

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmakologie a toxikologie

**VLIV CHOLESTATICKÉHO POŠKOZENÍ JATER  
NA ELIMINACI A TRANSPORT LÉČIV**

**Dizertační práce**

**Mgr. Eva Brčáková**

Školitel: Doc. PharmDr. František Štaud, Ph.D.  
Doktorský studijní program: Farmakologie a toxikologie

Hradec Králové

2009

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně citovány.

Eva Brčáková

## Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali během celého studia, a tak přispěli i k vypracování této práce. Děkuji školiteli Doc. PharmDr. Františku Štaudovi, Ph.D. za vedení mého doktorského studia.

Můj největší dík patří Doc. MUDr. Stanislavovi Mičudovi, Ph.D., mému školiteli – specialistovi, který mě svým odborným a neobvykle přátelským přístupem vedl během celého studia a jehož rady a připomínky mi byly cenným přínosem.

Zvláště bych ráda poděkovala Mgr. Leošovi Fuksovi za cenné konzultace a získání odborných zkušeností v oblasti molekulární biologie, dále MUDr. Jolaně Cermanové, Ph.D. a Prof. MUDr. Jiřině Martínkové, CSc. za podnětnou spolupráci při řešení problematiky mého studia, Bc. Jitce Hájkové, Mgr. Gabriele Kolouchové a Mgr. Petře Hiršové za pomoc v praktické oblasti. Poděkování náleží také Prof. MUDr. Vladimíru Geršlovi, CSc. za možnost pracovat v kolektivu Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové a všem ostatním spolupracovníkům na Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové, kteří se podíleli na vzniku prezentovaných výsledků.

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

Tato dizertační práce byla finančně podpořena výzkumným záměrem MŠMT 0021620820 a granty COST IP05OC062 a GA UK 116807/C/2007.

## Obsah

<b>PODĚKOVÁNÍ .....</b>	<b>3</b>
<b>OBSAH.....</b>	<b>4</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>6</b>
<b>ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>1. MORFOLOGICKÁ STRUKTURA A FUNKCE JATER .....</b>	<b>8</b>
1.1. <i>Morfologická struktura jater .....</i>	8
1.1.1. Hepatocyty.....	10
1.2. <i>Funkce jater.....</i>	12
1.2.1. Přehled základních funkcí jater.....	12
1.2.2. Eliminace léčiv v játrech .....	14
<b>2. TRANSPORT LÉČIV V JÁTRECH .....</b>	<b>15</b>
2.1. <i>Bazolaterální transportní proteiny .....</i>	16
2.1.1. Ntcp.....	16
2.1.2. Oatp.....	17
2.1.3. Oat.....	17
2.1.4. Oct.....	17
2.1.5. MRP1, MRP3–6 .....	17
2.1.6. OST $\alpha/\beta$ .....	18
2.2. <i>Kanalikulární transportní proteiny .....</i>	19
2.2.1. MRP2.....	19
2.2.2. MDR1 .....	20
2.2.3. MDR3.....	20
2.2.4. BSEP .....	20
2.2.5. BCRP.....	21
<b>3. CHOLESTÁZA A JATERNÍ TRANSPORTNÍ SYSTÉMY PRO LÉČIVA .....</b>	<b>22</b>
3.1. <i>Transportéry a patofyziologie cholestázy.....</i>	22
3.2. <i>Spontánní anticholestatická obranná reakce.....</i>	23
<b>4. PREKLINICKÉ MODELY STUDIA VLIVU CHOLESTÁZY NA FARMAKOKINETIKU LÉČIV .....</b>	<b>25</b>
4.1. <i>Metody in vitro .....</i>	26
4.2. <i>Metody in situ .....</i>	26
4.3. <i>Metody in vivo .....</i>	26
4.3.1. Extrahepatální cholestáza .....	27
4.3.2. Intrahepatální cholestáza .....	28
4.3.3. Farmakokinetická analýza .....	29
<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>32</b>
<b>PODÍL NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH.....</b>	<b>34</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>36</b>
<b>P-GLYCOPROTEIN FUNCTION AND EXPRESSION DURING OBSTRUCTIVE CHOLESTASIS IN RATS.....</b>	<b>46</b>

---

KOMENTÁŘ K ČLÁNKU .....	47
<b>INCREASED MELIBIOSE/RHAMNOSE RATIO IN BILE OF RATS WITH ACUTE CHOLESTASIS.....</b>	<b>57</b>
KOMENTÁŘ K ČLÁNKU.....	58
<b>ALTERATION OF METHOTREXATE BILIARY AND RENAL ELIMINATION DURING EXTRAHEPATIC AND INTRAHEPATIC CHOLESTASIS IN RATS .....</b>	<b>66</b>
KOMENTÁŘ K ČLÁNKU .....	67
<b>SOUHRN.....</b>	<b>77</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>82</b>
<b>SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ.....</b>	<b>87</b>
1. PŮVODNÍ PRÁCE PUBLIKOVANÉ V ODBORNÝCH ČASOPISECH.....	88
2. ABSTRAKTY Z MEZINÁRODNÍCH KONFERENCÍ.....	90
3. ABSTRAKTY Z ČESKÝCH A SLOVENSKÝCH KONFERENCÍ.....	92

## Seznam použitých zkratk

ABC	„ATP binding cassette“ - transportéry vážící ATP
BCRP	„Breast cancer resistance protein“ – transportér
BSEP	„Bile salt export pump“ – transportér
CAR	„Constitutive androstane receptor“ – nukleární receptor
CYP	Isoformy cytochromu P450
FXR	„Farsenoid X receptor“ – nukleární receptor
GST	Glutathion-S-transferázy – enzymy II. fáze biotransformace
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL-6	Interleukin 6
MDR	„Multidrug resistance proteins“ – podrodina ABC transportérů
MRP	„Multidrug resistance-associated proteins“ – podrodina ABC transportérů
NTCP	„Na <sup>+</sup> -taurocholate cotransporting polypeptide“ – polypeptid transportující organické anionty
OAT	„Organic anion transporter“ – transportéry organických aniontů
OATP	„Organic anion transporting polypeptide“ – polypeptidy transportující organické anionty
OCT	„Organic cation transporter“ – transportéry organických kationtů
OST $\alpha/\beta$	„Organic solute transporter $\alpha/\beta$ “ – transportéry organických aniontů
PBC	Primární biliární cirhóza
P-gp	P-glykoprotein (MDR1)
PSC	Primární sklerotizující cholangitida
PXR	„Pregnane X receptor“ – nukleární receptor
RT-PCR	„Reverse transcriptase – polymerase chain reaction“
SLC	„Solute carrier“ – rodina transportních proteinů
SULT	Sulfotransferázy – enzymy II. fáze biotransformace
TNF- $\alpha$	„Tumor necrosis factor $\alpha$ “
UGT	Uridin difosfát-glukuronosyltransferázy – enzymy II. fáze biotransformace

### **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.*

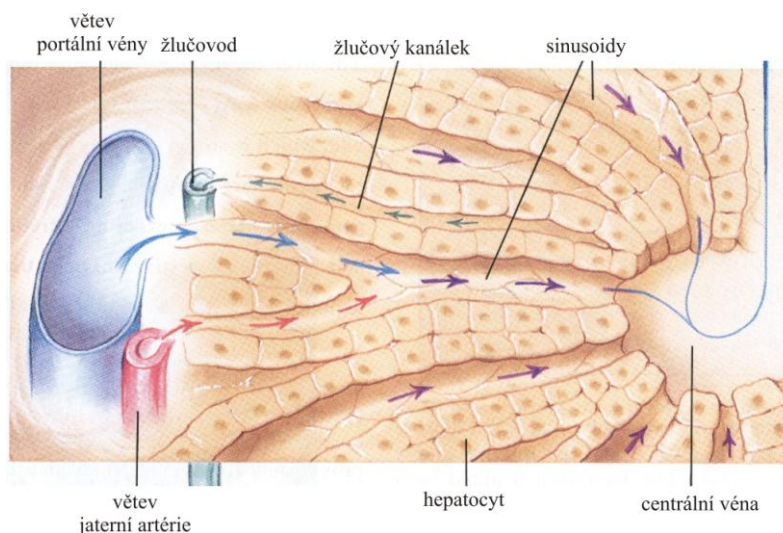
# ÚVOD

## 1. Morfologická struktura a funkce jater

Játra patří mezi životně důležité orgány. Jsou největším orgánem lidského těla, který zaujímá cca 1/50 celkové tělesné hmotnosti dospělého člověka (1200–1400 g u žen a 1400–1800 g u mužů). Kromě tvorby a sekrece žluči mají řadu metabolických, zásobních a endokrinních funkcí. Stěžejní je úloha jater ve vychytávání, detoxikaci a exkreci endogenních a exogenních látek včetně léčiv (Kuntz E. and Kuntz H.-D., 2008b).

### 1.1. Morfologická struktura jater

Jaterní tkáň je tvořena **trámci jaterních buněk** (hepatocytů). Jaterní trámce jsou obvykle tvořeny dvěma řadami těsně k sobě přiléhajících hepatocytů, které se hvězdovitě sbíhají k **centrální vėně**. Mezi trámci probíhají krevní kapiláry, tzv. **jaterní sinusoidy**, kterými protéká smíšená krev z větví portální vėny a jaterní artérie do centrální vėny. Portální vėna přivádí do jater 60–70 % krve s vysokým obsahem živin, ale nízkým obsahem kyslíku. Naopak jaterní artérie dodává krev bohatou na obě složky. Uspořádání hepatocytů v trámčích je takové, že každý je alespoň z jedné strany v kontaktu s krví sinusoidu přes **Disseho prostor**. Stěny sinusoidů jsou fenestrovány, což má význam pro transport látek. Část hepatocytu, která není v kontaktu s Disseho prostorem, tvoří stěnu žlučové kapiláry a na ni navazujícího intralobulárního **žlučovodu** (Obr. 1) (Kuntz E. and Kuntz H.-D., 2008b; Mareš J., 2003).

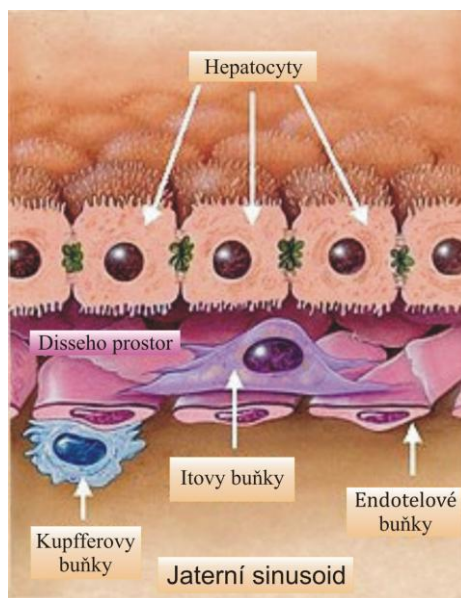


**Obr. 1.** Schéma struktury jater znázorňující tok krve a žluči v jaterním lalůčku. Krev protéká sinusoidy z větve portální vėny do centrální vėny (tzn. z periferie do centra lalůčku). Tok žluče směřuje z centra lalůčku do žlučovodů na periferii. → tok arteriální krve z jaterní artérie; → tok venózní krve z portální vėny; → tok smíšené krve; → tok žluče. Převzato a upraveno z Van De Graaff K. (2001).

Mezi endotelovými buňkami jaterních sinusoid jsou vmezeřeny makrofágy, tzv.



**Kupfferovy buňky** (neparenchymové buňky tvořící přibližně 25–30 % celkové buněčné populace jaterní tkáně). Tyto buňky jsou součástí mononukleárního fagocytárního systému, který pohlcuje látky s potenciálně toxickými účinky přiváděné do jater portální krví, a tak brání jejich přenosu do systémové cirkulace. V Disseho prostoru se také nacházejí hvězdicovité buňky strádající tuk a vitamin A, označované jako lipocyty neboli **Itovy buňky** (Obr. 2).



**Obr. 2.** Schématické znázornění jaterního sinusoidu. Převzato a upraveno z [www.medspace.com](http://www.medspace.com).

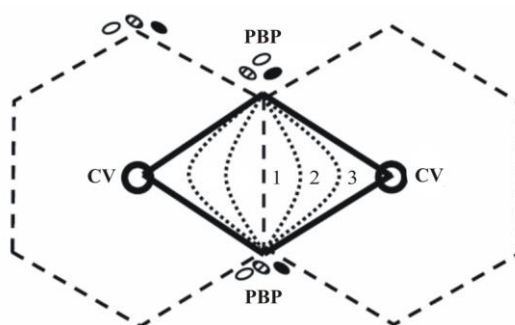
Základní morfologickou jednotku jater představuje **jaterní lalůček** (lalůček centrální vény - *lobulus venae centralis*), který je tvořen trámci jaterních buněk sbíhajících se k centrální véně (Obr. 3). Jaterní lalůček má tvar nepravidelného šestibokého hranolu se zaoblenými stěnami. Na periferii lalůčku jsou umístěny větve jaterní artérie (*arteria interlobularis*), portální vény (*vena interlobularis*) a interlobulární žlučovod, které tvoří jaterní trias (portobiliární prostor) (Kuntz E. and Kuntz H.-D., 2008b; Švíglerová J. and Slavíková J., 2008).

Základní funkční jednotku jater tvoří **primární jaterní acinus** (Obr. 3), který je uspořádán podél osy tvořené jaterní arterií, portální venulou, žlučovodem a lymfatickou cévou. Jaterní acinus je rozdělen do tří zón podle vzdálenosti od cév v ose lalůčku:

- zóna 1, **periportální** - lokalizována v centru acinu, zásobena krví s vyšším obsahem kyslíku a hrající zásadní úlohu v oxidaci látek (např. mastných kyselin), glukoneogenezi, ureagenezi, syntéze bílkovin, cholesterolu a žlučových kyselin a zneškodnění některých toxinů konjugací se síranovým aniontem,

- zóna 2, **intermediální** – přechodná zóna mezi první a třetí zónou,
- zóna 3, **pericentrální** – lokalizována na periferii acinu, zásobena krví s nižším obsahem kyslíku a mající klíčovou úlohu v redukčních reakcích, v glykolýze, lipogenezi, oxidaci cytochromem P450 a konjugaci s glutathionem a kyselinou glukuronovou; tato zóna má nejnižší regenerační kapacitu.

Jelikož intermediální zóna nemá žádné funkční rozhraní, předpokládá se, že jedna polovina této zóny by mohla být přiřazena zóně 1 a druhá polovina k zóně 3. Na řezu má jaterní acinus přibližně tvar dvou trojúhelníků přivrácených k sobě základnami (Obr. 3) (Kuntz E. and Kuntz H.-D., 2008b; Švíglerová J. and Slavíková J., 2008; Newsholme, et al., 2003).

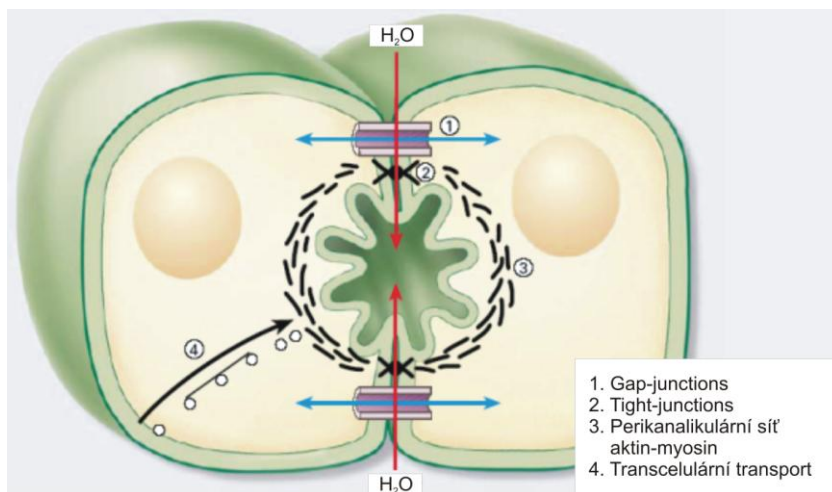


**Obr. 3.** Schéma jaterního lalůčku (vymezen přerušovaně) a primárního jaterního acinu (znázorněn plnou čarou). PBP – portobiliární prostor (jaterní trias), CV – centrální vena, 1 – periportální zóna, 2 – intermediální zóna, 3 – pericentrální zóna. Převzato a upraveno z Švíglerová J. a Slavíková J. (2008).

### 1.1.1. Hepatocyty

Hepatocyty jsou polarizované epiteliální buňky o velikosti 20–40  $\mu\text{m}$ . Zaujímají 80 % objemu jater a 60–65 % celkového počtu buněk jater. Na povrchu hepatocytů, který směřuje do Disseho prostoru, je vyvinuto velké množství mikrokloků, které významně zvětšují plochu pro intenzivnější výměnu látek mezi krví a hepatocyty. Hepatocyty obsahují jádro, které obklopuje cytoplazma s četnými ribozomy, endoplazmatickými retikuly, Golgiho aparátem, mitochondriemi, ale také lysozomy a peroxizomy. Povrch hepatocytu tvoří buněčná membrána, kterou lze rozdělit na dvě morfologicky a funkčně odlišné části (Kuntz E. and Kuntz H.-D., 2008b). Přibližně 85 % celkového povrchu jaterní buňky představuje **sinusoidální (bazolaterální) membrána** s absorpční a sekreční funkcí. Je přivrácená do Disseho prostoru a zajišťuje přímý kontakt mezi hepatocyty a krví jaterních sinusoid (přes fenestrace endotelových sinusoidálních buněk a Disseho prostory). V jaterních sinusoidách vzniká koncentrační gradient, po směru kterého se látky dostávají do hepatocytů přes jejich bazolaterální membránu. U látek s vyšší rozpustností v tucích

a menší molekulou je tento proces realizován zejména pasivní difúzí, zatímco u látek s větší molekulou, nebo látek polárních je zprostředkován prostřednictvím transportního proteinu. **Kanalikulární (apikální) membrána** tvoří 15 % celkového povrchu hepatocytu. Představuje exkretční pól hepatocytu a vytváří lem žlučového kanálku. Exkrece do žluči probíhá v tomto místě proti vysokému koncentračnímu gradientu.



**Obr. 4.** Buněčná komunikace v hepatocytech. „Gap-junctions“ usnadňují intercelulární komunikaci (např. přes difúzi sekundárních posílů, modré šipky), „tight junctions“ uzavírají kanalikulární lumen a brání tak návratu složek žluči do plazmy. Kanalikulární žluč vzniká osmotickou filtrací vody a malých elektrolytů (červené šipky) přes hepatocyty a těsné spoje jako odpověď na osmotický gradient vytvořený aktivními transportními systémy. Perikanalikulární síť aktin–myosin zprostředkovává kanalikulární kontrakce, které usnadňují tok žluče z pericentrálního do periportálního regionu. Transcelulární na mikrotubulech závislý vezikulární transport zajišťuje přenos makromolekul a rozpuštěných látek (černá šipka). Převzato a upraveno z Trauner, et al. (1998).

Hranice mezi bazolaterální a kanalikulární membránou tvoří mezibuněčné spoje typu „**tight-junctions**“ (těsné spoje), které uzavírají kanalikulární lumen a brání tak návratu složek žluči do plazmy (Kuntz E. and Kuntz H.-D., 2008b; Švíglerová J. and Slavíková J., 2008; Trauner, et al., 1998). Hepatocyty dále obsahují „**gap-junctions**“, které usnadňují intercelulární komunikaci (např. skrze difúzi sekundárních posílů, šíření akčního potenciálu). Oba typy spojení hepatocytů vytvářejí tzv. **hematobiliární bariéru**, která společně s transportními procesy v hepatocytech řídí tvorbu žluče. Je prokázáno, že těsné spoje regulují pohyb iontů, vody a rozpuštěných látek paracelulárními prostory mezi hepatocyty, a proto při jakémkoliv transportu léčiv do žluče je nutno současně uvážit i funkčnost dané bariéry. Pro zachování strukturální a funkční integrity hematobiliární bariéry je důležitá perikanalikulární síť aktin–myosin, která zprostředkovává kanalikulární kontrakce a usnadňuje tok žluče z pericentrálního do periportálního regionu. Přenos

makromolekul a rozpuštěných látek je v hepatocytech zprostředkován transcelulární cestou (Obr. 4) (Crawford, 1996;Trauner, et al., 1998).

## 1.2. Funkce jater

Mezi základní funkce jater patří metabolismus sacharidů, lipidů a proteinů, tvorba a sekrece žluči, imunitní, endokrinní a zásobní funkce, detoxikace a exkrece látek, syntéza hemokoagulačních faktorů, tvorba a zánik červených krvinek. Současně jsou játra také krevním rezervoárem, jelikož jaterní cévy obsahují přibližně 450 ml krve.

### 1.2.1. Přehled základních funkcí jater

**Metabolismus sacharidů.** Játra jsou významným orgánem regulace metabolismu sacharidů. Udržují plazmatickou koncentraci glukózy ve fyziologických mezích. V případě potřeby jsou schopna vychytávat až 87 % glukózy dodané portální krví. Pro udržení glukózové homeostázy zajišťují:

- glukoneogenezi,
- glykolýzu,
- skladování glykogenu,
- glykogenezi,
- glykogenolýzu (Graham, 2009;Raddatz and Ramadori, 2007;Voet D. and Voetová J.G., 1995).

**Metabolismus lipidů.** V metabolismu lipidů zastávají játra různé funkce:

- vychytávání,  $\beta$ -oxidace a přeměna volných mastných kyselin,
- syntéza ketolátek jako zdroje energie při hypoglykémii,
- syntéza plazmatických lipoproteinů,
- přeměna lipoproteinů,
- katabolismus LDL („low density lipoprotein“), VLDL („very low density lipoprotein“) a chylomikronových zbytků,
- syntéza a odbourávání cholesterolu,
- liponeogeneze (Canbay, et al., 2007;Voet D. and Voetová J.G., 1995).

