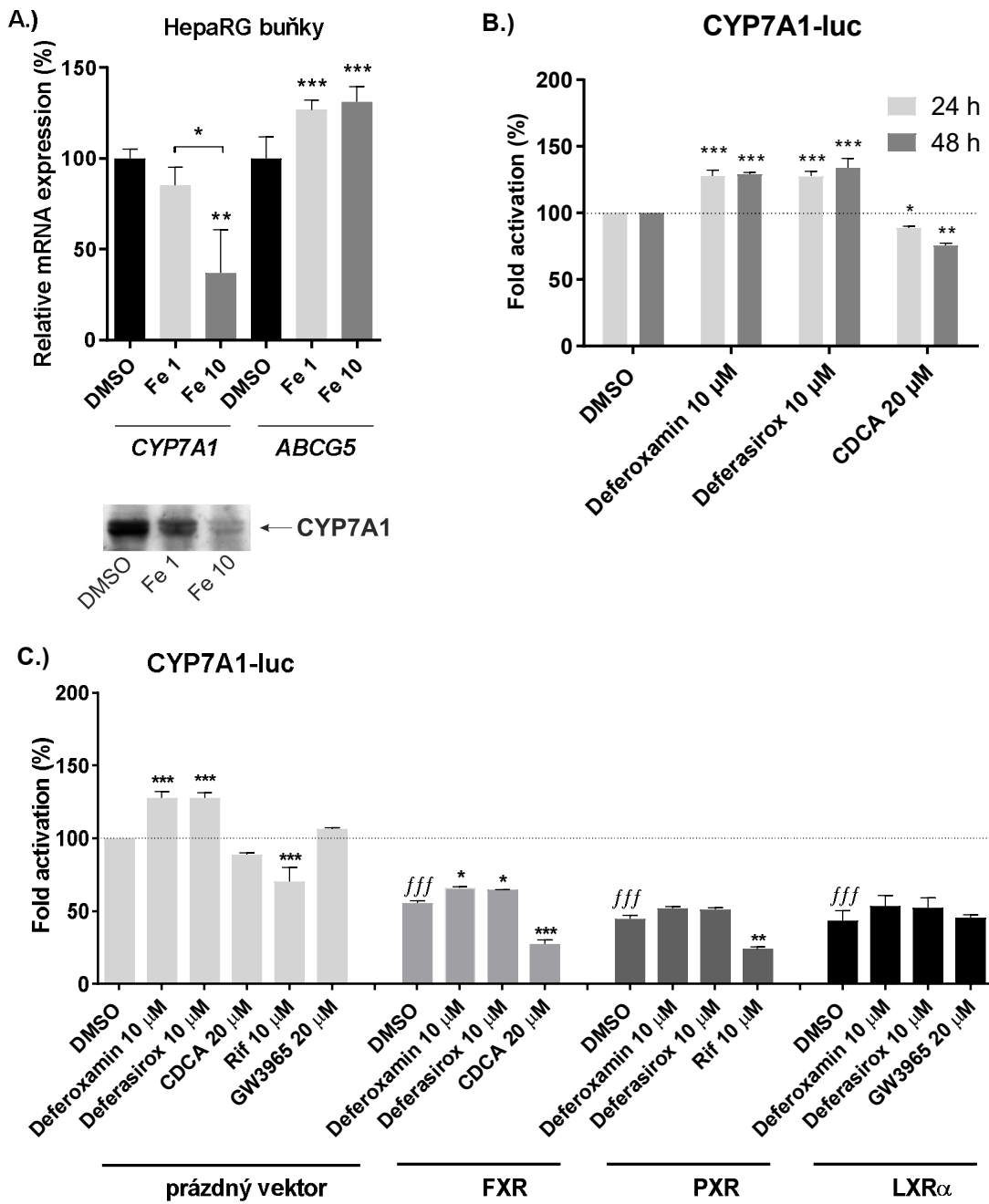


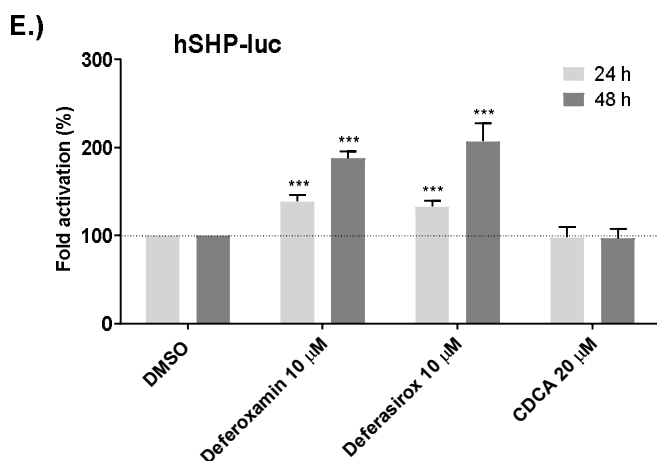
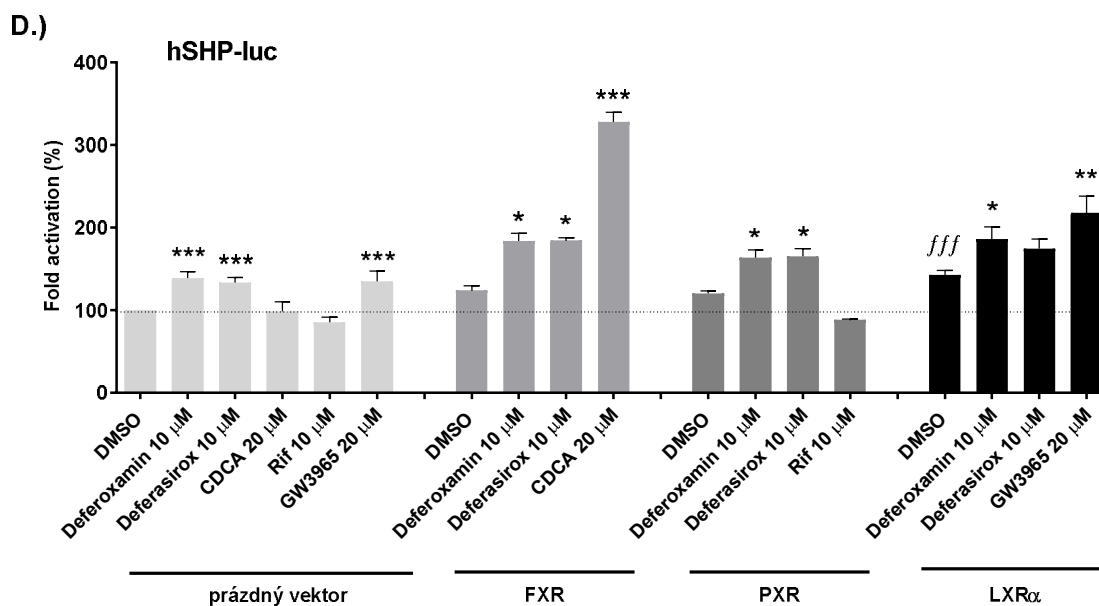
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa; ta $\beta$ MCA, kys. tauro- $\alpha/\beta$ -muricholová kys.; TDCA, kys. taurodeoxycholová;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

## 4.7 ID indukuje mRNA CYP7A1 v lidských HepaRG i HepG2 buňkách

Výsledky získané na zvířecím modelu byly verifikovány na lidských buněčných modelech. Proto byly provedeny *in vitro* studie s diferencovanou HepaRG buněčnou linií, která je široce akceptovaným buněčným modelem lidských diferencovaných hepatocytů. ID byla v HepaRG buňkách stimulována koncentrací 1  $\mu\text{M}$  Fe, a koncentrace 10  $\mu\text{M}$  Fe v mediu měla napodobit fyziologickou plazmatickou koncentraci železa. Nízké koncentrace železa v mediu vedly k indukci mRNA exprese CYP7A1 v porovnání s buňkami, které byly kultivovány s 10  $\mu\text{M}$  koncentrací Fe v mediu (Graf 10A). Z toho lze usoudit, že deplece železa reguluje expresi CYP7A1 podobným způsobem v potkaních i lidských játrech. S nárůstem transkripce genu *CYP7A1* při koncentraci 1  $\mu\text{M}$  Fe, narůstá i proteinová exprese CYP7A1 (Graf 10A). Dále byl v HepaRG buněčné linii zkoumán účinek železa na expresi mRNA *ABCG5*. Na rozdíl od *CYP7A1* nebyl efekt různých koncentrací železa zjištěn (Graf 10A). V následných experimentech prováděných na buňkách HepG2 byly použity chelátory železa k prozkoumání vlivu deplece železa na transaktivaci genů *CYP7A1* a *NR0B2* (SHP) v experimentech reportérových genů. Opět byla detekována stimulace *CYP7A1* (Graf 11B-C) a *NR0B2* (Graf 10D-E) promotoru po 24 a 48 hod inkubaci s deferoxaminem a deferasiroxem v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . ŽK CDCA, ligand FXR, a rifampicin, ligand PXR, snížily genovou transaktivaci *CYP7A1*, což je v souladu s regulací CYP7A1 přes nukleární receptory (Li and Chiang, 2015). HepG2 buňky byly ko-transfekovány s konstruktem reportérového genu a promotoru *CYP7A1* a s expresními konstrukty pro receptory FXR, PXR a LXR $\alpha$ . Samotná ko-exprese nukleárních receptorů významně omezila aktivaci reportérového konstruktů *CYP7A1*, což je v souladu s jejich popisovaným efektem a dokladuje to funkčnost použitého systému. Aplikace chelátorů železa do tohoto systému nevedla k významné indukci nebo represí transaktivace *CYP7A1* (Graf 10C). Podobně tyto nukleární receptory neměly žádný významný vliv na transaktivaci *SHP* po inkubaci s chelátory železa (Graf 10D-E). Lze proto konstatovat, že deplece železa indukovaná chelátory železa v těchto experimentech neměla žádný účinek na transaktivaci FXR, PXR nebo LXR $\alpha$  (Graf 10D-E). Tyto data prokazují, že indukční vliv deplece železa na transkripci genu *CYP7A1* je nezávislý na aktivaci exprese FXR, PXR a LXR $\alpha$  nukleárních receptorů. Tuto hypotézu dále podporuje skutečnost, že buňky HepG2 mají nízkou endogenní aktivitu FXR, PXR a LXR $\alpha$ .

Graf 10: Genová exprese CYP7A1 na lidských buněčných liniích.





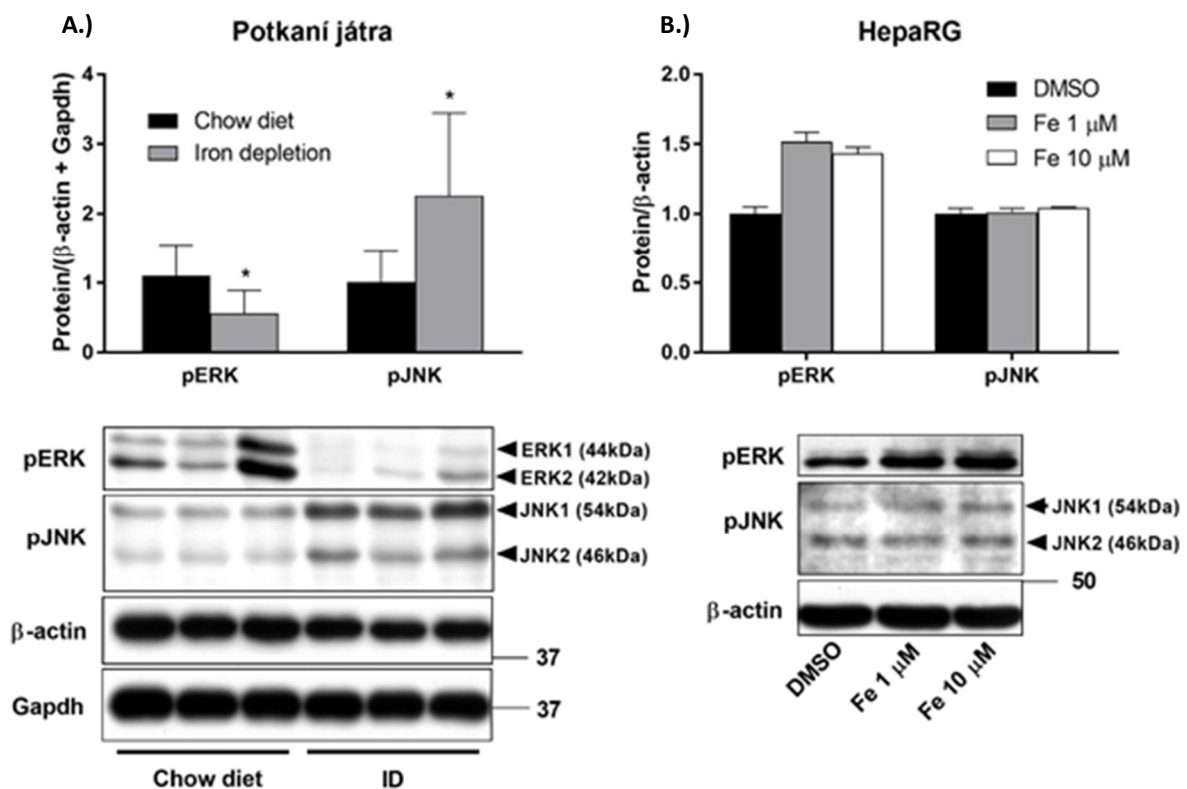
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ze tří experimentů; signifikantní rozdíl oproti kontrole \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; DMSO, dimethylsulfoxid; Fe, železo; CDCA, chenodeoxycholvá kyselina; Rif, rifampicin, ligand PXR; GW3965, ligand LXR $\alpha$ .

## 4.8 Změny v expresi pERK a pJNK kinázy

V důsledku absence vlivu nukleárních receptorů během ID, se pozornost zaměřila na druhou hlavní cestou represe transkripce genu CYP7A1, kterou je fosforylace extracelulární regulační kinázy (ERK) a c-Jun N-terminal kinasy (JNK). Obě kinázy integrují intracelulární

signalizaci vycházející z několika regulačních kaskád jako např. fibroblast growth factor receptor 4, epidermal growth factor receptor (EGFR) nebo insulin receptor (IR). Fosforylace ERK a JNK inhibuje transaktivaci *CYP7A1/CYP8B1* genů prostřednictvím inhibice HNF4 $\alpha$  (Inagaki et al., 2005; Qi et al., 2015). Proto byla provedena detekce pERK a pJNK v játrech ID potkanů a na HepaRG buňkách inkubovaných s rozdílnou koncentrací železa (Graf 11B). Přestože jaterní pERK byla u ID zvířat snížena (Graf 11A), co může podporovat desinhibici *Cyp7a1*, pJNK byl indukován u ID (Graf 11A), což by podporovalo opačný účinek. Podobně rozporuplné výsledky přinesly experimenty provedené na HepaRG buňkách. Variabilní změny v pERK a pJNK kinase naznačují, že se tyto neúčastní pozorované upregulace *Cyp7a1/CYP7A1* během deplece železa.

Graf 11: Expres ERK a JNK kinázy v játrech a v lidské buněčné linii.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, (n = 7 pro každou skupinu) u potkanů a u HepaRG buněčné linii jako průměr  $\pm$  SD tří experimentů; signifikantní rozdíl oproti kontrole \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa; DMSO, dimethylsulfoxid; Fe, železo.

## **4. Výsledky část 2. - Homeostáza ŽK během nadbytku železa (IO)**

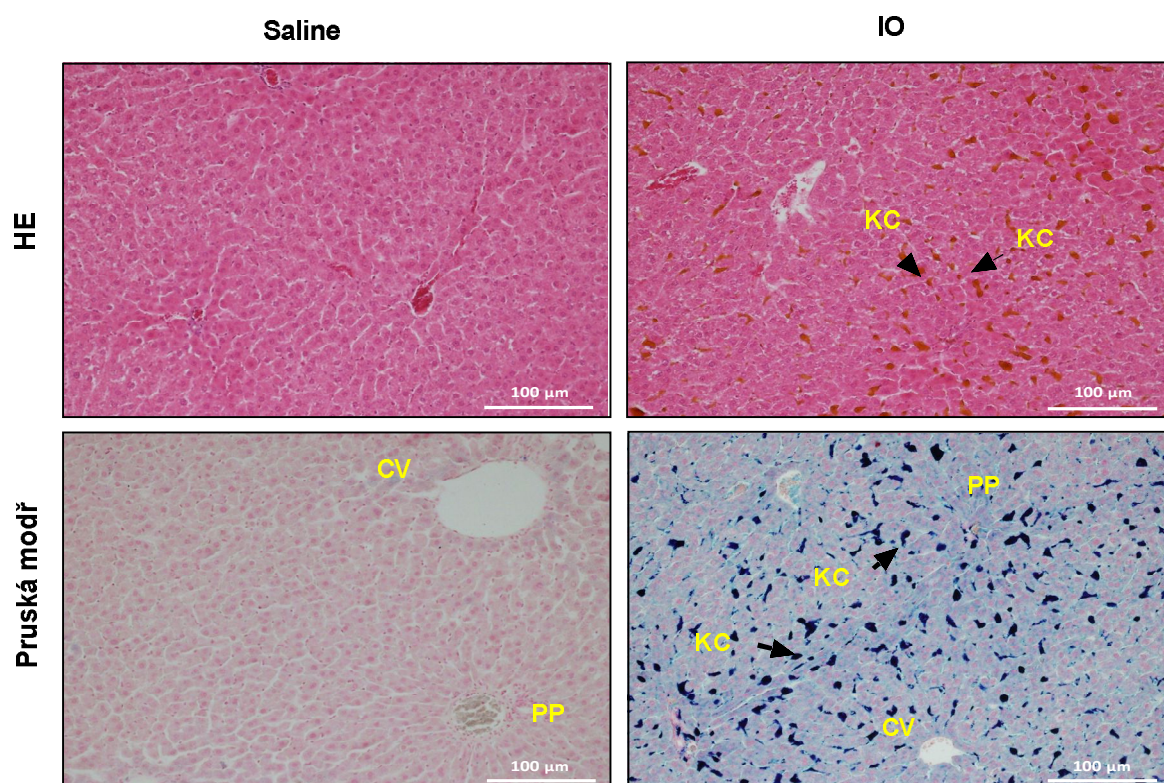
### **4.9 Přetížení železem (IO) způsobuje jeho masivní depozici v potkaních h játrech**

#### **4.9.1 Histologické vyšetření jater**

Na vytvoření signifikantní kumulace železa v parenchymatózních i neparenchymatózních buňkách jater byl použit ověřený model založený na intraperitoneálním podání 8 dávek (100 mg/kg na dávku) komplexu železa dextran-heptonové kyseliny aplikované každý druhý den (Najafzadeh et al., 2010). Tento režim aplikace vedl k masivnímu ukládání železa do jater bez signifikantních projevů těžkého hepatocelulárního nebo cholestatického poškození, jak je zřejmé z histologické analýzy jater obarvených hematoxylin-eozinem (HE) a Pruskou modří (PB) (Graf 12). Masivní ukládání železa bylo patrné zejména v periportálních (PP) zónách jaterního acinu ve srovnání s oblastmi kolem centrální žíly (CV), jak je vizualizováno opalescentními strukturami v barvení HE a modrými depozity při barvení PB. Železo bylo koncentrováno zejména v Kupfferových buňkách (KC), ale barvení PB vykazovalo také depozita v cytoplazmě hepatocytů IO potkanů. U zvířat aplikovaných fyziologickým roztokem nebyla přítomna žádná zjevná kumulace železa v játrech. Hmotnost jater nebyla signifikantně změněna u IO skupiny v porovnání s kontrolní skupinou ( $13.5 \pm 0.5$  g u kontrolní skupiny a  $14.2 \pm 0.5$  g u IO skupiny).



Graf 12: Histologická barvení jater na strukturu parenchymu a kumulaci železa.



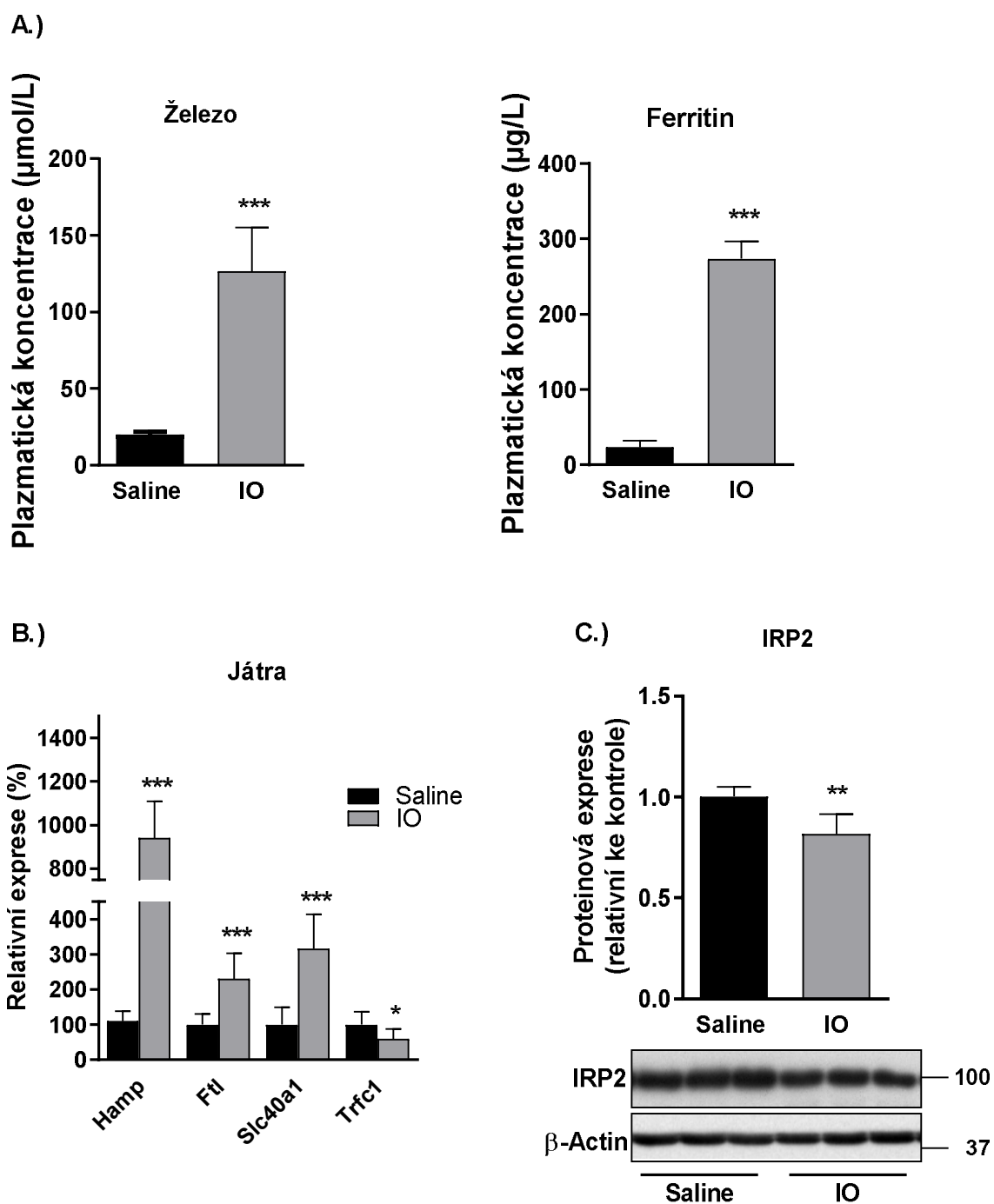
N = 6 pro každou skupinu; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (100 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu (100 mg/kg) ob den; HE, hematoxylin-eosin; KC, Kupfferovy buňky; PP, periportální oblast; CV, centrální vena.

#### 4.9.2 Jaterní homeostáza železa během IO

Přetížení železem u IO skupiny bylo potvrzeno zvýšením plazmatické koncentrace železa a ferritinu (Graf 13A) a signifikantně zvýšenou mRNA jaterní expresí genů, které jsou klíčové v metabolismu železa, tj. hepcidinu (*Hamp*), ferritinu (*Ftl*), ferroportinu (*Slc40a1*) a represí transferrinového receptoru 1 (*Tfrc1*) (Graf 13B). Tyto výsledky prokázaly typické histologické, biochemické a molekulární znaky vyskytující se při kumulaci železa v játrech. Současně došlo k významnému snížení exprese „iron-response element-binding protein 2“ (IRP2) (Graf 13C), jako indikátoru přebytku železa v játrech (Anderson et al., 2012). IRP2 byl recentně demonstrován v roli pozitivního regulátoru transkripce Cyp7a1 (Liang et al., 2017), což koresponduje s výsledky této studie a s rozporupnými výsledky regulace Cyp7a1/CYP7A1 prostřednictvím hlavních intracelulárních kaskád.



Graf 13: Biochemické a molekulární indikátory přetížení organismu železem.



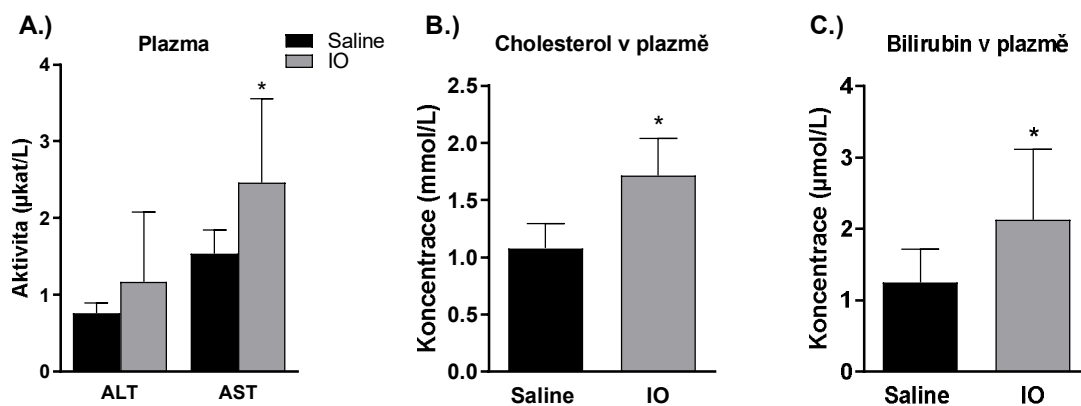
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu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

## 4.10 Přetížení železem vedlo k mírnému poškození jater a k oxidačnímu stresu

### 4.10.1 Biochemické vyšetření plazmy

Kumulace železa v jaterní tkáni může indukovat oxidační poškození jater (Philippe et al., 2007). Pro zjištění jaterního poškození v použitém IO modelu byla analyzována plazma a korespondující jaterní biomarkery. Škodlivý efekt IO na jaterní funkci byl potvrzen mírným, ale signifikantním nárůstem aktivity aspartátaminotransferázy (AST) (Graf 14A) a zvýšenou plazmatickou koncentrací cholesterolu a bilirubinu (Graf 14B,C).

Graf 14: Indikátory jaterního poškození v plazmě.

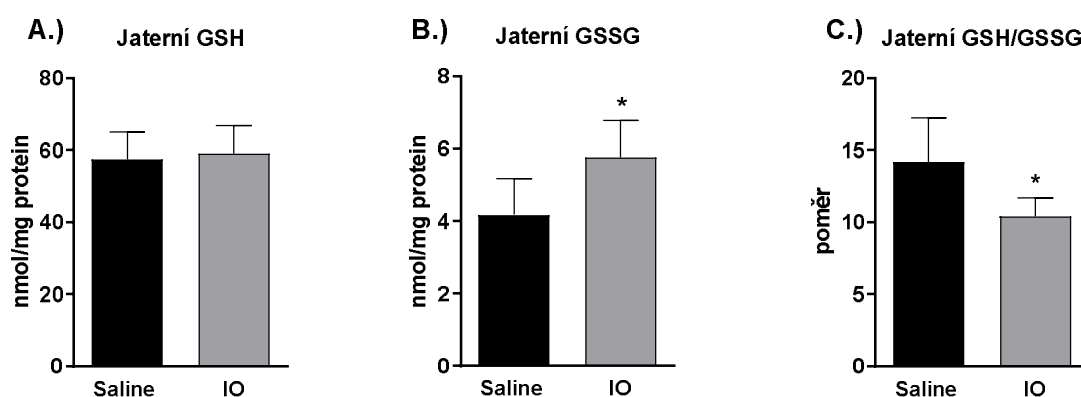


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) obden; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu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

### 4.10.2 Oxidační stres v játrech

Indukce oxidačního stresu v játrech IO potkanů byla potvrzena nárůstem koncentrace oxidované formy glutathionu (GSSG) (Graf 15B) a poklesem poměru GSH/GSSG (Graf 15C).

Graf 15: Koncentrace různých forem glutathionu v játrech a jejich poměr.

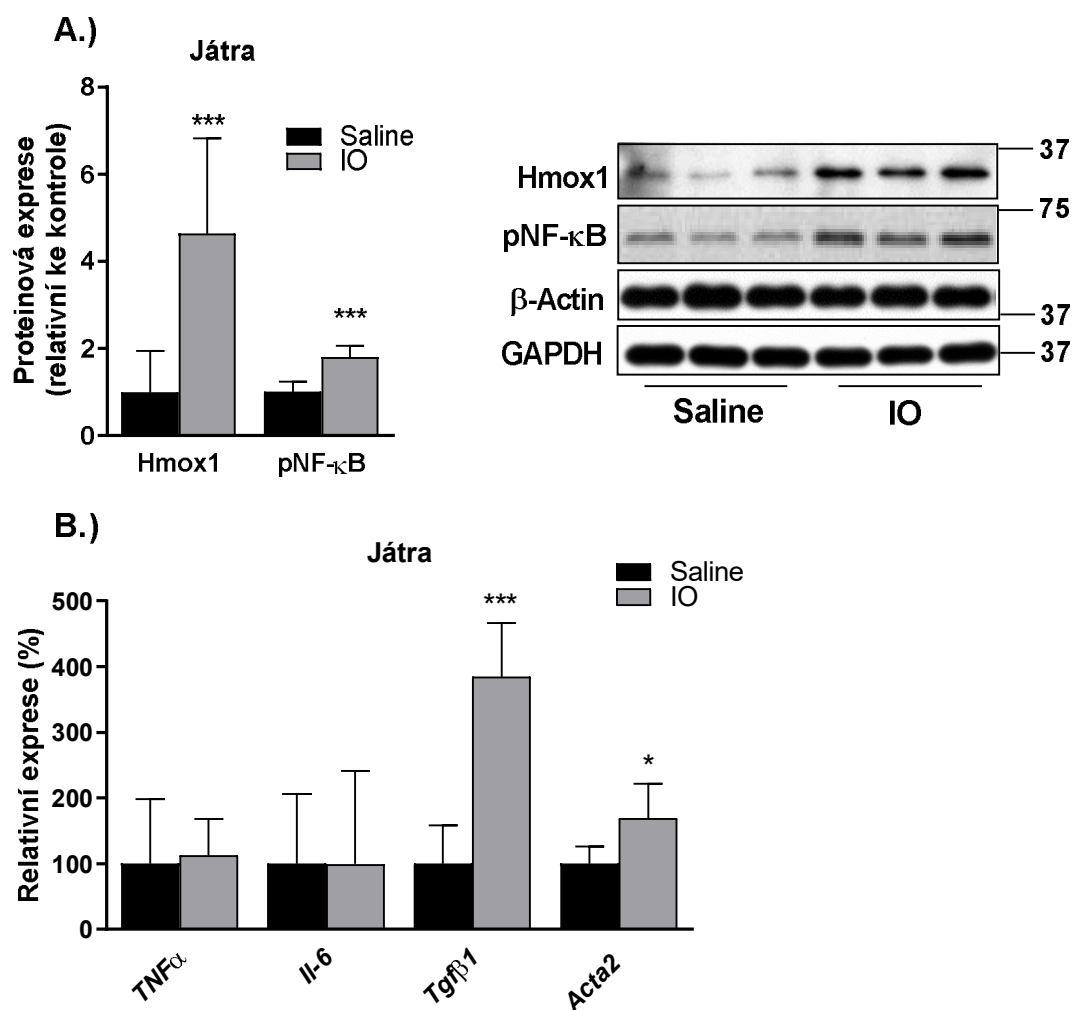


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, ( $n = 6$  pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná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

### 4.10.3 Zvýšená exprese zánětlivých indikátorů

Změny v koncentraci glutathionu byly doprovázeny nárůstem exprese proteinů, které jsou aktivovány oxidačním stresem. Jedná se o hemoxygenasu 1 (Hmox1) a fosforylovanou p65 podjednotku NF- $\kappa$ B (Graf 16A). Tyto změny neprovázely akutní zánětlivou odpověď jater, jak tomu napovídá absence přítomnosti zánětlivých buněk při histologickém vyšetření (Graf 12) a nezměněná genová exprese tumor nekrosis faktoru (*Tnfa*) a interleukinu 6 (*Il6*) (Graf 16B). Navíc kumulace železa v játrech vedla k aktivaci exprese *Tgfb1*, doprovázené nárůstem exprese jím regulovaného *Acta2* (kóduje  $\alpha$ -SMA protein) (Graf 16B), tj. chronické profibrotické cesty (Mehta et al., 2018).

Graf 16: Genová exprese zánětlivých indikátorů.



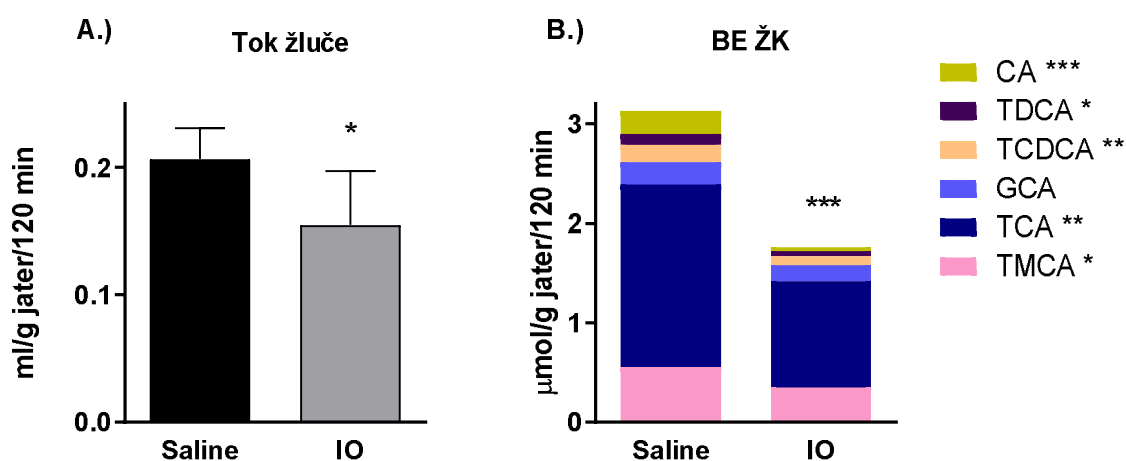
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami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

## 4.11 IO redukuje tok žluče v důsledku snížení biliární sekrece ŽK

### 4.11.1 Tok žluče a koncentrace ŽK ve žluči

Snížená biliární sekrece ŽK již byla během IO jednou popsána (Brunet et al., 1999), ale jen s marginální návazností na komplexní mechanismy tvorby žluče a homeostázu ŽK. Proto byl v této studii proveden sběr žluče s následnou analýzou spektra jednotlivých ŽK a dalších hlavních složek žluče, včetně toku žluče nezávislého na ŽK založeného především na biliární sekreci glutathionu. Přetížení železem způsobilo u potkanů signifikantní zpomalení toku žluče (Graf 17A) a snížení biliární sekrece ŽK (Graf 17B).

Graf 17: Tok žluče a biliární sekrece individuálních ŽK.

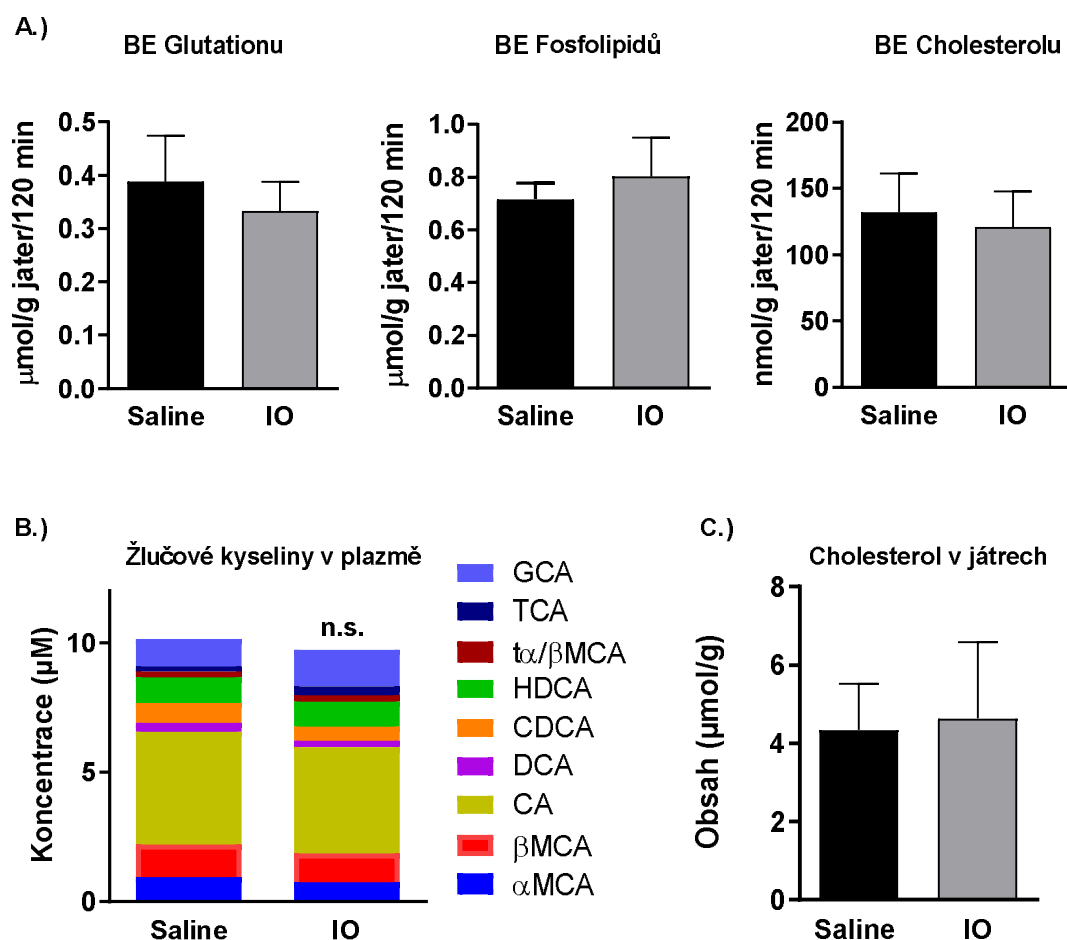


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) obden; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu (100 mg/kg) obden; BE, biliární sekrece; ŽK, žlučové kyseliny; CA, kys. cholová; TDCA, kys. taurodeoxycholová; TCDCA, kys. taurochenodeoxycholová; GCA, kys. glykocholová; TCA, kys. taurocholová; TMCA, kys. taumuricholová.

### 4.11.2 Biliární sekrece hlavních složek žluče

Biliární sekrece glutathionu, cholesterolu a fosfolipidů se mezi kontrolními a IO potkany signifikantně nelišila (Graf 18A). Rovněž nezměněny zůstaly systémové koncentrace ŽK v plazmě a koncentrace cholesterolu v játrech (Graf 18B-C). Tyto údaje podporují závěr, že snížení produkce žluči u IO potkanů odráží sníženou biliární sekreci ŽK.

Graf 18: Biliární sekrece osmotických složek žluče.



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

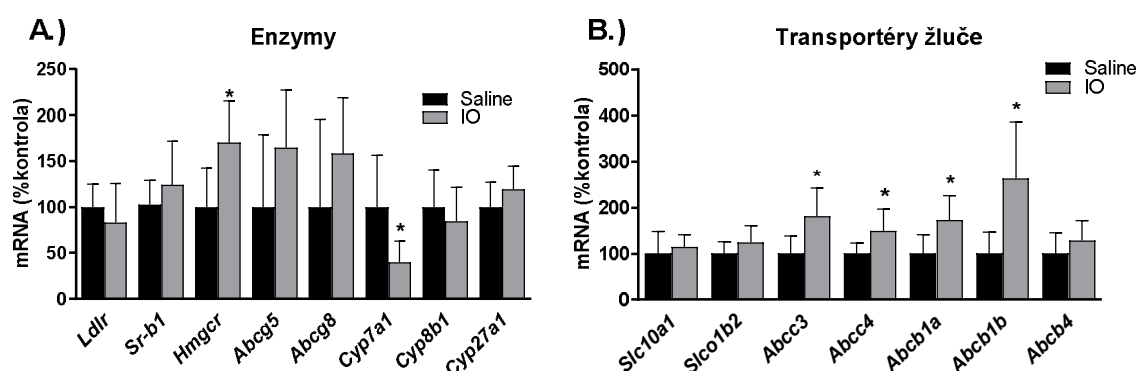
## 4.12 Působení IO na jaterní expresi molekul odpovědných za obrat ŽK a cholesterolu

### 4.12.1 PCR analýza transportérů a enzymů odpovědných za metabolismus ŽK

Za účelem odhalení mechanismů odpovědných za změny biliární kinetiky cholesterolu a ŽK byla analyzována exprese jaterních transportních proteinů a enzymů s klíčovými

funkcemi v absorpci, sekreci a metabolismu těchto látek. Při hodnocení klíčových genů v syntéze ŽK a cholesterolu, IO signifikantně snížil expresi mRNA *Cyp7a1* a signifikantně zvýšil genovou expresi 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A reductasy (*Hmgcr*), rychlost udávajícího enzymu syntézy cholesterolu (Graf 19A). Ze všech apikálních a bazolaterálních transportérů IO signifikantně indukoval expresi mRNA *Abcb1a/1b* a *Abcc3/Abcb4* (Graf 19B).

Graf 19: Genová exprese enzymů a transportérů ŽK.



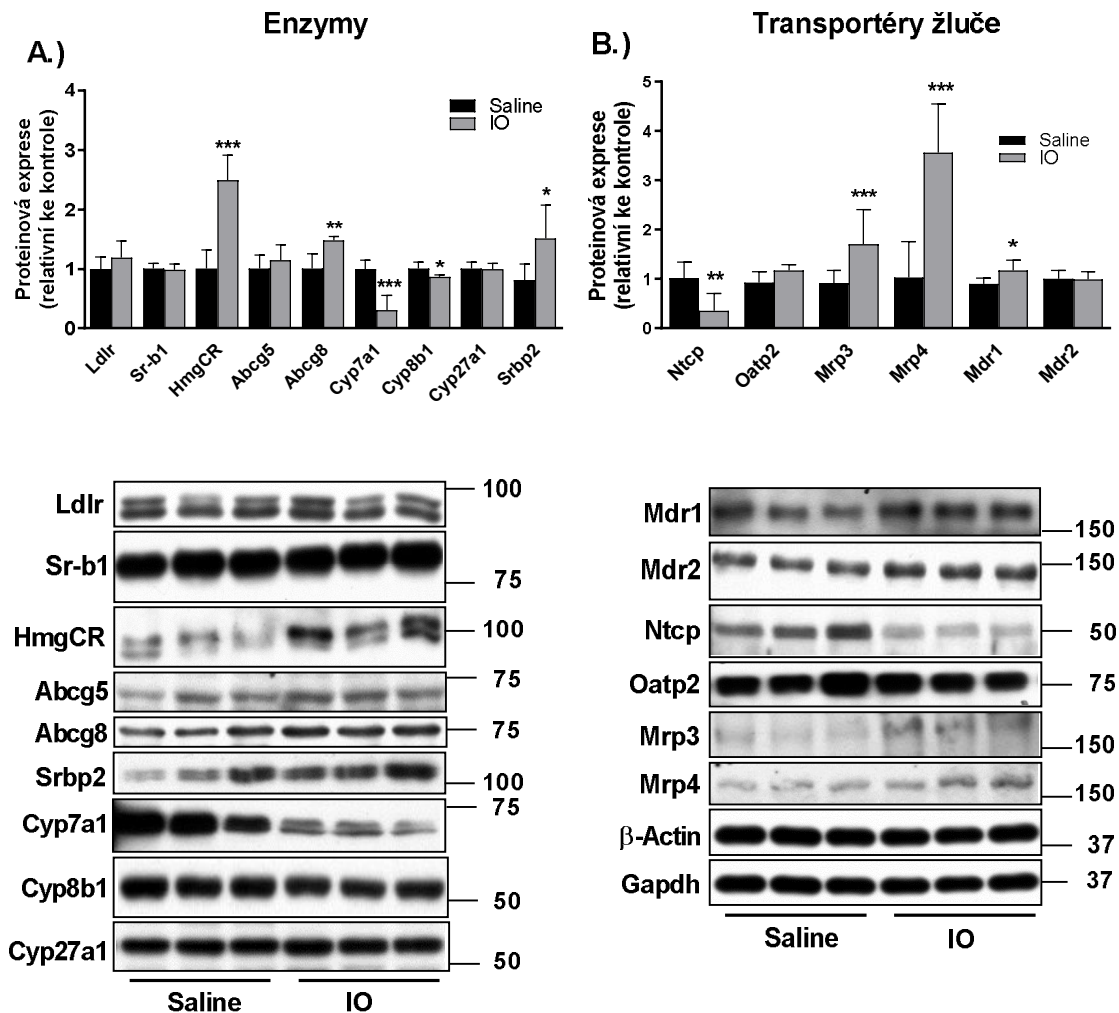
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikanční rozdíl oproti kontrole \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížena železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami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

#### 4.12.2 WB analýza transportérů a enzymů zodpovědných za jaterní obrát žlučových komponent

Pozorované transkripční změny byly následovány odpovídajícími změnami v expresi příslušných proteinů. Byla zjištěna downregulace *Cyp7a1* (Graf 20A), upregulace HmgCR (Graf 20A), *Mdr1* (Graf 20B), hlavního apikálního efluxního transportéru pro léčiva, a *Mrp3* / *Mrp4* (Graf 20B), bazolaterální efluxní transportéry pro konjugované aniontové sloučeniny, jakými jsou glukuronidy různých endo- a xenobiotik a ŽK. Nicméně IO také snížil proteinovou expresi *Cyp8b1* (Graf 20A) a *Ntcp*, esenciálního proteinu pro vychytávání ŽK z portální krve do hepatocytů (Graf 20B). Zvýšená exprese *Abcg8*, apikálního efluxního transportéru pro cholesterol z jater do žluče, nebyla následována odpovídající změnou v

Abcg5, což může znamenat, že funkce tohoto heterodimeru nebyla zvýšena, jak naznačuje také nezměněná biliární sekrece cholesterolu (Graf 18A).

Graf 20: Expres transportérů a enzymů ŽK.



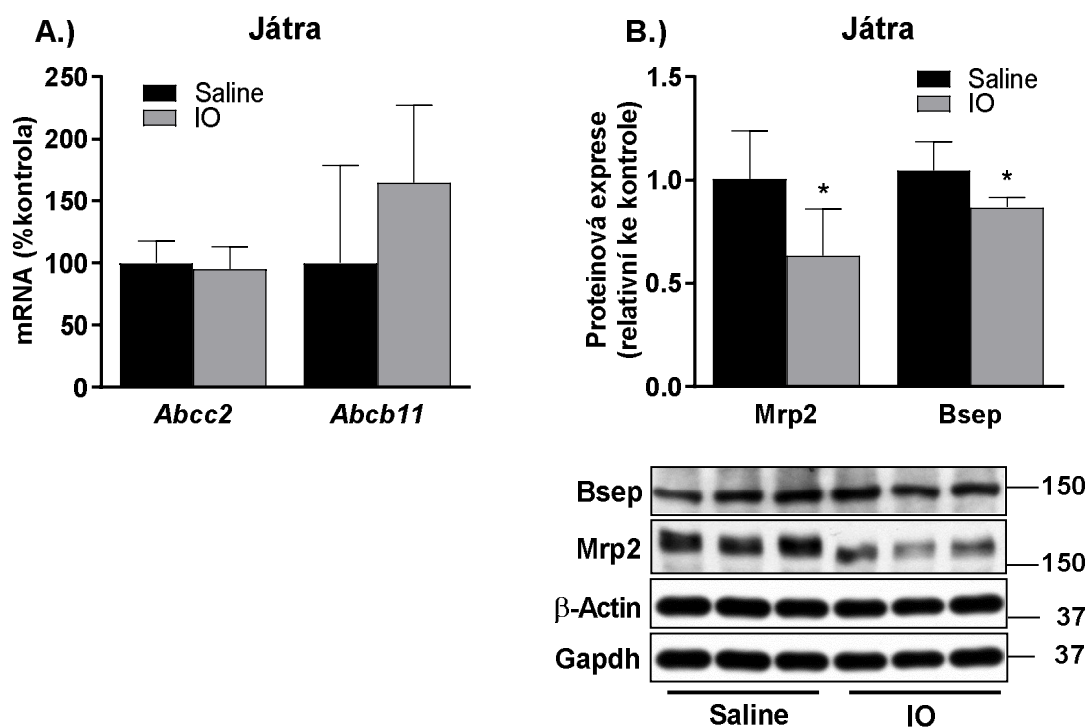
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami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



### 4.12.3 Western blot a PCR analýza Mrp2 a Bsep

Genová exprese obou proteinů nebyla u IO změněna (Graf 21A), zatímco Western blot analýza potvrdila downregulaci jak Bsep, tak Mrp2 na úrovni proteinu (Graf 21B). Předchozí studie popisují (Zinchuk et al., 2005; Geier et al., 2007), že Bsep a Mrp2 mohou být regulovány posttranskripčně, a to zvýšeným přesunem z kanalikulární membrány do intracelulárního subapikálního prostoru s následnou degradací.

Graf 21: Expese hlavních apikálních transportérů na úrovni mRNA a proteinu

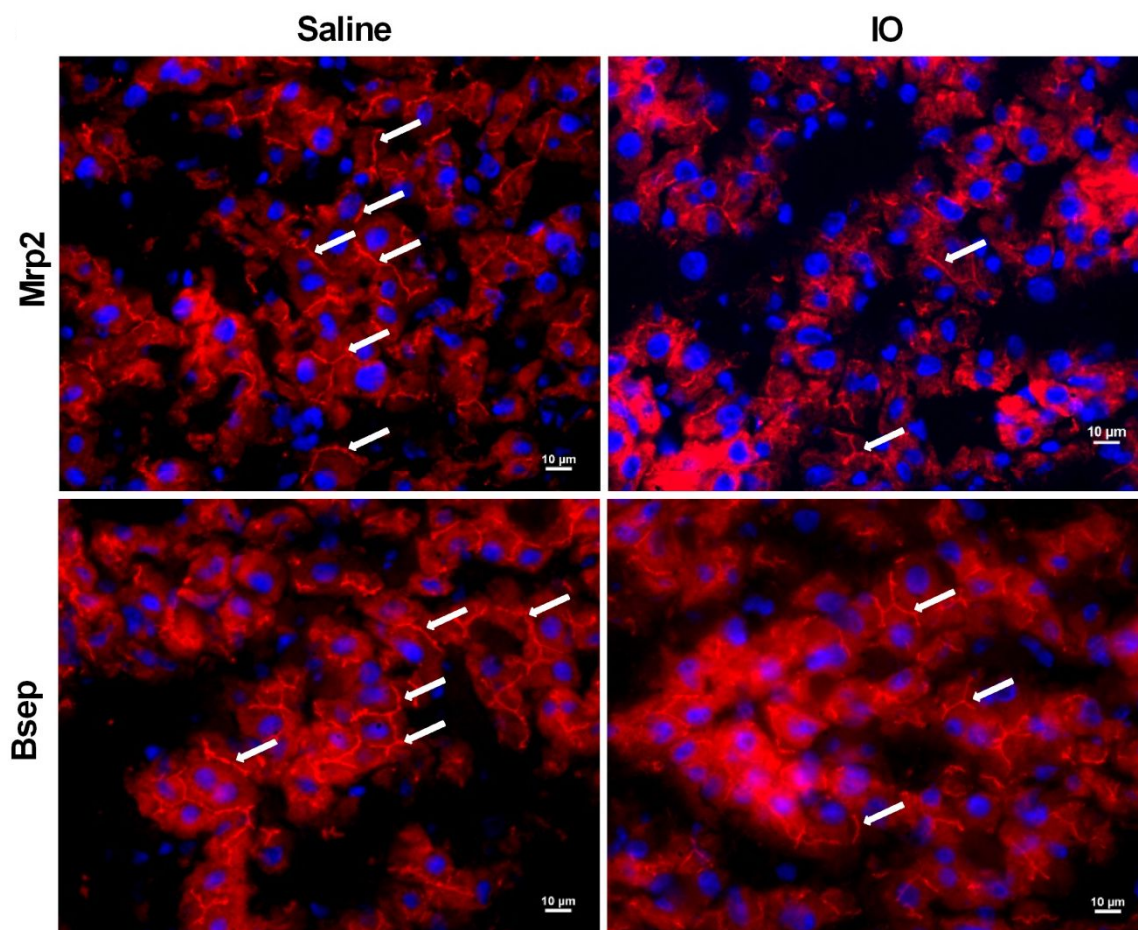


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, (n = 6 pro každou skupinu); Signifikantní rozdíl oproti kontrole \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížena železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu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

#### 4.12.4 Imunohistochemie kanalikulárních transportérů Bsep a Mrp2

Na potvrzení downregulace obou transportérů a identifikaci jejich lokalizace byla provedena imunohistochemická analýza. Imunohistochemické barvení jater ukázalo silnou expresi Mrp2 i Bsep v kanalikulární membráně hepatocytů u kontrolních potkanů (Graf 22). U IO potkanů byla exprese obou transportních proteinů snížena s apikální i subapikální distribucí, což podporuje zmiňovanou posttranskripční regulaci.

Graf 22: Lokalizace apikálních transportérů na membránách hepatocytů.

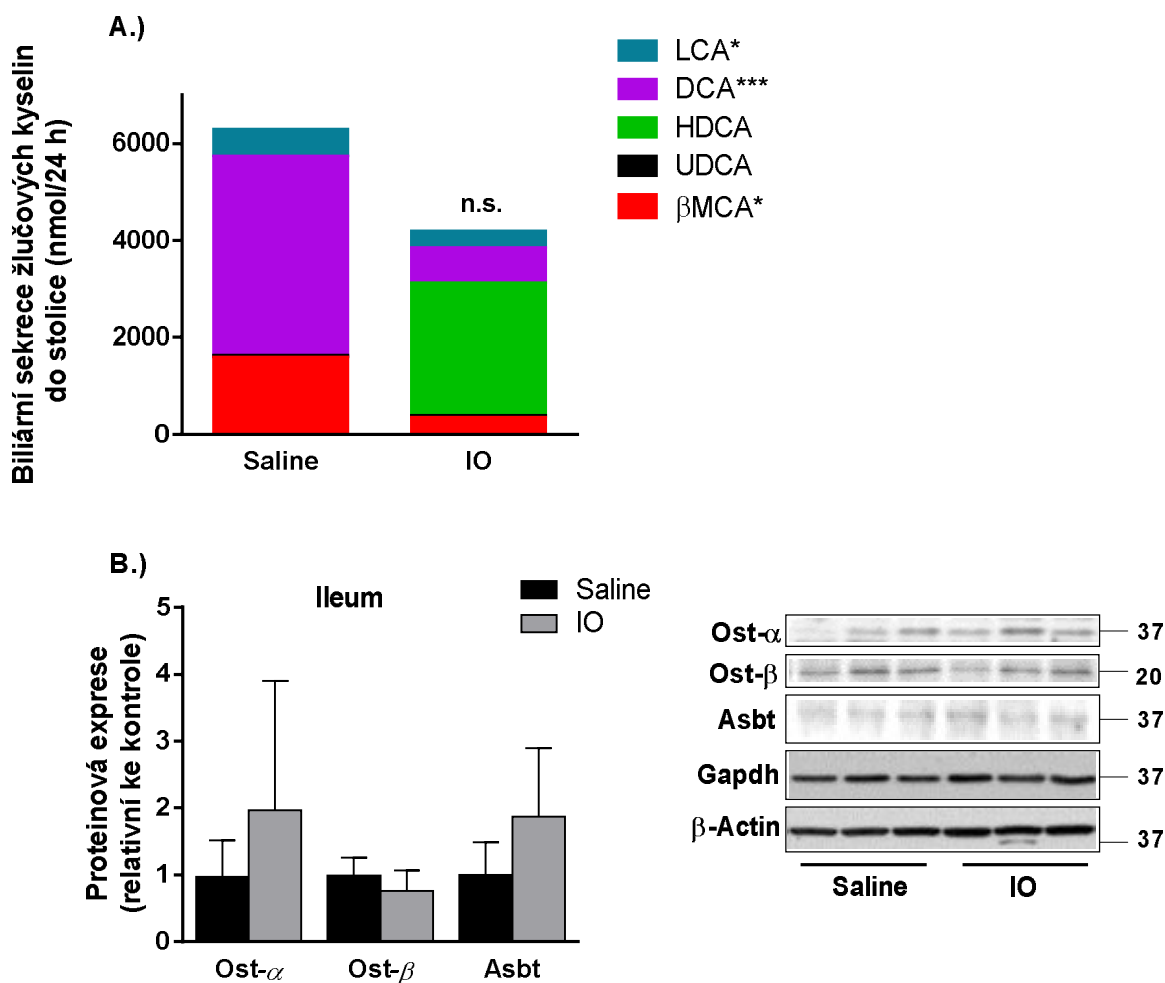


N = 6 pro každou skupinu; Saline, kontrolní skupina, aplikovaná i.p. 8 dávkami fyziologického roztoku (1 ml/kg) ob den; IO, skupina přetížená železem, aplikovaná i.p. 8 dávkami gleptoferronu (100 mg/kg) ob den; Mrp2, Multidrug resistance protein 2; Bsep, Bile Salt Export Pump.

## 4.13 IO mění střevní obrat ŽK

Přibližně 95 % ŽK vstupujících do střeva žlučí je reabsorbováno v ileu do portální krve a následně znovu použito hepatocyty k sekreci do žluči. Pro posouzení obratu ŽK byla proto analyzována ztráta ŽK do stolice. LC-MS analýza potvrdila, že ŽK byly přítomny ve stolici pouze v nekonjugované formě. Obsah ŽK ve stolici byl mezi jednotlivými zvířaty ve skupině vysoce variabilní, proto tendence ke snížení vylučování ŽK u IO potkanů nedosáhla statistické významnosti (Graf 23A). To naznačuje, že snížená biliární sekrece ŽK mohla být kompenzována jejich sníženou reabsorpcí v ileu. Western blot analýza nepotvrdila signifikantní změny exprese proteinů Asbt a Ost $\alpha/\beta$ , tj. hlavních transportérů pro reabsorpci ŽK na apikálních a bazolaterálních membránách enterocytů ilea (Graf 23B), a proto jsme se soustředili na analýzu individuálních ŽK ve vzorcích stolice. Analýza LC-MS ukázala, že exkrece ŽK do stolice byla snížena u většiny ŽK u IO potkanů s výjimkou kyseliny hyodeoxycholové (HDCA) (Graf 23A). HDCA byla přítomna ve významném množství ve čtyřech ze šesti IO potkanů, a tím vytvořila variabilitu celkového obsahu ŽK ve stolici. HDCA nebyla vůbec přítomná u kontrolní skupiny potkanů. To naznačuje, že metabolická konverze ŽK střevní mikroflórou může výrazně modifikovat sníženou biliární sekreci ŽK u IO potkanů.

Graf 23: Biliární sekrece individuálních ŽK a ileální transportéry ŽK.



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

## 5. Diskuse

Z dosažených výsledků vyplývá, že dieta s deplecí železa vedla u potkanů k nárůstu toku žluče v důsledku zvýšení biliární sekrece ŽK a glutathionu se současným navýšením biliární sekrece cholesterolu a fosfolipidů. U ID potkanů došlo ke změně spektra ŽK ve žluči, k poklesu plazmatických koncentrací ŽK a cholesterolu. Molekulární analýza prokázala, že tyto změny u ID skupiny souvisí s aktivací transkripce *Cyp7a1*, enzymu udávajícího rychlost syntézy ŽK z cholesterolu a *Abcg5/8* apikálních transportérů pro cholesterol. Experimenty provedené na HepaRG diferencované lidské buněčné linii potvrdily transkripční aktivaci lidského promotoru pro CYP7A1 při depleci železa nezávisle na FXR, LXR $\alpha$  a PXR regulaci. Zajímavostí je, že nedošlo ke změně exprese transportérů pro ŽK nebo ke změně jejich buněčné lokalizace. Výsledky v této studii tedy prezentují důležité informace o mechanismech zodpovědných za snížení sérových koncentrací cholesterolu a ŽK při depleci železa v organismu.