**Metabolismus aminokyselin a proteinů.** Aminokyseliny jsou distribuovány do svalů (80 %), jater (15 %) a plazmy (5 %). Podíl volných aminokyselin je pouze 0,5 %. V játrech dochází k degradaci všech esenciálních aminokyselin kromě leucinu, izoleucinu a valinu, které jsou rozkládány ve svalech. V játrech probíhá:

- deaminace aminokyselin,

- tvorba močoviny z CO<sub>2</sub> a dvou molekul amoniaku vzniklého při deaminaci aminokyselin,
- vzájemná přeměna aminokyselin,
- tvorba plazmatických bílkovin vyjma imunoglobulinů, syntéza transportních proteinů – albumin, ceruloplasmin, haptoglobin, globulin vázající tyroxin, globulin vázající retinol, transkobalamin, transferin aj. (Kuntz E. and Kuntz H.-D., 2008a; Voet D. and Voetová J.G., 1995).

**Metabolismus žlučových kyselin.** Primární žlučové kyseliny (kyselina cholová a chenodeoxycholová) vznikají v hepatocytech jako degradační produkty cholesterolu činností mikrozomálních, peroxizomálních a mitochondriálních enzymů. Zde jsou konjugovány s taurinem a glycinem. Činností anaerobních mikroorganismů v ileus, caecus a colon jsou primární žlučové kyseliny konvertovány na sekundární žlučové kyseliny (kyselina deoxycholová, lithocholová a ketolithocholová). Následně je kyselina lithocholová enzymaticky konvertována na kyselinu sulfolithocholovou v játrech a kyselina ketolithocholová je přeměněna na kyselinu ursodeoxycholovou v játrech i ve střevě. Většina žlučových kyselin podléhá enterohepatální cirkulaci (cca 90 % secernovaných kyselin do žluče). Pouze malá část těchto kyselin se nevstřebává ve střevě a je vyloučena z organismu stolicí (Hofmann, 1990; Kuntz E. and Kuntz H.-D., 2008a; Voet D. and Voetová J.G., 1995).

**Metabolismus bilirubinu.** Bilirubin vzniká degradací hemu z rozpadlých erytrocytů v játrech (hepatocyty, Kupfferovy buňky), slezině, ledvinách a kostní dřeni. Jedná se o nepolární, ve vodě nerozpustnou, lipofilní látku, která je pro organismus potenciálně toxická (Mareš J., 2003). Ve vazbě na plazmatický albumin je transportován přes sinusoidální membránu do hepatocytů prostřednictvím Na<sup>+</sup>-závislého transportního proteinu NTCP („Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide“) a Na<sup>+</sup>-nezávislých transportérů z rodiny OATP ("Organic anion transporting polypeptide"). V hladkém endoplazmatickém retikulu hepatocytu dochází k jeho konjugaci s kyselinou glukuronovou za účasti enzymu glukuronyltransferázy. Následně vzniká ve vodě rozpustný bilirubindiglukuronid, který je vylučován nadrobinou MRP („Multidrug resistance-associated protein“) transportérů přes kanalikulární membránu hepatocytů do žluče (Konrádová V., et al., 2000).

**Metabolismus porfyrinu.** Porfyriny jsou prostetickou skupinou hemoproteinů, které zahrnují např. hemoglobin, myoglobin, cytochromy, oxygenázy, katalázy aj. K syntéze hemu dochází především v kostní dřeni (80–85 %) a v játrech (15 %), přičemž

dvě třetiny hemu vytvořeného v mitochondriích jater jsou využity pro tvorbu cytochromu P450 (Kuntz E. and Kuntz H.-D., 2008a).

**Endokrinní funkce.** Játra přispívají k udržení hormonální homeostázy, ale na druhou stranu jsou jimi i ovlivňovány. Mezi tyto hormony patří inzulin, glukagon, katecholaminy, glukokortikoidy, androgeny, estrogeny a progesteron. Játra mimo jiné zasahují také do metabolismu vitamínu D prostřednictvím hydroxylace cholekalciferolu (vitamin D<sub>3</sub>).

**Zásobní funkce.** Játra jsou rezervoárem vitamínu A, D a B12, iontů mědi a železa, které se vyskytuje ve formě feritinu a hemosiderinu (Kuntz E. and Kuntz H.-D., 2008a; Švíglerová J. and Slavíková J., 2008).

### 1.2.2. Eliminace léčiv v játrech

Játra jsou centrálním orgánem zajišťujícím metabolismus endogenních látek (např. žlučových kyselin, bilirubinu) a xenobiotik (alkoholu, léčiv, toxinů aj.), tak i jejich následnou exkreci do žluče. Tomu odpovídá bohatá enzymová výbava a přítomnost širokého spektra transportních proteinů. Jednotlivé děje probíhají v kaskádě: vychytávání do jater – metabolismus – eflux z jater (Funk, 2008). Látky jsou do jater přiváděny především prostřednictvím portální cirkulace, která tvoří cca 60–70 % krevního zásobení tohoto orgánu.

Při difúzi, resp. transportu v intracelulárním prostoru se dostávají látky do kontaktu s enzymovými systémy, které se ujímají jejich biotransformace na dané metabolit/y. Jaterní metabolismus probíhá ve dvou fázích.

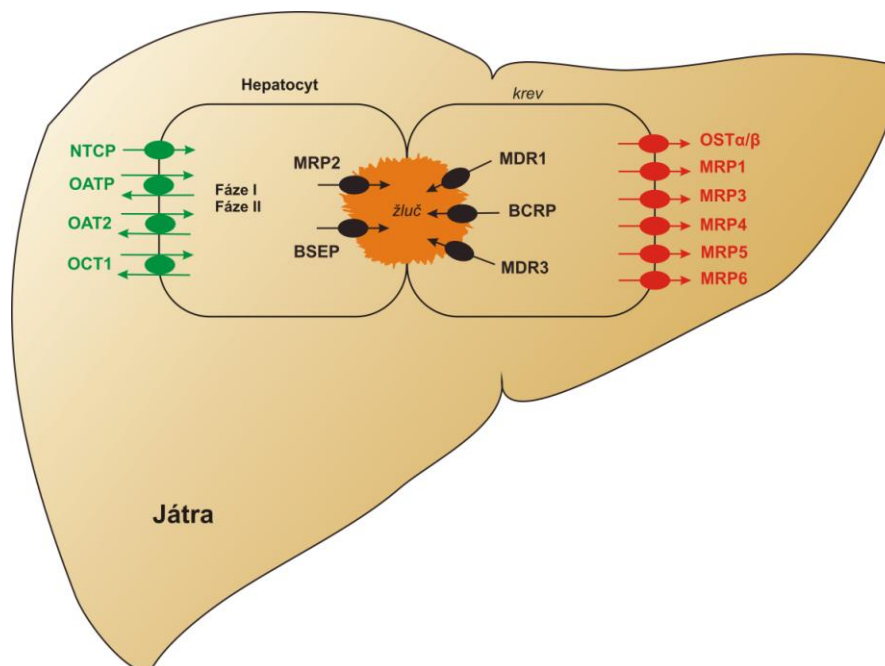
- **Fáze I** je založena na řadě reakcí (oxidace, redukce, hydrolýza), jejíž podstatou je malá změna ve struktuře molekuly léčiva (dealkylace, hydroxylace, oxidace, deaminace, hydrolýza). Účelem těchto reakcí je zvýšení hydrofility látek nebo odhalení nukleofilních skupin (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -COOH) pro následné konjugační děje. Základním enzymovým systémem této fáze jsou isoformy cytochromu P450. Na I. fázi biotransformace léčiv se mohou podílet také např. esterázy (např. pseudocholinesteráza), oxidázy (např. xantinoxidáza), nebo reduktázy (např. epoxid reduktáza).
- **Fáze II** spočívá v konjugaci mateřské látky nebo jejího metabolitu s produkty intermediárního metabolismu: kyselinou glukuronovou, glutathionem, síranovým aniontem, kyselinou octovou, nebo některými aminokyselinami (glycinem, glutaminem). Tomu odpovídá bohatá enzymová výbava, především vysoký obsah

UGT (UDP-glukuronosyltransferázy), GST (glutathion-S-transferázy), SULT (sulfotransferázy) a NAT (N-acethyltransferázy) v játrech (Evans and Relling, 1999;Strolin and Baltes, 2003;Zamek-Gliszczyński, et al., 2006).

Následně opouští léčivo, popř. jeho metabolity hepatocyty buď prostřednictvím zpětného transportu do krve, který probíhá po směru koncentračního gradientu, nebo je vylučováno do žluče většinou proti koncentračnímu gradientu. Tento proces je uskutečněn prostřednictvím jednosměrných, ABC transportérů („ATP binding cassette proteins“), které jsou lokalizovány na kanalikulární membráně a jejichž funkce je závislá na dodávce energie ve formě ATP (Funk, 2008).

## 2. Transport léčiv v játrech

Játra se podílejí na metabolismu a/nebo exkreci mnoha endogenních a exogenních látek. Lipofilní molekuly se mohou pohybovat z plazmy do jaterního cytosolu prostou nebo facilitovanou difúzí. Řada polárních organických látek stejně jako lipofilních molekul je nicméně transportována prostřednictvím transportních proteinů lokalizovaných na bazolaterální membráně hepatocytů. Do tohoto procesu se zapojují především transportéry ze skupiny SLC (Obr. 5). Jednosměrné nebo obousměrné bazolaterální transportní systémy přenášejí své substráty z jaterního cytosolu do krve, zatímco kanalikulární transportní systémy zajišťují biliární exkreci endogenních látek, léčiv a jejich metabolitů. Zde se uplatňují především ABC transportéry, které exportují své substráty do žluče proti koncentračnímu gradientu, čímž snižují koncentraci svých substrátů v hepatocytu a připravují koncentrační gradient na bazolaterální membráně (Faber, et al., 2003). ABC transportéry lokalizované na bazolaterální membráně hepatocytů (MRP1, MRP3–6 - „Multidrug resistance-associated protein 1, 3–6“) zvyšují svoji expresi během různých jaterních onemocnění (např. při cholestáze) a vedou ke zvýšenému exportu látek z hepatocytů do krve, čímž chrání hepatocyty před toxickým vlivem kumulujících se látek a jednak přispívají k přesměrování snížené jaterní exkrece na exkreci renální (Trauner and Boyer, 2003).



**Obr. 5.** Transportní proteiny na membránách hepatocytů. Léčiva jsou vychytávána do hepatocytů NTCP („Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide“) transportérem a skupinou OATP („Organic anion transporting polypeptide“) transportérů na bazolaterální membráně hepatocytu. OAT2 zajišťuje vychytávání látek charakteru organických aniontů a OCT1 látek charakteru organických kationtů s menší molekulou. Transport do žluče je zprostředkován kanalikulárním BSEP („Bile salt export pump“), MRP2 („Multidrug resistance-associated protein 2“) a BCRP („Breast cancer resistance protein“) proteinem. MDR3 („Multidrug resistance protein 3“) přenáší fosfatidylcholin, který vytváří ve žluči smíšené micely společně se žlučovými kyselinami a cholesterolem. MDR1 („Multidrug resistance protein 1“) transportuje léčiva charakteru organických kationtů. MRP1, MRP3, MRP4, MRP5 a MRP6 („Multidrug resistance-associated protein 1, 3, 4, 5 a 6“) a OST $\alpha/\beta$  („Organic solute transporter  $\alpha/\beta$ “) lokalizované na bazolaterální membráně hepatocytu představují alternativní cestu exkrece žlučových kyselin a dalších látek charakteru organických aniontů do systémové cirkulace. Převzato a upraveno ze Zollner a Trauner (2006).

## 2.1. Bazolaterální transportní proteiny

Transportní systémy lokalizované na bazolaterální (sinusoidální) membráně hepatocytů slouží pro obousměrný pohyb léčiv mezi krví a hepatocyty. Přehled bazolaterálních transportérů a seznam jejich základních substrátů znázorňuje Tab. 1.

### 2.1.1. NTCP

NTCP („Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide“; Slc10A1) je bazolaterální transportér, který přenáší z portální krve konjugované žlučové kyseliny a s nižší afinitou i nekonjugované. Hnací silou je kotransport Na<sup>+</sup> s taurocholátem v poměru 2:1 (Meier, et al., 1997). Substráty pro NTCP jsou především žlučové kyseliny, avšak jeho význam pro kinetiku léčiv je malý.



### 2.1.2. OATP

OATP („Organic anion transporting polypeptide“; SLCO1A) přenašeče reprezentuje rodina proteinů s významnou úlohou pro transport léčiv. Funkce těchto transportérů je nezávislá na přítomnosti  $\text{Na}^+$ . Tyto proteiny zprostředkovávají obousměrný transport látek, kdy hnací silou může být protitransport bikarbonátu, glutathionu a/nebo glutathion-S-konjugátu (Hagenbuch and Meier, 2004; Li, et al., 2000). Do současnosti bylo identifikováno více než 50 členů této skupiny, z kterých je exprimováno u člověka 11. Mezi nejdůležitější zástupce této rodiny transportérů patří OATP1A2 (SLCO1A2), OATP1B1 (SLCO1B1), OATP1B3 (SLCO1B3) a OATP2B1 (SLCO2B1). OATP1B1 je hlavním transportním proteinem pro vychytávání léčiv v játrech. Všechny výše zmíněné transportéry kromě OATP2B1 se účastní přenosu žlučových kyselin do hepatocytů (Kullak-Ublick, et al., 2001). Substrátová specifita těchto transportérů je široká a kromě spektra organických aniontů zahrnuje i látky bazické povahy s větší molekulou (kationty II. typu, např. chinidin) a neutrální steroidy – Tab. 1 (Hagenbuch and Gui, 2008).

### 2.1.3. OAT

Rodina SLC22A („Organic anion transporter“) zahrnuje transportéry, které byly poprvé klonovány v ledvinách. OAT1 (SLC22A6) a OAT3 (SLC22A8) jsou velmi důležité pro transport léčiv v buňkách proximálních ledvinných tubulů. Hrají významnou roli v exkreci celé řady endogenních látek i léčiv, např. nesteroidních protizánětlivých látek, urikosurik a diuretik (Koepsell and Endou, 2004). V játrech je lokalizován především OAT2 transportní protein (SLC22A7) (van Montfoort, et al., 2003; Zair, et al., 2008). Tyto transportéry jsou schopné přemísťovat organické anionty oběma směry.

### 2.1.4. OCT

Skupina OCT („Organic cation transporter“; SLC22A) transportérů zprostředkovává obousměrný přenos organických kationtů s menší molekulou. Hnací silou transportu OCT je v tomto případě pouze elektrochemický gradient přenášeného kationtu. Hlavním zástupcem této skupiny transportérů v lidských játrech je OCT1 (SLC22A1). OCT2 (SLC22A2) je exprimován v ledvinách a OAT3 (SLC22A3) je rozšířen i v jiných tkáních (Koepsell, et al., 2003).

### 2.1.5. MRP1, MRP3–6

Tyto transportéry (MRP1, MRP3, MRP4, MRP5 a MRP6) z ABCC podrodiny jsou

lokalizovány na bazolaterální membráně hepatocytů a jejich hlavní úlohou je eflux endogenních látek a xenobiotik z hepatocytů zpět do krve. MRP1 („Multidrug resistance-associated protein 1“; ABCC1) je v lidských hepatocytech uchováván převážně v intracelulárních vezikulech a vyžaduje, aby látky, jež jsou jeho substráty, byly ve formě konjugátů s glutathionem, kyselinou glukuronovou nebo sírovou (Jedlitschky, et al., 1997). Expres MRP3 („Multidrug resistance-associated protein 3“; ABCC3) a MRP4 („Multidrug resistance-associated protein 4“; ABCC4) je za normálních podmínek nízká a stoupá při cholestáze, resp. deficitu MRP2. Jejich zvýšená exprese a následně zvýšený eflux substrátů zpět do krve představuje kompenzační mechanismus poškozené biliární exkrece intracelulárně se kumulujících látek typu žlučových kyselin a konjugovaného bilirubinu (Zollner and Trauner, 2008). MRP4 a MRP5 („Multidrug resistance-associated protein 5“; ABCC5) mají schopnost transportovat cyklické nukleotidy cAMP (cyklický adenosin-3',5'-monofosfát) a cGMP (cyklický guanosin-3',5'-monofosfát) (Reid, et al., 2003). MRP6 („Multidrug resistance-associated protein 6“; Abcc6) je exprimován na bazolaterální i kanalikulární membráně potkaních hepatocytů. Jeho role v jaterní exkreci léčiv se zdá být minoritní, jelikož netransportuje látky charakteru aniontů (Madon, et al., 2000). Ačkoli byly u lidí detekovány vysoké hladiny MRP6 mRNA v játrech a ledvinách, jeho role pro transport léčiv zůstává neobjasněná (Kool, et al., 1999).

#### **2.1.6. OST $\alpha/\beta$**

OST $\alpha/\beta$  („Organic solute transporter  $\alpha/\beta$ “) jsou transportéry exprimované kromě jater také v ileu a ledvinách. Jejich úlohou je přenášet žlučové kyseliny, steroidy a další organické látky přes bazolaterální membránu epitelálních buněk těchto orgánů. V cholangiocytech a buňkách proximálních tubulů ledvin podporují funkci ASBT („Apical sodium-dependent bile salt transporter“) transportéru, hlavního proteinu pro reabsorpci žlučových kyselin z těchto buněk (Boyer, et al., 2006).

**Tab. 1.** Bazolaterální lékové transportní proteiny hepatocytů. T<sub>3</sub> – trijodtyronin, T<sub>4</sub> – tyroxin, LTC<sub>4</sub> – leukotrien C<sub>4</sub>, cAMP - cyklický adenosin-3',5'-monofosfát, cGMP - cyklický guanosin-3',5'-monofosfát, BQ-123 - [cyklo {D-Trp-D-Asp-L-Pro-D-Val-L-Leu}]

Symbol genu	Protein	Substráty
<i>SLCO1A1</i>	NTCP	žlučové kyseliny, estron-3-sulfát, sulindak, rosuvastatin
<i>SLCO1A2</i>	OATP1A2	žlučové kyseliny, estron-3-sulfát, T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub> , fexofenadin, oubain, chinin
<i>SLCO1B1</i>	OATP1B1	žlučové kyseliny, bilirubin, estron-3-sulfát, T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub> , ouabain, statiny, sartany, rifampicin
<i>SLCO1B3</i>	OATP1B3	žlučové kyseliny, bilirubin, estron-3-sulfát, LTC <sub>4</sub> , T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub> , digoxin, rifampicin, metotrexát, fluvastatin, valsartan, olmesartan, digoxin
<i>SLCO2B1</i>	OATP2B1	estron-3-sulfát, benzylpenicilin, pravastatin, fluvastatin, digoxin
<i>SLC22A7</i>	OAT2	prostaglandiny, p-aminohipurát, salicyláty, tetracykliny, zidovudin
<i>SLC22A1</i>	OCT1	acetylcholin, kortikosteron, progesteron, metformin, chinidin, verapamil, acyklovir, ritonavir, ranitidin
<i>ABCC1</i>	MRP1	daunorubicin, doxorubicin, etoposid, vinkristin
<i>ABCC3</i>	MRP3	sulfatované žlučové kyseliny, metotrexát
<i>ABCC4</i>	MRP4	konjugované žlučové kyseliny, cAMP, cGMP, metotrexát
<i>ABCC5</i>	MRP5	cAMP, cGMP
<i>ABCC6</i>	MRP6	BQ-123
<i>OST<math>\alpha/\beta</math></i>	OST $\alpha/\beta$	žlučové kyseliny, estron-3-sulfát, prostaglandin E <sub>2</sub> , digoxin

## 2.2. Kanalikulární transportní proteiny

Transportní systémy lokalizované na kanalikulární (apikální) membráně hepatocytů slouží pro eflux (exkreci) endogenních látek a xenobiotik z hepatocytů do žluče. Přehled kanalikulárních transportérů a seznam jejich základních substrátů sumarizuje Tab. 2.

### 2.2.1. MRP2

MRP2 („Multidrug resistance-associated protein 2“; ABCC2) je z největší šíře studovaný apikální transportér z rodiny MRP transportérů, který přenáší látky typu organických aniontů, jako jsou soli žlučových kyselin, konjugáty s glutathionem, glukuronidem a sulfátové konjugáty, ale i nekonjugovaná léčiva (např. metotrexát, pravastatin, azitromycin) (Fuksa L, et al., 2006; Jedlitschky, et al., 2006; Nies and Keppler,

2007). V játrech MRP2 zajišťuje jeden ze základních mechanismů tvorby žluče, která je nezávislá na sekreci osmoticky aktivních solí žlučových kyselin. Význam této funkce byl dokumentován výrazným snížením tvorby žluče u Mrp2 deficitních potkanů (Ito, et al., 1997; Paulusma, et al., 1996). U člověka byl popsán geneticky podmíněný deficit MRP2, který se projevuje konjugovanou hyperbilirubinémií označovanou jako Dubin-Johnsonův syndrom (Konig, et al., 1999). U těchto pacientů se zvyšují hladiny MRP3 proteinu jako kompenzační mechanismus na nedostatečnou biliární exkreci organických aniontů (Trauner, et al., 1999; Zollner and Trauner, 2006).

### 2.2.2. MDR1

P-gp (P-glykoprotein; ABCB1) je vůbec prvním objeveným lékovým transportérem (Juliano and Ling, 1976) a je sledován především pro souvislost s mnohočetnou lékovou rezistencí nádorů vůči chemoterapeutikům – např. paklitaxelu, antracyklinům, vinkristinu a vinblastinu. P-gp transportuje primárně hydrofobní kationty, avšak dokáže s nízkou efektivitou transportovat anionty se silným nábojem – např. metotrexát (Chan, et al., 2004). Jelikož je P-gp lokalizován na kanalikulárních membránách buněk tkání s exkrecí funkcí (hepatocyty, enterocyty, buňky proximálních tubulů ledvin), resp. bariérovou funkcí (placenta, hematoencefalická a testikulární bariéra), má významnou roli ve farmakokinetice řady léčiv, která jsou jeho substrátem. Kromě nádorové rezistence tak hraje klíčovou roli v obraně organismu před účinkem xenobiotik. V hepatocytech a buňkách proximálních tubulů ledvin napomáhá exkreci svých substrátů, ve sliznici tenkého střeva brání vstřebávání toxinů/léčiv a omezuje distribuci xenobiotik do vitálně důležitých a citlivých orgánů a tkání (např. mozku, varlat, plodu).

### 2.2.3. MDR3

MDR3 (ABCB4) slouží především jako transportér fosfolipidů (např. fosfatidylcholinu) do žluče, čímž dochází k vytváření micel a následně k ochraně před škodlivým detergentním působením žlučových kyselin na okolní tkáň. Význam MDR3 v eliminaci léčiv je minoritní, nicméně s nízkou afinitou je schopen transportovat některé kationty typu digoxinu, paklitaxelu nebo vinblastinu (Smith, et al., 2000).

### 2.2.4. BSEP

BSEP (ABCB11) je hlavní kanalikulární transportér pro exkreci konjugovaných a nekonjugovaných žlučových kyselin z hepatocytu do žluče, čímž se stává primárně

zodpovědným za samotnou tvorbu žluče a svojí funkcí přímo navazuje na činnost bazolaterálně lokalizovaného NTCP (Byrne, et al., 2002). Porucha exprese nebo inhibice jeho funkce je jedním ze základních mechanismů intrahepatální cholestázy, což je u lidí spojeno s výskytem progresivní familiární intrahepatální cholestázy 2. typu (PFIC2). U těchto pacientů jsou koncentrace žlučových kyselin ve žluči < 1 % oproti normálním hladinám v důsledku genové mutace ABCB11 a deficitu, resp. absence BSEP na kanalikulární membráně hepatocytu. Některé, jinak klinicky nevýznamné, mutace BSEP vytvářejí predispozici ke vzniku cholestatické žloutenky v těhotenství (Byrne, et al., 2009). Ačkoli tento protein nemá klíčovou roli v jaterní exkreci xenobiotik, může mít významný vliv na řadu lékových interakcí a následnou hepatotoxicitu.

### 2.2.5. BCRP

BCRP („Breast cancer resistance protein“) je transportér původně identifikovaný v nádorových buňkách. Tento protein dimerizuje v plazmatické membráně a zprostředkovává nádorovou rezistenci k léčivům jako mitoxantron, doxorubicin, daunorubicin, irinotekan aj. (Staud and Pavek, 2005). BCRP je lokalizován v mnoha tkáních: placenta, tenké a tlusté střevo, hepatocyty, žilní a kapilární endotel (Maliepaard, et al., 2001). V hepatocytech je lokalizován na kanalikulární membráně a slouží zde jako efluxní cesta pro řadu steroidů, xenobiotik a jejich konjugovaných metabolitů (sulfátů a glukuronidů) (Enokizono, et al., 2007; Zamek-Gliszczyński, et al., 2006).

**Tab. 2.** Kanalikulární lékové transportní proteiny hepatocytů. LTC4 – leukotrien C4

Symbol genu	Protein	Substráty
<i>ABCC2</i>	MRP2	bilirubin, cisplatina, doxorubicin, indinavir, indometacin, glibenklamid, LTC4, metotrexát, pravastatin, většina léčiv a jejich metabolity konjugované s kyselinou glukuronovou a glutathionem
<i>ABCB1</i>	MDR1	antracykliny, digoxin, fexofenadin, imunosupresiva, losartan, rhodamin 123, steroidní hormony, takrolimus, verapamil, aj.
<i>ABCB4</i>	MDR3	fosfolipidy
<i>ABCB11</i>	BSEP	konjugované a nekonjugované žlučové kyseliny, pravastatin, sulindak
<i>ABCG2</i>	BCRP	daunorubicin, doxorubicin, estron-3-sulfát, irinotekan, kyselina listová, mitoxantron, topotekan aj.

### 3. Cholestáza a jaterní transportní systémy pro léčiva

Cholestáza (z řeckého *chole*, žluč a *stasis*, stáza, zastavení) je porucha vylučování žluči do střeva na různých úrovních hepatobiliárního systému. Je-li překážka ve velkých žlučovodech, tzv. **extrahepatální cholestáza**, dochází k rozšíření biliárního traktu nad překážkou. Vyskytuje se především u cholelitiázy, tumorů pankreatu, cholangiogenních tumorů obturujících terminální část žlučovodu, stenóz a tumorů Vaterovy papily (Vaňásek T., 2007). Pokud je příčina cholestázy uvnitř jater, tzv. **intrahepatální cholestáza**, nejsou žlučovody dilatovány. Příčina intrahepatální cholestázy může být jak v intrahepatálních žlučovodech (např. primární biliární cirhóza), tak v hepatocytech (např. akutní virová hepatitida s cholestatickými rysy) (Boyer, 2007;Rodriguez-Garay, 2003). Akutní intrahepatální cholestáza provází virové hepatitidy, polékové a toxická poškození jater, alkoholické onemocnění jater a těhotenský ikterus. Chronická intrahepatální cholestáza je znakem primární biliární cirhózy (PBC), primární sklerotizující cholangitidy (PSC), polékových poškození a chronické rejekce jaterního štěpu. V etiologii cholestáz jednoznačně dominují cholestázy extrahepatální, kde převažující část, až 50 %, tvoří maligní onemocnění, na druhém místě je cholelitiáza. Velmi častou příčinou cholestázy jsou septické stavy a polékové cholestázy podílející se necelými 10 %, virové a autoimunitní hepatitidy s 5 – 7 % (Mareček Z., 2007).

Mezi klinické projevy cholestázy patří žloutenka, pruritus a acholická stolice se steatoreou. Při delším trvání se rozvíjejí hypovitaminózy vitaminu A, D, E a K. Játra jsou palpačně zvětšená a tuhá. V laboratoři dominuje zvýšení sérové hladiny konjugovaného bilirubinu, ALP (alkalické fosfatázy), GMT ( $\gamma$ -glutamyl transpeptidázy), žlučových kyselin a cholesterolu. Jaterní transaminázy AST (S-aspartátaminotransferáza) a ALT (S-alaninaminotransferáza) se zvyšují později. V moči je přítomný bilirubin (Rodriguez-Garay, 2003;Vaňásek T., 2007). Kumulující se žlučové kyseliny jako silné detergenty mohou zapříčinit strukturální i funkční poškození membrán většiny tkání. Kromě toho zadržené žlučové kyseliny snižují *de novo* syntézu žlučových kyselin (Rodriguez-Garay, 2003).

#### 3.1. Transportéry a patofyziologie cholestázy

Základním patofyziologickým důsledkem cholestázy je jaterní a následně i systémová kumulace toxických látek typu žlučových kyselin a bilirubinu (Trauner, et al., 1997). Tyto látky mohou v závislosti na intenzitě a době trvání cholestázy podmínit vážné poškození organismu. Ve snaze kompenzovat vzniklou situaci se aktivují tzv. spontánní

anticholestatické obranné mechanismy, jejichž účelem je zmírnit stav pomocí alespoň částečného přeměrování exkrece daných látek z jater do ledvin (Lee and Boyer, 2000). Podstatou tohoto procesu je změna exprese, lokalizace a funkce odpovědných transportních proteinů v játrech a ledvinách. Změněná exprese hepatobiliárních transportních systémů na úrovni proteinu tak může být primární příčinou cholestázy, nebo sekundárním důsledkem adaptivních změn exprese transportérů. (Roma, et al., 2008b). Změny exprese transportérů jako primární příčinu cholestázy lze popisovat u dědičných forem onemocnění (např. progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 2 - mutace BSEP transportéru, Dubin-Johnson syndrom – mutace MRP2). Ve většině případů ale dochází ke změnám exprese transportérů sekundárně jako odpověď na retenci toxických biliárních látek (žlučových kyselin, bilirubinu). Látky s cholestatickým efektem (např. léčiva, hormony, prozánětlivé cytokiny) mohou buď snižovat expresi transportérů, nebo přímo inhibovat jejich funkci. Typickými příklady léčiv s cholestatickým efektem jsou rifamycin, cyklosporin A nebo glibenklamid. Tyto látky přímo omezují sekreci žlučových kyselin inhibicí BSEP (Stieger, et al., 2000). Většina cholestatických onemocnění vzniká v důsledku obstrukce (např. extrahepatální biliární obstrukce způsobená nádory, kameny) nebo destrukce žlučovodu (PSC, PBC). Snížená exprese transportních systémů u těchto onemocnění vysvětluje, alespoň částečně, poškození transportní funkce, což má za následek další prohlubení cholestázy. Ne všechny změny exprese transportních proteinů mají pro-cholestatický nebo negativní charakter. Zatímco některé přispívají k cholestáze, většina změn exprese transportérů v játrech a extrahepatálních tkáních (např. v ledvinách) funguje jako kompenzační mechanismus, který je alternativní cestou exkrece pro kumulující se toxické látky (Zollner, et al., 2001; Zollner, et al., 2003).

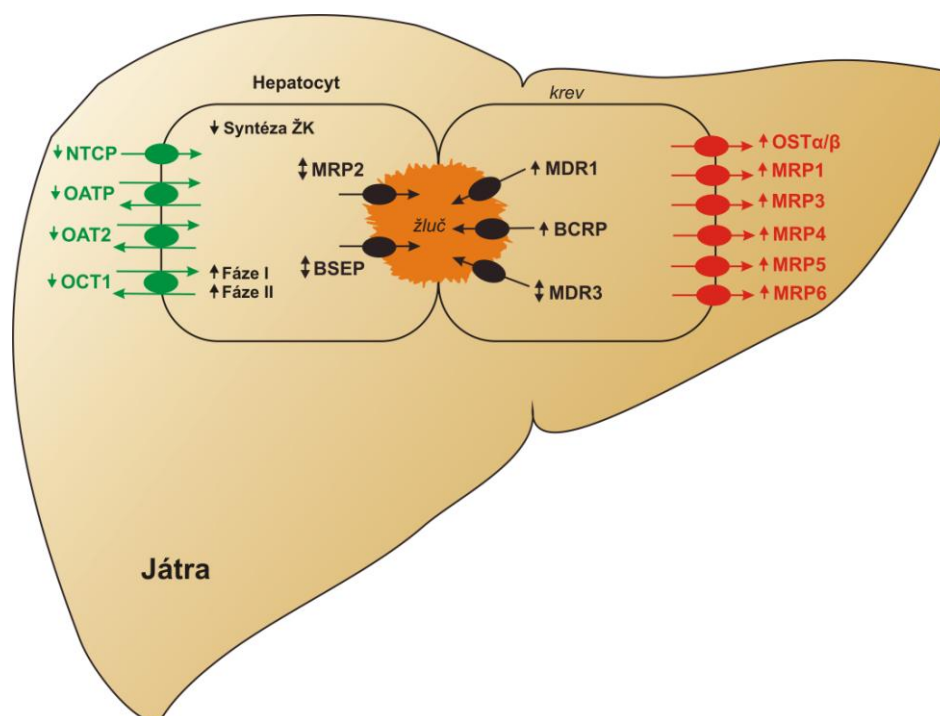
### **3.2. Spontánní anticholestatická obranná reakce**

Pro některé zvířecí modely experimentální cholestázy a některé typy cholestatického onemocnění u lidí existuje společný vzorec adaptivních odpovědí zahrnující změny exprese transportérů, tzv. spontánní anticholestatickou obrannou reakci. Tato odpověď chrání hepatocyty před zadržováním toxických látek (žlučových kyselin, bilirubinu a léčiv). Adaptivní změny zahrnují sníženou expresi bazolaterálních transportérů důležitých pro import látek doprovázenou zvýšenou expresí bazolaterálních systémů pro jejich eflux (Obr. 6). Sníženou expresi bazolaterálních transportních systémů lze pozorovat u chronických cholestatických onemocnění u lidí. NTCP a OATP1B1 vykazují sníženou expresi na úrovni proteinu u cholestatické alkoholové hepatitidy (Zollner, et al., 2001),

pozdních stádií PBC (Zollner, et al., 2003), PFIC2 a PFIC3 (progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 2 a 3) (Keitel, et al., 2005), PSC (Oswald, et al., 2001) a extrahepatální biliární artrezie. Proteinová exprese OATP1B3 je snižena u PFIC1 (progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 1) a PFIC2. Snižena exprese OATP2B1, OCT1 a OAT2 transportních proteinů byla recentně prokázána ve studii na lidských primárních hepatocytech exponovaných TNF- $\alpha$  a IL-6 cytokiny (Vee, et al., 2009). Zvýšenou expresi bazolaterálních efluxních pump MRP1, MRP3, MRP4, MRP5 a MRP6 („Multidrug resistance-associated protein 1, 3, 4, 5 a 6“) na úrovni proteinu lze pozorovat v pozdních stádiích PBC (Barnes, et al., 2007; Ros, et al., 2003; Zollner, et al., 2007). Zvýšená exprese MRP3 a MRP4 je popisována také u PFIC3 (Keitel, et al., 2005; Scheffer, et al., 2002). U pacientů v pokročilých stádiích PBC byla prokázána zvýšená exprese OST $\alpha$  a OST $\beta$  na úrovni mRNA (Boyer, et al., 2006). Exprese MRP2 je snižena u mnoha cholestatických onemocnění jater, ačkoli lze změny pozorovat pouze v pozdních stádiích onemocnění. Například exprese MRP2 je snižena jen u některých pacientů ve IV. stádiu PBC, ale zůstává beze změny v I.-III. stádiu (Kullak-Ublick, et al., 2002). Podobně je exprese BSEP dobře zachována u pacientů s PBC a akutní nebo zánětem indukovanou cholestázou (alkohol, léčiva, autoimunitní hepatitida) (Zollner, et al., 2001; Zollner, et al., 2003). U pacientů s PBC byla prokázána zvýšená exprese BCRP efluxního proteinu (Barnes, et al., 2007). mRNA exprese MDR3 transportéru je zachována u PBC, ale zvýšena u pacientů s obstrukční cholestázou (Lee and Boyer, 2000; Trauner, et al., 1999).

Adaptační změny exprese transportérů jsou dále podporované sníženou syntézou žlučových kyselin (isoformy cytochromu P450 – CYP7A1 a CYP8B1) a naopak navozením detoxifikace žlučových kyselin (indukce enzymů fáze I a fáze II metabolismu žlučových kyselin). Mezi enzymy fáze I patří CYP3A4 a CYP2B6. Enzymy fáze II zahrnují SULT2A1 (kde SULT je sulfotransferáza) a UGT2B4 (kde UGT je UDP-glukuronosyltransferáza) (Boyer, 2007). Hydroxylací žlučových kyselin se zvyšuje intracelulární koncentrace méně toxických polyhydroxylovaných solí žlučových kyselin. Většina těchto transformací usnadňuje exkreci solí žlučových kyselin do žluče (sulfatace) nebo do krve, a tím umožňuje následnou exkreci močí (hydroxylace, sulfatace a glukuronidace) (Roma, et al., 2008b).





**Obr. 6.** Molekulární mechanizmy cholestázy – anticholestatická obranná reakce. Snížená exprese bazolaterálních transportérů NTCP („Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide“), OATP („Organic anion transporting polypeptide“), OAT2 („Organic anion transporter 2“ a OCT1 („Organic cation transporter 1“) snižuje hepatocelulární retenci látek. Expresse kanalikulárního BSEP („Bile salt export pump“), MRP2 („Multidrug resistance-associated protein 2“) a MDR3 („Multidrug resistance protein 3“) transportéru, který zajišťuje přenos fosfatidylcholinu, je zachována. Expresse MDR1 („Multidrug resistance protein 1“) a BCRP („Breast cancer resistance protein“) je během cholestázy zvýšená. Indukce bazolaterálních efluxních proteinů MRP1, MRP3, MRP4, MRP5 a MRP6 („Multidrug resistance-associated protein 1, 3, 4, 5 a 6“) a OST $\alpha/\beta$  („Organic solute transporter  $\alpha/\beta$ “) je alternativní cestou eliminace pro léčiva i endogenní látky (soli žlučových kyselin, bilirubin). Převzato a upraveno ze Zollner a Trauner (2006).

#### 4. Preklinické modely studia vlivu cholestázy na farmakokinetiku léčiv

Pro studium cholestázy se využívají *in vitro*, *in situ* a *in vivo* metody. Zatímco *in vitro* a *in situ* studie poskytují možnost studia podílu konkrétních transportérů a jednotlivých modulujících vlivů (např. cytokinů a žlučových kyselin) na změny transmembránového přenosu léčiv během cholestázy, *in vivo* studie nabízí komplexní pohled na farmakokinetiku sledovaných léčiv a jejich eliminaci do žluče během působení všech regulačních patofyziologických vlivů.

#### 4.1. Metody *in vitro*

*Izolované membránové frakce* hepatocytů jsou metodou umožňující studium metabolismu a transportu látek. Mezi hlavní výhody takto získaných frakcí patří relativní nenáročnost metody, možnost přípravy mikrosomální jaterní frakce různých živočišných druhů, reprodukovatelnost a možnost delšího skladování takto připravené mikrosomální nebo jiné frakce (Zhuge, et al., 2004). Limitující faktory metody jsou krátká funkčnost, absence enzymů II. fáze metabolismu a potřeba kofaktorů k jejich aktivitě (Kučera O., et al., 2006). Dalším možným přístupem v této oblasti je příprava *primárních hepatocytů*. Vzhledem ke špatné dostupnosti lidských hepatocytů se využívají především potkaní hepatocyty. Tento model umožňuje studovat transportní systémy léčiv v přítomnosti různých mediátorů včetně žlučových kyselin a cytokinů a dále predikci *in vivo* údajů o metabolické nebo hepatobiliární clearance (O'Brien, et al., 2004). Hepatocyty získané z jater pomocí kolagenázy mohou být použity okamžitě k testování anebo mohou být zmrazeny a dále uchovány po ošetření ochranným médiem. Nevýhodou tohoto modelu je rychlá ztráta aktivity biotransformačních enzymů, pokles funkční kapacity hepatocytů, pokles množství a aktivity cytochromu P450 a rychle se zvyšující exprese Mdr1 transportního proteinu (Chandra and Brouwer, 2004; Kučera O., et al., 2006; Rodriguez-Garay, 2003).

#### 4.2. Metody *in situ*

Široce používanou metodou studia cholestázy je model potkaních *izolovaných perfundovaných jater*, který zachovává trojrozměrnou strukturu jater s mezibuněčnými kontakty, tvorbou a sekrecí žluče. Tento model nejbližší simuluje podmínky obdobné živému organismu. V tomto případě lze patogenezi poškození jater studovat bez ovlivnění jinými orgány. Tato metoda umožňuje hodnocení vychytávání látek do jater, jejich biliární exkreci a sinusoidální eflux, proto je často využívanou metodou pro studium lékových a toxických poškození a pro kinetické modelování. Výhodou je možnost přesného definování podmínek, tj. skladby perfuzního media a koncentrací léčiv. Nevýhodami tohoto modelu jsou naopak všestranná náročnost (časová, personální, finanční atd.) a rychlý pokles funkčních aktivit (Kučera O., et al., 2006; Rodriguez-Garay, 2003).

#### 4.3. Metody *in vivo*

Pro studium vlivu cholestázy na metabolismus a exkreci léčiv se ve farmakologii používají zvířecí modely. Ačkoli je vzorec exprese transportních proteinů podobný u zvířat

a lidí, nelze nalézt "univerzální" zvířecí model, který by plně simuloval podmínky lidského organismu. Mezi zvířata používaná pro výzkum cholestázy patří malí laboratorní hlodavci – potkan a myš.

#### 4.3.1. Extrahepatální cholestáza

Pro studium extrahepatální (obstrukční) cholestázy se v současnosti používá model *podvazu žlučovodu* u experimentálních zvířat (potkan, myš). Extrahepatální cholestáza vede k částečné nebo úplné zástavě toku žluče v důsledku obstrukce žlučových cest. V rychlém sledu dochází k náhlé, výrazné kumulaci toxických látek (zejména žlučových kyselin) a k rozvoji spontánní anticholestatické obranné reakce. Na bazolaterální membráně hepatocytů dochází k down-regulaci (snížení exprese) transportérů pro žlučové kyseliny (Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4 a Oatp1b2), která vede ke snížení vstupu látek do buněk (Lee and Boyer, 2000). Následně klesá exprese kanalikulárních efluxních transportérů (Bsep a Mrp2) (Lee and Boyer, 2000; Trauner, et al., 1997). Naopak se zvyšuje exprese bazolaterálních proteinů (především Mrp3 a Mrp4) umožňujících zpětný transport látek z hepatocytů do krve a jejich zvýšenou exkreci prostřednictvím up-regulovaných („up-regulace“ – zvýšená exprese) transportérů (Mrp2 a Mrp3) v ledvinných tubulech (Donner and Keppler, 2001; Soroka, et al., 2001; Tanaka, et al., 2002). Náhlý vzestup intrabiliárního tlaku výrazně narušuje hematobiliární bariéru, což vede ke ztrátě osmotické hnací síly v důsledku refluxu osmoticky aktivních látek do intersticia (Tomsik, et al., 2007). Proto je také změna permeability bariéry nejvíce patrná u tohoto modelu cholestázy v porovnání s modely intrahepatální cholestázy (aplikace ethinylestradiolu, sepse atd.), kdy není tak výrazně ovlivněn paracelulární transport látek (Rodriguez-Garay, 2003). Mezi základní molekuly zapojené do regulace exprese transportních proteinů patří nukleární receptory (transkripční faktory), na které se v průběhu cholestázy vážou zadržované biliární látky (např. žlučové kyseliny) (Donner, et al., 2007; Fernandez-Martinez, et al., 2006; Liu, et al., 2001; Plebani, et al., 1999). Klíčovým receptorem spontánní anticholestatické obranné reakce je FXR („Farnesoid X receptor“), který je zodpovědný za regulaci všech enzymů a transportních proteinů zapojených do homeostázy žlučových kyselin. Tyto látky tvoří logicky jeho základní fyziologické ligandy a jejich kumulace v těle vede prostřednictvím FXR ke snížení jejich syntézy a urychlení močové exkrece (Fiorucci, et al., 2007). Dalšími nukleárními receptory, jejichž ovlivnění je spojeno s indukci genů zapojených do detoxikace a transportu bilirubinu a žlučových kyselin, jsou PXR („Pregnane X receptor“) a CAR („Constitutive androstane receptor“), jejichž ligandy jsou xenobiotika (Pávek P., et

al., 2005).