Železo umožňuje transport kyslíku v organismu, ale zastává i roli kofaktoru v dalších fyziologických a patofyziologických reakcích (Fleming and Ponka, 2012). Mimo jiné nachází železo uplatnění v řadě jaterních funkcí a játra rovněž hrají hlavní roli v regulaci homeostázy železa. Proto je poznání vzájemného vztahu měnících se koncentrací železa a regulace různých jaterních pochodů velmi důležité. Pokud jde o možný vliv ID na sekreci žluči a homeostázu žlučových komponent, většina dosud známých informací se soustředila na homeostázu cholesterolu. Opakovaně bylo pozorováno, že ID má schopnost snižovat sérovou koncentraci cholesterolu u lidí i u potkanů (Stangl and Kirchgessner, 1998; Choi et al., 2001), nicméně odpovědné mechanismy nebyly plně objasněny. Snížená sérová hladina cholesterolu u ID potkanů v naší práci koresponduje s dostupnými literárními údaji, což bylo základní podmínkou pro další hodnocení (Tabulka 8.). Detailní molekulární studií se nám podařilo identifikovat dva hlavní mechanismy zodpovědné za pokles cholesterolemie. Prvním je originální zjištění, že ID zvyšuje biliární sekreci cholesterolu (Graf 2A) prostřednictvím indukce kanalikulárního *Abcg5/8* transportéru (Graf 5A a 7A). To odpovídá nedávnému pozorování, že nízká hladina železa v séru je predispozičním faktorem pro supersaturaci žluči cholesterolem, což vede ke zvýšení tvorby cholesterolových žlučnickových kamenů u lidí s deplecí železa (Pamuk et al., 2009; Prasad et al., 2015). Ačkoliv následná analýza u ID potkanů prokázala pouze tendenci ke zvýšení indexu saturace cholesterolu ve žluči (Graf 2C), získané informace o zvýšení sekrece cholesterolu do žluči během ID představují první průkaz možného mechanismu. Navíc toto zjištění nabývá na významu v klinické praxi, protože na

rozdíl od potkanů, kteří nemají žlučník, u lidí může koncentrování žluče ve žlučníku vést k dalšímu zvýšení koncentrace cholesterolu ve žluči a k následnému výskytu žlučových kamenů (Van Erpecum, 2011). Dalším mezidruhovým rozdílem akcentujícím význam zjištění pro lidi je nižší obsah hydrofilních ŽK jakou je kyselina ursodeoxycholová, která redukuje krystalizaci cholesterolu za patofyziologických podmínek (Wang and Carey, 1996). U potkanů s deplecí železa byla pozorována zvýšená koncentrace zejména hydrofilních kyselin tauro- $\alpha/\beta$ -muricholové. Lze proto předpokládat, že zvýšená syntéza ŽK u lidí s deplecí železa vede k rozdílným spektrům ŽK. To může vzniknout v důsledku dominance klasické cesty syntézy ŽK s převahou hydrofobních ŽK, které mohou dále podporovat tvorbu žlučových kamenů.

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

Předešlé studie prokázaly redukcí jaterního obsahu cholesterolu u potkanů s ID (Kamei et al., 2010). Tento literární údaj koreluje se zvýšenou biliární sekrecí cholesterolu a jeho zvýšenou proměnou na ŽK, a také se sníženým vychytáváním cholesterolu do jater přes redukované Ldl a Sr-b1 receptory (Graf 7A). Nicméně jaterní obsah cholesterolu byl u našich zvířat s ID nezměněn, což je patrně způsobeno nezměněnou expresí Hmg-CoA reduktázy a snížením exprese efluxního transportéru Abca1 pro přenos cholesterolu z hepatocytů do plazmy (Graf 7A). To znamená, že redukováná sekrece cholesterolu z hepatocytů na basolaterální membráně kompenzuje zvýšenou biliární eliminaci cholesterolu na úkor snížení plazmatické koncentrace cholesterolu u ID potkanů.

Zvýšení biliární sekrece ŽK je možné dosáhnout jejich zvýšenou syntézou, ale rovněž zvýšeným transportem do žluče prostřednictvím Bsep. Za účelem rozlišení obou mechanismů jsme provedli dodatečnou *in vivo* clearance studii s infuzí radioaktivně značeného  $^3\text{H}$ -

taurocholátu (Graf 4). Za těchto podmínek byl vynechán podíl *de novo* syntézy ŽK. I u těchto zvířat došlo k nárůstu toku žluče, což potvrdilo choleretický účinek ID. Nicméně koncentrace <sup>3</sup>H-taurocholátu v plazmě i rychlost jeho biliární sekrece nebyla u ID potkanů změněna, což poukazuje na absenci podílu Bsep na pozorovaných změnách v homeostáze ŽK (Graf 4). Zvýšená exprese Ntcp a Oatp transportérů zodpovědných za vychytání ŽK z plazmy na bazolaterální membráně, nebyla spojena se zvýšeným biliární sekrecí <sup>3</sup>H-taurocholátu, což lze vysvětlit oboustranným transportem <sup>3</sup>H-taurocholátu přes bazolaterální membránu. Tyto údaje dále podporují skutečnost, že zvýšená syntéza a následně jaterní dispozice ŽK, je hlavní determinantou, která je zodpovědná za stimulaci toku žluče během ID. Naopak pozorovaná redukce střevního *Osta/β* transportéru může přispět k jejich snížené plazmatické koncentraci během ID v důsledku snížení reabsorpce ŽK v ileu (Graf 6A). Tyto mechanismy mohou rovněž přispívat ke zmírnění cholestatického poškození jater prostřednictvím redukce dispozice železa, jak bylo uvedeno v předchozích studiích (Peretz et al., 2006; Otagawa et al., 2008; Cermanova et al., 2014).

Nárůst biliární koncentrace ŽK (Graf 9B) u ID potkanů byl doprovázen zvýšenou sekrecí fosfolipidů (Graf 2B). Tento údaj souhlasí s redukcí koncentrace fosfolipidů v séru pozorovanou v předchozí studii s ID zvířaty (Stangl and Kirchgessner, 1998). Nicméně odpovídající kanikulární transportér pro fosfolipidy, Mdr2, byl na proteinové úrovni beze změny navzdory indukci exprese jeho *Abcb4* genu na úrovni mRNA. Podobné zvýšení *Abcb4* bylo zaznamenáno i v předešlé studii Kamei et al. (2010). Důvod nesrovnalosti mezi mRNA a proteinovou expresí Mdr2 není znám. Tato zjištění však naznačují, že zvýšená biliární sekrece fosfolipidů může být u ID zvířat přičítána zvýšení biliární sekrece ŽK, které extrahují fosfolipidy z kanikulární membrány do žluče (Oude Elferink and Paulusma, 2007). Analogická situace byla zaznamenána i u myši se zvýšenou expresí Bsep, s výrazně zvýšenou biliární sekrecí ŽK a současně i fosfolipidů bez změny exprese *Abcb4/Mdr2* (Figge et al., 2004).

Zvýšený tok žluče může být rovněž důsledkem upregulace Mrp2 transportéru, který je klíčový pro transport anionických sloučenin přes kanikulární membránu do žluče, a to včetně osmoticky aktivního glutathionu (Ruiz et al., 2007). Deplece železa v naší experimentální skupině zvířat nevedla ke změnám exprese Mrp2 (Graf 5A a 7C), přesto však došlo ke zvýšení biliární sekrece glutathionu. Vysvětlení tohoto jevu lze nalézt ve zvýšení jaterního obsahu redukované formy glutathionu (GSH). Tato kumulace patrně souvisí s jeho obrannou funkcí proti oxidačnímu poškození jater prostřednictvím inaktivace reaktivních forem kyslíku (ROS). Poměr GSH/GSSG je proto obecně používán jako indikátor

oxidačního stresu v tkáních (Chen et al., 2013). Kumulace železa v tkáních je známým faktorem generování volných radikálů Fentonovou reakcí (Fleming and Ponka, 2012). Lze proto předpokládat, že snížení jaterního obsahu železa pomocí ID potravy vedlo u zvířat ke snížené oxidaci GSH v důsledku snížené tvorby volných radikálů následované zvýšenou dispozicí a zvýšenou biliární sekrecí glutathionu.

Prozánětlivé cytokiny jako IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$  mohou inhibovat tvorbu žluči snížením exprese bazolaterálních i kanikulárních transportních proteinů, což je podkladem pro vznik cholestázy během zánětlivých onemocnění (Boyer\_2013). Deplece železa může vést ke snížení exprese zmíněných cytokinů během zánětu (Darshan et al., 2010). Proto jsme provedli analýzu mRNA hlavních cytokinů, které jsou indukovány během akutního nebo chronického zánětu v játrech (Graf 6B). U zvířat s ID nedošlo ke změně genové exprese zánětlivých markerů, což naznačuje, že tyto cytokiny nejsou zodpovědné za změny v játrech pozorované u ID potkanů.

Indukce genové exprese *Abcg5/8*, *Abcb4*, *Abcc3*, *Nr0b2* (Shp), *Cyp7a1*, *Cyp8b1* a *Srebf1* (Graf 5) v experimentální ID skupině naznačuje aktivaci nukleárních receptorů jako FXR a LXR $\alpha$ , které představují hlavní regulační receptory pro zmíněné geny (Halilbasic et al., 2013). Proto byly analyzovány geny, které představují typické cílové struktury pro jednotlivé nukleární receptory. Genová exprese Bsep a Shp, která je regulovaná především FXR, však vykazovala nejednotnou odpověď; první byl nezměněn a druhý výrazně up-regulován. Podobná reakce byla detekována v ileu, kde *Osta $\beta$*  geny regulované FXR byly reprimované (Graf 6A). Proto můžeme očekávat, že aktivace FXR receptoru nehraje důležitou roli ve sledovaných změnách u ID potkanů, což potvrdila i následná *in vitro* studie. *Nr0b2* (Shp) gen může být také indukován stimulací LXR $\alpha$  (Kim et al., 2009). Rovněž zvýšení exprese dalších genů regulovaných LXR $\alpha$  jakými jsou *Cyp7a1*, *Abcg5/8* a *Srebf1*, silně naznačuje, že ID podporuje v játrech potkanů signalizaci přes LXR $\alpha$  receptor. Tuto hypotézu potvrzuje nález zvýšené proteinové exprese LXR $\alpha$  receptoru. Nezměněná mRNA LXR $\alpha$  (Graf 5D) svědčí pro posttranskripční modulaci jeho exprese u ID skupiny (Graf 7A).

Protože v literatuře byly jisté pochybnosti o schopnosti LXR $\alpha$  transaktivovat lidský CYP7A1 (Li and Chiang, 2012), provedli jsme mechanistické experimenty v diferencovaných lidských HepaRG buňkách a v buňkách HepG2 exprimujících exogenní LXR $\alpha$  společně s transfekcí luciferasou značeného CYP7A1 promotoru, kde GW3965 byl použit jako syntetický ligand LXR $\alpha$  (Graf 10C). V této *in vitro* studii jsme potvrdili, že ID indukuje mRNA expresi CYP7A1, což svědčí pro podobný účinek nedostatku železa v lidských hepatocytech, jaký jsme pozorovali v potkaních játrech a otevírá klinickou relevanci našich



poznatků. Nicméně koexprese CYP7A1 promotoru s LXRA, FXR nebo PXR prokázala na buňkách HepG2 supresivní účinek na CYP7A1 promotorový konstrukt a GW3965 neměl žádný účinek na aktivaci promotoru CYP7A1 v nepřítomnosti nebo přítomnosti LXRA. Podobně ligandy FXR a PXR, CDCA a rifampicin, měly supresivní účinek na transaktivaci promotoru CYP7A1 (Graf 10C), což je v souladu s jejich rolí v regulaci CYP7A1 (Li\_2015). Na základě těchto pozorování můžeme tvrdit, že deplece železa indukuje v lidských buňkách expresi CYP7A1 nezávisle na LXRA, FXR a PXR. Naše data rovněž vyloučily možnosti regulace CYP7A1 přes pERK a pJNK kinázy, což je v souladu s absencí změn protizánětlivých cytokinů.

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

Pro zjištění komplexního vlivu železa na homeostázu ŽK byla námi následně provedena studie, ve které byl indukován jeho přebytek s významnou jaterní kumulací (Graf 12). Podobně jako v případě nedostatku železa, i zde byly známy především účinky nadbytku železa na prekursor ŽK, cholesterol. Tyto studie demonstrovaly významné rozdíly mezi podmiňující patologickou situací. Zatímco lidé a myši (Padda et al., 2015) s geneticky podmíněným IO, jakými jsou talasemie nebo dědičná hemochromatóza, mají většinou snížené

plazmatické koncentrace cholesterolu, modely hlodavců založené na aplikaci železa obvykle zvyšují plazmatické (Brunet et al., 1999) a případně i jaterní koncentrace cholesterolu (Graham et al., 2010). Podobně je opakovaně popisována významná kumulace železa v játrech asi u jedné třetiny nemocných s metabolickým syndromem provázeným nealkoholovým ztukovatěním jater (NAFLD), u kterých lze rovněž najít významně zvýšený cholesterol v plazmě (Dongiovanni et al., 2011). Tato klinická situace je označována jako dysmetabolický syndrom s nadbytkem železa (Dysmetabolic Iron Overload Syndrome) a zvířecí modely založené na nadměrné aplikaci železa lépe korespondují s tímto stavem. Tomuto poznatku odpovídá i námi detekované ukládání železa v hepatocytech i neparenchymatózních buňkách (např. Kupfferovy buňky) typické pro NAFLD (Valenti et al., 2010), zatímco geneticky podmíněné nemoci vedou ke kumulaci železa především v hepatocytech.

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

Jaterní HmgCR je regulována transkripčním faktorem SREBP-2 jako odpověď na snížený obsah cholesterolu ve tkáni (Horton et al., 2002). Nezměněné koncentrace cholesterolu v játrech u našich IO potkanů naznačují vliv dalšího faktoru aktivujícího SREBP-2. V poslední době bylo popsáno, že SREBP-2 může být indukován ROS (Seo and Shin, 2017). Zvýšená produkce ROS je typickým průvodním jevem kumulace železa v játrech (Philippe et al., 2007). Snížený jaterní poměr GSH/GSSG (Graf 15C) a indukce exprese

Hmox1 a fosforylace p65\_NF- $\kappa$ B (Graf 16A) potvrdily vznik oxidačního stresu u našich potkanů s IO. Proto lze předpokládat, že indukce jaterní dráhy ROS-SREBP-2 je zodpovědná za indukci HmgCR u potkanů s IO. Absence kumulace cholesterolu v játrech (Graf 18C) spolu s jeho nezměněným vylučováním žlučí (Graf 18A) naznačují, že zvýšené koncentrace cholesterolu v plazmě jsou podmíněny jeho zvýšeným výstupem z jater do krevního řečiště v reakci na zvýšenou syntézu indukovanou HmgCR a na zpomalenou syntézu ŽK díky sníženému Cyp7a1. Indukce HmgCR také naznačuje potenciální terapeutickou strategii léčby statiny, léky blokujícími HmgCR, které skutečně projevily příznivé účinky u NASH, tj. syndromu spojeného se zvýšeným ukládáním železa v játrech (Dongiovanni et al., 2015).

Transportní proteiny, které zprostředkovávají vychytání ŽK do hepatocytů a jejich biliární sekreci, nebyly dosud během IO studovány navzdory důkazu redukce biliární sekrece ŽK (Brunet et al., 1999). V naší studii se podařilo prokázat posttranskripční downregulaci hlavních z nich, Ntcp, Bsep a Mrp2, která svým charakterem připomíná zvýšenou degradaci těchto proteinů pozorovanou během zánětu (Zinchuk et al., 2005; Geier et al., 2007). Údaje z imunohistochemie skutečně potvrdily signifikantně sníženou kanalikulární lokalizaci Bsep a Mrp2 v játrech potkanů s IO ve srovnání s kontrolními potkany. Tento způsob regulace odpovídá aktivaci Tgf- $\beta$  kaskády a především probíhajícímu oxidačnímu stresu u potkanů s IO. To potvrzuje i upregulace Mdr1, která je indukovaná v játrech vazbou fosforylovaného NF- $\kappa$ B na promotor Mdr1 (Nishanth et al., 2010). Společně se sníženou syntézou ŽK mohou tyto změny přispívat ke snížení biliární sekrece ŽK (Graf 17B) u potkanů s IO a mohou modifikovat biliární sekreci mnoha sloučenin včetně léků. Kromě toho snížené vychytávání ŽK prostřednictvím redukce Ntcp a jejich zvýšený eflux z hepatocytů do krve přes indukovaný Mrp4, může přispět k nezměněným plazmatickým koncentracím ŽK a zabránit intracelulární kumulaci ŽK v důsledku jejich zhoršené biliární sekrece. Současně naše data vysvětlují pozorované zvýšení plazmatických koncentrací bilirubinu v důsledku downregulace apikálního Mrp2 (biliární sekrece), upregulace bazolaterálního Mrp3 (eflux z hepatocytů do krve) a indukce Hmox1 (katalyzuje rozklad hemu s následným uvolněním bilirubinu).

Vliv IO na vylučování ŽK do stolice nebyl dosud popsán. Proto jsme provedli analýzy ŽK ve sbírané stolici. Důležitým bylo zjištění, že u potkanů s IO zůstalo vylučování ŽK stolicí neovlivněno (Graf 23A) navzdory jejich snížené dodávce do střeva prostřednictvím žluče, což svědčí pro snížené zpětné vychytávání ŽK ze střeva. Hlavní transportéry pro zpětné vychytávání ŽK ze střeva, Abst a Ost, však nebyly IO významně ovlivněny. Naproti tomu

analýza spektra ŽK ve stolici IO potkanů poukázala na výraznou individuálně variabilní intestinální konverzi ŽK na HDCA. Předchozí studie prokázala neúčinnou absorpci HDCA ze střeva u potkanů kmene Wistar, což vedlo k závěru, že fekální ztráty ŽK prostřednictvím jejich konverze na HDCA mohou být důležitým mechanismem pro regulaci dispozice cholesterolu v organismu (Madsen et al., 1975). Pro sníženou absorpci HDCA v naší studii svědčila analýza HDCA v portální krvi, kde nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami, navzdory zvýšenému obsahu HDCA ve stolici 4 ze 6 IO zvířat, absenci HDCA ve stolici odebrané od kontrolní skupiny a absenci HDCA ve žluči u obou skupin. Lze předpokládat, že variabilní proměna ŽK na HDCA je zprostředkovaná změnou spektra intestinálních bakterií u IO potkanů (Eyssen et al., 1999), nicméně tato hypotéza musí být dále studována. Analýza ŽK ve stolici přinesla i další významné zjištění, a to že změnu v expresi jaterních syntetických drah ŽK lépe reflektuje jejich obsah ve stolici nežli ve žluči. Týkalo se to především redukce Cyp8b1, hlavního enzymu neutrální cesty; zatímco biliární sekrece ukazovala neselektivní snížení syntézy ŽK navzdory nezměněnému klíčovému enzymu kyselé dráhy tj. Cyp27a1, obsah ŽK ve stolici ukázal zejména pokles DCA, hlavního reprezentanta této neutrální dráhy u IO potkanů. To potvrzovala i zvýšená tvorba HDCA, metabolitu kyseliny muricholové, typického produktu kyselé dráhy syntézy ŽK.

## Závěr

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

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

Důležitým bylo rovněž zjištění zvýšené biliární sekrece cholesterolu u zvířat s nedostatkem železa prostřednictvím indukce jeho transportních proteinů, což za této situace dále vysvětlilo snížené plazmatické hladiny cholesterolu a poprvé přineslo možné vysvětlení zvýšené tvorby žlučových kamenů u lidí s deplecí železa. U zvířat s nadbytkem železa byl identifikován možný mechanismus zvýšené syntézy cholesterolu prostřednictvím oxidačním stresem aktivované Srebp2- HmgCR kaskády. Současně byla u zvířat s nadbytkem železa identifikována indukce hlavního enzymu a transportéru pro eliminaci léčiv, což může mít dopad pro farmakokinetiku řady léčiv, která jsou jejich substráty.

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

## **Podíl studenta na vědecké práci**

Na daných studiích jsem se podílela přípravou *in vivo* experimentů (příprava potkanů, asistence při kanylaci, odběry vzorků, rozbor orgánů), PCR a Western blot analýzou vzorků jater a střev potkanů. Měřila jsem obsah cholesterolu v játrech a koncentraci cholesterolu a fosfolipidů v žluči pomocí komerčně dostupných kitů. Provedla jsem izolaci žlučových kyselin ze stolice. Vyhodnocovala a zpracovávala jsem naměřená data ze všech prováděných analýz. Podílela jsem se na psaní prvoautorských článků, které byly publikovány v časopisech s impakt faktorem v Q1.

## Použitá literatura

- Addo L, Ikuta K, Tanaka H, Toki Y, Hatayama M, Yamamoto M, Ito S, Shindo M, Sasaki Y, Shimonaka Y, Fujiya M and Kohgo Y (2016) The three isoforms of hepcidin in human serum and their processing determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-tandem MS). *International journal of hematology* **103**:34-43.
- Ahmed SM, Luo L, Namani A, Wang XJ and Tang X (2017) Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease* **1863**:585-597.
- Aigner E, Weiss G and Datz C (2015) Dysregulation of iron and copper homeostasis in nonalcoholic fatty liver. *World journal of hepatology* **7**:177-188.
- Alrefai WA and Gill RK (2007) Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharmaceutical research* **24**:1803-1823.
- Alvaro D, Della Guardia P, Bini A, Gigliozzi A, Furfaro S, La Rosa T, Piat C and Capocaccia L (1995) Effect of glucagon on intracellular pH regulation in isolated rat hepatocyte couplets. *The Journal of clinical investigation* **96**:665-675.
- Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS and Leibold EA (2012) Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1823**:1468-1483.
- Arezes J and Nemeth E (2015) Hepcidin and iron disorders: new biology and clinical approaches. *International journal of laboratory hematology* **37 Suppl 1**:92-98.
- Balakrishnan A and Polli JE (2006) Apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT, SLC10A2): a potential prodrug target. *Mol Pharm* **3**:223-230.
- Batts KP (2007) Iron overload syndromes and the liver. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **20 Suppl 1**:S31-39.
- Borst P, de Wolf C and van de Wetering K (2007) Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch* **453**:661-673.
- Boyer JL (2013) Bile formation and secretion, in *Compr Physiol* pp 1035-1078.
- Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bendayan M and Levy E (1999) Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats, in *Hepatology* pp 1809-1817.
- Camaschella C (2017) New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood reviews* **31**:225-233.
- Cao A and Galanello R (2010) Beta-thalassemia. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* **12**:61-76.
- Carey MC (1978) Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile. *J Lipid Res* **19**:945-955.
- Carey MC and Small DM (1972) Micelle Formation by Bile Salts: Physical-Chemical and Thermodynamic Considerations. *JAMA Internal Medicine* **130**:506-527.
- Carmona U, Li L, Zhang L and Knez M (2014) Ferritin light-chain subunits: key elements for the electron transfer across the protein cage. *Chemical communications (Cambridge, England)* **50**:15358-15361.
- Cermanova J, Kadova Z, Dolezelova E, Zagorova M, Safka V, Hroch M, Laho T, Holeckova M, Mokry J, Kovarikova P, Bures J, Sterba M and Micuda S (2014) Deferoxamine but not dexrazoxane alleviates liver injury induced by endotoxemia in rats, in *Shock* pp 372-379.
- Connerty P, Ahadi A and Hutvagner G (2015) RNA Binding Proteins in the miRNA Pathway. *International journal of molecular sciences* **17**.



- Coppin H, Darnaud V, Kautz L, Meynard D, Aubry M, Mosser J, Martinez M and Roth MP (2007) Gene expression profiling of Hfe<sup>-/-</sup> liver and duodenum in mouse strains with differing susceptibilities to iron loading: identification of transcriptional regulatory targets of Hfe and potential hemochromatosis modifiers. *Genome biology* **8**:R221.
- Darshan D, Frazer DM, Wilkins SJ and Anderson GJ (2010) Severe iron deficiency blunts the response of the iron regulatory gene Hmp and pro-inflammatory cytokines to lipopolysaccharide. *Haematologica* **95**:1660-1667.
- de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ and Edwards PA (2013) Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab* **17**:657-669.
- Deugnier Y, Bardou-Jacquet E and Laine F (2017) Dysmetabolic iron overload syndrome (DIOS). *Presse medicale (Paris, France : 1983)* **46**:e306-e311.
- Di Ciaula A, Wang DQ, Bonfrate L and Portincasa P (2013) Current views on genetics and epigenetics of cholesterol gallstone disease. *Cholesterol* **2013**:298421.
- Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fargion S and Valenti L (2011) Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: a promising therapeutic target. *J Hepatol* **55**:920-932.
- Dongiovanni P, Petta S, Mannisto V, Mancina RM, Pipitone R, Karja V, Maggioni M, Kakela P, Wiklund O, Mozzi E, Grimaudo S, Kaminska D, Rametta R, Craxi A, Fargion S, Nobili V, Romeo S, Pihlajamaki J and Valenti L (2015) Statin use and non-alcoholic steatohepatitis in at risk individuals. *J Hepatol* **63**:705-712.
- Esteller A (2008) Physiology of bile secretion. *World J Gastroenterol* **14**:5641-5649.
- Evenson MA (1988) Measurement of copper in biological samples by flame or electrothermal atomic absorption spectrometry. *Methods in enzymology* **158**:351-357.
- Eyssen HJ, De Pauw G and Van Eldere J (1999) Formation of hyodeoxycholic acid from muricholic acid and hyocholic acid by an unidentified gram-positive rod termed HDCA-1 isolated from rat intestinal microflora. *Applied and environmental microbiology* **65**:3158-3163.
- Figge A, Lammert F, Paigen B, Henkel A, Matern S, Korstanje R, Shneider BL, Chen F, Stoltenberg E, Spatz K, Hoda F, Cohen DE and Green RM (2004) Hepatic overexpression of murine Abcb11 increases hepatobiliary lipid secretion and reduces hepatic steatosis. *J Biol Chem* **279**:2790-2799.
- Fleming RE and Ponka P (2012) Iron overload in human disease, in *N Engl J Med* pp 348-359.
- Geier A, Wagner M, Dietrich CG and Trauner M (2007) Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochimica et biophysica acta* **1773**:283-308.
- Geyer J, Wilke T and Petzinger E (2006) The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372**:413-431.
- Goodwin B, Watson MA, Kim H, Miao J, Kemper JK and Kliewer SA (2003) Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha, in *Mol Endocrinol* pp 386-394.
- Graham RM, Chua AC, Carter KW, Delima RD, Johnstone D, Herbison CE, Firth MJ, O'Leary R, Milward EA, Olynyk JK and Trinder D (2010) Hepatic iron loading in mice increases cholesterol biosynthesis. *Hepatology* **52**:462-471.
- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Canie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C and Guguen-Guillouzo C (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus, in *Proc Natl Acad Sci U S A* pp 15655-15660.
- Halilbasic E, Claudel T and Trauner M (2013) Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond, in *J Hepatol* pp 155-168.

- Han S, Li T, Ellis E, Strom S and Chiang JY (2010) A novel bile acid-activated vitamin D receptor signaling in human hepatocytes. *Mol Endocrinol* **24**:1151-1164.
- Hirsova P, Karlasova G, Dolezelova E, Cermanova J, Zagorova M, Kadova Z, Hroch M, Sispera L, Tomsik P, Lenicek M, Vitek L, Pavek P, Kucera O, Cervinkova Z and Micuda S (2013) Cholestatic effect of epigallocatechin gallate in rats is mediated via decreased expression of Mrp2, in *Toxicology* pp 9-15.
- Hofer T, Marzetti E, Seo YA, Xu J, D. Knutson M and Leeuwenburgh C (2008) *Mechanisms of iron regulation and oxidative stress in sarcopenia and neurodegenerative diseases*. Research Signpost. ISBN 978-81-308-0267-1
- Hofmann AF and Hagey LR (2008) Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci* **65**:2461-2483.
- Horton JD, Goldstein JL and Brown MS (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation* **109**:1125-1131.
- Hůlek (2018) *Hepatologie*. Grada Publishing.
- Hyrsova L, Smutny T, Carazo A, Moravcik S, Mandikova J, Trejtnar F, Gerbal-Chaloin S and Pavek P (2016) The pregnane X receptor down-regulates organic cation transporter 1 (SLC22A1) in human hepatocytes by competing for ("squelching") SRC-1 coactivator. *Br J Pharmacol* **173**:1703-1715.
- Chen Y, Day SD, Wick AF, Strahm BD, Wiseman PE and Daniels WL (2013) Changes in soil carbon pools and microbial biomass from urban land development and subsequent post-development soil rehabilitation. *Soil Biology and Biochemistry* **66**:38-44.
- Chiang JY (2003) Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Bile acids and nuclear receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**:G349-356.
- Chiang JY (2004) Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol* **40**:539-551.
- Chiang JY (2013) Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol* **3**:1191-1212.
- Chiang JY (2017a) Recent advances in understanding bile acid homeostasis. *F1000Res* **6**:2029.
- Chiang JY, Kimmel R, Weinberger C and Stroup D (2000) Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J Biol Chem* **275**:10918-10924.
- Chiang JYL (2017b) Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver Res* **1**:3-9.
- Choi J, Cooper KL, Hensle TW and Fisch H (2001) Incidence and surgical repair rates of hypospadias in New York state. *Urology* **57**:151-153.
- Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, Jones SA, Goodwin B, Richardson JA, Gerard RD, Repa JJ, Mangelsdorf DJ and Kliewer SA (2005) Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* **2**:217-225.
- Iwanaga T, Nakakariya M, Yabuuchi H, Maeda T and Tamai I (2007) Involvement of bile salt export pump in flutamide-induced cholestatic hepatitis, in *Biol Pharm Bull* pp 739-744.
- Kamei A, Watanabe Y, Ishijima T, Uehara M, Arai S, Kato H, Nakai Y and Abe K (2010) Dietary iron-deficient anemia induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study, in *Physiological Genomics* pp 149-156.
- Kawabata H (2018) The mechanisms of systemic iron homeostasis and etiology, diagnosis, and treatment of hereditary hemochromatosis. *International journal of hematology* **107**:31-43.