#### 4.3.2. Intrahepatální cholestáza

Pro simulaci intrahepatální cholestázy se v preklinických studiích využívá nejčastěji model aplikace endotoxinu nebo ethinylestradiolu či jiných léčiv potkanům. Současně narůstá význam zvířat s přirozeným nebo navozeným deficitem jednoho z transportérů. Pro indukci **endotoxémie** se používá lipopolysacharid (LPS) izolovaný ze *Salmonella Typhimurium* nebo *Escherichia coli*. Cholestáza navozená aplikací LPS vede k podobným změnám exprese transportních proteinů v játrech jako extrahepatální cholestáza. Tyto změny jsou zprostředkovány pravděpodobně 1) prozánětlivými cytokiny jako TNF- $\alpha$  („Tumor necrosis factor  $\alpha$ “), IL-1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ ) a IL-6 (interleukin 6) produkovanými Kupfferovými buňkami, 2) oxidem dusnatým, který produkují hepatocyty a Kupfferovy buňky jako následek LPS zprostředované aktivace NF- $\kappa$ B („Nuclear factor  $\kappa$ B““ (Aoki, et al., 2008). Hepatocyty reagují na zvýšenou produkci prozánětlivých cytokinů změnou genové exprese především na transkripční úrovni (Roma, et al., 2008a).

Další možností, jak navodit intrahepatální cholestázu u potkanů, je aplikace **ethinylestradiolu**. V tomto případě dochází k poškození toku žluče a změnám exprese transportních proteinů na kanalikulární i bazolaterální membráně hepatocytu a následně ke snížení biliární exkrece žlučových kyselin, bilirubinu a xenobiotik včetně léčiv. Změny exprese transportních proteinů u tohoto modelu jsou srovnatelné se změnami pozorovanými u cholestázy navozené podáním LPS. Efekt ethinylestradiolu se připisuje endogennímu estrogenovému metabolitu estradiol-17 $\beta$ -D-glukuronidu, který způsobuje snížení toku žluče a sekrece žlučových kyselin u potkanů. Ethinylestradiol a jeho metabolit estradiol-17 $\beta$ -D-glukuronid vedou současně ke zvýšení permeability hematobiliární bariéry, což má za následek paracelulární návrat žlučových kyselin do krve (Rodriguez-Garay, 2003;Roma, et al., 2008a).

Mezi **další léčiva**, která vedou k navození cholestázy, patří např. cyklosporin A, rifampicin, rifamycin, glibenklamid a troglitazon. Tyto látky inhibují transport zprostředkovaný Bsep proteinem (Fattinger, et al., 2000;Funk, et al., 2001). Současně byla prokázána inhibice exprese Oatp1a1 a Oatp1a4 zprostředkovaná rifampicinem a rifamycinem (Fattinger, et al., 2000). Cyklosporin A současně inhibuje také expresi Mrp2 transportéru. Bsep a Mrp2 pravděpodobně hrají klíčovou roli v patogenezi cholestázy navozené léčivou (Bohan and Boyer, 2002).

Mezi široce používané modely intrahepatální cholestázy patří zvířata s přirozeným

nebo získaným deficitem konkrétního transportéru. Nějčastěji jsou používány dva potkaní kmene s kongenitální hyperbilirubinémií v důsledku absence Mrp2 transportéru. U kmene Wistar se jedná o Groningen žluté/transport deficitní (GY/TR-) potkany, u kmene Sprague-Dawley jsou označováni jako Eisai hyperbilirubinemičtí (EHBR) potkani. Podobným modelem cholestázy je potkaní kmen Gunn s přirozenou nekonjugovanou hyperbilirubinémií a vrozenou deficiencí UGT1A1 (UDP-glukuronosyltransferáza 1A1), enzymu konjugujícího bilirubin v játrech (Buchler, et al., 1996;Cuperus, et al., 2009;Fuksa L, et al., 2006). Pro vysvětlení mechanismů exkrece endogenních látek a xenobiotik a pro popis funkcí transportních systémů během cholestázy se využívají také myší modely s cílenou inaktivací („knockout“) určitého genu, např. Mdr1a, dvojité knockoutovaných myší, např. Mdr1a/Mdr1b-/-, nebo trojitě knockoutovaných myší, např. Bcrp1-/-/Mdr1a/1b-/- (Marchetti, et al., 2008;Rodriguez-Garay, 2003).

#### 4.3.3. Farmakokinetická analýza

Pro hodnocení farmakokinetiky léčiv *in vivo* se u modelů cholestázy používají dva non-kompartmentové přístupy. První je založený na kontinuálním podávání léčiva pro dosažení ustáleného stavu plazmatických koncentrací, druhý vychází z jednorázového podání léčiva a následného dostatečně dlouhého sledování plazmatických koncentrací pro získání jejich, co nejkompletnějšího, profilu (včetně eliminační fáze). Biliární eliminace se počítá z hodnot naměřených v nasbíraných vzorcích žluče.

Farmakokinetické parametry léčiva po dosažení jeho ustálených plazmatických koncentrací nabízí výhodu kratšího trvání experimentu, kdy za pomoci vhodně zvolené nárazové dávky a následné kontinuální nitrožilní infuze lze navodit tuto situaci do několika desítek minut od zahájení podávání. Pro výpočet jednotlivých parametrů se pak používají následující rovnice:

$$BE = X_Z \cdot xC_Z$$

$$RE = X_M \cdot xC_M$$

kde BE je biliární exkrece léčiva,  $X_Z$  tok žluče,  $C_Z$  koncentrace léčiva ve žluči; RE je renální exkrece léčiva,  $X_M$  tok moče a  $C_M$  koncentrace léčiva v moči,

$$CL = R / C_{ss}$$

$$CL_B = BE / C_{ss}$$

$$CL_R = RE / C_{ss}$$

kde CL je celková clearance, R rychlost infúze,  $C_{ss}$  koncentrace léčiva v ustáleném stavu,  $CL_B$  biliární clearance, BE biliární exkrece,  $CL_R$  renální clearance a RE renální exkrece.

Podíl glomerulární filtrace (GF) na  $CL_R$  je pak vyjádřen pomocí stanovení clearance kreatininu ( $CL_{KR}$ ):

$$CL_{KR} = \frac{X_M \cdot C_M}{C_{KR}}$$

kde  $CL_{KR}$  je clearance kreatininu,  $X_M$  tok moče,  $C_M$  koncentrace kreatininu v moči a  $C_{KR}$  koncentrace kreatininu v plazmě.

Farmakokinetické parametry léčiva po jednorázovém podání vychází z komplexní analýzy časového průběhu plazmatických koncentrací léčiva. Iniciálně se z křivky určuje nejvyšší naměřená plazmatická koncentrace látky ( $C_{max}$ ) a příslušná doba dosažení této koncentrace ( $T_{max}$ ). Analýza terminální fáze časové křivky umožní odečíst eliminační konstantu ( $k_{el}$ ), která představuje směrnici této křivky. Z ní je pak počítán biologický poločas eliminace ( $t_{1/2}$ ) jako podíl  $\ln 2$  a  $k_{el}$ . Následně je počítána plocha pod křivkou plazmatických koncentrací ( $AUC_{0-\infty}$ ) jako součet  $AUC_{0-T_{posledni}}$  určené logaritmicke-lineárním lichoběžníkovým pravidlem mezi časem 0 (podání léčiva) a časem poslední měřené koncentrace ( $T_{posledni}$ ) a  $AUC$  extrapolované do nekonečna ( $AUC_{T_{posledni}-\infty}$ ), která se určuje jako podíl poslední měřené koncentrace dělené  $k_{el}$ . Celková clearance ( $CL_{Tot}$ ) se určuje vztahem:

$$CL_{Tot} = \text{dávka} / AUC_{0-\infty}$$

Paralelně je počítán zdánlivý distribuční objem ( $Vd_z$ ):

$$Vd_z = CL_{Tot} / k_{el}$$

Distribuční objem pro koncentraci v ustáleném stavu ( $Vd_{ss}$ ) je získáván vztahem:

$$Vd_{ss} = CL_{Tot} \cdot \frac{AUMC}{AUC_{T_{posledni}-\infty}}$$

kde AUMC je momentová plocha pod křivkou.

Biliární ( $CL_{Bil}$ ) clearance lze při tomto způsobu hodnocení stanovit pomocí vztahu:

$$CL_B = M_B / AUC_{0-T_{poslední}}$$

kde  $M_B$  je množství léčiva vyloučené do žluči během sledovaného období. Výhodou tohoto přístupu je vyšší citlivost modelu na potenciální změny a komplexnější informace o kinetice (např. distribuční objem), zatímco nevýhodou je nutnost dostatečně dlouhého sledování pro získání co nejkompletnějšího profilu koncentrací v čase.

## **Cíle práce**



**Cíle dizertační práce:**

Hlavním cílem předkládané práce bylo studium vlivu cholestatického poškození jater na eliminaci a transport léčiv.

1. Studium cholestázou navozených změn v biliární a renální exkreci léčiv, které jsou substráty transportních proteinů odpovědných za jejich exkreci do žluče a moče u potkana.
2. Studium exprese a funkce lékových transportních proteinů v játrech a ledvinách během cholestázy navozené u potkana.
3. Studium funkce hematobiliární bariéry („tight-junctions“) jako důležitého prvku pro tvorbu žluče během obstrukční cholestázy u potkana pomocí rhamnózo/melibiózového permeabilitního testu.

## **Podíl na jednotlivých publikacích**

Experimentální část práce je souhrnem tří publikací:

**I.** Micuda S, Brčakova E, Fuksa L, Cermanova J, Osterreicher J, Hroch M, Mokry J, Pejchal J, Martinkova J and Staud F (2008) *P-glycoprotein function and expression during obstructive cholestasis in rats*. Eur J Gastroenterol Hepatol 20:404-412

**II.** Tomsik P, Sispera L, Rezacova M, Niang M, Stoklasova A, Cerman J, Knizek J, Brčakova E, Cermanova J and Micuda S (2008) *Increased melibiose/rhamnóse ratio in bile of rats with acute cholestasis*. J Gastroenterol Hepatol 23:1934-1940.

**III.** Brčakova E, Fuksa L, Cermanova J, Kolouchova G, Hroch M, Hirsova P, Martinkova J, Staud F and Micuda S (2009) *Alteration of methotrexate biliary and renal elimination during extrahepatic and intrahepatic cholestasis in rats*. Biol Pharm Bull 32 (v tisku)

U článku III je předkladatelka této dizertační práce první autorkou, v případě článků I a II spoluautorkou.

V práci I se autorka podílela na *in vivo* experimentech, které zahrnovaly chirurgické operace, odběry vzorků, jejich zpracování a analýzu. Pomocí zavedené metody Western blot analyzovala expresi P-glykoproteinu v játrech a ledvinách.

Ve studii II se autorka podílela na *in vivo* experimentech ve stejné šíři jako u předešle uvedené práce.

Ve studii III autorka koordinovala všechny experimenty, podílela se na *in vivo* studii a analyzovala expresi transportérů na úrovni mRNA a proteinu metodou qRT-PCR a Western blot.

Autorka dizetrace sepsala rukopis práce III. Ve studii I a II se podílela na sepsání částí týkajících se *in vivo* metod a úpravách textů, ve studii I dále na sepsání částí týkajících se metody Western blot.

HPLC analýzu rhodaminu 123 a metotrexátu ve vzorcích plazmy, moče a žluče prováděl Ing. Miloš Hroch z Ústavu farmakologie LF HK UK.

HPLC analýzu melibiózy a rhamnózy v plazmě, moči a žluči prováděl Ing. Luděk Šišpera, CSc. z Ústavu lékařské biochemie LF HK UK.

Imunohistochemickou analýzu prováděl prof. MUDr. Jaroslav Mokry, Ph.D. z Ústavu histologie a embryologie LF HK UK, MUDr. Jaroslav Pejchal a Prof. MUDr. Jan Österreicher, Ph.D. z Katedry radiobiologie, Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzity obrany v Brně.

## **Seznam použité literatury**

Aoki K, Nakajima M, Hoshi Y, Saso N, Kato S, Sugiyama Y and Sato H (2008) Effect of aminoguanidine on lipopolysaccharide-induced changes in rat liver transporters and transcription factors. *Biol Pharm Bull* **31**:412-420.

Barnes SN, Aleksunes LM, Augustine L, Scheffer GL, Goedken MJ, Jakowski AB, Prumboom-Brees IM, Cherrington NJ and Manautou JE (2007) Induction of hepatobiliary efflux transporters in acetaminophen-induced acute liver failure cases. *Drug Metab Dispos* **35**:1963-1969.

Bohan A and Boyer JL (2002) Mechanisms of hepatic transport of drugs: implications for cholestatic drug reactions. *Semin Liver Dis* **22**:123-136.

Boyer JL (2007) New perspectives for the treatment of cholestasis: lessons from basic science applied clinically. *J Hepatol* **46**:365-371.

Boyer JL, Trauner M, Mennone A, Soroka CJ, Cai SY, Moustafa T, Zollner G, Lee JY and Ballatori N (2006) Upregulation of a basolateral FXR-dependent bile acid efflux transporter OSTalpha-OSTbeta in cholestasis in humans and rodents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**:G1124-G1130.

Buchler M, Konig J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T and Keppler D (1996) cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* **271**:15091-15098.

Byrne JA, Strautnieks SS, Ihrke G, Pagani F, Knisely AS, Linton KJ, Mieli-Vergani G and Thompson RJ (2009) Missense mutations and single nucleotide polymorphisms in ABCB11 impair bile salt export pump processing and function or disrupt pre-messenger RNA splicing. *Hepatology* **49**:553-567.

Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ and Thompson RJ (2002) The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* **123**:1649-1658.

Canbay A, Bechmann L and Gerken G (2007) Lipid metabolism in the liver. *Z Gastroenterol* **45**:35-41.

- Chan LM, Lowes S and Hirst BH (2004) The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* **21**:25-51.
- Chandra P and Brouwer KL (2004) The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res* **21**:719-735.
- Crawford JM (1996) Role of vesicle-mediated transport pathways in hepatocellular bile secretion. *Semin Liver Dis* **16**:169-189.
- Cuperus FJ, Hafkamp AM, Havinga R, Vitek L, Zelenka J, Tiribelli C, Ostrow JD and Verkade HJ (2009) Effective treatment of unconjugated hyperbilirubinemia with oral bile salts in Gunn rats. *Gastroenterology* **136**:673-682.
- Donner MG and Keppler D (2001) Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* **34**:351-359.
- Donner MG, Schumacher S, Warskulat U, Heinemann J and Haussinger D (2007) Obstructive Cholestasis Induces TNF- $\alpha$ - and IL-1 $\beta$ -mediated Periportal Down-regulation of Bsep and Zonal Regulation of Ntcp, Oatp1a4 and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**:G1134-G1146.
- Enokizono J, Kusuhara H and Sugiyama Y (2007) Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the biliary excretion and intestinal efflux of troglitazone sulfate, the major metabolite of troglitazone with a cholestatic effect. *Drug Metab Dispos* **35**:209-214.
- Evans WE and Relling MV (1999) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* **286**:487-491.
- Faber KN, Muller M and Jansen PL (2003) Drug transport proteins in the liver. *Adv Drug Deliv Rev* **55**:107-124.
- Fattinger K, Cattori V, Hagenbuch B, Meier PJ and Stieger B (2000) Rifamycin SV and rifampicin exhibit differential inhibition of the hepatic rat organic anion transporting polypeptides, Oatp1 and Oatp2. *Hepatology* **32**:82-86.
- Fernandez-Martinez E, Perez-Alvarez V, Tsutsumi V, Shibayama M and Muriel P (2006) Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol* **58**:49-58.

- Fiorucci S, Rizzo G, Donini A, Distrutti E and Santucci L (2007) Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends Mol Med* **13**:298-309.
- Fuksa L, Mičuda S, Cermanová J, Brčáková E and Štaud F. Fyziologická funkce MRP2. *Československá fyziologie* **55**, 57-65. 2006.
- Funk C (2008) The role of hepatic transporters in drug elimination. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**:363-379.
- Funk C, Ponelle C, Scheuermann G and Pantze M (2001) Cholestatic potential of troglitazone as a possible factor contributing to troglitazone-induced hepatotoxicity: in vivo and in vitro interaction at the canalicular bile salt export pump (Bsep) in the rat. *Mol Pharmacol* **59**:627-635.
- Graham TE (2009) Glycogen: an overview of possible regulatory roles of the proteins associated with the granule. *Appl Physiol Nutr Metab* **34**:488-492.
- Hagenbuch B and Gui C (2008) Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* **38**:778-801.
- Hagenbuch B and Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* **447**:653-665.
- Hofmann AF (1990) Bile acid secretion, bile flow and biliary lipid secretion in humans. *Hepatology* **12**:17S-22S.
- Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T and Sugiyama Y (1997) Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am J Physiol* **272**:G16-G22.
- Jedlitschky G, Hoffmann U and Kroemer HK (2006) Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**:351-366.
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B and Keppler D (1997) ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J* **327** ( Pt 1):305-310.

Juliano RL and Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**:152-162.

Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, Kuhlkamp T, Keppler D, Haussinger D and Kubitz R (2005) Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* **41**:1160-1172.

Koepsell H and Endou H (2004) The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch* **447**:666-676.

Koepsell H, Schmitt BM and Gorboulev V (2003) Organic cation transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **150**:36-90.

Konig J, Rost D, Cui Y and Keppler D (1999) Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* **29**:1156-1163.

Konrádová V., Uhlík J. and Vajner L. (2000) Trávicí systém, in *Funkční histologie* (Konrádová V., Uhlík J. and Vajner L. eds) pp 153-185, H & H, Jinočany.

Kool M, van der LM, de HM, Baas F and Borst P (1999) Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res* **59**:175-182.

Kučera O., Lotková H., Křiváková P., Roušar T. and Červinková Z. (2006) Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů in vitro. *Československá fyziologie* **55**:103-110.

Kullak-Ublick GA, Baretton GB, Oswald M, Renner EL, Paumgartner G and Beuers U (2002) Expression of the hepatocyte canalicular multidrug resistance protein (MRP2) in primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* **23**:78-82.

Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ and Hagenbuch B (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* **120**:525-533.

Kuntz E. and Kuntz H.-D. (2008a) Biochemistry and Functions of the Liver, in *Hepatology*



(Kuntz E. and Kuntz H.-D. eds) pp 36-76, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

Kuntz E. and Kuntz H.-D. (2008b) Morphology of the Liver, in *Hepatology* (Kuntz E. and Kuntz H.-D. eds) pp 16-33, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

Lee J and Boyer JL (2000) Molecular alterations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders. *Semin Liver Dis* **20**:373-384.

Li L, Meier PJ and Ballatori N (2000) Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Mol Pharmacol* **58**:335-340.

Liu TZ, Lee KT, Chern CL, Cheng JT, Stern A and Tsai LY (2001) Free radical-triggered hepatic injury of experimental obstructive jaundice of rats involves overproduction of proinflammatory cytokines and enhanced activation of nuclear factor kappaB. *Ann Clin Lab Sci* **31**:383-390.

Madon J, Hagenbuch B, Landmann L, Meier PJ and Stieger B (2000) Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol Pharmacol* **57**:634-641.

Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van D, V, Scheper RJ and Schellens JH (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* **61**:3458-3464.

Marchetti S, de Vries NA, Buckle T, Bolijn MJ, van Eijndhoven MA, Beijnen JH, Mazzanti R, van TO and Schellens JH (2008) Effect of the ATP-binding cassette drug transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2 on erlotinib hydrochloride (Tarceva) disposition in in vitro and in vivo pharmacokinetic studies employing Bcrp1<sup>-/-</sup>/Mdr1a/1b<sup>-/-</sup> (triple-knockout) and wild-type mice. *Mol Cancer Ther* **7**:2280-2287.

Mareček Z. (2007) Farmakoterapie jaterní cholestázy. *Remedia* **17**:316-322.

Mareš J. (2003) Fyziologie trávení a vstřebávání, in *Lékařská fyziologie* (Trojan S. ed) pp 321-390, Grada Publishing, Praha.

McRae MP, Brouwer KL and Kashuba AD (2003) Cytokine regulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* **35**:19-33.

- Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B and Stieger B (1997) Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* **26**:1667-1677.
- Nies AT and Keppler D (2007) The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2) 1. *Pflugers Arch* **453**:643-659.
- O'Brien PJ, Chan K and Silber PM (2004) Human and animal hepatocytes in vitro with extrapolation in vivo. *Chem Biol Interact* **150**:97-114.
- Oswald M, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G and Beuers U (2001) Expression of hepatic transporters OATP-C and MRP2 in primary sclerosing cholangitis. *Liver* **21**:247-253.
- Pastan I and Gottesman M (1987) Multiple-drug resistance in human cancer. *N Engl J Med* **316**:1388-1393.
- Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P and Oude Elferink RP (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* **271**:1126-1128.
- Pávek P., Červený L., Mičuda S., Štaud F., Novotná-Čečková M. and Fendrich Z. (2005) Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí. *Remedia* **15**:406-409.
- Plebani M, Panozzo MP, Basso D, De PM, Biasin R and Infantolino D (1999) Cytokines and the progression of liver damage in experimental bile duct ligation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**:358-363.
- Raddatz D and Ramadori G (2007) Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Z Gastroenterol* **45**:51-62.
- Reid G, Wielinga P, Zelcer N, de HM, Van DL, Wijnholds J, Balzarini J and Borst P (2003) Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol Pharmacol* **63**:1094-1103.
- Rodriguez-Garay EA (2003) Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol* **2**:150-158.

Roma MG, Crocenzi FA and Mottino AD (2008a) Dynamic localization of hepatocellular transporters in health and disease. *World J Gastroenterol* **14**:6786-6801.

Roma MG, Crocenzi FA and Sanchez Pozzi EA (2008b) Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clin Sci (Lond)* **114**:567-588.

Ros JE, Libbrecht L, Geuken M, Jansen PL and Roskams TA (2003) High expression of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. *J Pathol* **200**:553-560.

Scheffer GL, Kool M, de HM, de Vree JM, Pijnenborg AC, Bosman DK, Elferink RP, van d, V, Borst P and Scheper RJ (2002) Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab Invest* **82**:193-201.

Smith AJ, van HA, van MG, Szabo K, Welker E, Szakacs G, Varadi A, Sarkadi B and Borst P (2000) MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem* **275**:23530-23539.

Soroka CJ, Lee JM, Azzaroli F and Boyer JL (2001) Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology* **33**:783-791.

Staud F and Pavek P (2005) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol* **37**:720-725.

Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA and Meier PJ (2000) Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* **118**:422-430.