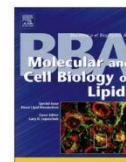
- Killip S, Bennett JM and Chambers MD (2007) Iron deficiency anemia. *American family physician* **75**:671-678.
- Kim TH, Kim H, Park JM, Im SS, Bae JS, Kim MY, Yoon HG, Cha JY, Kim KS and Ahn YH (2009) Interrelationship between liver X receptor alpha, sterol regulatory element-binding protein-1c, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, and small heterodimer partner in the transcriptional regulation of glucokinase gene expression in liver. *J Biol Chem* **284**:15071-15083.
- Klaassen CD and Aleksunes LM (2010) Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev* **62**:1-96.
- Kroot JJ, Tjalsma H, Fleming RE and Swinkels DW (2011) Hepcidin in human iron disorders: diagnostic implications. *Clinical chemistry* **57**:1650-1669.
- Kuntz and Kuntz (2008) *Hepatology*. Springer Medizin Verlag Heidelberg. ISBN 978-3-540-76838-8
- Lawen A and Lane DJ (2013) Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxidants & redox signaling* **18**:2473-2507.
- Li T, Franc JM, Boehme S and Chiang JY (2013) Regulation of cholesterol and bile acid homeostasis by the cholesterol 7alpha-hydroxylase/steroid response element-binding protein 2/microRNA-33a axis in mice. *Hepatology* **58**:1111-1121.
- Li T and Chiang JY (2012) Bile Acid signaling in liver metabolism and diseases. *Journal of lipids* **2012**:754067.
- Li T and Chiang JY (2014) Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacol Rev* **66**:948-983.
- Li T and Chiang JY (2015) Bile acids as metabolic regulators. *Current opinion in gastroenterology* **31**:159-165.
- Liang H, Huang H, Tan PZ, Liu Y, Nie JH, Zhang YT, Zhang KL, Diao Y, He Q, Hou BY, Zhao TT, Li YZ, Lv GX, Lee KY, Gao X and Zhou LY (2017) Effect of iron on cholesterol 7alpha-hydroxylase expression in alcohol-induced hepatic steatosis in mice. *J Lipid Res* **58**:1548-1560.
- Ludwig H, Evstatiev R, Kornek G, Aapro M, Bauernhofer T, Buxhofer-Ausch V, Fridrik M, Geissler D, Geissler K, Gisslinger H, Koller E, Kopetzky G, Lang A, Rumpold H, Steurer M, Kamali H and Link H (2015) Iron metabolism and iron supplementation in cancer patients. *Wiener klinische Wochenschrift* **127**:907-919.
- Madsen DC, Chang L and Wostmann B (1975) w-Muricholate: a tertiary bile acid of the Wistar rat. *Proc Indiana Acad Sc* **84**.
- Matsubara T, Li F and Gonzalez FJ (2013) FXR signaling in the enterohepatic system. *Mol Cell Endocrinol* **368**:17-29.
- Matsuoka K and Yamamoto A (2017) Study on Micelle Formation of Bile Salt Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Oleo Sci* **66**:1129-1137.
- Mehta KJ, Coombes JD, Briones-Orta M, Manka PP, Williams R, Patel VB and Syn WK (2018) Iron Enhances Hepatic Fibrogenesis and Activates Transforming Growth Factor-beta Signaling in Murine Hepatic Stellate Cells. *The American journal of the medical sciences* **355**:183-190.
- Metzger AL, Heymsfield S and Grundy SM (1972) The lithogenic index--a numerical expression for the relative lithogenicity of bile. *Gastroenterology* **62**:499-501.
- Morita SY and Terada T (2014) Molecular mechanisms for biliary phospholipid and drug efflux mediated by ABCB4 and bile salts. *Biomed Res Int* **2014**:954781.
- Muncie HL, Jr. and Campbell J (2009) Alpha and beta thalassemia. *American family physician* **80**:339-344.

- Munoz M, Villar I and Garcia-Erce JA (2009) An update on iron physiology, in *World J Gastroenterol* pp 4617-4626.
- Murray M and Zhou F (2017) Trafficking and other regulatory mechanisms for organic anion transporting polypeptides and organic anion transporters that modulate cellular drug and xenobiotic influx and that are dysregulated in disease. *Br J Pharmacol* **174**:1908-1924.
- Najafzadeh H, Jalali MR, Morovvati H and Taravati F (2010) Comparison of the prophylactic effect of silymarin and deferoxamine on iron overload-induced hepatotoxicity in rat. *Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology* **6**:22-26.
- Natalini B, Sardella R, Gioiello A, Ianni F, Di Michele A and Marinozzi M (2014) Determination of bile salt critical micellization concentration on the road to drug discovery. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **87**:62-81.
- Newman R, McHugh J and Turner M (2016) RNA binding proteins as regulators of immune cell biology. *Clinical and experimental immunology* **183**:37-49.
- Nishanth RP, Ramakrishna BS, Jyotsna RG, Roy KR, Reddy GV, Reddy PK and Reddanna P (2010) C-Phycocyanin inhibits MDR1 through reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 mediated pathways in human hepatocellular carcinoma cell line. *European journal of pharmacology* **649**:74-83.
- Oswald S (2018) Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) transporter expression, localization and function in the human intestine. *Pharmacol Ther.*
- Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y and Kawada N (2008) Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* **294**:R311-320.
- Oude Elferink RP and Paulusma CC (2007) Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Arch* **453**:601-610.
- Outen CE (2017) Checks and balances for the iron bank. *J Biol Chem* **292**:15990-15991.
- Padda RS, Gkouvatsos K, Guido M, Mui J, Vali H and Pantopoulos K (2015) A high-fat diet modulates iron metabolism but does not promote liver fibrosis in hemochromatotic H<sub>2</sub>h<sub>2</sub>y<sup>-/-</sup> mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **308**:G251-261.
- Pamuk GE, Umit H, Harmandar F and Yesil N (2009) Patients with iron deficiency anemia have an increased prevalence of gallstones. *Annals of hematology* **88**:17-20.
- Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE and Mangelsdorf DJ (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* **93**:693-704.
- Peretz G, Link G, Pappo O, Bruck R and Ackerman Z (2006) Effect of hepatic iron concentration reduction on hepatic fibrosis and damage in rats with cholestatic liver disease. *World J Gastroenterol* **12**:240-245.
- Philippe MA, Ruddell RG and Ramm GA (2007) Role of iron in hepatic fibrosis: one piece in the puzzle. *World J Gastroenterol* **13**:4746-4754.
- Porez G, Prawitt J, Gross B and Staels B (2012) Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. *J Lipid Res* **53**:1723-1737.
- Prasad PC, Gupta S and Kaushik N (2015) To study serum iron levels in patients of gall bladder stone disease and to compare with healthy individuals. *The Indian journal of surgery* **77**:19-22.
- Prasnicka A, Cermanova J, Hroch M, Dolezelova E, Rozkydalova L, Smutny T, Carazo A, Chladek J, Lenicek M, Nachtigal P, Vitek L, Pavek P and Micuda S (2017) Iron depletion induces hepatic secretion of biliary lipids and glutathione in rats. *Biochimica et biophysica acta* **1862**:1469-1480.

- Qi Y, Jiang C, Cheng J, Krausz KW, Li T, Ferrell JM, Gonzalez FJ and Chiang JY (2015) Bile acid signaling in lipid metabolism: metabolomic and lipidomic analysis of lipid and bile acid markers linked to anti-obesity and anti-diabetes in mice. *Biochimica et biophysica acta* **1851**:19-29.
- Reichert CO, da Cunha J, Levy D, Maselli LMF, Bydlowski SP and Spada C (2017) Hepcidin: Homeostasis and Diseases Related to Iron Metabolism. *Acta haematologica* **137**:220-236.
- Reshetnyak VI (2013) Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World J Gastroenterol* **19**:7341-7360.
- Ruiz ML, Villanueva SS, Luquita MG, Ikushiro S, Mottino AD and Catania VA (2007) Beneficial effect of spironolactone administration on ethynylestradiol-induced cholestasis in the rat: involvement of up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2. *Drug Metab Dispos* **35**:2060-2066.
- Rulcova A, Prokopova I, Krausova L, Bitman M, Vrzal R, Dvorak Z, Blahos J and Pavek P (2010) Stereoselective interactions of warfarin enantiomers with the pregnane X nuclear receptor in gene regulation of major drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **8**:2708-2717.
- Seo K and Shin SM (2017) Induction of Lipin1 by ROS-Dependent SREBP-2 Activation. *Toxicological research* **33**:219-224.
- Shapiro H, Kolodziejczyk AA, Halstuch D and Elinav E (2018) Bile acids in glucose metabolism in health and disease. *J Exp Med* **215**:383-396.
- Schmidt DR, Holmstrom SR, Fon Tacer K, Bookout AL, Kliewer SA and Mangelsdorf DJ (2010) Regulation of bile acid synthesis by fat-soluble vitamins A and D. *J Biol Chem* **285**:14486-14494.
- Schneider BD and Leibold EA (2003) Effects of iron regulatory protein regulation on iron homeostasis during hypoxia. *Blood* **102**:3404-3411.
- Silva M, da Costa Guerra JF, Sampaio AF, de Lima WG, Silva ME and Pedrosa ML (2015) Iron dextran increases hepatic oxidative stress and alters expression of genes related to lipid metabolism contributing to hyperlipidaemia in murine model. *Biomed Res Int* **2015**:272617.
- Song KH, Li T, Owsley E and Chiang JY (2010) A putative role of micro RNA in regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase expression in human hepatocytes. *J Lipid Res* **51**:2223-2233.
- Stangl GI and Kirchgessner M (1998) Different degrees of moderate iron deficiency modulate lipid metabolism of rats. *Lipids* **33**:889-895.
- Steinbicker AU and Muckenthaler MU (2013) Out of balance--systemic iron homeostasis in iron-related disorders. *Nutrients* **5**:3034-3061.
- Tarling EJ, Clifford BL, Cheng J, Morand P, Cheng A, Lester E, Sallam T, Turner M and de Aguiar Vallim TQ (2017) RNA-binding protein ZFP36L1 maintains posttranscriptional regulation of bile acid metabolism. *The Journal of clinical investigation* **127**:3741-3754.
- Tempel W, Grabovec I, MacKenzie F, Dichenko YV, Usanov SA, Gilep AA, Park HW and Strushkevich N (2014) Structural characterization of human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. *J Lipid Res* **55**:1925-1932.
- Trauner M and Boyer JL (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* **83**:633-671.
- Trojan S. (2003) *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing, Praha. ISBN 80-247-0512-5
- Valenti L, Fracanzani AL, Bugianesi E, Dongiovanni P, Galmozzi E, Vanni E, Canavesi E, Lattuada E, Roviario G, Marchesini G and Fargion S (2010) HFE genotype,

- parenchymal iron accumulation, and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **138**:905-912.
- Van Erpecum KJ (2011) Pathogenesis of cholesterol and pigment gallstones: an update. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* **35**:281-287.
- Wang DQ and Carey MC (1996) Complete mapping of crystallization pathways during cholesterol precipitation from model bile: influence of physical-chemical variables of pathophysiologic relevance and identification of a stable liquid crystalline state in cold, dilute and hydrophilic bile salt-containing systems. *J Lipid Res* **37**:606-630.
- Wang QM, Du JL, Duan ZJ, Guo SB, Sun XY and Liu Z (2013) Inhibiting heme oxygenase-1 attenuates rat liver fibrosis by removing iron accumulation, in *World J Gastroenterol* pp 2921-2934.
- Yu C, Wang F, Kan M, Jin C, Jones RB, Weinstein M, Deng CX and McKeehan WL (2000) Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. *J Biol Chem* **275**:15482-15489.
- Yu XH, Qian K, Jiang N, Zheng XL, Cayabyab FS and Tang CK (2014) ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* **428**:82-88.
- Zhang JM, Wang XH, Hao LH, Wang H, Zhang XY, Muhammad I, Qi Y, Li GL and Sun XQ (2017) Nrf2 is crucial for the down-regulation of Cyp7a1 induced by arachidonic acid in Hepg2 cells. *Environ Toxicol Pharmacol* **52**:21-26.
- Zhou H and Hylemon PB (2014) Bile acids are nutrient signaling hormones. *Steroids* **86**:62-68.
- Zinchuk V, Zinchuk O and Okada T (2005) Experimental LPS-induced cholestasis alters subcellular distribution and affects colocalization of Mrp2 and Bsep proteins: a quantitative colocalization study. *Microscopy research and technique* **67**:65-70.

## **Příloha 1** (Prasnicka et al., 2017) (IF2017-4,966)



## Iron depletion induces hepatic secretion of biliary lipids and glutathione in rats



Alena Prasnicka<sup>a</sup>, Jolana Cermanova<sup>a</sup>, Milos Hroch<sup>b</sup>, Eva Dolezelova<sup>c</sup>, Lucie Rozkydalova<sup>a,d</sup>, Tomas Smutny<sup>d</sup>, Alejandro Carazo<sup>d</sup>, Jaroslav Chladek<sup>a</sup>, Martin Lenicek<sup>c</sup>, Petr Nachtigal<sup>c</sup>, Libor Vitek<sup>e,f</sup>, Petr Pavek<sup>d</sup>, Stanislav Micuda<sup>a,\*</sup>

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

<sup>b</sup> Department of Medical Biochemistry, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Czech Republic

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

<sup>d</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>e</sup> Department of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Charles University, 1st Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

<sup>f</sup> 4th Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Iron depletion  
Bile production  
Bile acid synthesis  
Cyp7a1  
Abcg5/8

### ABSTRACT

Iron depletion (ID) has been shown to induce the liver expression of Cyp7a1, the rate-limiting enzyme initiating conversion of cholesterol to bile acids (BA), although the effect on bile acids metabolism and bile production is unknown. Therefore, we investigated changes in bile secretion and BA synthesis during diet-induced iron depletion (ID) in rats. ID increased bileflow along with augmented biliary excretion of bile acids, glutathione, cholesterol and phospholipids. Accordingly, we found transcriptional upregulation of the Cyp7a1, Cyp8b1, and Cyp27a1 BA synthetic enzymes, as well as induction of the Abcg5/8 cholesterol transporters in ID rat livers. In contrast, intravenous infusion of <sup>3</sup>H-taurocholate failed to elicit any difference in biliary secretion of this compound in the ID rats. This corresponded with unchanged expression of canalicular rate-limiting transporters for BA as well as glutathione. We also observed that ID substantially changed the spectrum of BA in bile and decreased plasma concentrations of BA and cholesterol. Experiments with differentiated human hepatic HepaRG *CYP7A1* orthologue upregulation resulting from reduced iron concentrations. Results employing a luciferase reporter gene assay suggest that the transcriptional activation of the *CYP7A1* promoter under ID conditions works independent of farnesoid X (FXR), pregnane X (PXR) and liver X (LXR $\alpha$ ) receptors activation. It can be concluded that this study characterizes the molecular mechanisms of modified bile production as well as cholesterol as along with BA homeostasis during ID. We propose complex upregulation of BA synthesis, and biliary cholesterol secretion as the key factors affected by ID.

### 1. Introduction

Bile serves as one of the essential routes for the endobiotic and xenobiotic compound excretion of an organism. Secretion of bile is mediated primarily by the cooperation of transporting proteins at the basolateral and apical membranes of hepatocytes, which excrete bile acids (BA) and glutathione into bile, thus producing osmotic gradient, which attracts water into the biliary lumen[1]. The entire process is sensitively regulated and rapidly responds to systemic or local conditions, as can be seen during different types of intrahepatic and

extrahepatic cholestasis[2], or after the administration of choleric or cholestatic compounds [3,4]. Because the involved transporting proteins are simultaneously responsible for biliary excretion of drugs, with their functions affected under different pathophysiological conditions [5], serious changes in the pharmacokinetics of their substrates may consequently occur, resulting in either diminished response or cumulative toxicity [6,7]. A better understanding of factors regulating the mechanisms responsible for bile production and transport under pathophysiological conditions may therefore be of significant medical importance.

**Abbreviations:** DCA, deoxycholic acid;  $\beta$ MCA,  $\beta$ -muricholic acid; CA, cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; HDCA, hyodeoxycholic acid; ID, iron depletion; Rif, rifampicin; TUDCA, tauroursodeoxycholic acid; TCDCA, taurochenodeoxycholic acid; TDCA, taurodeoxycholic acid; Ta/ $\beta$ MCA, tauro- $\alpha$ / $\beta$ -muricholic acids; TCA, taurocholic acid; GUDCA, glycourso-deoxycholic; GDCA, glycodeoxycholic acid

\* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Simkova 870, 500 03 Hradec Kralove, Czech Republic.  
E-mail address: micuda@lfhk.cuni.cz (S. Micuda).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.09.003>

Received 16 May 2017; Received in revised form 16 August 2017; Accepted 5 September 2017

Available online 06 September 2017

1388-1981 / © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



Iron is an essential biogenic metal, one crucial in many physiological processes [8]. Although the details regarding the involvement of iron in bile production is unknown, it is clear that some chronic liver pathologies associated with cholestasis, such as primary biliary cholangitis and biliary atresia, are typically associated with reduced iron content in the liver [9–12]. Interestingly, preclinical studies showed that further deprivation of iron by diet alleviated the severity of liver fibrosis in rats with cholestasis induced by bile duct ligation [13]. Similarly, a reduction of iron content by the iron chelator deferoxamine attenuated endotoxin-induced liver injury in rats. The same study also demonstrated that deferoxamine might reduce liver gene expression of the *Ntcp* transporter for BA [14]. Furthermore, dietary iron depletion in rats up-regulated liver *Cyp7a1*, the rate-limiting enzyme of BA biosynthesis from cholesterol, a finding which was accompanied with reduced cholesterol concentrations in plasma [15]. These data suggest that lack of iron in the liver may have a significant impact on the regulation of BA synthesis and excretion, thus on bile formation. This hypothesis, however, has never been studied in detail. The need for these data is emphasized by the frequent occurrence of ID, which is the leading cause of anemia worldwide [16].

The aim of the present study was to evaluate the role of ID in the regulation of the mechanisms responsible for bile production and hepatic turnover of biliary constituents. The changes in enzymes and transporting proteins involved in BA, cholesterol, phospholipids and glutathione transport and synthesis were examined in rats fed an iron-depleted diet. Our results show that ID augments bile production by increasing biliary secretion of BA and glutathione. In addition, our results indicate the increased liver synthesis of BA due to induction of the *Cyp7a1/CYP7A1* enzyme under ID conditions in rats or in differentiated human hepatic HepaRG cells treated with iron or iron chelators. We also found that ID increases biliary secretion of cholesterol by upregulation of the *Abcg5/8* transporters. We thus propose a complex effect of ID on the stimulation of bile production, in which mainly augmented BA synthesis and cholesterol transport are critical.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

<sup>3</sup>H-taurocholic acid, and Ecolite(+)™ liquid scintillation cocktail were purchased from MGP (Czech Republic). All other chemicals were of the highest analytical grade and were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, CA, USA) or Biorad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Standards of bile acids came either from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA; murideoxycholic,  $\alpha$ -muricholic,  $\beta$ -muricholic, glycochenodeoxycholic, tauroursodeoxycholic, taurochenodeoxycholic, tauro- $\alpha$ -muricholic, and tauro- $\beta$ -muricholic acid), or from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA; lithocholic, ursodeoxycholic, chenodeoxycholic, deoxycholic, cholic, glycolithocholic, glyoursodeoxycholic, glycocholic, glycodeoxycholic, taurocholic, taurodeoxycholic, hyodeoxycholic, and hyocholic acid).

Deuterium labeled internal standards d5-taurocholic, d5-glycocholic, d4-glycochenodeoxycholic, and d4-taurochenodeoxycholic acid came from Santa Cruz Biotechnology; d4-chenodeoxycholic, d4-lithocholic, d4-cholic, d4-ursodeoxycholic, and d4-deoxycholic acid from Sigma-Aldrich. Ammonium acetate and formic acid (both LC-MS grade) were purchased from Sigma-Aldrich; acetonitrile (LiChrosolv, isocratic grade) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany); methanol (LC-MS grade) from Biosolve BV (Valkenswaard, The Netherlands).

### 2.2. Experimental animals

Male Wistar rats weighing 250 g  $\pm$  20 g were obtained from Velaz (Prague). The rats were housed under controlled environmental conditions with free access to food and water. All experiments were approved and supervised by the institutional Animal Research Committee.

Animals were randomized into two groups (7 animals per group): control rats were fed a standard chow diet (Cat. No. C1000, Altromin, Germany), while the other group was fed for three weeks an ID diet (containing 5.155 mg/kg Fe; Cat. No. C1038, Altromin, Germany), as described previously [15]. The animals were pair fed, and no differences in food intake were detected between groups. All animals thereafter underwent a bile collection study.

### 2.3. Bile collection study

Evaluation of bile flow was performed after overnight fasting. In brief, under general anesthesia induced by intraperitoneal administration of sodium pentobarbital (50 mg/kg), rats were fixed in a supine position on a heated platform to maintain body temperature at 37 °C, and carotid artery (for blood sampling), jugular vein (for saline administration), and bile duct (for bile collection) were cannulated. The study was then started by initiation of continuous intravenous infusion of saline (6 mL/kg/h) to replace fluid loss by sampling and by perspiration. Bile was collected in pre-weight tubes over 30 min. At the end of the experiment, the rats were sacrificed by exsanguination, tissues were harvested, weighed and all samples were snap frozen and stored at –80 °C until analysis.

### 2.4. In vivo clearance of <sup>3</sup>H taurocholate

To confirm the effect of ID on bile production and to distinguish between BA synthetic and excretory processes, we repeated the bile collection study in another set of control and ID animals but with infusion of radiolabeled taurocholate. After three weeks of an ID diet, the animals were anesthetized and prepared identically as described above. Samples of bile and plasma were taken over 120 min in a 30 min intervals. The animals initially received an intravenous loading dose of 12 nmol/kg of unlabeled taurocholic acid together with 1.2  $\mu$ Ci/kg of <sup>3</sup>H-taurocholate over 10 min. The loading dose was then followed by continuous intravenous infusion of 100 nmol/h/kg of unlabeled taurocholic acid, and 10  $\mu$ Ci/h/kg of <sup>3</sup>H-taurocholate. The administered fluids contained stable ratios of <sup>3</sup>H-labeled and unlabeled taurocholic acid to enable calculation of biliary kinetic parameters of taurocholate. The dosage schedule was calculated on the basis of the parameters presented by Iwanaga et al. [17] in order to reach steady state plasma concentrations.

### 2.5. Biochemical analyses

The serum concentrations of glucose, triacylglycerols (TAG), cholesterol, bilirubin and iron, and the activities of AST and ALT in serum were measured by routine laboratory methods using the Modular PP analyzer (Roche, Basel, Switzerland). Commercial kits were used for analysis of phospholipids (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Cat. No. MAK049), and cholesterol (Cayman Chemical, Michigan, USA, Cat. No. 10007640). Concentrations of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were analyzed separately using a validated HPLC method with fluorescence detection, as described previously [18]. During liquid scintillation counting, samples of plasma (25  $\mu$ L), and bile (5  $\mu$ L) were mixed with 5 mL of Ecolite scintillation cocktail, kept for 3 h in the dark (to lose background luminescence), and analyzed on Tri-Carb (Canberra Packard) according to the manufacturer's instructions. Hematological parameters were measured immediately after blood sampling on Sysmex XE-2100 analyzer (Sysmex, Kobe, Japan) as recommended by the manufacturer. The hepatic iron content was determined using atomic absorbance spectroscopy by a method modified by Evenson [19]. The cholesterol saturation index (CSI) in bile was calculated as a ratio of actual molar percentage of cholesterol in bile to maximum soluble molar percentage of cholesterol at given concentrations of bile acids and phospholipids [20]. Maximum solubility of cholesterol was calculated as described previously [21].



## 2.6. LC-MS analysis of bile acids

Fifty microliter of plasma were precipitated by 160µL of acetonitrile (containing a mixture of deuterium-labeled standards), vortex mixed and centrifuged at 15,000g for 10 min (room temperature). The supernatant was dried at 60 °C under nitrogen, then dissolved in 50µL of 40% methanol, and incubated for 1 h at -20 °C. After 10 min centrifugation at 15,000g (10 °C), 10µL of supernatant was analyzed using LC-MS. Bile samples were diluted 500 × with distilled water, further processing was identical to that of plasma. The sample was separated on a HPLC system (Dionex Ultimate 3000, Dionex Softron GmbH, Germany) equipped with a Pinnacle DB C18 column (100 × 2.1 mm, 3µm, Restek, USA) and appropriate guard column. The mobile phase consisted of water, methanol, ammonium acetate, and formic acid; flow rate was 0.3 mL/min, with the column chamber set to 55 °C. Ammonium acetate and formic acid concentrations at all times were kept at 0.005 M and 0.012% (v/v), respectively, with methanol concentrations (v/v) as follows: 0–2.5 min 40%; 2.5–3.5 min 40–57%; 3.5–9.5 min 57–59%; 9.5–10.0 min 59–70%; 10.0–14.0 min 70–72%; 14.0–16.0 min 72–76%. Then, the column was washed with 95% methanol for 9 min and equilibrated with 40% methanol for 5 min (ammonium acetate and formic acid were present in both steps). BA were detected on a triple quadrupole mass spectrometer (TSQ Quantum Access Max with H-ESI II probe, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) operating in SRM mode. Monitored transitions were 375.3→375.3 for monohydroxy, 391.3→391.3 for dihydroxy, and 407.3→407.3 for trihydroxy BA. Glycine-conjugated mono, di, and trihydroxy BA were monitored as 432.3→432.3 (432.3→74.1), 448.3→448.3 (448.3→74.1), and 464.3→464.3 (464.3→74.1), respectively. Taurine-conjugated mono, di, and trihydroxy BA were monitored as 482.3→482.3 (482.3→124.1), 498.3→498.3 (498.3→124.1), and 514.3→514.3 (514.3→124.1), respectively. Internal standards contained 4–5 deuterium atoms, increasing them *z* by 4–5. All transitions were monitored from 1 to 18 min to enable the unspecific detection of other bile acids not included in the standard mixture. Tauro- $\alpha$ -muricholic and tauro- $\beta$ -muricholic acids were not sufficiently separated, thus the mixed peak was integrated together. Furthermore, we calculated the CA/CDCA ratio in bile to characterize activity of CYP8B1, the rate limiting enzyme in classic pathway of BA synthesis [22]. Because CA and CDCA were below detection limit in bile of our animals, we have calculated the ratio from taurine conjugated forms TCA/TCDCa.

## 2.7. Quantitative real time RT-PCR

Gene expression analysis was performed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) on the 7500 HT Fast Real-Time PCR System Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA). RNA was isolated from liver tissue (20–30 mg per sample) and from ileum tissue (30–40 mg per sample) using TRI reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The isolated RNA was converted into cDNA via a High Capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies). Ten nanograms of cDNA was loaded into each reaction, all performed in duplicate. The amplifications were run using a TaqMan Fast Universal PCR Master Mix and pre-designed Taq-Man Gene Expression Assay kits (Life Technologies). *Gapdh* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) or *RLPO* genes were used as a reference for normalizing data (Life Technologies) from rat tissues and human cells, respectively. The relative expression ratio was then calculated from Ct as previously described [18].

## 2.8. Cell culture studies and DNA constructs

Cryopreserved HepaRG™ (GIBCO®) cells and media were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). HepaRG cell line was cultured in William's Medium E (WME) containing 10% FBS, 1% glutamine, 1% Pen/Strep, 5µg/µL insulin, and 50µM hydrocortisone

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The original concentration of iron in WME was 0.25µM. For induction of differentiation, a two-step protocol was used as previously described [23,24]. The HepaRG cells were seeded at low density ( $2.6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and maintained in culture medium for two weeks. The cells were thereafter incubated in the same culture medium with the addition of 1.5% DMSO (necessary for differentiation of HepaRG cells) for another two weeks. The HepaRG cells were then treated with ammonium iron(III) citrate (Sigma-Aldrich) at different concentrations (1 and 10µM), and iron chelating agents deferoxamine and deferasirox (10µM). After 24 h, the cells were washed with PBS, lysed in TRI-reagent for isolation of total RNA, which was further reverse transcribed and analyzed by qRT-PCR. The *RLPO* gene was used as a reference for normalizing data (Life Technologies). During Western blotting, cells were lysed in RIPA lysis buffer with protease and phosphatase inhibitors (Roche) after 48 treatment with ammonium iron(III) citrate (1 and 10µM).

A human Caucasian hepatoblastoma (HepG2) cell line was purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% FBS supplemented with 1% non-essential amino acids. The transient transfection luciferase reporter gene assays were carried out using a Lipofectamine 3000 reagent (ThermoFisher Scientific) as we have described in previous studies [25]. In brief, the HepG2 cells were seeded into 48-well plates and transfected with the CYP7A1-luc promoter (-1887/+24) luciferase reporter construct (150 ng/well) [26], the expression plasmids for FXR, PXR or LXR $\alpha$  (100 ng/well) and the *Renilla reniformis* luciferase transfection control plasmid (pRL-TK) (30 ng/well) after 24 h, following which the cells were treated with the iron chelating agents deferoxamine or deferasirox (10µM), chenodeoxycholic acid (a FXR ligand, 20µM), rifampicin (10 M, a ligand of PXR), GW3965 (20 M, a LXR $\alpha$  ligand) or DMSO (0.1%) as a vehicle control for additional 24 or 48 h. After this treatment, the cells were lysed and luciferase activity was measured with the Dual Luciferase Assay Kit (Promega, Hercules, CA). The data are expressed as the fold change in firefly luciferase activity normalized to *Renilla* luciferase activity in each sample relative to the vehicle (DMSO 0.1%)-treated controls, which were normalized to one. All the gene reporter assays were performed in antibiotic-free medium.

The expression plasmids for the human PXR receptor pSG5-hPXR, pSG5-FXR and pSG5-LXR $\alpha$  were kindly provided by Dr. S. Kliewer (University of Texas, Dallas, TX, USA) and Dr. Makoto Makishima (Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan). CYP7A1-luc promoter (-1887/+24) luciferase reporter construct was generated as previously described [26], and kindly donated by Dr. J. Chiang (Northeastern Ohio Universities College of Medicine).