Strolin BM and Baltes EL (2003) Drug metabolism and disposition in children. *Fundam Clin Pharmacol* **17**:281-299.

Sukhai M, Yong A, Kalitsky J and Piquette-Miller M (2000) Inflammation and interleukin-6 mediate reductions in the hepatic expression and transcription of the *mdr1a* and *mdr1b* Genes. *Mol Cell Biol Res Commun* **4**:248-256.

- Švíglerová J. and Slavíková J. (2008) Játra, in *Fyziologie gastrointestinálního traktu* (Švíglerová J. and Slavíková J. eds) pp 51-65, Karolinum, Praha.
- Tanaka Y, Kobayashi Y, Gabazza EC, Higuchi K, Kamisako T, Kuroda M, Takeuchi K, Iwasa M, Kaito M and Adachi Y (2002) Increased renal expression of bilirubin glucuronide transporters in a rat model of obstructive jaundice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**:G656-G662.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I and Willingham MC (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:7735-7738.
- Tomsik P, Sispera L, Niang M, Stoklasova A, Cerman J, Knizek J, Brcakova E, Cermanova J and Micuda S (2007) Increased melibiose/rhamnose ratio in bile of rats with acute cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol* **23**:1934-1940.
- Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, Ananthanarayanan M, Koeppl TA, Schlosser SF, Suchy FJ, Keppler D and Boyer JL (1997) The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* **113**:255-264.
- Trauner M and Boyer JL (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* **83**:633-671.
- Trauner M, Meier PJ and Boyer JL (1998) Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* **339**:1217-1227.
- Trauner M, Meier PJ and Boyer JL (1999) Molecular regulation of hepatocellular transport systems in cholestasis. *J Hepatol* **31**:165-178.
- Van De Graaff K. (2001) Digestive System, in *Human Anatomy* (Van De Graaff K. ed) pp 634-674, The McGraw-Hill Companies.
- van Montfoort JE, Hagenbuch B, Groothuis GM, Koepsell H, Meier PJ and Meijer DK (2003) Drug uptake systems in liver and kidney. *Curr Drug Metab* **4**:185-211.
- Vaňásek T. (2007) Cholestatické choroby jater, in *Gastroenterologie a Hepatologie* (Zavoral M. and Venerová J. eds) pp 94-96, TRITON, Praha.

Vee ML, Lecureur V, Stieger B and Fardel O (2009) Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha or interleukin-6. *Drug Metab Dispos* **37**:685-693.

Voet D. and Voetová J.G. (1995) Metabolismus, in *Biochemie* (Voet D. and Voetová J.G. eds) pp 433-858, Victoria Publishing , Praha.

Zair ZM, Eloranta JJ, Stieger B and Kullak-Ublick GA (2008) Pharmacogenetics of OATP (SLC21/SLCO), OAT and OCT (SLC22) and PEPT (SLC15) transporters in the intestine, liver and kidney. *Pharmacogenomics* **9**:597-624.

Zamek-Gliszczynski MJ, Hoffmaster KA, Nezasa K, Tallman MN and Brouwer KL (2006) Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *Eur J Pharm Sci* **27**:447-486.

Zhuge J, Yu YN and Wu XD (2004) Stable expression of human cytochrome P450 2D6\*10 in HepG2 cells. *World J Gastroenterol* **10**:234-237.

Zollner G, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Marschall HU, Zatloukal K, Denk H and Trauner M (2003) Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* **38**:717-727.

Zollner G, Fickert P, Zenz R, Fuchsbichler A, Stumptner C, Kenner L, Ferenci P, Stauber RE, Krejs GJ, Denk H, Zatloukal K and Trauner M (2001) Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* **33**:633-646.

Zollner G and Trauner M (2006) Molecular mechanisms of cholestasis. *Wien Med Wochenschr* **156**:380-385.

Zollner G and Trauner M (2008) Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis* **12**:1-26, vii.

Zollner G, Wagner M, Fickert P, Silbert D, Gumhold J, Zatloukal K, Denk H and Trauner M (2007) Expression of bile acid synthesis and detoxification enzymes and the alternative bile acid efflux pump MRP4 in patients with primary biliary cirrhosis. *Liver Int* **27**:920-929.

# **P-GLYCOPROTEIN FUNCTION AND EXPRESSION DURING OBSTRUCTIVE CHOLESTASIS IN RATS**

Micuda S, Brcakova E, Fuksa L, Cermanova J, Osterreicher J, Hroch M, Mokry J, Pejchal J, Martinkova J and Staud F (2008) *P-glycoprotein function and expression during obstructive cholestasis in rats*. Eur J Gastroenterol Hepatol 20:404-412

## Komentář k článku

Extrahepatální (obstrukční) cholestáza vzniká v důsledku biliární obstrukce, která vede k jaterní a systémové kumulaci potenciálně toxických látek (žlučové kyseliny, bilirubin), což v konečném důsledku způsobuje poškození jater a žloutenku. Spontánní anticholestatická odpověď hepatocytů zahrnuje snížení exprese bazolaterálních transportních proteinů (např. Ntcp, Oatp1a1, Oatp1b2) a kanalikulárních efluxních transportérů (např. Mrp2, Bsep) společně s adaptačním zvýšením exprese bazolaterálních transportních systémů (např. Mrp3–6). Následně dochází ke zvýšené expresi renálních transportérů pro vychytávání a exkreci látek v primárních proximálních tubulech. Všechny tyto změny vedou ke zmírnění kumulace žlučových kyselin a bilirubinu v organismu.

P-glykoprotein (P-gp), kódovaný *MDR1* genem u lidí a *Mdr1a/Mdr1b* geny u hlodavců, je na dodávce ATP závislý efluxní transportér lokalizovaný na apikální membráně např. hepatocytů, střeva, ledvin, mozku, kde zprostředkovává přenos hydrofobních léčiv, jako jsou některé cytostatika, imunosupresiva, steroidní hormony nebo blokátory kalciových kanálů. Cholestáza vede ke zvýšení exprese P-gp v hepatocytech, což by mohlo mít za následek změnu farmakokinetiky léčiv, které jsou substráty tohoto transportéru. Ačkoli je cholestázou navozena změna exprese P-gp dobře popsána, není zcela objasněno, jestli má tato změna také vliv na jeho funkci. Proto cílem studie bylo *in vivo* hodnocení biliární a renální exkrece rhodaminu 123, substrátu P-glykoproteinu během akutní a chronické cholestázy u potkanů.

Akutní cholestáza byla navozena podvazem žlučovodu v trvání jednoho dne a chronická cholestáza navozena podvazem žlučovodu v trvání sedmi dnů. Poté byl obnoven tok žluče a po dosažení koncentrace v ustáleném stavu rhodaminu 123 byly zahájeny sběry žluče i moče. Exprese P-gp v játrech a ledvinách byla hodnocena metodou Western blot a kvantitativní imunohistochemií.

V játrech byla pozorována zvýšená exprese P-gp u akutní i chronické obstrukční cholestázy. Periportální lokalizace P-gp se rozšířila také do pericentrální zóny. V ledvinách byla imunohistochemicky prokázána zvýšená exprese P-gp u akutní cholestázy, která klesla po sedmi dnech podvazu žlučovodu. Změny biliární a renální clearance rhodaminu 123 neodpovídaly nicméně změnám exprese P-gp. Zatímco biliární clearance byla snížena u akutní cholestázy a zachována u chronické cholestázy, renální clearance byla u akutní cholestázy zachována a klesala po sedmi dnech podvazu žlučovodu. Z výsledků studie vyplývá, že extrahepatální cholestáza způsobuje časově závislé změny eliminace

rhodaminu 123, které neodpovídají plně změnám exprese P-gp v játrech a ledvinách. Závěrem lze konstatovat, že data z této studie přispívají k vysvětlení, proč je během akutní cholestázy často poškozena eliminace substrátů P-glykoproteinu.

Článek byl udělen první cenou v soutěži o nejlepší práci v kategorii Experimentální farmakologie za rok 2008 Českou společností pro experimentální a klinickou farmakologii a toxikologii České lékařské společnosti J. E. Purkyně.



## P-glycoprotein function and expression during obstructive cholestasis in rats

Stanislav Micuda<sup>a</sup>, Eva Brackova<sup>a</sup>, Leos Fuksa<sup>a</sup>, Jolana Cermanova<sup>a</sup>, Jan Osterreicher<sup>d</sup>, Milos Hroch<sup>a</sup>, Jaroslav Mokry<sup>b</sup>, Jaroslav Pejchal<sup>d</sup>, Jirina Martinkova<sup>a</sup> and Frantisek Staud<sup>c</sup>

**Objectives** The present study was aimed at evaluation of *in vivo* biliary and renal excretion of rhodamine 123 (Rho123), a P-glycoprotein (P-gp) substrate, in rats during either acute or chronic cholestasis induced by bile duct obstruction (BDO).

**Methods** The Rho123 clearance study was performed either one (BDO1) or seven (BDO7) days after BDO. Bile flow was reconstituted, and bile and urine were collected after steady-state plasma concentration of Rho123 was attained. Tissue expression of P-gp was evaluated by quantitative immunohistochemistry, and immunoblotting.

**Results** Significant up-regulation of the liver P-gp protein was observed in acute and chronic cholestasis. Primary periportal location of P-gp was enlarged also to pericentral areas. In the kidneys, immunohistochemistry showed pancellular increase in P-gp after 1 day of BDO, which subsided after 7 days of BDO. Nevertheless, biliary and renal clearances (CL<sub>Bile</sub> and CL<sub>R</sub>) of Rho123 did not reflect the induction of P-gp expression. While CL<sub>Bile</sub> was reduced one day after cholestasis and restored on the seventh day, the CL<sub>R</sub> was preserved in BDO1 group and reduced in BDO7 group without change in glomerular filtration rate. In parallel, biliary and renal clearances of conjugated bilirubin

were significantly reduced in both cholestatic groups compared with controls.

**Conclusion** These findings suggest that extrahepatic cholestasis causes time-dependent changes in elimination of Rho123 which do not exactly reflect alteration of P-gp expression in the rat liver and kidney. These data may help to explain impaired elimination of P-gp substrates after short-term cholestasis that may commonly occur in clinical practice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20:404–412 © 2008 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2008, 20:404–412

Keywords: acute and chronic extrahepatic cholestasis, mdr1, P-glycoprotein, rhodamine-123

<sup>a</sup>Department of Pharmacology, <sup>b</sup>Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, <sup>c</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague and <sup>d</sup>Department of Radiobiology, Faculty of Military Medicine in Hradec Kralove, University of Defence in Brno, Hradec Kralove, The Czech Republic

Correspondence to Dr Stanislav Micuda, MD, PhD, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, PO Box 38, Simkova 870, 500 38 Hradec Kralove, The Czech Republic  
Tel: +420 495 816 233; fax: +420 495 513 022;  
e-mail: micuda@fhk.uni.cz

Received 16 February 2007 Accepted 8 November 2007

### Introduction

P-glycoprotein (P-gp), encoded by *MDR1* gene in humans and *mdr1a/1b* genes in rodents, functions as an ATP-dependent efflux transporter identified on apical membranes of various tissues including the intestine, liver, kidney, adrenal gland, brain, eye and testis. In these organs, P-gp mediates the cellular efflux of many structurally and pharmacologically unrelated hydrophobic compounds, such as some anticancer agents, immunosuppressants, steroid hormones, calcium channel blockers, HIV protease inhibitors and cardiac glycosides [1]. As a consequence, changes in expression and activity of P-gp are commonly associated with substantial interindividual variability in the pharmacokinetics of these drugs, producing unpredictable changes in patients' response to therapy. Besides genetic 'polymorphism' and drug-drug interactions that have been most commonly described as a cause of modified P-gp activity, some

disease states such as endotoxemia, primary biliary cirrhosis, hepatocellular carcinomas, chronic hepatitis C virus infection and submassive cell necrosis are also associated with changes in the expression of P-gp [2–5]. Pharmacokinetics of P-gp substrates is consequently altered with subsequent impairment of clinical efficiency of these compounds. This situation could be exemplified by a significant 50% reduction in doxorubicin biliary clearance during endotoxin-induced down-regulation of hepatic P-gp protein expression [6,7]. The identification and characterization of disease-induced changes of the P-gp function could be, therefore, of clinical importance.

Extrahepatic or obstructive cholestasis is a pathological condition caused by biliary obstruction leading to hepatic and systemic accumulation of potentially toxic biliary compounds, such as bile acids and bilirubin, with consequent liver damage and jaundice [8]. Intensive

research in recent years revealed that obstructive cholestasis implicates profound changes in the expression of many hepatic transporters. Spontaneous anticholestatic defense mechanisms of hepatocytes against anionic compounds comprise downregulation of sinusoidal uptake (Ntcp, Oatp1, Oatp4) and canalicular efflux (mrp2) transporters, together with an adaptive induction of basolateral alternative export pumps (e.g. mrp3) [9,10]. In addition, renal uptake and efflux transporters for organic anions are upregulated (e.g. mrp2 and mrp3), thus facilitating the excretion of toxic substrates through urine [11]. Taken together, all these changes serve as adaptive mechanisms that may reduce the dangerous accumulation of bile acids and bilirubin within the organism. In contrast, little is known about the function of P-gp during obstructive cholestasis. It has been demonstrated that hepatic expression of P-gp protein and mRNA was several-fold upregulated starting from the first day of cholestasis, and persisted at least for the following 14 days [12–14]. In addition, immunohistochemistry of rat livers showed that during obstructive cholestasis, an increased P-gp remained localized at the canalicular domain of hepatocytes [15] suggesting a morphological basis for the potentially increased function. Nevertheless, exact proof of this hypothesis is still missing.

In this study, we determined the functional consequences of increased hepatic P-gp expression during acute and chronic obstructive cholestasis induced in rats by bile duct obstruction (BDO) lasting for 1 (BDO1) or 7 days (BDO7). Simultaneously, because the kidney offers an alternative route for elimination of xenobiotics in cholestatic liver disease, we examined the effects of BDO on the expression and function of P-gp in the kidney as well. Therefore, rhodamine-123 (Rho123), a model substrate for P-gp, was applied to bile duct-obstructed rats after reconstitution of bile flow to study its biliary and renal clearances as markers of P-gp function. Immunohistochemistry and western blot were used to describe the expression of P-gp in the liver and kidney. Verification of the present cholestatic in-vivo model was performed by evaluation of plasma concentrations and renal and biliary clearances of bilirubin, a sensitive in-vivo marker of cholestatic liver impairment.

## Methods

### Materials

Rho123 was purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, Missouri, USA). Mouse monoclonal antibody C219, directed to the *mdr1a/b*, was purchased from Signet Laboratories, Inc. (Dedham, Massachusetts, USA). Horseradish peroxidase-conjugated goat antimouse immunoglobulin G was obtained from GE Healthcare (Prague, Czech Republic). All other reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, Missouri,

USA) and SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany), respectively, and were of the highest purity available.

### Animal model

Male Wistar rats ( $n = 6$  in each group) weighing 280–320 g were subjected to BDO or sham-operation (controls) under general anesthesia (pentobarbital sodium 50 mg/kg of body weight intraperitoneally). The abdominal cavity was opened and the common bile duct exposed and cannulated. The open end of the cannula was sealed and stitched to the abdominal wall just under the skin. In sham-operated rats, the common bile duct was exposed, but not cannulated. All the rats received humane care according to the criteria outlined in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (revised 1996; <http://www.nap.edu/books/0309053773/html/81.html>). The study protocol was approved by the animal welfare committee of the Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove.

For Rho123 clearance experiments, control rats and rats with BDO were anesthetized by pentobarbital (50 mg/kg) 1 or 7 days after an earlier surgical procedure, and the bile duct was either cannulated in sham-operated animals or its obstruction was released (BDO animals) by cutting the free tip of the biliary cannula following a small abdominal incision, and bile was consequently collected in 20-min intervals. In addition, all the rats were cannulated with polyethylene tubes in the right jugular vein for drug administration, the left carotid artery for blood sampling and the urinary bladder for urine collection. The body temperature of the animals was maintained at 37°C with a heat lamp.

To elucidate the effect of BDO on steady-state biliary excretion and renal handling of Rho123, the rats received a bolus intravenous injection of Rho123 in a loading dose of 80 µg/kg followed by constant-rate infusion (Perfusor Compact; Braun, Prague, Czech Republic) of a 4% mannitol solution delivering a dose of 400 µg of Rho123/h at a rate of 2 ml/h until the end of the study. A 60-min infusion was found to result in a steady-state concentration of Rho123. These dosages were calculated using pharmacokinetic parameters obtained from an earlier study [16]. Mannitol was used to obtain a sufficient and constant urine flow rate. After a steady-state concentration of Rho123 was reached, bile and urine were collected in preweighed tubes at 20-min intervals for 60 min for pharmacokinetic analysis. Blood samples were taken at the midpoint of the bile and urine collection periods. Plasma samples were obtained by centrifugation of the blood samples at 3000 × *g* for 10 min. The volume of bile and urine samples was measured gravimetrically, with the specific gravity assumed to be 1.0. All plasma, bile and urine samples were stored at

-80°C until analysis. At the end of the experiments, the animals were killed by exsanguination and the livers and kidneys were immediately removed and stored at -80°C until analysis.

#### Analytical procedures

The concentrations of Rho123 in plasma, urine and bile were determined by the high-pressure liquid chromatography method described previously [16]. Briefly, the apparatus used for high-pressure liquid chromatography was a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a fluorescence detector (RF-10A; Shimadzu) (excitation, 480 nm; emission, 520 nm) consisting of an LC-10AS liquid pump and SIL-10A autoinjector. The conditions were as follows: column, TSKgel ODS-80TM (Tosoh; Tokyo, Japan); mobile phase, acetonitrile and 1% acetic acid (40:60, v/v); column temperature (LCO 100; ECOM s.r.o., Prague, Czech Republic), 50°C; and flow rate, 0.7 ml/min. The calibration curve of Rho123 was prepared each time in a concentration range from 0 to 5.0 µmol/l. The correlation coefficient (linearity) was always more than 0.999, and the detection limit was approximately 1 nmol/l. The within-day coefficient of variation was below 5.6%, whereas the between-day coefficient of variation was found to be below 6.8%. The concentrations of creatinine, total and conjugated bilirubin in plasma and urine were measured on Cobas Integra 800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

#### Pharmacokinetic analysis

Total plasma clearance ( $CL_{Tot}$ ) of Rho123 was estimated by dividing the constant infusion rate of Rho123 by the steady-state concentration in plasma ( $C_{ss}$ ). Biliary and renal clearances ( $CL_{Bile}$  and  $CL_R$ ) of Rho123 and bilirubin during each collection period were calculated by dividing the respective excretion rate by  $C_{ss}$  determined for that collection period. Glomerular filtration rate (GFR) was evaluated as clearance of endogenous creatinine ( $CL_{CR}$ ). The renal clearance ratio of Rho123 was calculated as  $CL_R/GFR$ .

#### Western blotting analysis

Crude plasma membrane was prepared from rat liver and kidney homogenates as described previously [16]. Fifty micrograms of liver or kidney crude plasma membrane were separated on a 6.25% polyacrylamide gel. After the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Prague, Czech Republic), it was blocked for 1 h at room temperature with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20. The membrane was then incubated with C219 (1:500) antibody for 1 h, washed and incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated goat antimouse IgG antibody (1:1000). After the membrane was washed four times with Tween 20 buffer, chemiluminescence development was performed using ECL reagents (GE Healthcare).

The immunoreactive bands on the autoradiography films were scanned with GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) and semiquantified using the QuantityOne imaging software (Bio-Rad).

#### Quantitative immunohistochemistry

Liver samples were frozen in hexane precooled in liquid nitrogen and stored at -80°C. Cryosections (5–6 µm thick) were prepared with a cryotome Minitome (Prague, Czech Republic). Immunostaining was carried out using C219 and horseradish peroxidase-conjugated rabbit antimouse antibodies diluted in phosphate-buffered saline containing 5% fetal calf serum at 1:100. Visualization was achieved by incubating with 3,3' diaminobenzidine tetrachloride as the peroxidase substrate. Stained samples were evaluated using the BX-51 microscope (Olympus, Prague, Czech Republic) and computer image analysis was done by ImagePro 4.11 (Media Cybernetics, Maryland, USA). Six microscopic fields at a 600-fold original magnification were randomly selected from each rat sample. The immunoreactive structures were detected in the inverted gray scale. Subsequently, integral optical densities of positive stained areas were measured.

#### Statistical analysis

Data are presented as means and SEMs. Significant differences between means were evaluated by analysis of variance. Post-hoc comparisons between the different groups were done by Tukey's test (Instat 3.0; Graphpad Software, Inc., San Diego, California, USA). A difference was considered significant when  $P$  was less than 0.05 ( $P < 0.05$ ).

## Results

#### Effect of bile duct obstruction on the steady-state pharmacokinetics of rhodamine-123

Time-dependent influence of cholestasis on the pharmacokinetics of Rho123, a model P-gp cationic substrate, under steady-state conditions in rats 1 or 7 days after BDO, is presented in Table 1. In the rats 24 h after BDO, bile flow rates, Rho123 biliary excretion rate and  $CL_{Bile}$  were significantly reduced without marked changes in either  $CL_R$  or  $CL_{Tot}$ . In contrast, 7 days of extrahepatic cholestasis resulted in full restoration of bile flow rate with a tendency to be higher than in the control group. Plasma  $C_{ss}$  rose significantly in BDO7 group, which corresponds with decreased renal and consequently total clearance. The  $CL_{CR}$  remained unchanged in both BDO groups. The  $CL_R/CL_{CR}$  ratio of Rho123 showed a tendency to decrease, which was more prominent in the BDO7 group (significant when compared with controls using unpaired  $t$ -test), although the differences failed to reach the 5% level of statistical significance.