## 2.9. Western blot

The method was performed as described previously [3]. Briefly, the liver samples (200 mg) were homogenized in an ice-cold buffer (1 mL; 25 mM TRIS-HCl, pH = 7.6, 0.1% (w/w) TRITON-X, containing 0.5µg/mL benzamide) using MagNA Lyser (Roche Diagnostics GmbH, Germany) 2 × 30 s at 6000 rpm. Supernatants obtained after 10,000g centrifugation at 4 °C for 10 min were centrifuged at 100,000g at 4 °C for 20 min. Pellets were re-suspended in a buffer containing 50 mM HEPES (pH = 7.4), 0.1 KCl, 3 mM MgCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, and protease inhibitors (aprotinin, leptin, benzamide). Whole cell lysate was prepared from HepaRG cells by direct homogenization in a Sample buffer. Homogenates were separated by SDS-PAGE on 6.25% or 10% polyacrylamide gels and then transferred to a PVDF membrane, which was blocked for 1 h with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBS-T), and then incubated with primary antibodies for 1 h in concentrations ranging 1:500–1:5000. The membrane was washed four times with TBS-T, and incubated with secondary antibodies for 1 h. The visualization was performed with SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (ThermoFisher). The



immunoreactive bands on X-ray films were scanned with a densitometer ScanMaker i900 (UMAX, Prague, Czech Republic), and semi-quantified using the Quantity One imaging software (Bio-Rad). The expression of proteins was normalized to the expression of two loading controls, Gapdh, and  $\beta$ -actin.

### 2.10. Immunohistochemistry of *Mdr2* and *Bsep* in the liver

Serial cross-sections (7  $\mu$ m) of liver median lobe taken from Wistar rats were cut on a cryostat and placed on gelatin-coated slides. Five slides from each animal and from each group were taken for immunohistochemical analysis. Before antigen detection, the slides were incubated with anti-avidin and anti-biotin solutions (Vector Laboratories, USA). Thereafter the slides were incubated with primary antibodies and after that with goat anti-rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, USA) (diluted 1:100 in BSA) and ExtraAvidin red fluorochrome CY3 (Sigma Chemical, USA) (diluted 1:300 in BSA) for the detection of either *Mdr2* or *Bsep*. For nuclear counterstaining the blue-fluorescent DAPI nucleic acid stain (Invitrogen, Czech Republic) was used. Staining with nonimmune isotype-matched immunoglobulins assessed the specificity of the immunostaining. Primary antibodies, including rabbit polyclonal antibodies anti-*Mdr2* (dilution 1:50, 1 h at RT) and anti-ABC11 (*Bsep*, dilution 1:50, 1 h at RT), were purchased from Termo Scientific (USA). Photo documentation and image digitizing from the microscope were performed with the Olympus AX 70, with a digital VDS Vosskühler (GmbH, Germany) using image analysis software NIS (Laboratory Imaging, Czech Republic).

### 2.11. Data analysis

The kinetics of the biliary elimination of BA, glutathione, and  $^3$ H-taurocholate were calculated from concentrations analyses of these compounds in plasma and bile, assuming first-order kinetics. Biliary secretion was calculated by multiplying bileflow in specific intervals with the biliary concentration of tested compounds measured in that interval. Biliary clearance ( $CL_{\text{Bile}}$ ) was calculated by dividing the biliary excretion (BE) value by the plasma concentration of a specified compound, measured in the plasma sample taken in the middle of a collection period. Data are presented as means  $\pm$  SDs. Measured in the iron-deprived rats and the corresponding control group, the statistical significance of differences between the means of each parameter was evaluated by an unpaired *t*-test or One-way ANOVA with a Newman-Keuls post-hoc test. Time-dependent changes in cumulative biliary secretions of compounds between control and ID animals were evaluated by Two-way ANOVA with a Dunn post-hoc test. A difference of  $p < 0.05$  was considered significant. Data analysis was performed by GraphPad Prism 6.0 software (San Diego, USA).

## 3. Results

### 3.1. ID by diet modifies biochemical and hematological parameters

The induction of iron depletion in animals was verified by reduced serum concentrations of iron (Table 1), reduced liver content of iron, and by reduced hematocrit and hemoglobin concentrations during hematological examination (Table 1). Reduced iron disposition in the liver was further supported by the downregulated mRNA expression of hepcidin (*Hamp*) ( $100 \pm 7.1\%$  vs.  $0.6 \pm 0.2\%$  in control and ID rats, respectively;  $p < 0.001$ ). These changes accompanied the reduction in cholesterol concentrations in serum (Table 1). Liver cholesterol content was not significantly changed in the iron-depleted animals in comparison to control animals ( $5.5 \pm 0.6 \mu\text{mol/g}$  vs.  $6.4 \pm 0.8 \mu\text{mol/g}$  in control and ID rats, respectively).

**Table 1**

The effect of iron depletion on hepatic iron concentrations and on serum biochemical and hematological parameters.

Parameter	Chow diet	Iron depletion
<b>Liver</b>		
Fe ( $\mu\text{mol/g}$ tissue)	464 $\pm$ 131	227 $\pm$ 69**
<b>Serum</b>		
Fe ( $\mu\text{mol/L}$ )	21 $\pm$ 1.8	15 $\pm$ 0.7**
ALT ( $\mu\text{kat/L}$ )	0.7 $\pm$ 0.06	1.2 $\pm$ 0.2
AST ( $\mu\text{kat/L}$ )	2.6 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 0.8*
Cholesterol (mmol/L)	1.8 $\pm$ 0.06	1.4 $\pm$ 0.09**
TAG (mmol/L)	0.9 $\pm$ 0.76	0.15 $\pm$ 0.03
Erythrocytes ( $10^{12}/\text{L}$ )	8.9 $\pm$ 0.15	8.8 $\pm$ 0.15
Hemoglobin (g/L)	166 $\pm$ 2.5	146 $\pm$ 3.1***
Hematocrit	0.48 $\pm$ 0.007	0.42 $\pm$ 0.008**
WBC count ( $10^9/\text{L}$ )	6.4 $\pm$ 0.5	6.1 $\pm$ 0.6
Neutrophils (proportion)	0.18 $\pm$ 0.003	0.09 $\pm$ 0.03

Data are means  $\pm$  SD ( $n = 7$  in each group); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to controls.

### 3.2. Choleretic effect of ID

The body weight of the animals was reduced ( $p < 0.01$ ) by diet from  $0.48 \pm 0.03$  kg in control animals to  $0.44 \pm 0.02$  kg in the ID rats. The calculation of biliary secretion parameters was therefore related to liver weights, which were not significantly different between groups ( $18.4 \pm 1.1$  g vs.  $19.3 \pm 1.9$  g in control and ID rats, respectively). Reduced iron in the diet led to a significant increase in bileflow (Fig. 1A) accompanied with an increase in biliary secretion of both major bile osmotic constituents, total BA (calculated as sum of all bile acids quantified by LC-MS), and glutathione (Fig. 1B, C). The biliary secretion of cholesterol and phospholipids was also elevated in the ID animals (Fig. 1D, E). However, these changes did not induce statistically significant change in the CSI of bile (Fig. 1F).

Furthermore, ID increased the liver content of reduced glutathione and decreased its oxidized form, leading to a significant increase in net concentration of glutathione as well as in the tissue reduced/oxidized glutathione ratio (Fig. 2A–D).

### 3.3. Biliary secretion of administered $^3$ H-taurocholate was not changed in the ID animals

Next, we performed the clearance study with an infusion of radiolabeled and unlabeled taurocholic acid to elucidate whether ID affects mainly hepatic BA production or BA transport. The ID diet also increased cumulative bile production in this set of animals (Fig. 3A). Steady state plasma concentrations of taurocholate were attained using the suggested dosage schedule within 45 min (Fig. 3B), and biliary clearance remained stable throughout the entire period (Fig. 3C). Neither of these parameters was changed by ID diet. Similarly, cumulative biliary excretion of administered  $^3$ H-taurocholic acid was identical between the control and ID animals (Fig. 3D). These data suggest that ID does not stimulate bile production by upregulation of canalicular BA transporter capacities.

### 3.4. ID increases gene expression of molecules involved in bile production

In order to identify mechanisms behind the observed choleretic and metabolic effects of ID, we studied the mRNA expression of relevant liver and ileal enzymes, transporters along with selected transcriptional factors (Fig. 4). As compared to the control chow diet-fed animals, analysis of 30 different mRNAs in liver samples from ID animals revealed significantly increased hepatic gene expressions of the enzymes involved in BA synthesis (*Cyp7a1*, *Cyp8b1*), biliary phospholipid (*Acb4*), and cholesterol secretion (*Acb5/8*), and biliary lipid metabolism (*Srebf1*, sterol regulatory element-binding transcription factor 1,

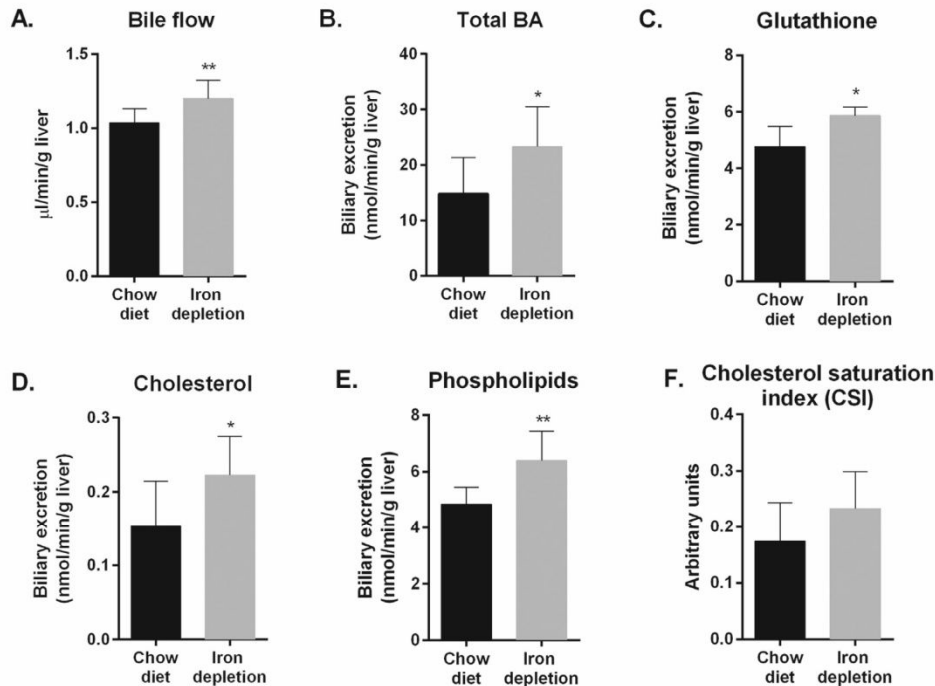


Fig. 1. Bile production, biliary secretion of bile acids, glutathione, cholesterol and phospholipids, along with cholesterol saturation index in the control (chow diet) and iron depleted rats. Measurement was performed in bile samples collected over 30 min in the chow diet or iron depleted diet animal groups. Values represent means  $\pm$  SD from groups of 7 animals. Asterisks indicate significance in the iron deprived rats compared to corresponding controls (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

and *Nr0b2/Shp*, a small heterodimer partner), and decreased mRNA expressions of *Abca1* (cholesterol efflux regulatory protein), and *Slc4a2* (anion exchanger 2) (Fig. 4A–D). Furthermore, we analyzed the mRNA expression of molecules involved in the reabsorption of BA in the ileum and we detected downregulation of *Osta*/ $\beta$ , a heterodimeric transporter for reabsorption of BA, and marked upregulation of *Nr0b2* (Fig. 4E). We did not see any effect of ID on the expression of genes involved in the inflammatory process (Fig. 1 Supplementary material).

### 3.5. ID up-regulates enzymes and transporters responsible for cholesterol processing in the liver

Western blot analysis of selected hepatic proteins responsible for bile formation showed that, compared to controls on a chow diet, the ID animals demonstrate up-regulation of the *Cyp7a1* enzyme (rate limiting for BA synthesis from cholesterol), *Cyp8b1* enzyme (an important enzyme in the classic pathway of BA synthesis), *Cyp27a1* enzyme (an important enzyme in the alternative pathway of BA synthesis), *Abcg5/8* transporters (major canalicular transporters for cholesterol), and *LXR $\alpha$*  receptor (liver X receptor), respectively (Fig. 5A). The major basolateral uptake transporters for bile acids and drugs, *Ntcp* (sodium-taurocholate co-transporting polypeptide), and *Oatp1a1/Oatp1a4* (Organic anion-transporting polypeptide) were also upregulated (Fig. 5B). On the other hand, ID reduced protein expression of the basolateral uptake/efflux transporters for cholesterol, *Ldl-receptor*, *Sr-b1* (Scavenger receptor b1), and *Abca1*, and also the expression of the major apical transporter for biliary secretion of phosphatidylcholine, *Mdr2* (Multidrug resistance protein 2) (Fig. 5A/C). *Bsep* (bile salt export pump), the rate-limiting transporters for biliary excretion of BA, was unaffected in the ID rats, which was in agreement with the unchanged biliary excretion of  $^3\text{H}$ -taurocholate (Fig. 3C). Similarly, *Mrp2* (multidrug resistance-associated protein 2) protein expression was also unchanged in the ID rats (Fig. 5),

and this effect contrasted with increased biliary secretion of glutathione (Fig. 1C).

In order to corroborate these results, *Mdr2* and *Bsep* localization was further studied through immunohistochemistry to compare distribution of these proteins at the canalicular membranes and sub-membraneous space of hepatocytes. Fluorescence staining in the liver confirmed strong expression of both *Mdr2* and *Bsep* at the canalicular membranes of hepatocytes in all liver samples (Fig. 6). No changes in either the intensity or localization of expression for both *Mdr2* and *Bsep* were detected between studied groups (Fig. 6A–D), which excluded the contribution of increased membrane density of these proteins to elevated biliary excretion of BA, and phospholipids, respectively.

### 3.6. LC-MS detection of bile acids in plasma and bile

In other experiments, we determined whether ID have an effect on BA in plasma and bile. Using a LC-MS method we were able to determine 24 unconjugated and conjugated bile acids in plasma and bile. The total BA concentration was calculated as a sum of concentrations of individual BA. ID reduced total BA concentrations in plasma (Fig. 7A), and increased total BA concentrations in bile (Fig. 7B). A majority of individual BA were found at concentrations below the limit of method quantification (0.02  $\mu\text{M}$ ). Thus, we were finally able to accurately quantify 9 BA in plasma and 8 BA in bile. In our experiments, diet-induced ID produced significant reduction in plasma concentrations of tauro-chenodeoxycholic, hyodeoxycholic,  $\beta$ -muricholic, and cholic acids, while concentrations of tauro-ursodeoxycholic acid were increased (Fig. 7A). Biliary concentrations of BA also showed a reduction in tauro-chenodeoxycholic and cholic acid. However, in accordance with increased *Cyp8b1* expression, biliary CA/CDCA ratio increased from  $6.8 \pm 1.9$  in control rats to  $36.2 \pm 16.1$  ( $p < 0.001$ ) in iron depleted rats. Importantly, we detected markedly increased concentrations of tauro- $\alpha/\beta$ -muricholic acids in bile of ID rats (Fig. 7B).



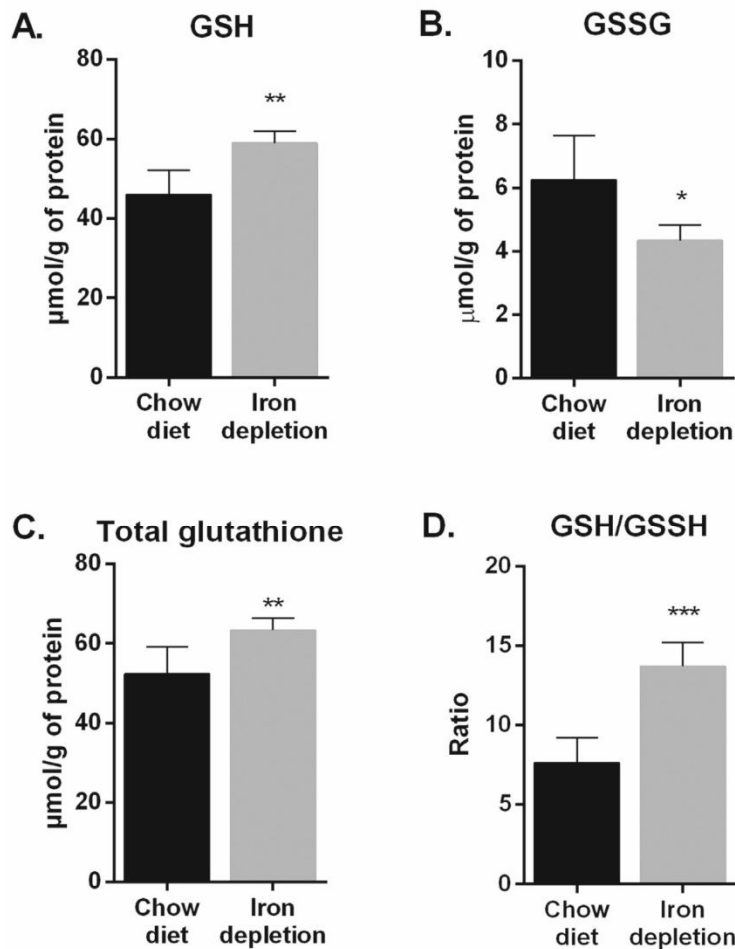


Fig. 2. The effect of iron depletion on the liver concentrations of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione. For three weeks the animals received either a chow or iron deficient diet. Values are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n=7$  in each group); significantly different from the control group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Changes in biliary excretion of individual BA followed the changes in biliary concentrations, and we detected a marked increase in the excretion of tauro- $\alpha/\beta$ -muricholic acids, as well as a reduced excretion of cholic and tauro-chenodeoxycholic acid in the ID animals (Fig. 7C). These data point to a significant role of iron in the regulation of BA synthesis in rats.

### 3.7. Low concentrations of iron induces CYP7A1 mRNA in human HepaRG cells and iron chelators stimulate CYP7A1 transactivation in HepG2 cells

To compare the animal results with the human cellular models, an in vitro study was conducted with a differentiated HepaRG cell line, a widely-accepted cellular model of normal human differentiated hepatocytes. ID was simulated in HepaRG cells by iron concentration of  $1\mu\text{M}$  in medium, whereas a concentration of  $10\mu\text{M}$  in medium was used to mimic normal plasma iron concentration. Higher iron concentration in the medium led to suppression of CYP7A1 mRNA expression when compared to iron depletion conditions ( $1\mu\text{M}$  of iron in media) (Fig. 8A). Thus, we can say that iron depletion in the medium significantly induces CYP7A1 mRNA expression. Increased transcription of the CYP7A1 gene by  $1\mu\text{M}$  of iron consequently increased expression of CYP7A1 protein (Fig. 8A). Upon examining the effect of iron on ABCG5 mRNA expression in HepaRG cells, we observed that the addition of iron to the medium increased the gene expression (Fig. 8A), but there was no difference between the effects of  $1\mu\text{M}$  and  $10\mu\text{M}$ .

In subsequent experiments performed on HepG2 cells, we used iron chelators to examine the effect of iron depletion on CYP7A1 and SHP (NR0B2) genes transactivation in the reporter gene experiments. We found significant stimulation of CYP7A1 (Fig. 8B, C) and SHP (Fig. 2S, Supplementary data) promoters after 24 or 48 h of treatment with deferoxamine and deferasirox at a  $10\mu\text{M}$  concentration. Chenodeoxycholic acid (CDCA), a farnesoid X receptor (FXR) ligand, and rifampicin, a pregnane X receptor (PXR) nuclear receptor ligand, both suppressed CYP7A1 gene transactivation, which is consistent with the roles of the nuclear receptors in CYP7A1 regulation [27].

Next, we cotransfected the HepG2 cells with the CYP7A1 promoter reporter gene construct and expression constructs for FXR, PXR and LXR receptors. We observed that cotransfection of cells with the expression construct for either FXR, PXR or LXR does not result in significant stimulation or down-regulation of CYP7A1 transactivation in the presence of iron chelators, even though coexpressed nuclear receptors significantly suppressed CYP7A1 reporter construct activation (Fig. 8C). Similarly, these nuclear receptors had no significant effect on SHP transactivation after treatment with iron chelators (Fig. 2S, Supplementary data). Iron depletion induced by iron chelators in these experiments had no effect on FXR, PXR or LXR transactivation (Fig. 2S, Supplementary data).

These data indicate that iron depletion can significantly augment CYP7A1 gene transactivation and that mRNA expression in human cellular models works independently from FXR, PXR and LXR nuclear

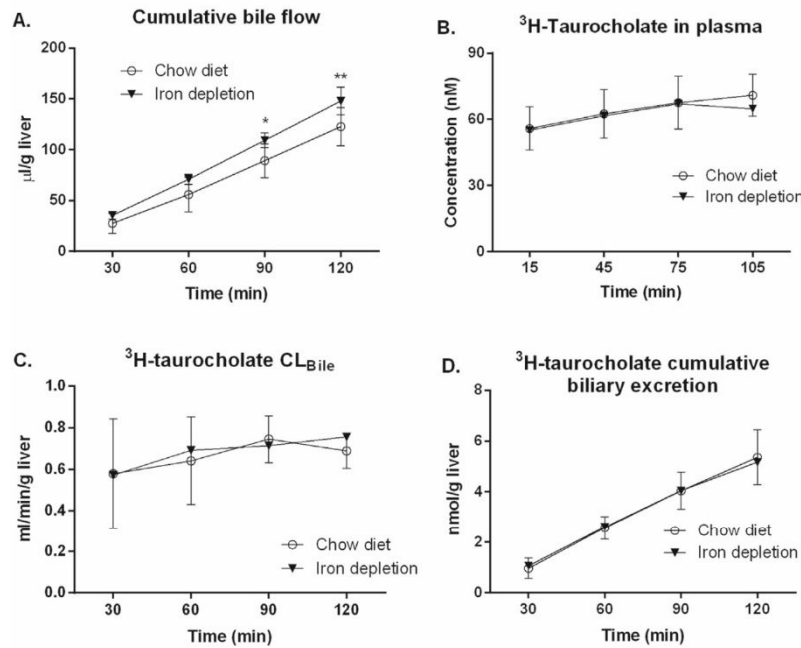


Fig. 3. Kinetics of biliary excretion of <sup>3</sup>H-labeled taurocholate in chow diet and iron deficient diet fed rats. Cumulative bile flow (A.), plasma concentrations of taurocholate (B.), taurocholate biliary clearance CL<sub>Bile</sub> (C.), and taurocholate cumulative biliary excretion (D.) were calculated. Values are expressed as mean ± SD (n = 7 in each group); significantly different from the control group (\*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

receptor expression and activation. This hypothesis is mainly based on the fact that HepG2 cells have a low endogenous activity of FXR, PXR and LXR $\alpha$ .

### 3.8. Changes in pERK and pJNK kinases

To further analyze mechanisms of ID-induced changes in BA synthesis, we focused on intracellular signaling. Phosphorylation of extracellular-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) is the second major pathway (besides nuclear receptor FXR and PXR) repressing *CYP7A1* gene transcription. Both kinases integrate the signaling from several receptors such as fibroblast growth factor receptor 4, epidermal growth factor receptor (EGFR) or insulin receptor (IR). Phosphorylated ERK and JNK inhibit transactivation of *CYP7A1/CYP8B1* genes by HNF4 $\alpha$  [28,29]. Therefore, we performed detection of pERK and pJNK in livers of iron depleted rats as well as in HepaRG cells treated with different concentrations of iron (Fig. 3S, Supplementary data). Although hepatic pERK was reduced in ID animals, which may support disinhibition of Cyp7a1, pJNK was induced by iron depletion. Experiments with HepaRG cells showed absence of any change in pERK or pJNK between low (1 $\mu$ M) and physiological concentrations (10 $\mu$ M) of iron. The patterns of changes in pERK and pJNK kinase indicates that they are not involved in observed upregulation of Cyp7a1/CYP7A1 during iron depletion.

## 4. Discussion

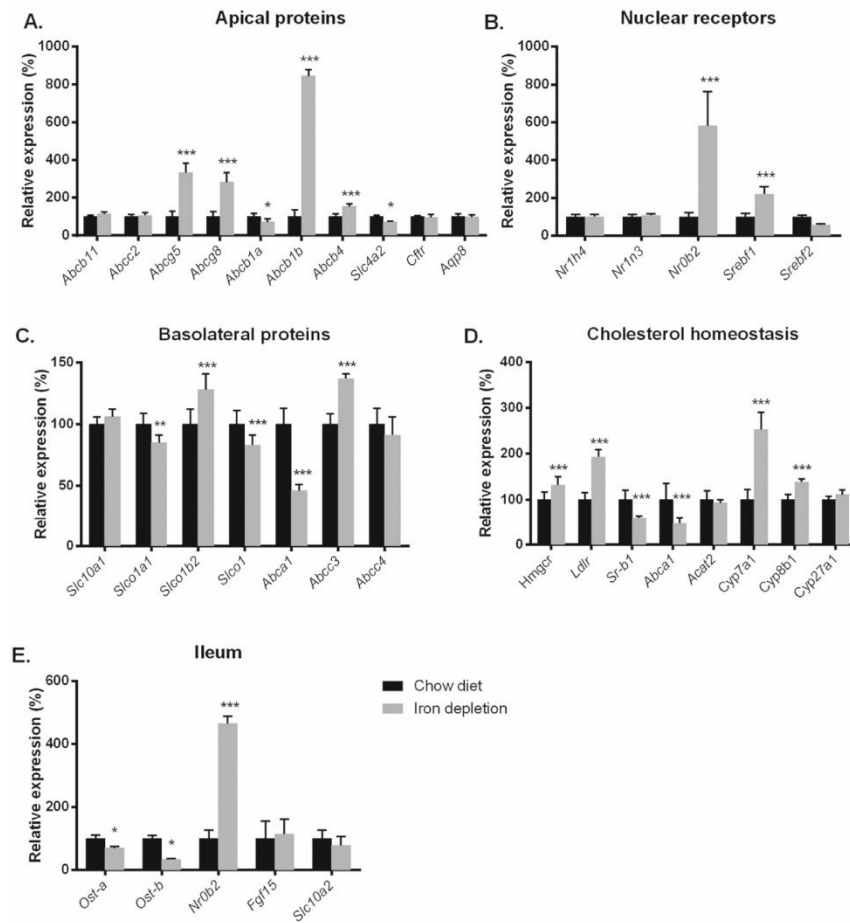
We describe herein the increased bileflow and augmented secretion of BA, cholesterol, glutathione and phospholipids in rats under ID conditions. We also observed that ID substantially changed the spectrum of BA in bile as well as decreased plasma concentrations of BA and cholesterol. In further mechanistic experiments, we found that out of 30 studied genes involved in bile acid formation and secretion, the *Cyp7a1* gene, encoding the rate-limiting enzyme converting cholesterol to BA; as well as the *Abcg5/8* cholesterol transporter, were consistently upregulated in ID rat livers. Experiments with differentiated human hepatic HepaRG cells confirmed the transcriptional activation of the human

*CYP7A1* promoter under ID conditions independent of FXR, PXR and LXR $\alpha$  receptor regulation. In contrast, neither the expression of BA transporters nor cellular localization was affected in the ID rats. These data thus provide important insights into our understanding of the serum cholesterol- and bile acid-lowering effects of iron depletion.

Iron is essential for oxygen transport and acts as a cofactor of numerous physiological and pathophysiological reactions [30]. Regarding the possible influence of ID on bile flow and the homeostasis of bile components, the most information is known about their effects on cholesterol levels. In general, ID tends to decrease serum cholesterol concentrations in humans and rats [31,32], but the mechanism is not entirely understood. Reduced serum levels of cholesterol in our animals with ID are thus consistent with these reports (Fig. 1D). We have identified two principal liver mechanisms responsible for this effect. First, ID increased biliary secretion of cholesterol by upregulated *Abcg5/8*, a canalicular transporter for cholesterol (Figs. 4, 5). This finding corresponds with the recent observation that a low serum level of iron is a predisposing factor for biliary supersaturation with cholesterol, leading to increased cholesterol gallstone formation in humans [33,34]. Although we have detected only a tendency toward an increased cholesterol saturation index in bile (Fig. 1F,  $p = 0.13$ ), information regarding the increased biliary secretion of cholesterol may become of further significance in humans. Unlike rats, in humans the presence of the gallbladder and the occurrence of diseases impairing its function enables the additional concentration of cholesterol in bile [35]. Moreover, hydrophilic BA such as ursodeoxycholic acid reduce cholesterol crystallization under pathophysiological conditions [36]. While increased concentration of most hydrophilic tauro- $\alpha/\beta$ -muri-cholic acid has been seen in iron-depleted rats, it may be assumed that the increased bile acid synthesis in iron-depleted humans results in different spectra of bile acids due to dominance of classic pathway of BA synthesis and prevalence of hydrophobic Bas, which may further support cholesterol gallstone formation.

The increased conversion of cholesterol to BA is the second mechanism which contributes to decreased plasma cholesterol concentration during ID, as suggested by Kamei et al. [15], who detected increased Cyp7a1 protein expression under these circumstances.