**Table 1** Steady-state pharmacokinetics of Rho123 in control, and bile duct obstructed rats (*n*=6 in each group)

	Rho123		
	Controls	BDO1	BDO7
Urine flow rate (μl/min)	13.0 ± 0.6	15.0 ± 1.1	13.0 ± 1.0
Bile flow rate (μl/min)	25.0 ± 0.9	16.0 ± 1.8**	29.0 ± 1.8
Urinary excretion rate (nmol/min/kg)	4.1 ± 0.6	3.7 ± 0.5	3.0 ± 0.4
Biliary excretion rate (nmol/min/kg)	1.2 ± 0.1	0.35 ± 0.05**	1.3 ± 0.2
Plasma C <sub>ss</sub> (μmol/l)	0.5 ± 0.02	0.6 ± 0.02	0.8 ± 0.04**
CL <sub>R</sub> (ml/min/kg)	7.6 ± 1.2	6.6 ± 0.8	3.5 ± 0.4*
CL <sub>Bile</sub> (ml/min/kg)	2.1 ± 0.3	0.6 ± 0.1***	1.5 ± 0.2
CL <sub>Total</sub> (ml/min/kg)	32.0 ± 0.9	32.0 ± 0.8	21.0 ± 1.2***
CL <sub>CR</sub> (ml/min/kg)	9.1 ± 1.1	10.1 ± 1.0	8.6 ± 2.0
CL <sub>R</sub> /CL <sub>CR</sub>	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.05

BDO1, BDO7, obstructive cholestasis induced by bile duct obstruction lasting for one or seven days.  
Values are means ± SEM (*n*=6).

BDO, bile duct obstruction; CL<sub>Bile</sub>, biliary clearance; CL<sub>CR</sub>, clearance of endogenous creatinine; CL<sub>R</sub>, renal clearance; C<sub>ss</sub>, steady-state concentration in plasma; CL<sub>Total</sub>, total plasma clearance; Rho123, rhodamine-123.  
Significantly different from control value (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001).

**Table 2** Kinetics of endogenous total (A) and conjugated bilirubin (B) in rats (*n*=6 in each group) after bile duct obstruction or sham operation

	Controls	BDO1	BDO7
<b>(A) Total bilirubin</b>			
Urinary excretion rate (nmol/min/kg)	0.3 ± 0.05	0.6 ± 0.07*	0.4 ± 0.07
Biliary excretion rate (nmol/min/kg)	4.6 ± 0.6	17.0 ± 2.7	25.0 ± 5.6**
Serum C <sub>ss</sub> (μmol/l)	4.3 ± 0.1	25.0 ± 6.0*	28.0 ± 6.3*
CL <sub>R</sub> (ml/min/kg)	0.08 ± 0.01	0.03 ± 0.008**	0.02 ± 0.002***
CL <sub>Bile</sub> (ml/min/kg)	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.2
CL <sub>R</sub> /CL <sub>CR</sub>	0.009 ± 0.002	0.003 ± 0.001*	0.002 ± 0.0003**
The total/conjugated bilirubin ratio (fold change)			
Urinary excretion	3.4 ± 0.5	1.9 ± 0.2*	1.8 ± 0.1**
Biliary excretion	2.5 ± 0.8	1.2 ± 0.02	1.2 ± 0.07
Serum C <sub>ss</sub>	30.0 ± 6.9	2.0 ± 0.4***	2.1 ± 0.3***
<b>(B) Conjugated bilirubin</b>			
Urinary excretion rate (nmol/min/kg)	0.1 ± 0.01	0.3 ± 0.05**	0.2 ± 0.05
Biliary excretion rate (nmol/min/kg)	3.0 ± 0.8	15.0 ± 2.4	22.0 ± 5.4**
Plasma C <sub>ss</sub> (μmol/l)	0.2 ± 0.05	14.2 ± 4.5*	15.6 ± 4.4*
CL <sub>R</sub> (ml/min/kg)	0.7 ± 0.2	0.03 ± 0.01**	0.02 ± 0.004***
CL <sub>Bile</sub> (ml/min/kg)	20.5 ± 8.5	1.6 ± 0.5*	1.6 ± 0.4*
CL <sub>R</sub> /CL <sub>CR</sub>	0.09 ± 0.03	0.004 ± 0.001**	0.002 ± 0.001**

Data on urine and flow rates are listed in Table 1 – samples from the same animals were analyzed. Pharmacokinetic analysis was performed on the base of the assumption that bilirubin serum concentrations were in steady state.

BDO1, BDO7, obstructive cholestasis induced by bile duct obstruction lasting for 1 or 7 days.

Values are means ± SEM (*n*=6).

BDO, bile duct obstruction; CL<sub>Bile</sub>, biliary clearance; CL<sub>CR</sub>, clearance of endogenous creatinine; CL<sub>R</sub>, renal clearance; C<sub>ss</sub>, steady-state concentration in plasma.

Significantly different from control value (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001).

**Serum, biliary and renal bilirubin kinetics after bile duct obstruction**

To verify the efficacy of the model of cholestasis used, we evaluated endogenous bilirubin (total and conjugated) kinetics in sham-operated and BDO1/7 rats (Table 2),

**Table 3** Selected serum liver biochemical tests in control and bile duct obstructed rats

	Controls	BDO1	BDO7
ALT (IU/l)	0.6 ± 0.1	12.0 ± 2.3***	1.5 ± 0.3
AST (IU/l)	1.7 ± 0.2	15.0 ± 2.3***	5.7 ± 1.4
GMT (IU/l)	0.02 ± 0.003	0.17 ± 0.04**	0.07 ± 0.02

BDO1, BDO7, obstructive cholestasis induced by bile duct obstruction lasting for one or seven days.

Values are means ± SEM (*n*=6).

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BDO, bile duct obstruction; GMT, gamma-glutamyltransferase.

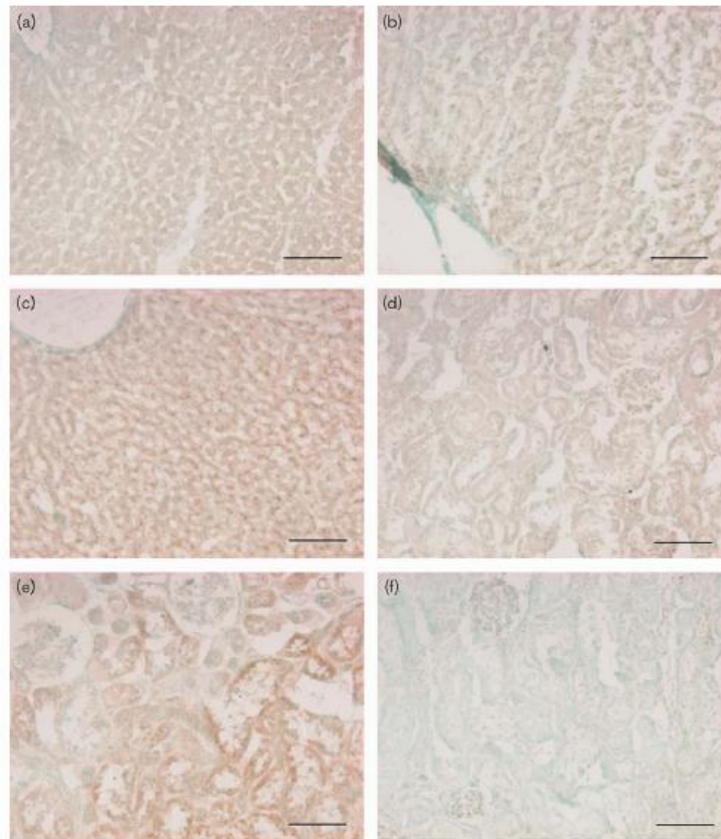
Significantly different from control value (*P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001).

assuming steady-state plasma concentrations. Both durations of extrahepatic cholestasis were associated with an increase in both the determined serum bilirubin levels. Most of elevated serum bilirubin was of the conjugated type as exemplified by decreased ratios of total to conjugated serum bilirubin concentrations (Table 2). Biliary excretions of the total and conjugated bilirubin were found increased in both groups of BDO rats. Biliary clearances of total bilirubin remained unchanged, however, whereas those of conjugated type were profoundly reduced after both durations of cholestasis. Urinary excretion of both types of bilirubin was found increased after 1 day of cholestasis and recovered after 7 days of operation. Renal clearance of both analytes was markedly reduced by BDO1/7 with the tendency to be worsened 'with progression' of cholestasis. Ratios of bilirubin renal clearances to creatinine clearances were reduced by both durations of cholestasis suggesting either a fall in active tubular secretion or increased reabsorption, which was much more prominent in conjugated bilirubin. Changes in the serum biochemical tests of liver function are demonstrated in Table 3. Significant increase in serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and gamma glutamyltransferase activities was observed, especially 1 day after BDO.

**Immunohistochemistry of P-glycoprotein**

Qualitative and quantitative aspects of P-gp tissue distribution in the liver and kidney were assessed in sham-operated and BDO rats. Fig. 1a shows the normal staining pattern seen in the liver of a control animal. Weak labeling was restricted to the hepatocyte apical membrane delineating the bile canaliculi preferentially in the periportal areas of the liver lobe. Livers from BDO1/7 rats showed a markedly increased labeling of the canalicular membrane with an extension of staining also to pericentral hepatocytes (Fig. 1b and c). In the kidney of control animals, P-gp yielded a weak signal on the apical surface of the epithelial cells of the proximal tubules (Fig. 1d). Quantification of P-gp by densitometry of the immunostained protein in controls and BDO1/7 rat liver and kidney is shown in Fig. 2c. In the liver, comparison of overall integral optical densities of stained

Fig. 1



Immunohistochemical microscopy of P-glycoprotein (P-gp) in control and cholestatic (1 and 7 days) rat liver and kidneys. Representative images (200-fold magnification) of six livers and kidneys per group of bile duct obstructed and sham-operated animals are shown. Cryosections (5–6  $\mu\text{m}$  thick) were labeled with the monoclonal antibody C219 directed against rat P-gp. In control rat liver, there was a weak P-gp immunostaining of hepatocytes in the vicinity of periportal areas (a). Bile duct obstruction increased the intensity of P-gp staining preferentially in the areas of central veins (b, c). In kidneys, very weak apical P-gp staining detected in proximal tubular cells of control animals (d) was pancellularly increased 1 day after bile duct obstruction (BDO) (e) and subsided in BDO7 animals (f). To quantify P-gp expression, six random visual fields were analyzed from each section at 600-fold of original magnification. Scale bar in images, 100  $\mu\text{m}$ ; same magnification for all panels.

P-gp protein between the sham-operated and either the BDO1 or BDO7 group indicated a 1.4-fold and a 1.9-fold increase, respectively. In the kidney, the same comparison revealed a significant 22.3-fold pancellular increase observed especially in three animals from the BDO1 group, whereas no significant change was observed after 7 days of cholestasis (Fig. 1e and f).

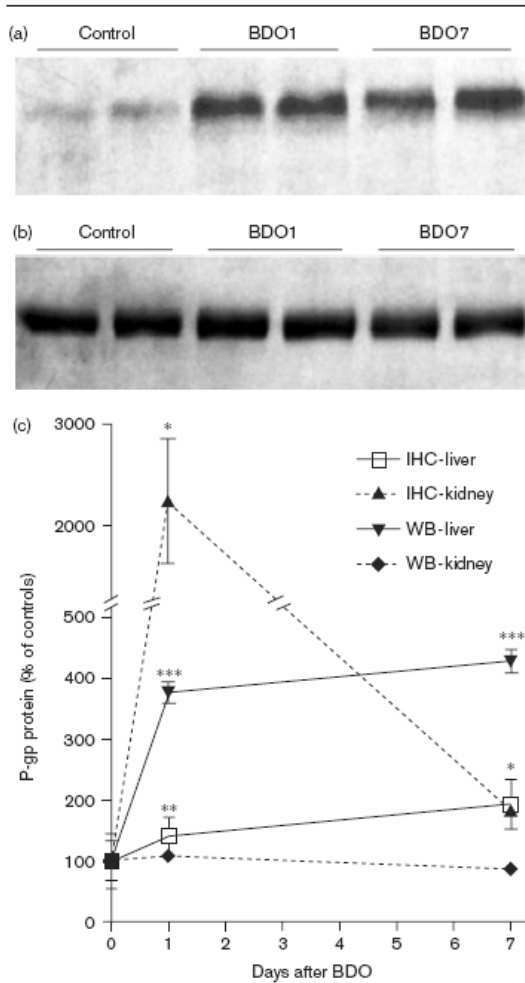
#### Western blot analysis

To further determine whether the expression of P-gp is altered at the protein level in obstructive cholestasis in livers and kidneys, western blot analysis was performed in total membrane fractions of these tissues obtained from

sham-operated controls and BDO rats. The protein blots, probed with the polyclonal C219 antibody, identified a band at 170 kDa (Fig. 2a and b). As seen in Fig. 2a, one day after BDO, there was a significant increase in the hepatic P-gp protein level to  $378.8 \pm 16.8\%$  of sham-operated controls ( $P < 0.001$ ). A more prolonged period of obstructive cholestasis (7 days) resulted in maintenance of upregulated P-gp protein in the liver to  $427.6 \pm 17.9\%$  ( $P < 0.05$ ) of sham-operated controls (Fig. 2a). In contrast, there were no significant changes of P-gp protein levels in kidneys 1 day after BDO with a slight, statistically insignificant, decrease in BDO7 animals (Fig. 2b).



Fig. 2



Effect of bile duct obstruction (BDO) on the expression of P-glycoprotein (P-gp) protein. Membrane fractions were isolated from liver and kidney obtained from sham-operated and BDO rats 1 and 7 days after initial surgery. Representative immunoblots of rat liver (a) and kidney are shown (b). Image (c) presents densitometric analysis on six independent controls and BDO samples at each time point. Data (mean  $\pm$  SEM) are expressed as percentages of values in sham-operated controls (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with controls). IHC, immunohistochemistry; WB, western blot.

**Discussion**

In this study, we evaluated the effect of acute and early chronic obstructive cholestasis on the P-gp-mediated biliary and renal excretion of its substrate, Rho123, in rats 1 or 7 days after BDO. Simultaneously with Rho123, endogenous total and conjugated bilirubin kinetics was analyzed in the same animals to ensure reliability of

established in-vivo rat cholestatic model. To support pharmacokinetic results of our in-vivo study, the expression of P-gp protein was evaluated by quantitative immunohistochemistry and western blot analysis in the liver and kidney.

A series of studies in humans and rats, including the present one, have reported several-fold upregulation of P-gp mRNA and protein expression during obstructive cholestasis [12,13,15,17,18]. This is an interesting observation because hepatic expression of most drug-transporting proteins is either preserved or, most commonly, downregulated during cholestatic liver injury. Hepatic uptake and biliary excretion of their respective substrates is consequently impaired [9]. These changes form the basic defense mechanism of hepatocytes against toxic effects of organic anions such as bile acids and bilirubin. Increase in hepatic P-gp expression, however, has no such clear functional rationale. P-gp is the main canalicular transporter for a variety of lipophilic xenobiotics with a large amphipatic or cationic molecule [1]. In the rat liver, there are two other important transporters for cationic compounds, Oct1 and Oatp2 [19]. Studies in *Xenopus laevis* oocytes demonstrated that rat Oct1 represents the hepatic uptake system for type I small organic cations. In contrast, Oct1 did not transport larger organic cations type II whose hepatic uptake seems to be primarily a function of the organic anion-transporting polypeptide 2 (Oatp2, Slco1a4) [19]. Nevertheless, expression of both transporters is progressively down-regulated after BDO, which could decrease disposition of P-gp substrates intracellularly in hepatocytes and subsequently at the canalicular membrane, compromising the efflux function of P-gp. This fact could, at least partially, explain the disagreement between increased expression of P-gp protein after BDO and unchanged or even decreased biliary excretion of Rho123 observed in our study.

Rho123 is a well-known substrate of P-gp, which has been widely used as an index of P-gp-mediated transport in rodents and tissue cultured models [20,21]. On the basis of these and our own [16] experience, we decided to use this compound for the assessment of hepatic and renal P-gp function in controls and cholestatic rats. In general, Rho123 pharmacokinetic parameters observed in sham-operated animals in our study are similar to values reported by other groups [20–22] suggesting reliability of the chosen model. Comparison of Rho123 renal and hepatic excretion showed that this compound is eliminated mostly by the kidney with only approximately 23% of the eliminated amount being excreted into bile. The difference between Rho123  $CL_{Tot}$  and sum of  $CL_R$  and  $CL_{Bile}$  could be ascribed to Rho123 intestinal exsorption clearance previously described by others [22]. In cholestatic animals, we observed time-dependent differences

in hepatic and renal elimination. Concerning hepatic elimination, 1 day of cholestasis decreased bile production and also Rho123 biliary excretion and clearance. In contrast, '7-day cholestasis produced almost complete' restoration of Rho123 biliary excretion, and difference from control values was not statistically significant. These data are in disagreement with the detected increase in P-gp expression in both durations of cholestasis. An explanation could be based on a detailed analysis of Rho123 physicochemical properties. Rho123 is a fluorescent dye, which exhibits a positive charge at physiological pH. Therefore, despite the assumption that it enters the cells by passive diffusion [23], partial water solubility at physiological pH eventuated the potential contribution of active transport to basolateral permeation of Rho123 into hepatocytes. Indeed, evidence exists that Rho123 is also taken up by Octs [24]. Decreased Oct1 reported during cholestasis supports this hypothesis [25]. Nevertheless, decrease in Oct1 expression is progressive in time and we observed normalization of Rho123 biliary excretion after 7 days. Apparently, decreased bile production observed 1 day after BDO also seems to play a role. Although the exact mechanism for this phenomenon is not clear, acute increase in intrabiliary pressure associated with impairment of tight junction interconnections between hepatocytes and backward bile leakage may be responsible, as exemplified by Chen *et al.* [26] and Kawaguchi *et al.* [27]. In addition, they also reported, in agreement with our results (Table 3), a higher intensity of changes in serum biochemical markers of liver injury during initial days of cholestasis compared with the more prolonged state.

Important questions arise about mechanisms underlying the increase in hepatic P-gp expression after BDO. Induction of P-gp protein expression during extrahepatic cholestasis has been described in association with increase in its mRNA expression suggesting transcriptional mechanism [12,18]. One possible explanation could be increased hepatic accumulation of lipophilic endobiotics (e.g. bilirubin) and xenobiotics, which cross the basolateral membrane of hepatocytes preferentially by passive diffusion (without participation of otherwise decreased basolateral uptake transporters), and could consequently activate transcription factors, which control P-gp expression such as CAR and PXR [28]. This fact is indirectly supported by recent similar findings, that some CAR and PXR receptor agonists, such as phenobarbital, Yin Chin, rifampicin and atorvastatin could restore/increase the expression and function of some anionic transporters during cholestasis (e.g. mrp2, oatp2) [29–31]. In addition, morphological patterns of redistributed expression of P-gp from periportal also to pericentral zone during cholestasis-induced upregulation suggest a similar mechanism as in the case of enzyme inducer-mediated upregulation of P-gp that we previously

described for dexamethasone, a PXR receptor agonist [16]. To mention all possibilities, posttranscriptional mechanism [28,32] in upregulation of P-gp has also been described to be involved in P-gp protein induction after administration of some enzyme inducers [33]. Nevertheless, evaluation of the exact mechanisms contributing to the upregulation of P-gp after BDO is a matter of further research.

It has been reported that Rho123 is actively secreted into urine by P-gp and that alterations in P-gp expression are accompanied with changes in P-glycoprotein-mediated renal tubular secretory clearance [20,34,35]. As shown by our results, cholestasis induced by BDO produced time-dependent changes in the renal excretion of the compound. One day after cholestasis, the net tubular secretion clearance,  $CL_R/CL_{CR}$  ratio, and renal clearance of Rho123 as well as the expression of P-gp protein were preserved, which complies with the reported nephroprotective effect of cytokines released from the impaired liver during the first day of cholestasis [36]. Seven days after BDO, we observed an unchanged renal excretory rate of Rho123. Correction of the parameter to plasma  $C_{SS}$ , however, revealed a decreased renal clearance of Rho123 at that time. As urine production was even slightly increased in the BDO7 group, similarly to an earlier report [17], it suggests an impairment in the tubular excretory function. In agreement, increased susceptibility of kidneys to damage has been previously demonstrated 4–7 days after BDO [36]. Moreover, we observed a slight reduction of P-gp protein expression on the seventh day after BDO as measured by western blot, which complies with the kinetic results. Interestingly, intensive pancellular increase in proximal tubular P-gp staining was observed by immunohistochemistry after 1 day of cholestasis without a corresponding change in western blot results or Rho123 kinetic parameters. Strong staining was seen, especially, in three animals. The reason for this effect is not known. Cross-reactivity of antibody could be the cause, but no such effect was seen in other animals from the group. One possible explanation is the variably increased synthesis with an impaired insertion/redistribution of antigen to plasma membrane as seen with mrp2 in the hepatocytes of acute cholestatic animals [37–39]. Diffuse cytoplasmic localization without clear association with the plasma membrane could thereafter produce a variable extraction of the antigen for western blot analysis. The mechanism and significance of this phenomenon requires further investigation.

To verify the reliability of our in-vivo cholestatic model, we also evaluated the serum concentration and biliary and renal clearance of endogenous bilirubin (total and conjugated), an endogenous organic anion. This typical marker of cholestatic liver injury is excreted from the hepatocytes into bile almost exclusively by mrp2, mainly

in glucuronosyl form [40]. The excretion across the canalicular membrane of hepatocytes is the rate-limiting step of overall hepatic transport of bilirubin [41] and is deficient in two mutant rat strains, GY/TR [42] and Eisai hyperbilirubinemic rat [43] with the absence of rat mrp2 [44]. During the extrahepatic cholestasis, mrp2 is rapidly redistributed from canalicular membrane of hepatocytes with consequent intensive downregulation of its expression [10,11]. As a compensatory mechanism, expression of basolateral mrp3 transporter is upregulated in the liver together with induction of excretory- (mrp2/3) and downregulation of apical uptake- (Isbt-ileal sodium-dependent bile salt transporter) transporters in the kidney [11,17]. Our data of increased serum concentration and urinary excretion of total and conjugated bilirubin correspond to these reports. When we corrected excretory data by plasma concentrations, we observed, however, a marked decrease in renal clearances of both bilirubin forms in either duration of cholestasis. The reason for this observation is currently unknown. As a similar observation was made previously for urinary excretion of bile acids in rats with BDO, we could accordingly suggest an altered plasma protein binding and currently unidentified renal tubular impairment as the interfering mechanism [45]. In contrast, our results of decreased biliary clearance of conjugated bilirubin are in strong agreement with previously described downregulation of hepatic mrp2 [9–11]. Moreover, we observed a decrease in the ratio of total to conjugated serum bilirubin concentration that might comply with an increased expression of basolateral mrp3 and downregulation of apical mrp2 [10,11]. Contribution of hepatic UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1), the main enzyme involved in bilirubin conjugation [46], to disproportionately increased serum-conjugated bilirubin concentrations remains a matter of further research, because expression of Ugt1a protein was described to be unchanged during cholestasis, whereas phase II metabolism of xenobiotics was severely reduced [47].