**Fig. 4.** The effect of ID on the liver and ileum mRNA expression of genes involved in bile production and BA homeostasis. Results are presented as relative expression (%) of the control chow diet group. Data are mean  $\pm$  SD ( $n = 7$  in each group); significantly different from the control group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

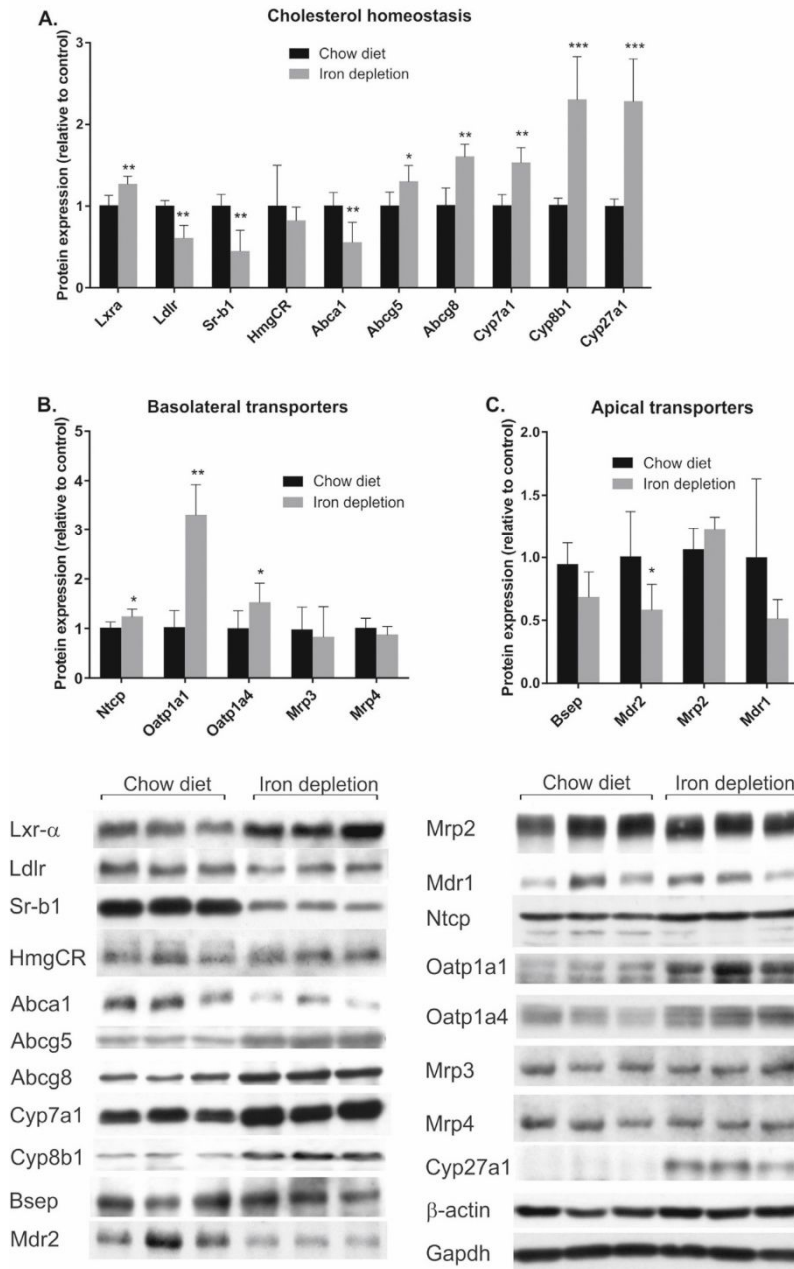
However, the absence of BA analysis in their study leaves the significance of this mechanism unresolved. We therefore focused on an analysis of the molecules responsible for BA metabolism in the liver, as well as on individual BA quantification. We confirmed the significant upregulation of Cyp7a1, but also Cyp8b1 and Cyp27a1. In agreement, the induction accompanied a marked increase in the biliary secretion of BA. The  $\alpha/\beta$ MCA was mainly responsible for this increase which complies with induced Cyp27a1, while increased biliary CA/CDCA ratio reflected upregulation of Cyp8b1. Together these data indicate complex induction of bile acid synthesis in iron depleted rats with Cyp7a1 being crucial as a rate limiting enzyme.

A previous study showed reduced hepatic content of cholesterol in rats with ID[15]. This may comply with the increased biliary secretion of cholesterol and its enhanced conversion to BAs. Moreover, the expression of the cholesterol uptake Ldl receptor as well as the Sr-b1 protein were also reduced in the liver of ID rats (Fig. 5). However, the disposition of cholesterol in the liver did not change in our ID rats. The unchanged expression of Hmg-CoA reductase suggests the unmodified synthesis of cholesterol. Thus, the only possible compensatory mechanism to be identified is the decreased expression of the cholesterol-exporting Abca1 protein (Fig. 5). This indicates that reduced cholesterol secretion from hepatocytes at the basolateral membrane compensates for increased cholesterol elimination, and may contribute to reduced plasma cholesterol levels during ID.

We performed an additional clearance study with an infusion of  $^3\text{H}$ -taurocholate to the ID rats (Fig. 3), a variable which omitted the

influence of endogenous BA synthesis, and thus only the function of the liver BA transporters was tested. Although bileflow was also increased in this subset of ID animals, the plasma concentrations and biliary secretion of  $^3\text{H}$ -taurocholate was unchanged, which suggests a negligible contribution of liver BA transporters to the observed increase in biliary excretion of total BA (Fig. 3). Furthermore, the increased expression of BA uptake proteins such as Ntcp and Oatps (Fig. 5), was not associated with increased biliary efflux of  $^3\text{H}$ -taurocholate, indicating that the uptake function of these proteins was compensated for by the bidirectional movement of  $^3\text{H}$ -taurocholate through the basolateral membrane. Collectively, these data suggest that increased liver synthesis, and consequently the disposition of BA, is the major determinant causing the stimulation of bile acid-dependent bileflow. Additionally, maintenance (Slc10a2 mRNA and the coded Asbt protein—unpublished observation) or even reduction in the ileal (Ost mRNA) (Fig. 4) transporters responsible for BA absorption indicates that the intestine may contribute to the lowering effect of ID on plasma concentrations of BA. These data also present certain possible mechanisms of mitigation of cholestatic liver injury by ID as presented in previous studies [13,14,37].

The increased biliary concentrations of BA in the ID animals was followed by increased secretion of phospholipids (Fig. 1B and E). This observation complies with depressed serum phospholipid level previously seen during moderate ID[32]. However, we detected the down-regulation of Mdr2, the flippase translocating phospholipids from the inner to outer leaflet of the canalicular membrane (Fig. 5C), despite the



**Fig. 5.** Western blot analysis of the liver proteins involved in bile production and secretion in rats. For three weeks the animals received either a chow or iron deficient diet. Results are presented as the relative expression (%) of the control chow diet group. Data are mean  $\pm$  SD ( $n = 7$  in each group); significantly different from the control group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

induction of the *Abcb4* mRNA of the Mdr2. Increased *Abcb4* mRNA was also previously presented by Kamei et al. [15]. Reason for discrepancy between mRNA and protein expression of Mdr2 is unknown. However, these findings suggest that the increased biliary secretion of phospholipids in the ID animals may be ascribed to an increased biliary secretion of BA which extracts phospholipids from the canalicular membrane to bile [38]. An analogous situation has been seen in Bsep-overexpressing mice with markedly increased biliary secretion of BA and phospholipids without a change in *Abcb4* expression [39].

An increase in BA independent bileflow by ID was also observed in this study (Fig. 1C). Cholagogues increasing bileflow through this mechanism usually up-regulate Mrp2, the key transporter for anionic

compounds at the canalicular membrane, as well as promote the biliary excretion of glutathione [40]. ID in this study did not change Mrp2 expression (Figs. 5C, 6C, D), but increased the disposition of reduced GSH for biliary transport. Among other functions, GSH represents a part of the essential defense mechanism of the liver against oxidative injury by means of the direct scavenging of hydroxyl radicals and superoxide. The GSH/GSSG ratio is generally used as an indicator of oxidative stress within tissues [41]. Accumulation of iron in tissues is a known factor for free radical generation by the Fenton reaction [30]. In agreement with this concept, it was assumed that the reduction of hepatic iron by ID diet in animals led to the reduced oxidation of GSH due to reduced free radical formation with consequently increased disposition and



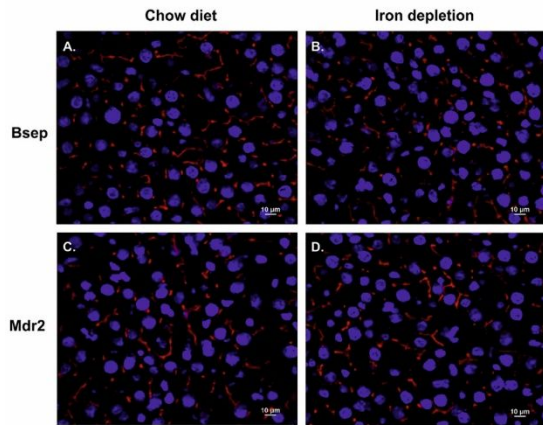
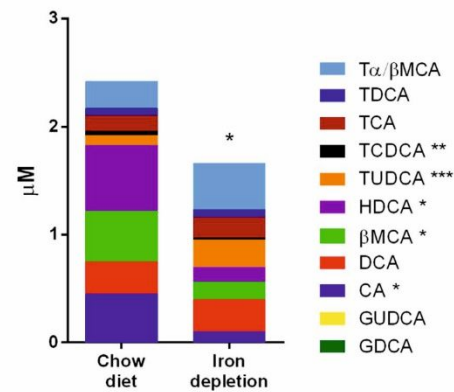


Fig. 6. Immunohistochemistry of Bsep and Mdr2 in the liver of chow diet and ID diet fed rats. The images show immunodetection of Bsep (A, B) and Mdr2 (C, D) in the control chow diet (A, C) and ID (B, D) rats. There was no significant change in localization or intensity between the control and ID rats. Pictures are representative images of five analyses in each animal ( $n = 7$  in each group).

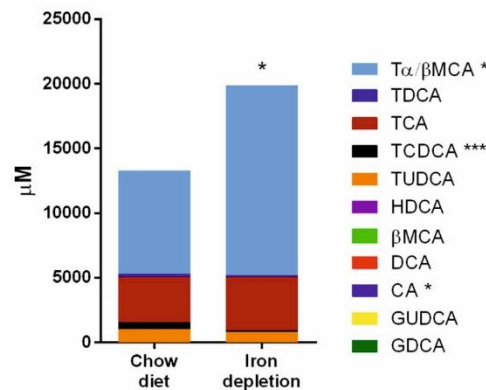
increased biliary secretion of GSH. Additionally, pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  may inhibit the formation of bile secretion by reducing the expression of both basolateral and canalicular transport proteins [1]. Since iron depletion may reduce some of these cytokines during inflammation [42], we also analyzed the transcription of the major molecules involved in acute and chronic liver response (Fig. 1 Supplementary data). ID in animals had no impact on inflammatory markers, which suggests that these pathways are not responsible for the observed effect of ID in the liver.

The induced gene expression of *Abcg5/8*, *Abcb4*, *Abcc3*, *Nr0b2* (*Shp*), *Cyp7a1*, *Cyp8b1*, and *Srebf1* (Figs. 4, 5) suggests the involvement and activation of a regulatory nuclear receptor under ID conditions. FXR and LXR $\alpha$  are the major receptors regulating these genes [43]. Gene expressions of *Bsep* and *Shp*, typical target genes for FXR, were differentially modulated; the first was unchanged and the second markedly up-regulated. The same situation occurred in the ileum, where other typical FXR target genes, such as *Ost1*, were even downregulated (Fig. 4). We may therefore anticipate that FXR receptor activation plays only a minor role in the observed effect of ID. On the other hand, *Nr0b2* (*Shp*) may also be induced by LXR $\alpha$  stimulation [44]. Up-regulation of other genes regulated mainly by this receptor such as *Cyp7a1*, *Abcg5/8* and *Srebf1* strongly suggests that ID promotes LXR $\alpha$  signaling in rats. In this study the increased protein expression of the LXR $\alpha$  receptor without any change in its mRNA points toward post-transcriptional modulation of LXR $\alpha$  expression (Figs. 4, 5). Because doubts have risen regarding the ability of LXR $\alpha$  to transactivate human *CYP7A1* [45], we performed mechanistic experiments in differentiated human HepaRG cells and in HepG2 cells expressing exogenous LXR $\alpha$  together with the *CYP7A1* promoter luciferase construct; GW3965, a potent synthetic ligand of LXR $\alpha$ , was used in these experiments (Fig. 8). We confirmed that iron depletion induces *CYP7A1* mRNA expression and stimulates transactivation of the *CYP7A1* gene (Fig. 8A, B, C). Coexpression of either LXR, FXR or PXR in the HepG2 cells displayed a suppressive effect on the *CYP7A1* promoter construct, and GW3965 had no effect on *CYP7A1* promoter activation in the absence or presence of LXR $\alpha$ . The FXR and PXR ligands CDCA and rifampicin had a suppressive effect on *CYP7A1* promoter transactivation (Fig. 8C), which is in agreement with the reported roles of these receptors in *CYP7A1* regulation [27]. In other experiments, we incubated HepaRG cells with a LXR inverse agonist (SR9238) and antagonist (TFCA) at 10  $\mu$ M concentration. However, no obvious induction of *CYP7A1* mRNA

### A. Concentrations in plasma



### B. Concentrations in bile



### C. Biliary excretion

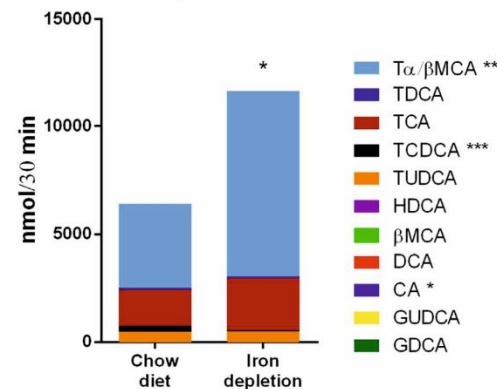
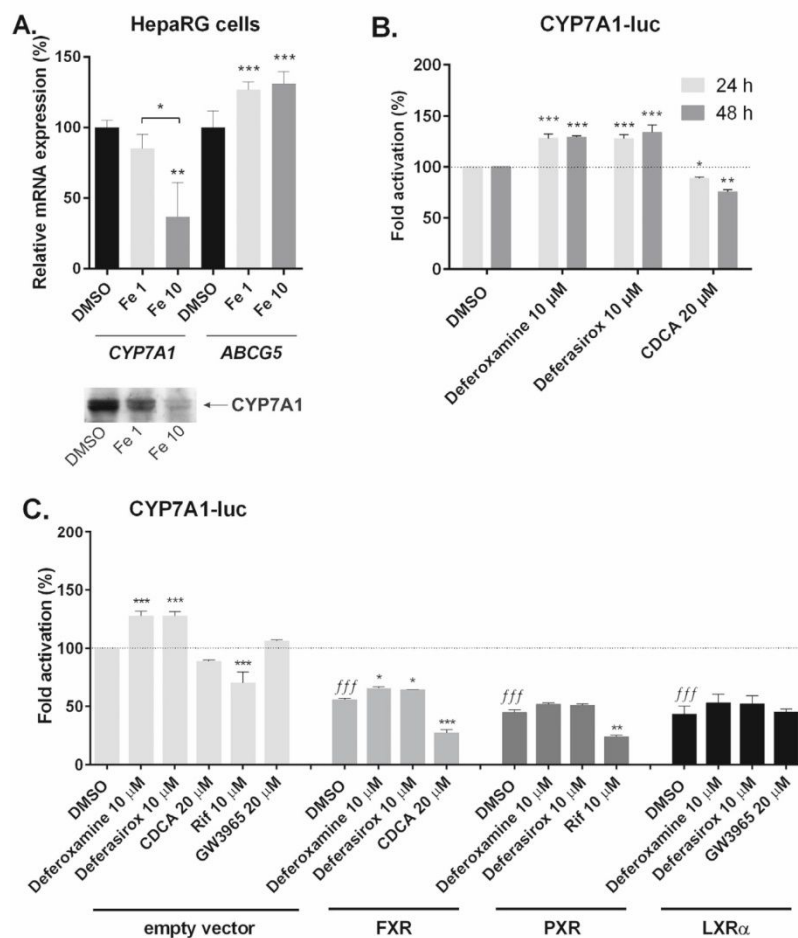


Fig. 7. Influence of iron depletion on plasma and biliary concentrations and biliary excretion of individual BA in rats. Total BA concentration was calculated as a sum of individual BA quantified in the sample. LC-MS measurements were performed in bile collected over 30 min and in plasma samples taken mid-interval. Values are means  $\pm$  SD ( $n = 7$  per group); asterisks indicate a significant difference between the control and ID group (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).



**Fig. 8.** The effect of iron depletion on the expression of *CYP7A1* and *ABCG5* genes mRNA in HepaRG cells and on *CYP7A1* transactivation in reporter gene assays in HepG2 cells. (A.) HepaRG cells were incubated either with vehicle (0.5% dimethyl sulfoxide), ammonium iron(III) citrate (Fe concentrations of 1 and 10  $\mu$ M) for 48 h. Cells were then lysed, and an RT-PCR assay was performed to analyze *CYP7A1* and *ABCG5* mRNA expression. Another set of cells was lysed in sample buffer and the *CYP7A1* protein analyzed by Western blot. (B.) HepG2 cells were transfected with the *CYP7A1* luciferase gene reporter construct and the cells were treated with deferoxamine, deferasirox (both 10  $\mu$ M) or chenodeoxycholic acid (CDCA, an FXR ligand) for 24 or 48 h. (C.) HepG2 cells were transfected with the *CYP7A1* luciferase reporter gene construct together with the expression constructs for human FXR, PXR and LXR $\alpha$ . Cells were treated with deferoxamine, deferasirox (both 10  $\mu$ M) or chenodeoxycholic acid (CDCA), rifampicin (Rif, 10  $\mu$ M) and GW3965 (20  $\mu$ M) for 24 h. Cells were then lysed and analyzed for both firefly and *Renilla* luciferase. Values express the fold-change of *CYP7A1* promoter activation related to the control vehicle treated cells. Data are presented as mean  $\pm$  SD of control (vehicle treated and empty expression construct transfected cells set to be 100%) ( $n = 3$  in each group); significantly different from vehicle (DMSO)-treated cells (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ); significantly different from empty expression construct transfected cells ( $p < 0.001$ ).

expression was observed (data not shown). Based on these observations, we can suggest that iron depletion induces *CYP7A1* expression independently from LXR $\alpha$ , FXR and PXR in human cells. Together with excluded contribution of pERK, and pJNK kinases, our data indicate complex regulatory mechanism of iron depletion-mediated changes in bile acid and cholesterol metabolism. Thus, other pathways of *Cyp7a1*/*CYP7A1* genes transcriptional regulation such as activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma 4 coactivator-1 (PGC-1) [46,47], modulation of cAMP [48], or miRNAs (miR-33a, miR-122a, and miR-422a) [49] should be further studied. Absence of marked changes in crucial regulatory mechanisms may also indicate subtle multistep modulation by iron depletion which may escape resolution by standard methods.

In conclusion, this study demonstrates that ID has a stimulating effect on bile production by enhancing the BA dependent and independent bileflow in rats. In relation to this effect, our findings allowed for the identification of liver enzymes and transporters which may contribute to serum the cholesterol- and bile acid-lowering effects of iron depletion. Our data also suggest that these effects of ID may be mainly regulated by the upregulation of *CYP7A1*/*Cyp7a1* in both rats and humans. Analysis of major mechanisms regulating bile acid synthesis failed to show single responsible pathway although activation of LXR $\alpha$  may play role in rats. The frequent occurrence of ID in the population therefore underscores the need for further investigation of the relationship of ID to cholesterol turnover, biliary diseases as well as outcomes in systemic cardiovascular diseases.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2017.09.003>.

#### Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2017.09.003> associated with this article can be found, in online version.

#### Acknowledgment

We gratefully acknowledge the skillful technical assistance of Jitka Hajkova and Hana Lastuvkova. This study was supported by grants from the Grant Agency of Charles University Progres Q40 and SVV 260397/2017 as well as 260 4141, the grant GACR (17-068415) and by the grant RVO-VFN64165/2016, provided by the Ministry of Health of the Czech Republic. We thank Dr. Tomas Simunek for his generous assistance.

#### References

- [1] J.L. Boyer, Bile formation and secretion, *Compr. Physiol.* 3 (2013) 1035–1078.
- [2] A. Geier, M. Wagner, C.G. Dietrich, M. Trauner, Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 283–308.
- [3] J. Cermanova, Z. Kadova, M. Zagorova, M. Hroch, P. Tomsik, P. Nachtigal, Z. Kudlackova, P. Pavek, M. Dubecka, M. Ceckova, F. Staud, T. Laho, S. Micuda, Boldine enhances bile production in rats via osmotic and farnesoid X receptor



- dependent mechanisms, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 285 (2015) 12–22.
- [4] S. Dawson, S. Stahl, N. Paul, J. Barber, J.G. Kenna, In vitro inhibition of the bile salt export pump correlates with risk of cholestatic drug-induced liver injury in humans, *Drug Metab. Dispos.* 40 (2012) 130–138.
- [5] T. Terada, D. Hira, Intestinal and hepatic drug transporters: pharmacokinetic, pathophysiological, and pharmacogenetic roles, *J. Gastroenterol.* 50 (2015) 508–519.
- [6] E. Brackova, L. Fuksa, J. Cermanova, G. Kolouchova, M. Hroch, P. Hirsova, J. Martinkova, F. Staud, S. Micuda, Alteration of methotrexate biliary and renal elimination during extrahepatic and intrahepatic cholestasis in rats, *Biol. Pharm. Bull.* 32 (2009) 1978–1985.
- [7] J. Konig, F. Muller, M.F. Fromm, Transporters and drug–drug interactions: important determinants of drug disposition and effects, *Pharmacol. Rev.* 65 (2013) 944–966.
- [8] M. Munoz, I. Villar, J.A. Garcia-Erce, An update on iron physiology, *World J. Gastroenterol.* 15 (2009) 4617–4626.
- [9] Y.H. Huang, J.H. Chuang, Y.L. Yang, C.C. Huang, C.L. Wu, C.L. Chen, Cholestasis downregulate hepcidin expression through inhibiting IL-6-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 signaling, *Lab. Investig.* 89 (2009) 1128–1139.
- [10] G. Kolouchova, E. Brackova, P. Hirsova, J. Cermanova, L. Fuksa, J. Mokry, P. Nachtigal, H. Lastuvkova, S. Micuda, Modification of hepatic iron metabolism induced by pravastatin during obstructive cholestasis in rats, *Life Sci.* 89 (2011) 717–724.
- [11] Y.H. Huang, H. Yu-Hsieh, C.C. Huang, V.T. Shin-Mu, M.H. Tai, C.L. Chen, J.H. Chuang, Liver hepcidin and stainable iron expression in biliary atresia, *Pediatr. Res.* 59 (2006) 662–666.
- [12] K. Sogawa, T. Yamada, Y. Suzuki, T. Masaki, S. Watanabe, Y. Uchida, K. Arima, M. Nishioka, K. Matsumoto, Elevation of ceruloplasmin activity involved in changes of hepatic metal concentration in primary biliary cirrhosis, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 84 (1994) 367–370.
- [13] K. Otogawa, T. Ogawa, R. Shiga, K. Nakatani, K. Ikeda, Y. Nakajima, N. Kawada, Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294 (2008) R311–320.
- [14] J. Cermanova, Z. Kadova, E. Dolezelova, M. Zagorova, V. Safka, M. Hroch, T. Laho, M. Holeckova, J. Mokry, P. Kovarikova, J. Bures, M. Sterba, S. Micuda, Deferoxamine but not dexrazoxane alleviates liver injury induced by endotoxemia in rats, *Shock* 42 (2014) 372–379.
- [15] A. Kamei, Y. Watanabe, T. Ishijima, M. Uehara, S. Arai, H. Kato, Y. Nakai, K. Abe, Dietary iron-deficient anemia induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study, *Physiol. Genomics* 42 (2010) 149–156.
- [16] T. Merono, P. Sorroche, L.A. Gomez Rosso, L. Casanas, L.E. Boero, J.A. Arbelbide, F.D. Brites, Proatherogenic disturbances in lipoprotein profile, associated enzymes and transfer proteins in women with iron deficiency anaemia, *Clin. Biochem.* 43 (2010) 416–423.
- [17] T. Iwanaga, M. Nakakariya, H. Yabuuchi, T. Maeda, I. Tamai, Involvement of bile salt export pump in flutamide-induced cholestatic hepatitis, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007) 739–744.
- [18] P. Hirsova, G. Karlasova, E. Dolezelova, J. Cermanova, M. Zagorova, Z. Kadova, M. Hroch, L. Sispera, P. Tomsik, M. Lenicek, L. Vitek, P. Pavek, O. Kucera, Z. Cervinkova, S. Micuda, Cholestatic effect of epigallocatechin gallate in rats is mediated via decreased expression of Mrp2, *Toxicology* 303 (2013) 9–15.
- [19] M.A. Evenson, Measurement of copper in biological samples by flame or electrothermal atomic absorption spectrometry, *Methods Enzymol.* 158 (1988) 351–357.
- [20] A.L. Metzger, S. Heymsfield, S.M. Grundy, The lithogenic index—a numerical expression for the relative lithogenicity of bile, *Gastroenterology* 62 (1972) 499–501.
- [21] M.C. Carey, Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile, *J. Lipid Res.* 19 (1978) 945–955.
- [22] G. Porcz, J. Prawitt, B. Gross, B. Staels, Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 1723–1737.
- [23] P. Gripon, S. Rumin, S. Urban, J. Le Seyec, D. Glaise, I. Cannie, C. Guyomard, J. Lucas, C. Trepo, C. Guguen-Guillouzo, Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, pp. 15655–15660.
- [24] L. Hrysova, T. Smutny, A. Carazo, S. Moravcik, J. Mandikova, F. Trejtnar, S. Gerbal-Chaloin, P. Pavek, The pregnane X receptor down-regulates organic cation transporter 1 (SLC22A1) in human hepatocytes by competing for (“squelching”) SRC-1 coactivator, *Br. J. Pharmacol.* 173 (2016) 1703–1715.
- [25] A. Rulcova, I. Prokopova, L. Krausova, M. Bitman, R. Vrzal, Z. Dvorak, J. Blahos, P. Pavek, Stereoselective interactions of warfarin enantiomers with the pregnane X nuclear receptor in gene regulation of major drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes, *J. Thromb. Haemost.* 8 (2010) 2708–2717.
- [26] J.Y. Chiang, R. Kimmel, C. Weinberger, D. Stroup, Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 10918–10924.
- [27] T. Li, J.Y. Chiang, Bile acids as metabolic regulators, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 31 (2015) 159–165.
- [28] Y. Qi, C. Jiang, J. Cheng, K.W. Krausz, T. Li, J.M. Ferrell, F.J. Gonzalez, J.Y. Chiang, Bile acid signaling in lipid metabolism: metabolomic and lipidomic analysis of lipid and bile acid markers linked to anti-obesity and anti-diabetes in mice, *Biochim. Biophys. Acta* 1851 (2015) 19–29.
- [29] T. Inagaki, M. Choi, A. Moschetta, L. Peng, C.L. Cummins, J.G. McDonald, G. Luo, S.A. Jones, B. Goodwin, J.A. Richardson, R.D. Gerard, J.J. Repa, D.J. Mangelsdorf, S.A. Kliewer, Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis, *Cell Metab.* 2 (2005) 217–225.
- [30] R.E. Fleming, P. Ponka, Iron overload in human disease, *N. Engl. J. Med.* 366 (2012) 348–359.
- [31] J.W. Choi, S.K. Kim, S.H. Pai, Changes in serum lipid concentrations during iron depletion and after iron supplementation, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 31 (2001) 151–156.
- [32] G.I. Stangl, M. Kirchgessner, Different degrees of moderate iron deficiency modulate lipid metabolism of rats, *Lipids* 33 (1998) 889–895.
- [33] P.C. Prasad, S. Gupta, N. Kaushik, To study serum iron levels in patients of gall bladder stone disease and to compare with healthy individuals, *Indian J. Surg.* 77 (2015) 19–22.
- [34] G.E. Pamuk, H. Umit, F. Harmandar, N. Yesil, Patients with iron deficiency anemia have an increased prevalence of gallstones, *Ann. Hematol.* 88 (2009) 17–20.
- [35] K.J. Van Erpecum, Pathogenesis of cholesterol and pigment gallstones: an update, *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 35 (2011) 281–287.
- [36] D.Q. Wang, M.C. Carey, Complete mapping of crystallization pathways during cholesterol precipitation from model bile: influence of physical-chemical variables of pathophysiological relevance and identification of a stable liquid crystalline state in cold, dilute and hydrophilic bile salt-containing systems, *J. Lipid Res.* 37 (1996) 606–630.
- [37] G. Peretz, G. Link, O. Pappo, R. Bruck, Z. Ackerman, Effect of hepatic iron concentration reduction on hepatic fibrosis and damage in rats with cholestatic liver disease, *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 240–245.
- [38] R.P. Oude Elferink, C.C. Paulusma, Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein), *Pflugers Arch.* 453 (2007) 601–610.
- [39] A. Figge, F. Lammert, B. Paigen, A. Henkel, S. Matern, R. Korstanje, B.L. Schneider, F. Chen, E. Stoltzenberg, K. Spatz, F. Hoda, D.E. Cohen, R.M. Green, Hepatic over-expression of murine Abcb11 increases hepatobiliary lipid secretion and reduces hepatic steatosis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 2790–2799.
- [40] M.L. Ruiz, S.S. Villanueva, M.G. Luquita, S. Ikushiro, A.D. Mottino, V.A. Catania, Beneficial effect of spironolactone administration on ethynylestradiol-induced cholestasis in the rat: involvement of up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2, *Drug Metab. Dispos.* 35 (2007) 2060–2066.
- [41] Y. Chen, H. Dong, D.C. Thompson, H.G. Shertzer, D.W. Nebert, V. Vasiliou, Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models, *Food Chem. Toxicol.* 60 (2013) 38–44.
- [42] D. Darshan, D.M. Frazer, S.J. Wilkins, G.J. Anderson, Severe iron deficiency blunts the response of the iron regulatory gene Hmp and pro-inflammatory cytokines to lipopolysaccharide, *Haematologica* 95 (2010) 1660–1667.
- [43] E. Halilbasic, A. Baghdasaryan, M. Trauner, Nuclear receptors as drug targets in cholestatic liver diseases, *Clin. Liver Dis.* 17 (2013) 161–189.
- [44] T.H. Kim, H. Kim, J.M. Park, S.S. Im, J.S. Bae, M.Y. Kim, H.G. Yoon, J.Y. Cha, K.S. Kim, Y.H. Ahn, Interrelationship between liver X receptor alpha, sterol regulatory element-binding protein-1c, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, and small heterodimer partner in the transcriptional regulation of glucokinase gene expression in liver, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 15071–15083.
- [45] T. Li, J.Y. Chiang, Bile acid signaling in liver metabolism and diseases, *J. Lipids* 2012 (2012) 754067.
- [46] M. Crestani, E. De Fabiani, D. Caruso, N. Mitro, F. Gilardi, A.B. Vigil Chacon, R. Patelli, C. Godio, G. Galli, LXR (liver X receptor) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor-4): key regulators in reverse cholesterol transport, *Biochem. Soc. Trans.* 32 (2004) 92–96.
- [47] S. Bhalla, C. Ozalp, S. Fang, L. Xiang, J.K. Kemper, Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1 $\alpha$ . Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 45139–45147.
- [48] J. Xiao, Y. Lv, B. Lin, G.L. Tipoe, M.B. Youdim, F. Xing, Y. Liu, A novel antioxidant multitarget iron chelator M30 protects hepatocytes against ethanol-induced injury, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2015 (2015) 607271.
- [49] T. Li, J.M. Francl, S. Boehme, J.Y. Chiang, Regulation of cholesterol and bile acid homeostasis by the cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase/steroid response element-binding protein 2/microRNA-33a axis in mice, *Hepatology* 58 (2013) 1111–1121.