In conclusion, this study is the first report using in-vivo clearance experiments to reveal the function of hepatic P-gp during obstructive cholestasis. We confirmed the increased expression of P-gp protein in the rat liver and kidney. This change, however, was not associated with a corresponding increase in Rho123 biliary clearance. One day after obstruction, Rho123 CL<sub>Bile</sub> was found significantly reduced most probably as a consequence of increased paracellular permeability and regurgitation of biliary constituents into plasma. Seven days after obstruction, the Rho123 CL<sub>Bile</sub> was found restored but not increased above values measured in sham-operated animals. In the kidneys, we observed an unimpaired Rho123 CL<sub>R</sub> after 1 day of cholestasis whereas its reduction owing to tubular impairment was seen on the seventh day after BDO. The mechanisms involved in these discrepancies between

morphological and functional changes of P-gp during extrahepatic cholestasis require further elucidation. Importantly, the selected in-vivo model of extrahepatic cholestasis with a reconstituted bile flow offers an excellent tool for the investigation of functional consequences of cholestasis for the pharmacokinetics and dynamics of endobiotics and xenobiotics.

### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the skilful technical assistance of Jitka Hájková. This study was supported by a grant from the Ministry of Education No. 1P05OC062-COST B25.002.

Conflict of interest: none declared.

### References

- 1 Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55:3–29.
- 2 Vos TA, Hooiveld GJ, Koning H, Childs S, Meijer DK, Moshage H, *et al.* Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxaemic rat liver. *Hepatology* 1998; 28:1637–1644.
- 3 Ros JE, Libbrecht L, Geuken M, Jansen PL, Roskams TA. High expression of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. *J Pathol* 2003; 200:553–560.
- 4 Zollner G, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Marschall HU, Zatloukal K, *et al.* Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 38:717–727.
- 5 Zollner G, Wagner M, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Zatloukal K, *et al.* Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005; 25:367–379.
- 6 Hartmann G, Vassileva V, Piquette-Miller M. Impact of endotoxin-induced changes in P-glycoprotein expression on disposition of doxorubicin in mice. *Drug Metab Dispos* 2005; 33:820–828.
- 7 Hidemura K, Zhao YL, Ito K, Nakao A, Tatsumi Y, Kanazawa H, *et al.* Shiga-like toxin II impairs hepatobiliary transport of doxorubicin in rats by down-regulation of hepatic P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein Mrp2. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1636–1642.
- 8 Pauli-Magnus C, Stieger B, Meier Y, Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *J Hepatol* 2005; 43:342–357.
- 9 Lee J, Boyer JL. Molecular alterations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders. *Semin Liver Dis* 2000; 20:373–384.
- 10 Donner MG, Keppler D. Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* 2001; 34:351–359.
- 11 Tanaka Y, Kobayashi Y, Gabazza EC, Higuchi K, Kamisako T, Kuroda M, *et al.* Increased renal excretion of bilirubin glucuronide transporters in a rat model of obstructive jaundice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282:G656–G662.
- 12 Schrenk D, Gant TW, Preisegger KH, Silverman JA, Marino PA, Thorgeirsson SS. Induction of multidrug resistance gene expression during cholestasis in rats and nonhuman primates. *Hepatology* 1993; 17:854–860.
- 13 Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, Ananthanarayanan M, Koeppl TA, Schlosser SF, *et al.* The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 1997; 113:255–264.
- 14 Lee JM, Trauner M, Soroka CJ, Stieger B, Meier PJ, Boyer JL. Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 2000; 118:163–172.
- 15 Accatino L, Pizarro M, Solis N, Koenig CS, Vollrath V, Chianale J. Modulation of hepatic content and biliary excretion of P-glycoproteins in hepatocellular and obstructive cholestasis in the rat. *J Hepatol* 1996; 25:349–361.
- 16 Micuda S, Fuksa L, Mundlova L, Osterreicher J, Mokry J, Cermanova J, *et al.* Morphological and functional changes of P-glycoprotein during dexamethasone induced hepatomegaly. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34:296–303.



# **INCREASED MELIBIOSE/RHAMNOSE RATIO IN BILE OF RATS WITH ACUTE CHOLESTASIS**

Tomsik P, Sispera L, Rezacova M, Niang M, Stoklasova A, Cerman J, Knizek J, Brcakova E, Cermanova J and Micuda S (2008) *Increased melibiose/rhamnose ratio in bile of rats with acute cholestasis*. J Gastroenterol Hepatol 23:1934-1940.

## Komentář k článku

Jedním z mechanismů, který významně ovlivňuje tvorbu žluče a pohyb látek mezi krví a žlučí, je tzv. hematobiliární bariéra. Je tvořena intercelulárními kontakty typu „tight-junctions“ a „gap-junctions“. Zatímco „gap-junctions“ slouží k výměně látek mezi buňkami charakteru intercelulární signalizace, „tight-junctions“ tvoří právě tu bariéru mezi krví a žlučí, jejíž kvalita spolu s transportními procesy v hepatocytech řídí tvorbu žluče. Zajímavostí je, že oba mechanismy jsou v naprosté většině případů studovány odděleně. Je velmi dobře prokázáno, že těsné spoje regulují pohyb iontů, vody a rozpuštěných látek paracelulárními prostory mezi hepatocyty, a proto při jakémkoli transportu léčiv do žluče je nutno současně uvážit i funkčnost dané bariéry. Zejména u obstrukční cholestázy bylo prokázáno, že kvalita bariéry je výrazně porušena a dochází ke zvýšenému pohybu látek mezi žlučí a krví. Podobně jako u transportérů jsou sice detailně popsány změny exprese proteinů bariéry (okludin, claudiny, ZO-1 atd.), informací z funkčních testů je málo. Ve většině prací byla použita křenuvová peroxidáza jako indikátor funkce hematobiliární bariéry, následně se však ukázalo, že tato látka má při průchodu do žluče významnou intracelulární komponentu. Cílem studie bylo zavést spolehlivý test permeability za použití melibiózy (disacharid) a rhamnózy (monosacharid). Toto použití vycházelo z širokých znalostí testování permeability střevní sliznice založené na skutečnosti, že monosacharid prochází volně transcelulárně, zatímco disacharidy paracelulárně.

Akutní obstrukční cholestáza byla navozena podvazem žlučovéhoodu v trvání jednoho dne. Po uplynulé době byla provedena 4hod *in vivo* kinetická studie s iniciální intravenózní aplikací melibiózy a rhamnózy, každá v dávce 100 mg/kg.

U intaktních potkanů představovala biliární exkrece melibiózy a rhamnózy v porovnání s jejich renální exkrecí (71 % a 62 %) pouze minoritní podíl z podané dávky (0,06 % a 0,4 %). Cholestáza vedla ke zvýšení exkrece obou cukrů do žluče a současně se zvýšil poměr melibióza/rhamnóza ve žluči, což představuje významný indikátor paracelulární permeability. Renální clearance melibiózy ani poměr renální exkrece melibióza/rhamnóza nebyl cholestázou ovlivněn.

Z výsledků studie vyplývá, že melibiózo-rhamnózový permeabilitní test je vhodný pro detekci a hodnocení cholestázou indukovaného poškození hematobiliární bariéry.

## HEPATOLOGY

**Increased melibiose/rhamnose ratio in bile of rats with acute cholestasis**

Pavel Tomsik,\* Ludek Sispera,\* Martina Rezacova,\* Mohamed Niang,\* Alena Stoklasova,\* Jaroslav Cerman,\* Jiri Knizek,† Eva Brackova,† Jolana Cermanova† and Stanislav Micuda†

\*Department of Biochemistry, †Department of Pharmacology, and ‡Department of Medical Biophysics, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

**Key words**

biliary excretion, cholestasis, melibiose, rhamnose.

Accepted for publication 14 April 2008.

**Correspondence**

1. Dr Pavel Tomsik, Department of Biochemistry, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, PO Box 38, Simkova 870, 500 38 Hradec Kralove, Czech Republic. Email: tomsikp@fhk.cuni.cz.  
 2. Dr Stanislav Micuda, Department of Pharmacology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, PO Box 38, Simkova 870, 500 38 Hradec Kralove, Czech Republic. Email: micuda@fhk.cuni.cz.

**Abstract**

**Background and Aim:** Melibiose/rhamnose permeability test is used for noninvasive intestinal mucosa barrier testing. However, the possible escape route of the absorbed saccharides through either intact or impaired blood–biliary barriers has not so far been explored. The objective of the present study was therefore two-fold: First, to describe in detail the biliary pharmacokinetics of melibiose and rhamnose in rats; second, to evaluate the changes of both sugars' pharmacokinetics upon impairment of the blood–biliary barrier by acute extrahepatic cholestasis in rats.

**Methods:** Bile duct obstructed (BDO), sham-operated and intact (unoperated) male Wistar rats were administered, 24 h after the appropriate intervention, with a single intravenous dose of melibiose and rhamnose, and a 4-h pharmacokinetic study was performed.

**Results:** In intact animals, the biliary excretion of melibiose and rhamnose was only 0.06% and 0.4% of the administered dose, respectively, while the urinary excretion accounted for 70.6% and 61.7%, respectively. In BDO animals, the biliary excretion rate of both saccharides, especially that of melibiose, was increased with a consequent 4.4-fold rise of the biliary melibiose/rhamnose ratio, the accepted paracellular permeability indicator. Both, the renal clearance of melibiose and the urinary melibiose/rhamnose ratio remained uninfluenced by cholestasis.

**Conclusion:** The present study is the first to describe in detail pharmacokinetic parameters and the biliary excretion of melibiose and rhamnose in healthy and cholestatic rats. The altered melibiose/rhamnose biliary excretion ratio in BDO rats indicates that the test is able to detect the impairment of the blood–biliary barrier in acute extrahepatic cholestasis.

**Introduction**

“Blood–biliary barrier” is the term designating the connection of hepatocytes by tight junctions to form cell plates strictly sealing the bile canaliculi and thus ensuring bile flow without its backward leakage into the blood. In particular, tight junctions play a central role in regulating the movement of solutes, ions, and water through the paracellular spaces between hepatocytes and maintaining the cellular polarity.<sup>1</sup> Previous studies have indicated that most cholestatic liver diseases are associated with the alterations of tight junctions which might produce a functional deficit of this barrier, as seen in obstructive jaundice.<sup>2</sup> However, while structural changes are well described in this pathophysiological situation,<sup>3</sup> limited information is available for quantitative estimation of the blood–biliary barrier function. Most permeability data come from short-term (5–30 min) studies with horseradish peroxidase (HRP) and [<sup>14</sup>C]sucrose. An increase in the movement of the compounds between the bile and the blood has been seen in cholestatic

animals.<sup>2,4–7</sup> On the other hand, more detailed kinetic data with the use of other well-accepted permeability tests are still missing. In addition, no information is available about the permeability of the blood–biliary barrier 24 h after bile duct obstruction in rats, a widely used model of acute cholestasis.

Dual-sugar tests of permeability are generally accepted as a noninvasive means of assessing intestinal damage in humans and animals.<sup>8–10</sup> In addition, they serve as a useful screening tool for the evaluation of the paracellular pathway of the intestinal epithelium in experimental animal models.<sup>10,11</sup> The concept is based on the assumption that larger disaccharides penetrate barriers through intercellular spaces, whereas monosaccharides go via the transcellular pathway. The testing sugars are administered orally and a consequent measurement of their ratio in the 5-h urine collection serves as the marker of the intestinal permeability. The most commonly used sugars for such evaluation are lactulose and L-rhamnose. Nevertheless, thanks to the diarrheal potential of lactulose, another nonphysiological disaccharide, melibiose, has

also been successfully introduced for testing in humans.<sup>12,13</sup> With the use of these tests, it was shown that intestinal permeability is increased in situations like sepsis, burn injury, and villous atrophy.<sup>9</sup> However, the sugar testing is based on assumptions that may not be valid during disease states. One of the main ones is the stable tissue distribution of the compound during evaluation. Nevertheless, this parameter is unpredictable in diseases such as extrahepatic cholestasis or cirrhosis, where the broken integrity of the blood–biliary barrier may offer disaccharides an alternative pathway to escape from the organism, and the results of intestinal permeability testing might be highly modified.<sup>3,14,15</sup> This fact is poorly studied. Moreover, there are no published studies describing the biliary excretion of either rhamnose or melibiose and the possible contribution of this pathway to their overall elimination.

The aims of present study were: first, to describe in detail the pharmacokinetics of rhamnose and melibiose in rats with special attention to their biliary excretion, and second, to evaluate the integrity of the blood–biliary barrier during acute extrahepatic cholestasis induced by bile duct obstruction (BDO) in rats. We used a tried dual-sugar permeability test based on intravenous coadministration of a single bolus dose of melibiose and rhamnose. In addition, we established a simple and sensitive high-performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous detection of both sugars in biological fluids.

## Methods

### Materials

L-rhamnose, melibiose, cellobiose, and fluorenylmethylcarbazate (fluorenylmethoxycarbonyl hydrazine) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other reagents were obtained from Sigma and SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Germany), respectively, and were of the highest purity available.

### Animal models

Male Wistar rats ( $n = 7$  in each group) weighing 280–320 g were subjected to BDO or sham operation (controls) under general anaesthesia (sodium pentobarbital 50 mg/kg body weight intraperitoneal [i.p.]). The abdominal cavity was opened and the common bile duct exposed and cannulated. The open end of the cannula was sealed and stitched to the abdominal wall just under the skin. In sham-operated rats, the common bile duct was exposed, but not cannulated. Intact group animals underwent pharmacokinetic study without any previous surgical procedure. All rats received humane care according to the criteria outlined in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.<sup>16</sup> The study protocol was approved by the animal welfare committee of Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove.

### Melibiose/rhamnose pharmacokinetics in rats

In rats under anaesthesia by i.p. injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg) the bile duct was either cannulated (sham-operated and intact rats) or its obstruction was released (BDO). Thereafter, the right jugular vein, left carotid artery, bile duct, and urinary bladder were cannulated for drug administration, blood sampling, bile

collection, and urine collection, respectively. After surgical preparations, the rats received a single bolus dose of melibiose and L-rhamnose (100 mg/kg). Blood samples ( $\approx 0.3$  mL) were taken at designated time intervals (–5, 4, 10, 30, 60, 90, 120, 180, and 240 min after injection of sugars). Plasma samples were obtained from the whole blood by centrifugation at 1200 g for 5 min at 4°C. Bile and urine samples were collected in preweighed tubes at 30-min intervals throughout the experiment. Samples were stored at –80°C until analysis. The body temperature of the animals was maintained at 37°C by placement of the animals on a heating platform.

### Drug analysis

The concentration of both sugars was determined by the HPLC method with a system (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisting of an LC-20AD pump, RF-10AxI fluorescence detector, SIL-20AC autosampler, CBM-20A communication bus module, and LC solution chromatography workstation. The derivative reagent was prepared by dissolving 5 mg fluorenylmethoxycarbonyl-hydrazine per ml acetonitrile followed by the addition of 40  $\mu$ L/mL acetic acid. For the analysis, 20  $\mu$ L of unknown sample, calibration standard, or spiked quality control sample were added to 100  $\mu$ L of internal standard solution (80  $\mu$ mol/L cellobiose in 90% ethanol). The mixture was centrifuged at 18 000 g for 10 min, and then 60  $\mu$ L of supernatant were added to 150  $\mu$ L of derivative reagent. The reaction mixture was heated at 65°C for 6 h, then cooled to room temperature and centrifuged again (18 000 g for 10 min). 100  $\mu$ L of the supernatant were transferred into a 2-mL vial with a 300- $\mu$ L glass insert. A 1  $\mu$ L aliquot was injected onto the Spherisorb ODSII column (125  $\times$  4 mm, 3  $\mu$ m; Waters, Milford, MA, USA) equipped with a C<sub>18</sub> precolumn (4  $\times$  3.2 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Sugars were chromatographed at 40°C by a linear gradient at a flow rate of 1 mL/min. The starting eluent consisted of 22.5% acetonitrile and 77.5% water. The content of acetonitrile was increased to 26.5% over the course of 22.5 min. The column was washed with methanol containing 1 mL/L acetic acid for 19 min to remove excess of reagent/byproducts and then equilibrated with starting eluent for 17 min before the next injection. The excitation and emission wavelengths of the fluorescence detector were 270 nm and 320 nm. The autosampler temperature was set at 10°C. Calibration curves exhibited good linearity for melibiose from 12 to 1250  $\mu$ mol/L and also for rhamnose from 25 to 2500  $\mu$ mol/L, where the coefficient of determination,  $r^2$ , was 0.999 for melibiose and 0.998 for rhamnose. The concentrations corresponding to the lowest nonzero calibration standard were taken as a lower limit of quantification and were 12  $\mu$ mol/L for melibiose and 25  $\mu$ mol/L for rhamnose. To assess accuracy and precision, the spiked quality control samples prepared at four concentration levels in blank plasma, bile and diluted urine (dilution 1:20 with water) were analyzed within the batch ( $n = 6$ ). The analytical recovery was from 95% to 105.6% in all but the lowest concentration of melibiose in urine examined (12  $\mu$ mol/L). In this case, the recovery was 118.6%. The precision expressed as a coefficient of variation was between 1.3% and 5.3% for both compounds in all three matrices.

The concentrations of creatinine and bilirubin (direct and total) and activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine

aminotransferase (ALT) in plasma were measured on Modular PP (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

### Pharmacokinetic analysis

Data were analysed with Kinetica and MS Excel software. Pharmacokinetic parameters of both sugars administered intravenously (i.v.) to rats as a single bolus dose were calculated according to standard noncompartmental techniques.<sup>17</sup> The highest detected plasma concentration of the compound ( $C_{max}$ ) and the corresponding time to reach this concentration ( $T_{max}$ ) were determined from the plasma concentration–time data. The elimination rate constant ( $K_{el}$ ) was estimated by subjecting the plasma concentrations in the terminal phase to linear regression analysis. The terminal elimination phase half-life ( $t_{1/2}$ ) was calculated by dividing  $\ln 2$  by  $K_{el}$ . The area under the plasma concentration–time curve ( $AUC_{0-\infty}$ ) was calculated as the sum of the  $AUC_{0-T_{last}}$  estimated by the log-linear trapezoidal rule from time 0 to the time of the last measured concentration ( $T_{last}$ ) and the AUC extrapolated to infinity ( $AUC_{T_{last}-\infty}$ ) calculated as the last measured concentration divided by  $K_{el}$ . Total clearance ( $CL_{Tot}$ ) was calculated as  $CL_{Tot} = Dose / AUC_{0-\infty}$ . The apparent volume of distribution ( $Vd_z$ ) was calculated as  $Vd_z = CL_{Tot} / K_{el}$ . The steady-state volume of distribution ( $Vd_{ss}$ ) was calculated as  $Vd_{ss} = CL_{Tot} \times AUMC / AUC_{T_{last}-\infty}$  where AUMC is the area under the first moment plasma concentration vs time curve. The biliary ( $CL_{Bile}$ ) and renal ( $CL_R$ ) clearance was calculated as  $CL_{Bile} = X_{Bile} / AUC_{0-T_{last}}$  and  $CL_R = X_{Urine} / AUC_{0-T_{last}}$ , where  $X_{Bile}$  and  $X_{Urine}$  were the amounts of melibiose or rhamnose excreted to bile and urine, respectively, during the evaluated period, and  $T_{last}$  was 240 min.<sup>18</sup>

Melibiose/rhamnose ratio in biological fluids was calculated in all collection periods separately as well as from cumulative data.

### Statistical analysis

Experiments were carried out on five animals per group. All experimental data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was examined by ANOVA using Graphpad Prism 5.0 software (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

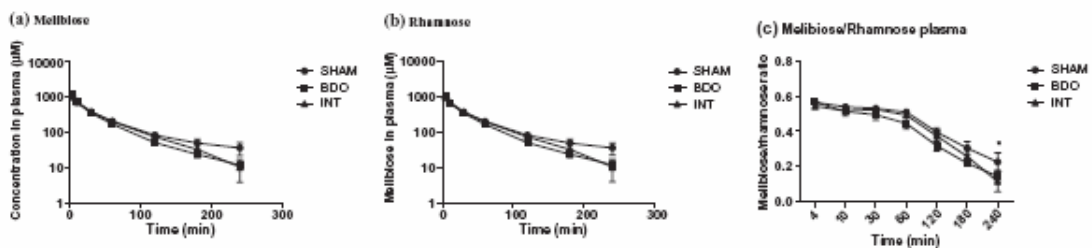
## Results

### Pharmacokinetics of melibiose and rhamnose in rats

Semilogarithmic plots of concentration–time data for melibiose and rhamnose after a single i.v. injection of 100 mg/kg to rats are shown in Figure 1. Pharmacokinetic parameters for both compounds are summarized in Table 1. Importantly, no significant differences in pharmacokinetic parameters of both compounds have been detected between intact and sham-operated animals. The volumes of distribution measured by both approaches ( $Vd_z$  and  $Vd_{ss}$ ) gave similar values. Comparison of the clearance values showed highly prevailing renal elimination of both sugars. To study the mechanisms involved in the renal excretion of both sugars, the ratios of renal clearances and the glomerular filtration marker, creatinine clearance was evaluated and showed values approximately 1 for both sugars (Table 1). In BDO animals, the total clearance of melibiose was slightly but insignificantly higher than control values, which was associated with a significant increase of  $CL_{Bile}$  when compared with data from sham-operated animals. Similar results were measured for rhamnose (Table 1b). In contrast, we did not observe change in any other of the measured pharmacokinetic parameters of melibiose or rhamnose after BDO.