## **Příloha 2 Scientific Reports (IF2017-4,122) - v druhý revizi**

1

### **Iron overload reduces synthesis and elimination of bile acids in rat liver**

Alena Prasnicka<sup>a,d</sup>, Hana Lastuvkova<sup>a</sup>, Fatemeh Alaei Faradonbeh<sup>a</sup>, Jolana Cermanova<sup>a</sup>, Milos Hroch<sup>b</sup>,  
Jaroslav Mokry<sup>c</sup>, Eva Dolezelova<sup>d</sup>, Petr Pavek<sup>e</sup>, Katerina Zizalova<sup>f</sup>, Libor Vitek<sup>f</sup>, Petr Nachtigal<sup>d</sup>,  
Stanislav Micuda<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup>Department of Medical Biochemistry, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

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

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

<sup>e</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>f</sup>Department of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

**Running title:** Iron overload and bile acids

**Corresponding author:** Stanislav Micuda, Prof., M.D., Ph.D., Department of Pharmacology, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Simkova 870, 500 03 Hradec Kralove, Czech Republic; Tel.: +420 495 816 233; e-mail: [micuda@lfhk.cuni.cz](mailto:micuda@lfhk.cuni.cz)

Grant support: This work was supported by grants from the Grant Agency of Charles University Progres Q40/05, SVV 260397/2017, and GAUK 5562/18, and by the ERDF-Project PERSONMED No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_048/0007441.

Keywords: Iron overload; Bile acids; Cyp7a1; Transporting proteins

Disclosures: The authors have no financial or personal disclosures relevant to this manuscript.

**Abstract**

Excessive iron accumulation in the liver, which accompanies certain genetic or metabolic diseases, impairs bile acids (BA) synthesis, but the influence of iron on the complex process of BA homeostasis is unknown. Thus, we evaluated the effect of iron overload (IO) on BA turnover in rats. Compared with control rats, IO (8 intraperitoneal doses of 100 mg/kg every other day) significantly decreased bile flow as a consequence of decreased biliary BA secretion. This decrease was associated with reduced expression of Cyp7a1, the rate limiting enzyme in the conversion of cholesterol to BA, and decreased expression of Bsep, the transporter responsible for BA efflux into bile. However, IO did not change net BA content in faeces in response to increased intestinal conversion of BA into hyodeoxycholic acid. In addition, IO increased plasma cholesterol concentrations, which corresponded with reduced Cyp7a1 expression and increased expression of Hmgcr, the rate-limiting enzyme in *de novo* cholesterol synthesis. In summary, this study describes the mechanisms impairing synthesis, biliary secretion and intestinal processing of BA during IO. Altered elimination pathways for BA and cholesterol may interfere with the pathophysiology of liver damage accompanying liver diseases with excessive iron deposition.

## Introduction

Bile production is an essential function of the liver and serves as an irreplaceable excretory pathway for elimination of lipophilic endo- and xenobiotics such as cholesterol, BA, bilirubin or drugs<sup>1</sup>. Moreover, as major components of bile, BA are required for micelle formation, intestinal fat digestion, regulation of bacterial growth, and immune response and production of regulatory mediators released to portal circulation such as fibroblast growth factor 19 or glucagon-like peptide 1. In addition, BA as the major metabolites of cholesterol, act as hormones by agonism at several receptors such as farnesoid X receptor (FXR), the G protein-coupled bile acid receptor 1 (TGR5), sphingosine-1-phosphate receptor 2, or pregnane X receptor (PXR), and regulate numerous liver functions including glucose and triglyceride metabolism<sup>2</sup>. Stimulation of these receptors demonstrates promising positive effects in liver diseases such as nonalcoholic steatohepatitis (NASH) or intrahepatic cholestasis<sup>3</sup>. On the other hand, BA accumulated during different forms of cholestasis may have a direct toxic effect on liver cells and tissues. Regulation of bile production and BA homeostasis are therefore key events in liver physiology and pathophysiology.

Iron is an essential trace element, in particular required to form haem for synthesis of haemoglobin, myoglobin or P450 enzymes. As a highly reactive molecule, iron is also involved in the cellular redox balance and generation of hydroxyl radicals which are necessary for regulation of several intracellular events including response to stressors or mitochondrial dysfunction<sup>4</sup>. Excessive concentration of iron in cells induces oxidative stress with peroxidative decomposition of polyunsaturated fatty acids in membrane phospholipids, thereby altering vital organelle integrity and cell function<sup>5,6</sup>. The metabolism of iron is therefore tightly regulated to prevent tissue damage. However, IO can occur in subjects with genetic disorders such as hereditary haemochromatosis and beta thalassaemia, or secondary to IO during blood transfusion and haemolysis<sup>7,8</sup>. Iron toxicity occurs especially in the liver, where the iron is mainly stored, leading to ongoing damage and finally to cirrhosis. Moreover, increased liver iron stores accompany common metabolic pathologies such as insulin resistance, type



2 diabetes mellitus, metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)<sup>9</sup>. It is of note, that these metabolic disorders produce marked changes in BA metabolism and could be treated by agonists of FXR receptor, which is the most important BA sensor<sup>10</sup>. However, the relationship between IO and BA liver homeostatic pathways has not been studied in depth.

Indeed, plasma concentrations of BA during IO have not been yet measured and only limited evidence suggests that biliary BA excretion may be reduced by dietary IO<sup>5</sup>. This observation may be related to IO-mediated reduction in the expression of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (Cyp7a1), the rate-limiting enzyme for conversion of cholesterol to BA in rats<sup>5,11,12</sup>, although no association between liver iron concentration and Cyp7a1 was seen in this model of IO<sup>13</sup>. Reduction in Cyp7a1 may also explain increased serum cholesterol levels in iron-administered rats<sup>5,14-17</sup>. However, the effect of liver iron accumulation on other BA synthetic pathways and on biliary and faecal BA excretion is not known. Therefore, we postulated the hypothesis that iron accumulation in an organism markedly reduces elimination of BA.

In the present study we evaluated the effect of IO on the mechanisms responsible for BA homeostasis in rat liver and ileum. We showed that increased iron deposition in rat liver results in decreased bile formation due to reduced biliary BA secretion through downregulated Bsep and Mrp2 apical transporters. Plasma concentrations of BA were not significantly affected by IO because reduced biliary BA secretion was accompanied by reduced liver BA synthesis, intestinal BA processing, and increased basolateral output from hepatocytes and reduced uptake to hepatocytes.

## Results

**IO causes massive iron deposition in rat livers.** To establish IO with significant iron liver accumulation in parenchymal and nonparenchymal cells, we used a validated rat model based on intraperitoneal (i.p.) administration of 8 doses (100 mg/kg per dose) of iron dextran-heptonic acid complex applied every other day<sup>18</sup>. This regimen resulted in massive iron liver deposition without significant hallmarks of hepatocellular or cholestatic injury as apparent from histological examination of haematoxylin-eosin (HE) and Prussian blue iron (PB) staining of liver sections (Figure 1A). Massive iron deposition was apparent, especially in periportal zones of the liver acinus when compared with regions around the central vein as visualized by opalescent structures in HE staining and blue deposits in PB staining. This corresponds with previously reported data<sup>8,19</sup>. No apparent staining was present in the saline-administered animals. Liver weights were not changed by IO and were  $13.5 \pm 0.5$  g in the saline-treated rats, and  $14.2 \pm 0.5$  g in the IO rats. IO with excessive liver accumulation was further confirmed by increased plasma concentrations of iron and ferritin (Figure 1C) and by increased liver mRNA expression of key iron metabolism associated genes such as hepcidin (*Hamp*), *ferritin (Ftl)*, ferroportin (*Slc40a1*) and down regulation of *transferrin receptor 1 (Trfc)* (Figure 1B). We also detected significantly reduced levels of iron-responsive element-binding protein 1 and iron-responsive element-binding protein 2 (IRP1 and IRP2) proteins (Figure 1D), a markers of iron excess in the liver<sup>20</sup>. IRP1 and IRP2 were recently demonstrated as a positive regulator of *Cyp7a1* transcription<sup>11</sup>. These results demonstrated typical histological, biochemical and molecular hallmarks of significant iron deposition in the liver of treated animals.



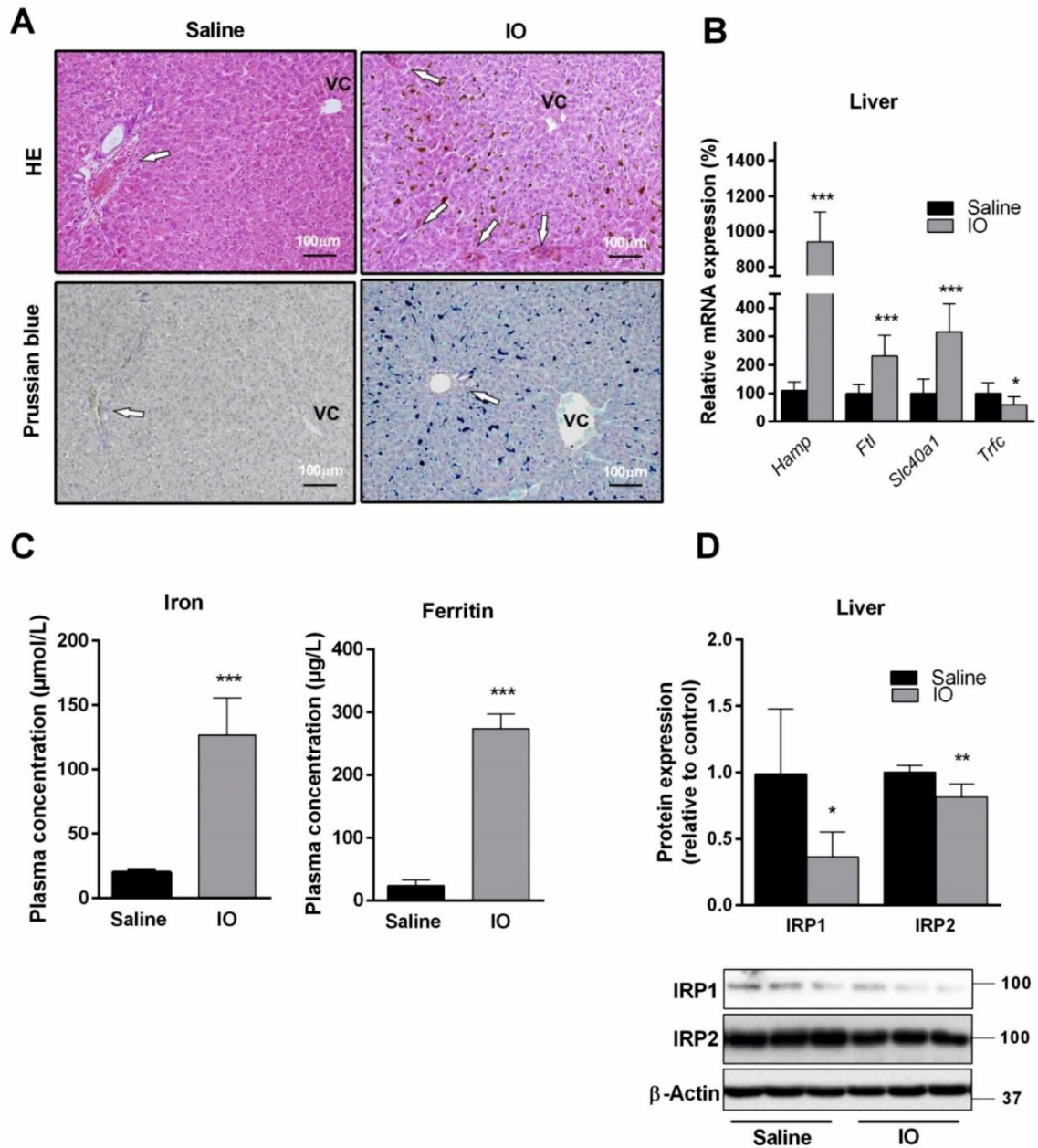


Figure-1. Excessive concentration of iron in IO rats administrated i.p. with 8 doses of gleptoferron every 2nd day. (A) Representative liver histology, stained with haematoxylin-eosin staining (HE) and Prussian blue. Arrows indicate periportal areas at the periphery of classical liver lobule; VC – vena centralis. Scale bar 100 mm. (B) mRNA liver expression of hepcidin (Hamp), ferritin (Ftl), ferroportin (Slc40a1) and transferrin receptor (Trfc) determined by real-time RT-PCR. (C) Concentration of iron and ferritin in plasma. (D) Liver protein content of IRP1 and IRP2 (iron-responsive element-binding protein 1 and 2) normalized to  $\beta$ -actin. Values are mean  $\pm$  SD (n = 6 in each group). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  iron-treated vs. saline-treated rats.

**IO causes mild liver injury and oxidative stress.** Excessive iron deposition in the liver can induce oxidative liver injury<sup>6</sup>. To determine liver injury in our IO model, we analysed the plasma and livers for corresponding biomarkers. The harmful effect of IO on liver functions was demonstrated by a mild but significant increase in aspartate transaminase (AST) activity, and plasma cholesterol and bilirubin concentrations (Figure 2A). Induction of oxidative stress in the liver of IO rats was confirmed by the increased presence of glutathione in its oxidized (GSSG) form (Figure 2B), reduced GSH/GSSG ratio (Figure 2B) and by increased protein expression of stress-response molecules, haem oxygenase 1 (Hmox1) and phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 subunit (Figure 2C). These changes did not trigger acute inflammatory response in the liver, as suggested by the absence of inflammatory cell accumulation in histology sections (Figure 1A) and unchanged gene expression of tumour necrosis factor (*Tnf*) and interleukin 6 (*Il6*) (Figure 2D). On the other hand, deposited iron activated *Tgf 1* production accompanied by increased expression of *Acta2* (encoding  $\alpha$ -SMA protein) (Figure 2D), a marker of activated hepatic stellate cells, which was also recently demonstrated<sup>21</sup>.

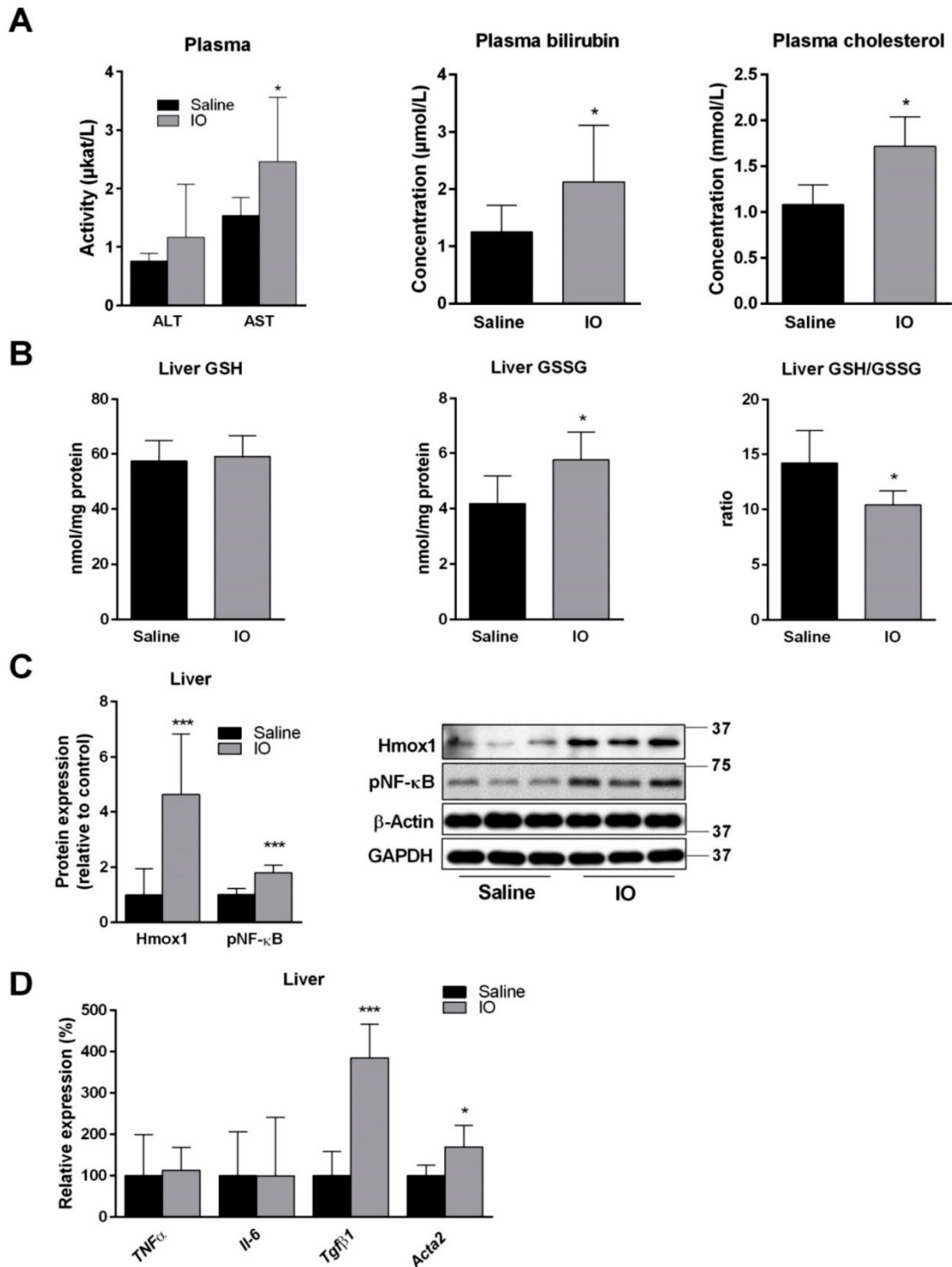


Figure-2. IO induced mild liver injury by activation of oxidative stress. (A) Activity and concentrations of ALT, AST, bilirubin, cholesterol in plasma. (B) Content of reduced and oxidized glutathione (GSSG) and GSH/GSSG ratio, determined by HPLC measurement. (C) Liver protein content of haem oxygenase (Hmox1) and phosphorylated NF- $\kappa$ B (p65) normalized to average of  $\beta$ -actin and Gapdh. (D) mRNA liver expressions of proinflammatory markers TNF $\alpha$ , Il-6, Tgfb1 and Acta2 (encoding  $\alpha$ -SMA protein) determined by real-time RT-

PCR. Values are mean  $\pm$  SD (n = 6 in each group). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. saline-treated rats.

**Bile flow is reduced by IO in response to reduced biliary secretion of BA.** Reduced biliary secretion of total BA during IO was reported previously in a single study<sup>5</sup>. To elaborate this finding, we performed a bile collection study with analysis of BA spectra and other major components of bile including BA-independent flow based mainly on biliary secretion of glutathione. IO caused significant reduction of net bile flow in rats (Figure 3A), accompanied by decreased biliary secretion of BA. Individual BA were proportionally reduced in the presence of IO (Figure 3B). Changes in biliary secretion of individual bile acids presents Supplementary Table 3. Biliary secretion of glutathione, cholesterol and phospholipids did not significantly differ between the control and IO rats (Figure 3C). Similarly, concentrations of BA and their spectra in plasma and the concentration of cholesterol in liver were not changed by iron administration (Figure 3D-E, Supplementary Table 3). Our data indicate that the reduction of bile production by IO reflected reduced biliary secretion of BA.

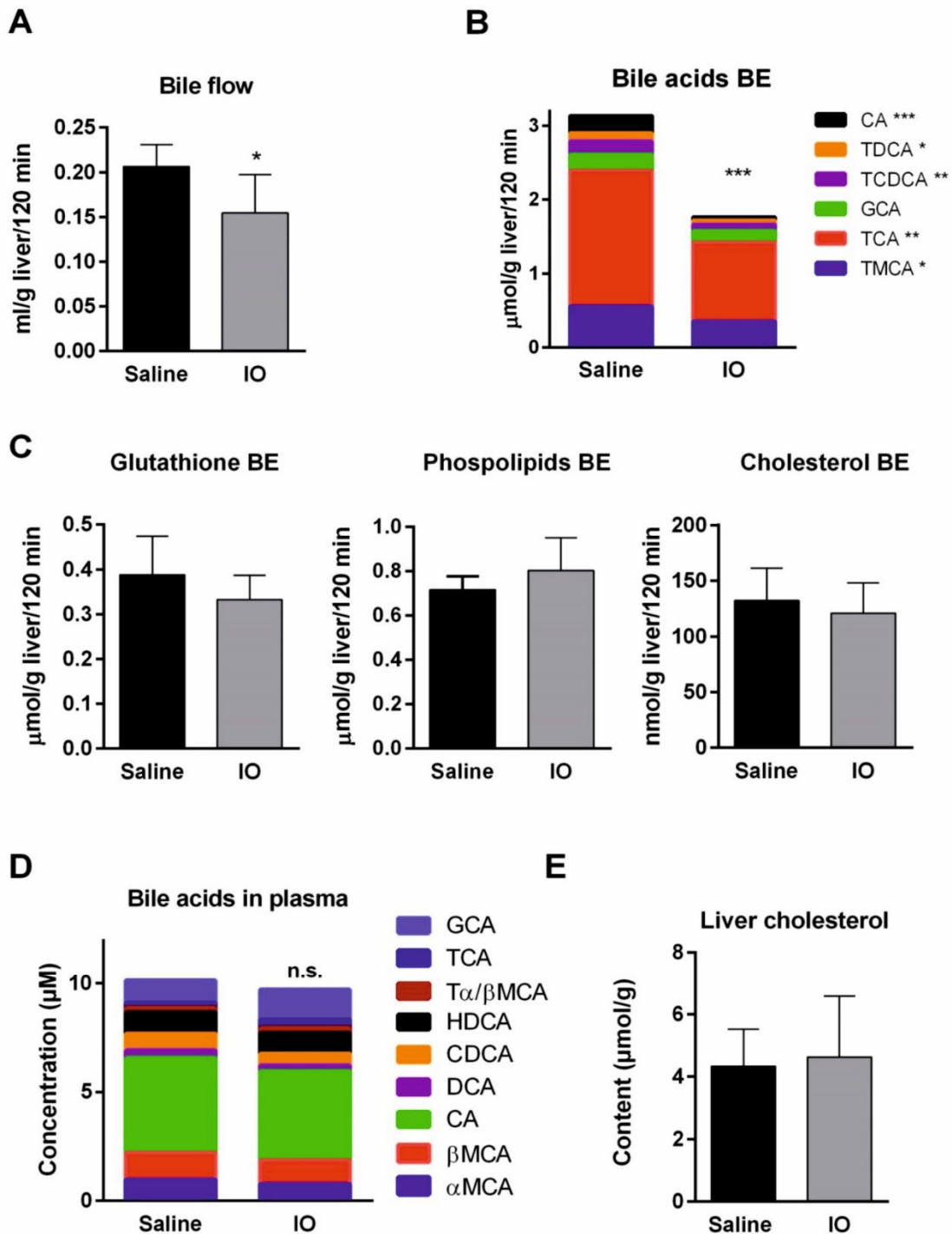


Figure-3. Bile flow was reduced in rats by IO in response to reduced biliary secretion of BA. (A) Rat bile duct was cannulated and bile was collected for 120 min. Then the bile flow was calculated from amount of collected bile to liver weight. (B and D) The concentrations of total and individual BAs in bile and plasma were measured by LC-MS analysis. (C and E) Biliary secretions of phospholipids, glutathione, cholesterol and hepatic content of cholesterol were determined by available commercial kits. Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 6$  in each group). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  iron-treated vs. saline-treated rats.

**Impact of IO on liver expression of molecules responsible for BA and cholesterol turnover.** In order to reveal the mechanisms responsible for changes in BA biliary kinetics, we analysed liver expression of transporting proteins and enzymes with crucial functions in cholesterol and BA uptake, secretion, and metabolism. Evaluating key genes in BA and cholesterol synthesis, IO significantly reduced mRNA expression of *Cyp7a1* and significantly increased gene expression of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (*Hmgcr*) (Figure 4A). Of all apical and basolateral transporters, IO significantly increased mRNA expression of *Abcb1a/1b*, *Abcc3* and *Abcb4*, respectively (Figure 4B). These transcriptional changes were followed by proportional changes in encoded proteins. We detected downregulation of *Cyp7a1* (Figure 4C) and up-regulation of *Hmgcr*, the rate-limiting enzyme for cholesterol synthesis (Figure 4C), *Mdr1* (Figure 4D), the major apical transporter for biliary excretion lipophilic drugs, and *Mrp3/Mrp4* (Figure 4D), the basolateral efflux transporters for conjugated anionic compounds such as bilirubin glucuronides and BA. However, IO also down-regulated liver protein levels of *Cyp8b1* enzyme for BA synthesis (Figure 4C), *Ntcp*, an essential protein for uptake of BA from portal blood to hepatocytes (Figure 4D). Increased expressions of *Abcg8*, an apical efflux transporter for cholesterol from liver to canaliculus, was not followed by a corresponding change in *Abcg5*, which may imply that the function of this heterodimer was not increased as also suggested by unchanged cholesterol biliary secretion (Figure 4). Previous studies described that *Bsep*, the rate limiting transporter for biliary BA secretion, and *Mrp2*, the rate-limiting transporter for anionic compounds including conjugates of BA and bilirubin, may be regulated post-transcriptionally by increased retrieval and degradation from the canalicular membrane<sup>22</sup>. Therefore, we performed immunohistochemical analysis in order to evaluate localization and expression of both proteins. Immunohistochemical staining in the liver showed strong *Mrp2* expression in the canalicular membrane of hepatocytes in the control rats (Figure 5A) as described in our previous paper<sup>23</sup>. On the contrary, *Mrp2* expression was reduced in the IO rats (Figure 5A). Similarly, *Bsep* expression was also detected in the canalicular membrane of hepatocytes in the control animals (Figure 5A). However, *Bsep* staining was substantially weaker in the IO rats (Figure 5A). Gene expressions of both proteins were not changed by IO (Figure 5B), while western blot analysis confirmed downregulation of both, *Bsep* and *Mrp2* at protein levels (Figure 5C). These data indicate significant posttranscriptional down-regulation of *Bsep* and *Mrp2* by IO.



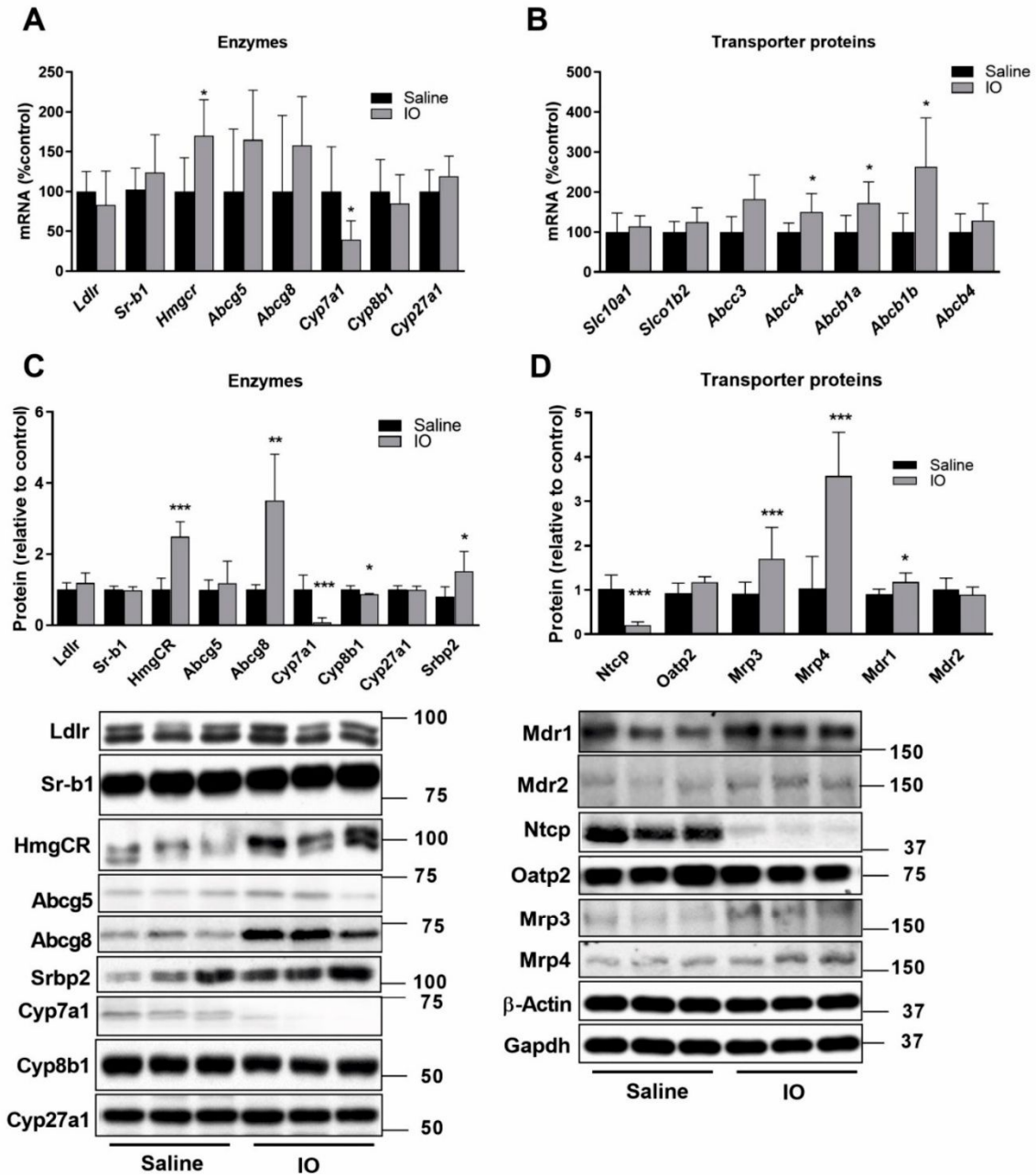


Figure-4. Impact of IO on liver mRNA and protein expression responsible for BA and cholesterol turnover. Isolated mRNAs (A) and the expression of transporters and enzymes responsible for cholesterol and BAs homeostasis. The expression of these genes was analysed by a real-time RT-PCR system and proteins by western blot immunodetection. Values are mean  $\pm$  SD (n = 6 in each group). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 iron-treated vs. saline-treated rats.

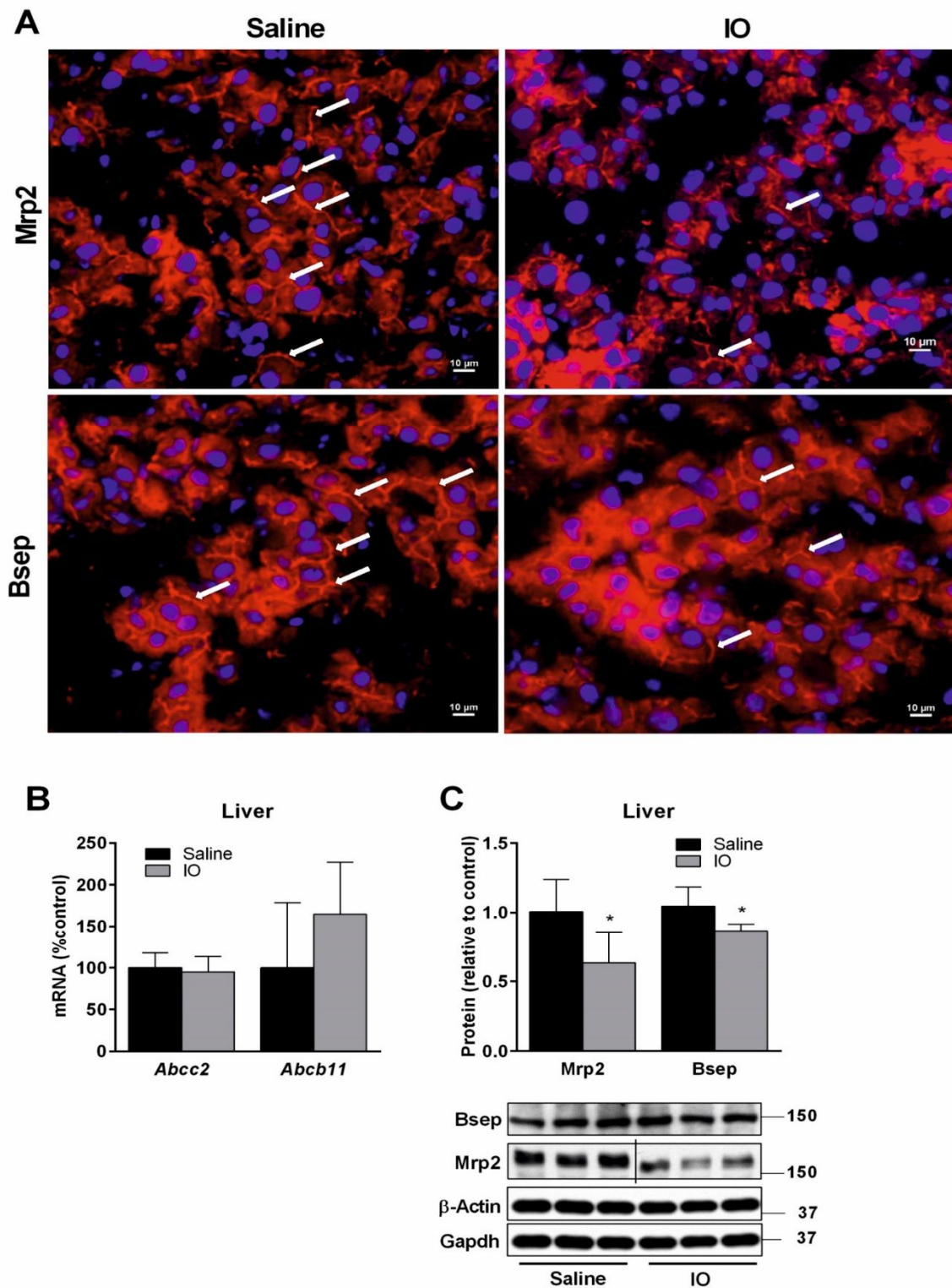


Figure-5. IO reduced posttranscriptionally the expression of Mrp2 and Bsep transporting proteins. (A) Immunohistochemical staining was used to detect Mrp2 and Bsep expression (red, white arrows) in the liver of saline and IO treated rats. Representative images of random fields are shown. Nuclei staining in blue (DAPI).



Scale bar 10 mm. Isolated mRNA (B) and proteins (C) from liver tissue were used for evaluation of gene expression and protein levels. The expression of these genes was analysed by real-time RT-PCR system and proteins by western blot immunodetection. Values are mean  $\pm$  SD (n = 6 in each group). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 iron-treated vs. saline-treated rats.

**IO changes intestinal BA turnover.** More than 90% of BA is reabsorbed from the ileum into portal blood, and subsequently reused by hepatocytes for secretion into the bile. In order to study intestinal turnover of BA, we analysed BA loss through faeces. BA were present in stool only in unconjugated form. In contrast to biliary secretion, the net faecal excretion of BA was highly variable between individuals; therefore, the tendency for decreased net faecal excretion of BA in the IO rats failed to reach statistical significance (Figure 6A, Supplementary Table 3). This suggests that potential hepatic retention of BA in response to reduced biliary secretion of BA was compensated for by their reduced ileum reabsorption. Western blot analysis did not confirm significant changes in protein expression of Asbt, and Ost  $\alpha/\beta$ , the major transporters for BA reabsorption at apical and basolateral membranes of ileum enterocytes, respectively (Figure 6B). We therefore focused on faecal content of individual BA. Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) analysis revealed that faecal BA loss was reduced for the majority of BA in the IO rats, with the exception of hyodeoxycholic acid (HDCA) (Figure 6A). HDCA was present in significant amounts in four out of six IO rats, and produced such variability in net stool BA content. HDCA was absent in the faeces of all saline-administered rats. Interestingly, concentrations of HDCA in plasma from portal bloods were  $12.4 \pm 1.5$  M in control and  $13.5 \pm 5.3$  M in IO groups, respectively, and they were not statistically different (P = 0.77). This indicates that metabolic conversion of BA by gut microbiota may modify reduced biliary secretion of BA in IO rats.

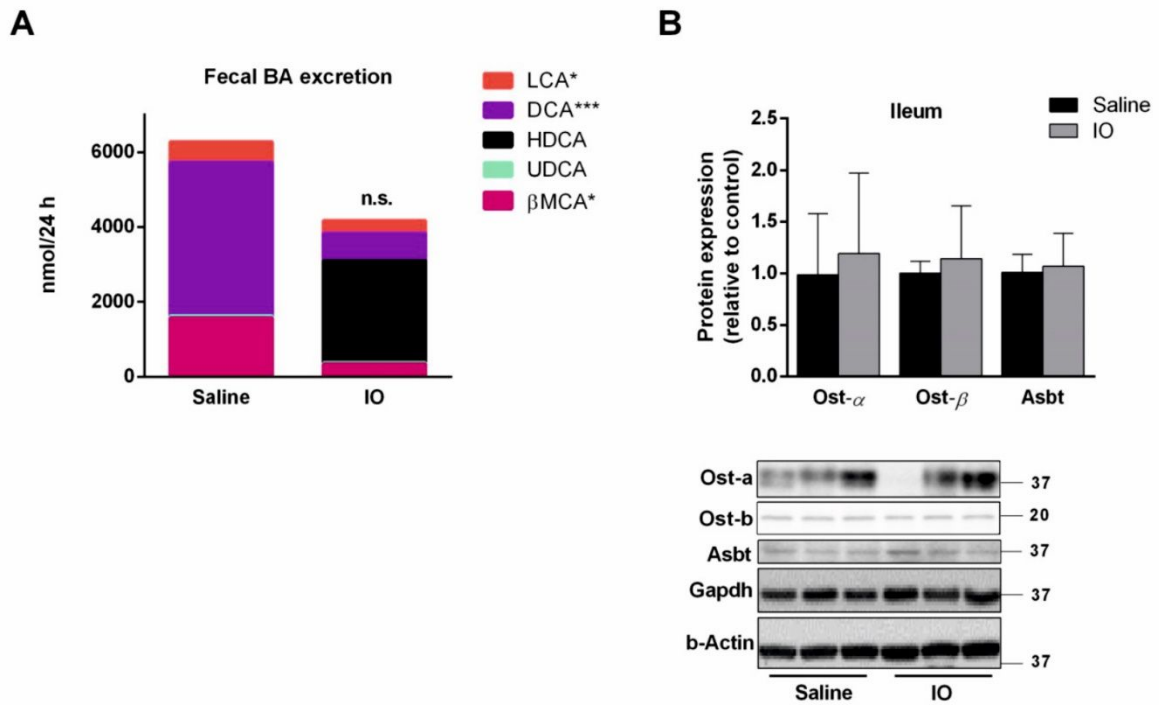


Figure-6. Iron overload changed intestinal BA turnover. (A) The BA were isolated from dried stool after 24 h collection. The concentrations of total and individual BA in bile and plasma were measured by LC-MS analysis. (B) Protein expression of major transporters for BA reabsorption in ileum was determined by western blot analysis and calculated to average of  $\alpha$ -Actin and Gapdh. Values are mean  $\pm$  SD in each group). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  iron-treated vs. saline-treated rats.

## Discussion

Alteration of cholesterol homeostasis by IO was reported by several studies, but the collected results indicate discrepancies between different models. While humans and mice<sup>24</sup> with genetically determined IO such as thalassaemia or hereditary haemochromatosis develop mostly reduced cholesterol plasma concentrations, rodent models based on iron administration usually develop increased plasma<sup>5</sup> or hepatic cholesterol<sup>13</sup> levels. Animal models based on excessive iron administration therefore better reflect hepatic iron deposition during dysmetabolic IO syndrome, the clinical syndrome detected in about one-third of patients with NAFLD or the metabolic syndrome, and characterized by iron liver deposition and elevated plasma cholesterol<sup>25</sup>.

Research on molecular mechanisms explaining hypercholesterolaemia accompanying increased liver iron content has not yielded consistent results. Brunet *et al.*<sup>5</sup> demonstrated reduced hepatic activities of both Hmgcr and Cyp7a1 in dietary iron loaded rats in association with increased plasma and unchanged liver cholesterol levels, and reduced biliary excretion of BA and cholesterol. Reduced gene expression of *Cyp7a1* together with increased plasma cholesterol concentrations were also detected in Hfe<sup>-/-</sup> DBA/2 mice but not in Hfe<sup>-/-</sup> C57BL/6 mice<sup>12</sup>. In another study, dietary IO mice showed positive correlation between hepatic iron content and both mRNA expression of *Hmgcr* and hepatic cholesterol content, while no relationship was seen with Cyp7a1 or with plasma cholesterol concentration<sup>13</sup>. Indeed, the results of this study demonstrate important new information that excessive IO may even lead to a harmful combination of Cyp7a1 downregulation coupled with marked induction of Hmgcr. We speculate that discrepancies reported by available studies regarding IO-induced changes in both HMG-CoA reductase and Cyp7a1 are related to underlying pathology and different degree and localization of iron liver accumulation.

Liver Hmgcr is regulated by SREBP-2 transcription factor in response to reduced tissue cholesterol content<sup>26</sup>. Thus, unchanged liver cholesterol concentrations in our IO rats suggest another factor activating SREBP-2. Indeed, recently it has been described that SREBP-2 may be

induced by reactive oxygen species (ROS)<sup>27</sup>. ROS production typically occurs during IO<sup>6</sup>. Reduced liver GSH/GSSG ratio and induced Hmox1 expression and NF- B p65 phosphorylation confirmed marked oxidative stress in the IO rats. We therefore suggest that induction of liver ROS–SREBP-2 pathway is responsible for Hmgcr induction in IO rats. The absence of cholesterol accumulation in the liver together with its unchanged biliary excretion suggests that increased plasma cholesterol concentrations are related to its increased output from the liver to the bloodstream in response to increased synthesis by induced Hmgcr, and reduced metabolism to BA due to reduced Cyp7a1. The finding of induced Hmgcr also indicates potential therapeutic strategy by statins, the Hmgcr-blocking drugs which indeed showed beneficial effects in NASH, a syndrome associated with increased incidence of liver iron deposition<sup>28</sup>.

The reduction of *Cyp7a1* gene expression in IO rats together with its recently detected induction during iron depletion<sup>29</sup> suggests that iron regulates Cyp7a1 expression by a transcriptional mechanism. Our recent study excluded involvement of major pathways regulating *Cyp7a1* transcription such as nuclear receptors (e.g. FXR or PXR) or Egf15-pERK/pJNK signalling in iron depletion-mediated induction of Cyp7a1<sup>29</sup>. On the other hand, Liang *et al*<sup>11</sup> recently discovered that modulation of *Cyp7a1* mRNA by iron is executed by iron-regulating proteins IRP1 and IRP2 in mice. In general, when cells are iron-deficient, IRPs bind to iron-responsive elements (IREs) in untranslated regions (UTRs) of target mRNAs such as divalent metal transporter 1 and transferrin receptor 1, and increase their expression by stabilizing the mRNAs, while IRPs binding to UTRs of ferritin or ferroportin 1 blocks the translation of these mRNAs. When iron is in excess, IRP1 acquires a 4Fe-4S cluster and creates an aconitase, while IRP2 undergoes degradation so their binding to UTRs generally declines<sup>11,20</sup>. Liang *et al*<sup>11</sup> demonstrated that *Cyp7a1* has a non-canonical IRE structure in its 3'-UTR that can efficiently bind both IRP1 and IRP2 and increase transcription of this enzyme. Increased liver iron content reduces IRP1 and IRP2 and consequently reduces Cyp7a1 expression, while desferrioxamine, an iron chelator, has an inducing effect. Impairment of the IRE structure in the UTR of *Cyp7a1* gene abolishes the modulating effect of iron. In the present study, reduced IRP2

expression and variable changes in liver FXR-SHP and FGF15-pJNK/pERK axes (data not shown) in IO rats imply iron-IRPs-Cyp7a1 regulation as a major mechanism of Cyp7a1 downregulation in IO rats.

Transporting proteins mediating hepatocyte uptake and biliary secretion of BA and bilirubin have not been previously studied in IO animals despite the evidence of reduced biliary BA secretion<sup>5</sup>. We demonstrate for the first time posttranscriptional down-regulation of Ntcp, Bsep and Mrp2 transporters for BA which resembles increased retrieval and degradation of these proteins during liver inflammation<sup>22,30</sup>. Data from immunohistochemistry indeed confirmed significantly reduced intensity and canalicular localization of both Bsep and Mrp2 in IO livers when compared with control rats. This pattern of regulation may correspond with significant oxidative stress induced by IO. In support, we detected upregulation of Mdr1, which is induced in the liver by binding of phosphorylated NF- $\kappa$ B to Mdr1 promoter<sup>31</sup>. These changes may, together with reduced BA synthesis, contribute to reduced biliary BA secretion in IO rats, and may modify biliary excretion of numerous compounds including drugs. Furthermore, reduced uptake of BA through reduced Ntcp, and their increased output to blood through induced Mrp4 may contribute to unchanged BA plasma concentrations and prevent intracellular BA accumulation due to impaired BA biliary excretion. Downregulation of apical Mrp2, and upregulation of basolateral Mrp3 transporters for bilirubin conjugates together with induced Hmox-1 may explain increased bilirubin plasma concentration in IO rats due to its increased synthesis and reversed transport to blood.

The impact of IO on faecal excretion of BA has been unknown to date. Despite reduced biliary BA secretion in the IO rats, the net BA output by stool remained statistically unaffected. Abst, and Osts, the major transporters for BA reuptake from the intestine, were not significantly changed by IO. In contrast, analysis of BA spectra in stool displayed marked but inter-individually variable intestinal conversion of BA into HDCA in the IO rats. A previous study showed inefficient absorption of HDCA from the intestinal tract in Wistar rats and proposed that HDCA formation might be an important mechanism for controlling the body cholesterol pools<sup>32</sup>. In our study, statistically

unchanged concentrations of HDCA in the portal blood confirms limited capacity for HDCA intestinal reabsorption, which subsequently results in marked increase of HDCA in the stool of some IO animals. Therefore, we suggest that the marked but variable metabolism of BA into HDCA by intestinal bacteria<sup>33</sup> of the IO rats was the reason for statistically unchanged net stool BA excretion in comparison with saline-administered animals. Potential changes in gut microbiome composition caused by IO must be further studied. Moreover, we have detected for the first time a reduction of liver Cyp8b1, the crucial enzyme for neutral pathway of BA synthesis, in IO rats, and analysed BA spectra in these animals. Combined downregulation of Cyp8b1 and Cyp7a1 was associated with significantly reduced content of faecal DCA, the major representative of neutral pathway of BA synthesis, in IO rats. Moreover, we have detected formation of HDCA, the metabolite of muricholic acid, a typical product of the acidic pathway of BA synthesis.

In conclusion, our data showed that IO results in a complex effect on BA homeostasis combining reduced liver BA synthesis, biliary secretion and reabsorption in the intestine, with reduced uptake to hepatocytes and increased output from hepatocytes to the bloodstream. Complex changes in transporting proteins indicate possibly dysfunctional elimination of numerous substrates including drugs. We propose that these abnormalities developed in response to oxidative stress, and IRP2 repression produced by excessive liver iron deposition. IO markedly influenced faecal excretion of BA, and our data emphasize the necessity for simultaneous evaluation of biliary BA excretion together with their intestinal processing by transporters and the gut microbiome. The interaction between iron and intestinal bacterial colonization requires further study. Finally, we further elaborate the mechanisms responsible for increased plasma cholesterol and bilirubin concentrations accompanying IO, which may serve as a potential therapeutic target.

## Acknowledgement

We gratefully acknowledge the skilful technical assistance of Jitka Hajkova. This study was supported by grants from the Grant Agency of Charles University Progres Q40/05, SVV 260397/2017, and GAUK 5562/18, and by the ERDF-Project PERSONMED No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_048/0007441.

21

## References

- 1 Boyer, J. L. Bile formation and secretion. *Comprehensive Physiology* **3**, 1035-1078, doi:10.1002/cphy.c120027 (2013).
- 2 Vitek, L. & Haluzik, M. The role of bile acids in metabolic regulation. *J Endocrinol* **228**, R85-96, doi:10.1530/joe-15-0469 (2016).
- 3 Halilbasic, E., Fuchs, C., Traussnigg, S. & Trauner, M. Farnesoid X Receptor Agonists and Other Bile Acid Signaling Strategies for Treatment of Liver Disease. *Digestive diseases* **34**, 580-588, doi:10.1159/000445268 (2016).
- 4 Zuo, L., Zhou, T., Pannell, B. K., Ziegler, A. C. & Best, T. M. Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly. *Acta physiologica* **214**, 329-348, doi:10.1111/apha.12515 (2015).
- 5 Brunet, S. *et al.* Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* **29**, 1809-1817, doi:10.1002/hep.510290612 (1999).
- 6 Philippe, M. A., Ruddell, R. G. & Ramm, G. A. Role of iron in hepatic fibrosis: one piece in the puzzle. *World J Gastroenterol* **13**, 4746-4754 (2007).
- 7 Fleming, R. E. & Ponka, P. Iron overload in human disease. *N Engl J Med* **366**, 348-359, doi:10.1056/NEJMra1004967 (2012).
- 8 Batts, K. P. Iron overload syndromes and the liver. *Mod Pathol* **20 Suppl 1**, S31-39, doi:10.1038/modpathol.3800715 (2007).
- 9 Aigner, E., Weiss, G. & Datz, C. Dysregulation of iron and copper homeostasis in nonalcoholic fatty liver. *World Journal of Hepatology* **7**, 177-188, doi:10.4254/wjh.v7.i2.177 (2015).
- 10 Neuschwander-Tetri, B. A. *et al.* Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **385**, 956-965, doi:10.1016/s0140-6736(14)61933-4 (2015).
- 11 Liang, H. *et al.* Effect of iron on cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase expression in alcohol-induced hepatic steatosis in mice. *J Lipid Res* **58**, 1548-1560, doi:10.1194/jlr.M074534 (2017).
- 12 Coppin, H. *et al.* Gene expression profiling of Hfe $^{-/-}$  liver and duodenum in mouse strains with differing susceptibilities to iron loading: identification of transcriptional regulatory targets of Hfe and potential hemochromatosis modifiers. *Genome Biol* **8**, R221, doi:10.1186/gb-2007-8-10-r221 (2007).
- 13 Graham, R. M. *et al.* Hepatic iron loading in mice increases cholesterol biosynthesis. *Hepatology* **52**, 462-471, doi:10.1002/hep.23712 (2010).
- 14 Silva, M. *et al.* Iron dextran increases hepatic oxidative stress and alters expression of genes related to lipid metabolism contributing to hyperlipidaemia in murine model. *BioMed research international* **2015**, 272617, doi:10.1155/2015/272617 (2015).
- 15 Cunnane, S. C. & McAdoo, K. R. Iron intake influences essential fatty acid and lipid composition of rat plasma and erythrocytes. *J Nutr* **117**, 1514-1519 (1987).
- 16 Dabbagh, A. J., Mannion, T., Lynch, S. M. & Frei, B. The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. *Biochem J* **300 ( Pt 3)**, 799-803 (1994).
- 17 Bristow-Craig, H. E., Strain, J. J. & Welch, R. W. Iron status, blood lipids and endogenous antioxidants in response to dietary iron levels in male and female rats. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition* **64**, 324-329 (1994).
- 18 Najafzadeh, H., Jalali, M. R., Morovvati, H. & Taravati, F. Comparison of the prophylactic effect of silymarin and deferoxamine on iron overload-induced hepatotoxicity in rat. *Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology* **6**, 22-26, doi:10.1007/s13181-010-0030-9 (2010).

- 19 Gulec, S., Anderson, G. J. & Collins, J. F. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **307**, G397-G409, doi:10.1152/ajpgi.00348.2013 (2014).
- 20 Anderson, C. P., Shen, M., Eisenstein, R. S. & Leibold, E. A. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 1468-1483, doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.010 (2012).
- 21 Mehta, K. J. *et al.* Iron Enhances Hepatic Fibrogenesis and Activates Transforming Growth Factor-beta Signaling in Murine Hepatic Stellate Cells. *Am J Med Sci* **355**, 183-190, doi:10.1016/j.amjms.2017.08.012 (2018).
- 22 Zinchuk, V., Zinchuk, O. & Okada, T. Experimental LPS-induced cholestasis alters subcellular distribution and affects colocalization of Mrp2 and Bsep proteins: a quantitative colocalization study. *Microsc Res Tech* **67**, 65-70, doi:10.1002/jemt.20184 (2005).
- 23 Cermanova, J. *et al.* Boldine enhances bile production in rats via osmotic and farnesoid X receptor dependent mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* **285**, 12-22, doi:10.1016/j.taap.2015.03.004 (2015).
- 24 Padda, R. S. *et al.* A high-fat diet modulates iron metabolism but does not promote liver fibrosis in hemochromatotic HJV(-)/(-) mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **308**, G251-261, doi:10.1152/ajpgi.00137.2014 (2015).
- 25 Dongiovanni, P., Fracanzani, A. L., Fargion, S. & Valenti, L. Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: a promising therapeutic target. *J Hepatol* **55**, 920-932, doi:10.1016/j.jhep.2011.05.008 (2011).
- 26 Horton, J. D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* **109**, 1125-1131, doi:10.1172/JCI15593 (2002).
- 27 Seo, K. & Shin, S. M. Induction of Lipin1 by ROS-Dependent SREBP-2 Activation. *Toxicological research* **33**, 219-224, doi:10.5487/tr.2017.33.3.219 (2017).
- 28 Dongiovanni, P. *et al.* Statin use and non-alcoholic steatohepatitis in at risk individuals. *J Hepatol* **63**, 705-712, doi:10.1016/j.jhep.2015.05.006 (2015).
- 29 Prasnicka, A. *et al.* Iron depletion induces hepatic secretion of biliary lipids and glutathione in rats. *Biochim Biophys Acta*, doi:10.1016/j.bbailip.2017.09.003 (2017).
- 30 Geier, A., Wagner, M., Dietrich, C. G. & Trauner, M. Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 283-308, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.04.014 (2007).
- 31 Nishanth, R. P. *et al.* C-Phycocyanin inhibits MDR1 through reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 mediated pathways in human hepatocellular carcinoma cell line. *Eur J Pharmacol* **649**, 74-83, doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.011 (2010).
- 32 Madsen, D. C., Chang, L. & Wostmann, B. -Muricholate: a tertiary bile acid of the Wistar rat. *Proc. Indiana Acad. Sci* **84**, 416-420 (1975).
- 33 Eyssen, H. J., De Pauw, G. & Van Eldere, J. Formation of hyodeoxycholic acid from muricholic acid and hyocholic acid by an unidentified gram-positive rod termed HDCA-1 isolated from rat intestinal microflora. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3158-3163 (1999).
- 34 Yu, C. *et al.* Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. *The Journal of biological chemistry* **275**, 15482-15489 (2000).
- 35 Hirsova, P. *et al.* Cholestatic effect of epigallocatechin gallate in rats is mediated via decreased expression of Mrp2. *Toxicology* **303**, 9-15, doi:10.1016/j.tox.2012.10.018 (2013).



**Author contributions:** A.P., L.V., and S.M. analysed the data, and wrote the manuscript; A.P., H.L., F.F.A., J.C., E.D., P.P. , and S.M. performed the *in vivo* experiments and all molecular analyses; J.M. performed the histology analyses; M.H. and K.Z. performed the LC-MS analyses; P.N. performed immunohistochemistry analyses. All authors participated in the revision and approved the final form of the manuscript.

## Methods

### *Animals*

Male Wistar rats (200-250 g) obtained from Velaz (Prague) were used for the experimentation. The rats were fed a standard diet under controlled environmental conditions: 12-h light-dark cycle; temperature  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  with free access to food and water. The rats were randomly divided into groups (n=6). The control group (saline) was administrated i.p. with physiological saline (1 ml/kg) and the IO group was administrated i.p. with 8 doses of gleptoferron (iron-dextran heptonic acid complex, 100 mg/kg) every other day as described previously<sup>18</sup>. Excessive iron accumulation in this model induces a marked increase in hepcidin production, thus significant suppression of ferroportin 1-mediated iron intestinal absorption can be expected<sup>19</sup>. Administration of the 7<sup>th</sup> dose was followed by placement of the rats into metabolic cages where the stool was collected for 24 h. Collected stools were dried for 72 h at room temperature and BA were isolated as described previously<sup>34</sup> with slight modifications. One day after the final i.p. dose, the animals were fasted overnight and the next day they were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.). The common bile duct (for bile collection) and carotid artery (for plasma collection) were cannulated. The bile was collected in pre-weighed tubes for 120 min and a blood sample was taken in the middle of this period. Thereafter, samples from portal vein were taken and the animals were sacrificed by exsanguination through carotid artery, and the livers and ilea were harvested and weighed. Tissue samples, plasma, bile, and extracted stool were snap frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for future analysis. All animals received humane care in accordance with the guidelines set by the institutional Animal Use and Care

Committee of Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Czech Republic. The protocol of the experiment was approved by the same committee (No. 18293/2016-2).

#### *Analytical methods*

Plasma AST/ALT activities and concentrations of iron, ferritin, cholesterol and bilirubin were measured by routine laboratory methods on a Cobas Integra 800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Biliary concentrations of phospholipids were determined by Phosphatidylcholine Assay kit (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). Concentrations of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione were analysed separately using the validated HPLC method with fluorescence detection as described previously<sup>35</sup>. The liver concentration of cholesterol was assayed by the commercial Cholesterol Assay Kit (Cayman Chemical, Michigan, USA) and the concentration of cholesterol in bile was measured by the commercial kit Cholesterol (Erba Lachema, Brno, Czech Republic). BA concentrations in plasma, bile and stool were measured using the LC-MS method described previously<sup>29</sup>.

#### *Quantitative real time RT-PCR*

Gene expression analysis by mRNA quantification was performed by reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) on a 7500 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) as previously detailed<sup>29</sup>. The primers used for analysis are specified in Supplementary Table S1. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) gene was used as a reference for normalizing the data (Applied Biosystems, Foster City, USA).

#### *Western blot*

The procedure was performed as reported previously<sup>29</sup>. Briefly, liver lysates were prepared by homogenization in an ice-cold buffer (25 mM TRIS.HCl, pH= 7.6, 0.1% w/w TRITON-X), containing 0.5 µg/ml benzamidine, aprotinine, leptine and 10 µl/ml phosphate ~~inhibits~~ (Thermo Scientific Prague, Czech Republic), and supernatant prepared by centrifugation of the lysate was separated using SDS-PAGE. Proteins were blotted to PVDF membranes, which were then blocked for 1 h with 5% non-fat

dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20, exposed to antibodies and chemiluminescent reagent, followed by quantification of bands on X-ray films or directly on membranes (Fusion Solo S, Vilber, France). Antibodies are described in the Supplementary Table S2. Equal loading of proteins onto the gel was confirmed by immunodetection of Gapdh and  $\beta$ -actin.

### *Histology*

The livers were collected immediately after death, fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, and cut to 4–5  $\mu$ m thick sections. These were stained with haematoxylin-eosin for assessment of liver morphological changes and with Prussian blue for the presence of iron. Sections were assessed by the same person using a BX-51 light microscope (Olympus) at x100 of original magnification. Ten visual fields were analysed per liver section from each animal.

### *Immunohistochemistry of Mrp2 and Bsep*

Five slides from each animal from each group were taken for immunohistochemical analysis. Serial cross-sections (7  $\mu$ m) were cut on a cryostat and placed on gelatinated slides. Before antigen detection, the slides were incubated with anti-avidin and anti-biotin solutions (Vector Laboratories, USA). Thereafter, the slides were incubated with primary antibodies and after that biotinylated goat anti-rabbit secondary (Jackson ImmunoResearch, USA) (diluted 1:100 in BSA) and ExtraAvidin red fluorochrome CY3 (Sigma Chemical, USA) were used (diluted 1:300 in BSA) for the detection of either Mrp2 or Bsep. For nuclear counterstaining the blue-fluorescent DAPI nucleic acid stain (Invitrogen, Czech Republic) was used. Staining with nonimmune isotype-matched immunoglobulins assessed the specificity of the immunostaining. Primary antibodies included the following: mouse monoclonal antibody anti-Mrp2 (dilution 1:20, 1 h at RT), purchased from Enzo Life Sciences (USA), and rabbit polyclonal antibody anti-Bsep (dilution 1:50, 1 h at RT), purchased from Thermo Scientific (USA). Photo documentation and image digitizing from the microscope were performed with the Olympus AX 70, with a digital VDS Vosskühler (GmbH, Germany) with Image Analysis Software NIS (Laboratory

Imaging, Czech Republic). Canalicular localization of Mrp2 was verified in our previous studies<sup>23,29</sup> using the same antibodies by co-localization with another canalicular protein, Zo-1.

#### *Statistical analysis*

Data are presented as mean  $\pm$  SD. Differences between the groups were assessed by a two test assuming unequal variance. Six animals per group were analysed. Differences were considered significant at *P*-value less than 0.05. All analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (San Diego, USA).