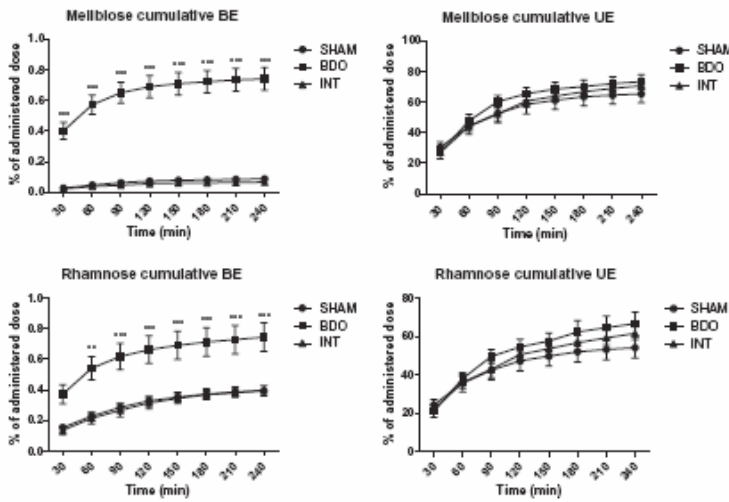
### Biliary and renal excretion

The urinary and bile flow rates throughout the experiment in respective groups of animals are presented in Figure 2. There was no statistically significant difference between the groups in any of measured intervals. Figure 3 shows the ratios of corresponding plasma to bile concentrations of melibiose and rhamnose. While this ratio was markedly decreased for melibiose in the BDO group, no significant decrease was seen for rhamnose in BDO animals. The cumulative biliary and urinary excretion time courses of melibiose and rhamnose in rats are shown in Figure 4. In intact (unoperated) rats, the principal route of elimination of both melibiose and rhamnose was urinary excretion, accounting for 70.6% and 61.7% of the administered dose, respectively, when urine was collected for 4 h. In contrast, biliary excretion of both compounds was minor, taking only 0.06% and 0.4% of the applied melibiose

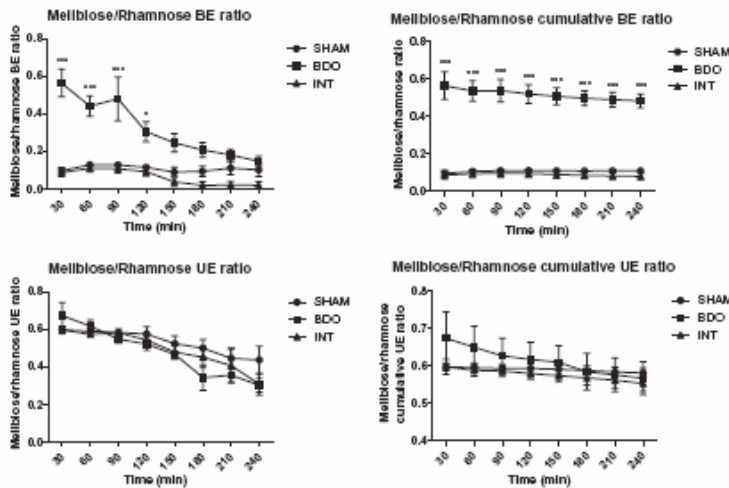


**Figure 1** Plasma concentrations versus time plots of melibiose (a) and rhamnose (b) and their ratio (c) in intact (INT), sham-operated (SHAM), and bile duct obstructed (BDO) rats applied the single intravenous bolus dose of 100 mg/kg. Values are the mean  $\pm$  SEM ( $n = 7$  in each group). Significantly different from sham-operated animals (\*\* $P < 0.01$ ).





**Figure 4** Cumulative biliary (BE) and urinary excretion (UE) of melibiose and rhamnose in intact (INT), sham-operated (SHAM), and bile duct obstructed (BDO) rats (24 h after surgical procedure). Values are the mean  $\pm$  SEM ( $n=7$  in each group). Significantly different from sham-operated animals (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).



**Figure 5** Melibiose/rhamnose ratio of their biliary (BE) and urinary excretion (UE) and changes of this ratio upon correction to cumulative values in intact (INT), sham-operated (SHAM), and bile duct obstructed (BDO) rats (24 h after surgical procedure). Values are the mean  $\pm$  SEM ( $n=7$  in each group). Significantly different from sham-operated animals (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

**Table 2** Selected serum liver biochemical tests in intact, sham-operated, and bile duct obstructed rats

	INT	SHAM	BDO
ALT (IU/L)	2.5 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 0.8	15.3 $\pm$ 1.3***
AST (IU/L)	4.8 $\pm$ 0.9	4.7 $\pm$ 1.1	16.0 $\pm$ 1.2***
Total bilirubin	3.0 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.2	11.6 $\pm$ 1.6**
Conjugated bilirubin	2.0 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 1.9*

Values are mean  $\pm$  SEM ( $n=7$ ).

Significantly different from control value (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BDO, bile duct obstructed; INT, intact; SHAM, sham operated.

The permeability of the blood–biliary barrier is one of the main factors contributing to the regulation of bile formation. It is formed by tight junction interconnections of hepatocytes and together with gap junctions it is regulated by a complex interplay of events.<sup>1</sup> During the extrahepatic cholestasis, the integrity of the barrier is impaired, which is associated with leakage of compounds from bile to blood and vice versa. However, most results come from microscopical techniques with the functional data being limited to a few studies using HRP.<sup>2,7</sup> According to these reports, obstructive cholestasis-induced HRP leakage from blood to bile shows two peaks: the first one, at 4–6 min after HRP injection, involves the paracellular pathway and the second, at 20–25 min, the transcellular pathway.<sup>2,19</sup> This raised the question of a possible limitation for the interpretation of such a test because transport processes of

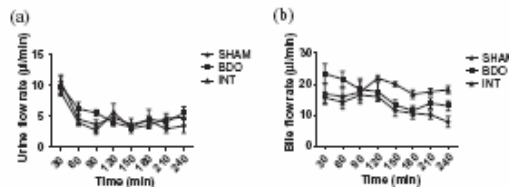
**Table 1** Pharmacokinetic parameters of melibiose and rhamnose after a single intravenous bolus dose of 100 mg/kg in intact, sham-operated, and bile duct obstructed rats (24 h after surgical procedure)

(a) Melibiose			
	INT	SHAM	BDO
Dose (μmol)	103 ± 1.6	97 ± 1.2	101 ± 1.9
C <sub>max</sub> (μM)	1033 ± 61	1003 ± 66	1150 ± 77
AUC <sub>0-24</sub> (μM.h)	662 ± 64	758 ± 88	598 ± 33
K <sub>el</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.02 ± 0.002	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.002
AUMC <sub>0-24</sub> (μM.h)	648 ± 158	1190 ± 364	531 ± 51
t <sub>1/2</sub> (min)	44.5 ± 6.4	73.3 ± 12.2	51 ± 4.6
MRT (h)	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.3	0.9 ± 0.06
CL <sub>ex</sub> (mL/h)	160 ± 14	141 ± 19	172 ± 11.1
V <sub>d</sub> (L)	0.17 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.2 ± 0.02
V <sub>dss</sub> (L)	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.01
CL <sub>0-24</sub> (mL/h)	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.01	1.28 ± 0.15***
CL <sub>ur</sub> (mL/h)	117 ± 13	102 ± 18	134 ± 12
CL <sub>cr</sub> (mL/h)	104 ± 13	126 ± 10	106 ± 15
CL <sub>ur</sub> /CL <sub>cr</sub>	1.2 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.4 ± 0.2

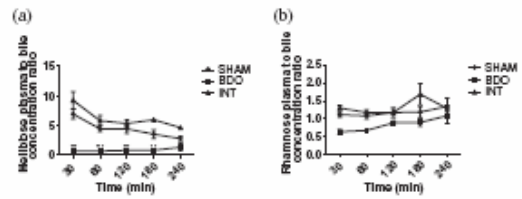
  

(b) Rhamnose			
	INT	SHAM	BDO
Dose (μmol)	214 ± 3.4	202 ± 2.5	210 ± 3.9
C <sub>max</sub> (μM)	1910 ± 124	1780 ± 119	2050 ± 134
AUC <sub>0-24</sub> (μM.h)	1510 ± 122	1790 ± 204	1490 ± 99
K <sub>el</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.01 ± 0.001	0.01 ± 0.001	0.01 ± 0.001
AUMC <sub>0-24</sub> (μM.h)	2200 ± 425	4490 ± 1080	2240 ± 262
t <sub>1/2</sub> (min)	78.3 ± 10.2	127 ± 12	85 ± 4.4
MRT (h)	1.4 ± 0.2	2.3 ± 0.3	1.5 ± 0.09
CL <sub>ex</sub> (mL/h)	145 ± 11	124 ± 16	144 ± 9.8
V <sub>d</sub> (L)	0.27 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.29 ± 0.02
V <sub>dss</sub> (L)	0.2 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.21 ± 0.01
CL <sub>0-24</sub> (mL/h)	0.63 ± 0.07	0.58 ± 0.06	1.2 ± 0.18***
CL <sub>ur</sub> (mL/h)	99 ± 11	85 ± 16	106 ± 12
CL <sub>cr</sub> (mL/h)	104 ± 13	126 ± 10	106 ± 15
CL <sub>ur</sub> /CL <sub>cr</sub>	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.2

Data are mean ± SEM (n = 7 in each group). Significantly different from SHAM group animals (\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001). BDO, bile duct obstructed; INT, intact; SHAM, sham operated.



**Figure 2** Urinary (a) and biliary (b) flow rates in intact (INT), sham-operated (SHAM), and bile duct obstructed (BDO) animals. The only statistical difference was detected between sham/intact animals and BDO animals in bile flow rate during the first 30-min collection period (P < 0.01). Values are the mean ± SEM (n = 7 in each group). Significantly different from sham-operated animals (\*\*P < 0.01).



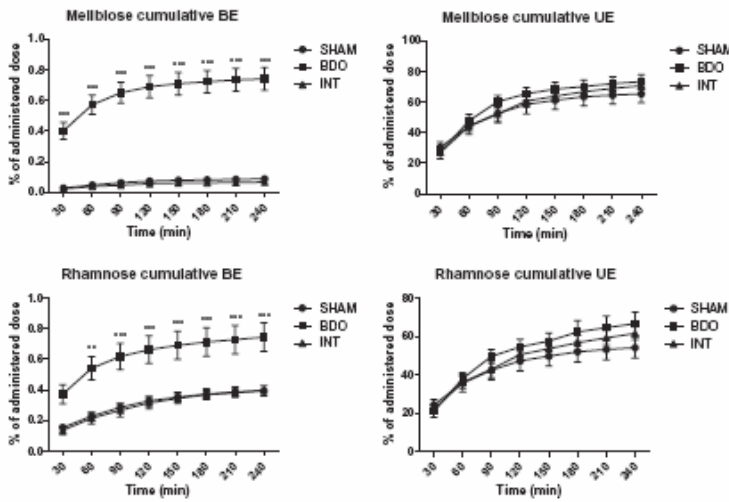
**Figure 3** Ratios of plasma to biliary concentrations of melibiose (a) and rhamnose (b). Values are the mean ± SEM (n = 7 in each group). Significantly different from sham-operated animals (SHAM) (\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001). BDO, bile duct obstructed; INT, intact.

and rhamnose doses, respectively. There were no significant differences in either urinary or biliary cumulative excretions between intact and sham-operated animals in any evaluated collection period. A 24-h bile duct obstruction produced a significant rise in biliary excretion of both compounds during the first 60 min of the experiment. As a consequence, cumulative biliary excretions of both compounds in BDO animals were substantially higher than in control rats (Fig. 4). The cumulative urinary excretion of both compounds was unchanged in BDO animals. The marker of paracellular permeability, the melibiose/rhamnose ratio, was calculated from quantitative excretion values. We detected a significant increase of this ratio in biliary excretion of BDO rats during the first four intervals (120 min) after administration of both sugars (Fig. 4). Therefore, cumulative biliary excretions showed an increased melibiose/rhamnose ratio throughout the experiment. Importantly, the sugar ratio of urinary excreted compounds remained uninfluenced in BDO animals. As a consequence, we detected no influence of BDO on the melibiose/rhamnose ratio in urinary excretion cumulative values (Fig. 5).

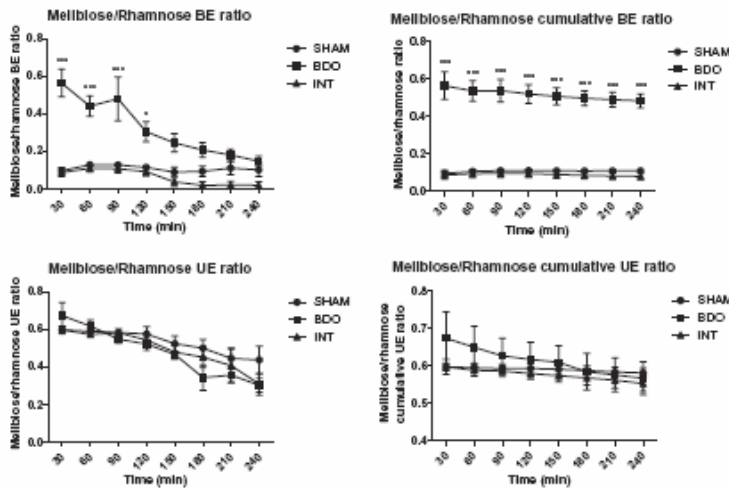
Changes in the serum biochemical tests of liver function are demonstrated in Table 2. A significant increase in serum ALT, and AST activities and concentrations of total and conjugated bilirubin was observed 1 day after BDO.

**Discussion**

In the present study, we used a dual-sugar test to evaluate the changes in permeability of the blood–biliary barrier in rats with acute extrahepatic cholestasis lasting for 24 h when compared to sham-operated and intact animals. A detailed pharmacokinetic study of intravenously applied melibiose and rhamnose showed that the biliary excretion rate of both compounds was increased during the first 60 min after administration to BDO animals in comparison to sham-operated rats. The increase was more marked for melibiose. As a consequence, the ratio of melibiose/rhamnose obtained from biliary excretion rate values was increased during the first 120 min of the kinetic study in BDO animals. When the cumulative data of biliary excretion were taken into consideration, the melibiose/rhamnose ratio was increased throughout the whole 4 h of the study. Importantly, the biliary excretion of both sugars is so negligible in comparison with their renal elimination that the urinary excretion rate of both compounds and their cumulative values were not influenced by cholestasis.



**Figure 4** Cumulative biliary (BE) and urinary excretion (UE) of melibiose and rhamnose in intact (INT), sham-operated (SHAM), and bile duct obstructed (BDO) rats (24 h after surgical procedure). Values are the mean  $\pm$  SEM ( $n=7$  in each group). Significantly different from sham-operated animals (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).



**Figure 5** Melibiose/rhamnose ratio of their biliary (BE) and urinary excretion (UE) and changes of this ratio upon correction to cumulative values in intact (INT), sham-operated (SHAM), and bile duct obstructed (BDO) rats (24 h after surgical procedure). Values are the mean  $\pm$  SEM ( $n=7$  in each group). Significantly different from sham-operated animals (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

**Table 2** Selected serum liver biochemical tests in intact, sham-operated, and bile duct obstructed rats

	INT	SHAM	BDO
ALT (IU/L)	2.5 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 0.8	15.3 $\pm$ 1.3***
AST (IU/L)	4.8 $\pm$ 0.9	4.7 $\pm$ 1.1	16.0 $\pm$ 1.2***
Total bilirubin	3.0 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.2	11.6 $\pm$ 1.6**
Conjugated bilirubin	2.0 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 1.9*

Values are mean  $\pm$  SEM ( $n=7$ ).

Significantly different from control value (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BDO, bile duct obstructed; INT, intact; SHAM, sham operated.

The permeability of the blood–biliary barrier is one of the main factors contributing to the regulation of bile formation. It is formed by tight junction interconnections of hepatocytes and together with gap junctions it is regulated by a complex interplay of events.<sup>1</sup> During the extrahepatic cholestasis, the integrity of the barrier is impaired, which is associated with leakage of compounds from bile to blood and vice versa. However, most results come from microscopical techniques with the functional data being limited to a few studies using HRP.<sup>2,7</sup> According to these reports, obstructive cholestasis-induced HRP leakage from blood to bile shows two peaks: the first one, at 4–6 min after HRP injection, involves the paracellular pathway and the second, at 20–25 min, the transcellular pathway.<sup>2,19</sup> This raised the question of a possible limitation for the interpretation of such a test because transport processes of



hepatocytes are also deeply influenced by cholestasis.<sup>20</sup> Therefore, in our study, we applied one of the well-described approaches for testing paracellular permeability: a dual-sugar test with rhamnose and melibiose, which is used for testing the integrity of the intestinal barrier.<sup>12,13</sup> As proposed, L-rhamnose permeates barriers by nonmediated transcellular diffusion, whereas melibiose penetrates selectively across the paracellular junctions.<sup>9</sup> In agreement, our data on distribution volume correspond with reported TBW (total body water) volume in rats and point to the ability of rhamnose to penetrate intracellularly while melibiose, according to Vd, remained extracellular. Moreover, the observed increase in biliary excretion, especially of melibiose, in 24-h BDO animals was consequently associated with increased melibiose/rhamnose ratio in the bile samples collected during the first 120 min after i.v. administration of both sugars. These data point to increased paracellular permeability similar to previously reported HRP values but for the first time this detailed information has been shown for 24-h BDO, the commonly used model of acute cholestasis. Therefore, the dual-sugar test may serve as an indicator of paracellular permeability in the blood to bile transport of compounds. Another question was if the clinical status of altered blood–biliary barrier could influence the results of intestinal permeability testing. During such testing, the melibiose/rhamnose ratio is evaluated in urine collected for 5 h.<sup>12</sup> In our study, 4-h urine cumulative collection data did not show a difference in melibiose/rhamnose ratios between control and BDO animals, despite the fact that CL<sub>50%</sub> of melibiose was increased by cholestasis. This suggests reliability of the intestinal barrier testing by sugars even in a status of altered blood–biliary barrier.

The kinetic behaviour of the studied sugars in the mammalian organism is poorly known. Rhamnose (6-deoxy-mannose) is a deoxy-hexose or methyl-pentose synthesized largely in its L-form in plants and bacteria but not in animal cells.<sup>21</sup> When administered intravenously to mammals, it is eliminated primarily by the kidneys and the reported cumulative 24-hour urinary recovery of the compound in rats and humans is 65% and about 74%, respectively.<sup>9,11</sup> The rest of the applied dose was supposed to be metabolized.<sup>11</sup> Malagon *et al.*<sup>22</sup> recently found increased concentrations of rhamnitol in urine during the testing of gut permeability in children and considered rhamnitol to be a relevant metabolite of rhamnose in humans. However, the origin of that rhamnitol has not been yet satisfactorily evidenced. Moreover, L-rhamnose is phosphorylated *in vitro* by mammalian L-fucose kinase preparation<sup>23</sup> and therefore could be converted into rhamnosides, which have been indeed sporadically found in mammal cells.<sup>24,25</sup> Melibiose (6-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-D-glucose) is a disaccharide produced by the fermentation of raffinose, found to be not convertible to glycogen in fasting rats<sup>26</sup> and since that time not reported to be metabolized in mammals. In our experiments, the 4-hour urine and bile collection yielded excretion of 70.6% and 61.7% of the applied melibiose and rhamnose doses, respectively, with highly prevailing urinary excretion. These data comply with previously reported values.<sup>10,11</sup> The suggested influence of other pathways, such as the metabolic conversion, awaits future clarification but for the permeability testing may be considered unimportant. Our results bring quantification of biliary excretion of both sugars in rats and we have shown that this pathway plays only a minor role in the overall turnover of both sugars. However, the stable values of plasma to bile concentration ratios of rhamnose slightly above

one suggest that a quick passive diffusion of rhamnose through hepatocytes occurs similarly to that in enterocytes and that this sugar quickly equilibrates between plasma and newly synthesized bile. Important values are the measured volumes of distribution which suggest that both compounds are distributed into intravascular and extracellular spaces. The higher distribution volume of rhamnose corresponds well with the reported ability of the compound to penetrate transcellularly.<sup>9</sup>

In conclusion, the present study is the first to report that the dual-sugar permeability test is a useful probe to describe the alteration of the blood–biliary barrier during acute 24-h lasting extrahepatic cholestasis in rats. Using this test, we demonstrated that the blood–biliary barrier becomes highly leaky in BDO animals and that this impairment could be reliably measured during the first 60 min after administration of the probes. In addition, for the first time, we have described in detail the excretion of both sugars into bile. Despite the cumulative data having shown that this pathway takes only a negligible part of the applied dose of both sugars, the quick equilibration of rhamnose concentrations was seen between the plasma and bile which may be interesting for the future evaluation of biliary drug excretion with respect to bile production. Importantly for sugar permeability studies in animals and humans, our data provides the evidence that overall results of intestinal mucosa integrity testing which are based on cumulative 5-h urine collection should not be altered by extrahepatic cholestasis.

## Acknowledgments

We acknowledge the skilful technical assistance of Lenka Kriesfalusyova. This study was supported by project grant no. MSM 0021620820, Ministry of Education, Czech Republic.

## References

- 1 Kojima T, Yamamoto T, Murata M, Chiba H, Kokai Y, Sawada N. Regulation of the blood–biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes. *Med. Electron. Microsc.* 2003; **36**: 157–64.
- 2 Takakuwa Y, Kokai Y, Sasaki K *et al.* Bile canalicular barrier function and expression of tight-junctional molecules in rat hepatocytes during common bile duct ligation. *Cell. Tissue Res.* 2002; **307**: 181–9.
- 3 Guyot C, Combe C, Desmouliere A. The common bile duct ligation in rat: a relevant *in vivo* model to study the role of mechanical stress on cell and matrix behaviour. *Histochem. Cell Biol.* 2006; **126**: 517–23.
- 4 Wiener SM, Hoyt RF Jr, Deleonardis JR *et al.* Manometric changes during retrograde biliary infusion in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000; **279**: G49–66.
- 5 Pastor A, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Factors influencing the inhibition of biliary glutathione efflux induced by biliary obstruction. *Life Sci.* 2000; **68**: 69–79.
- 6 Metz J, Aoki A, Merlo M, Forssmann WG. Morphological alterations and functional changes of interhepatocellular junctions induced by bile duct ligation. *Cell Tissue Res.* 1977; **182**: 299–310.
- 7 Rahner C, Stieger B, Landmann L. Structure-function correlation of tight junctional impairment after intrahepatic and extrahepatic cholestasis in rat liver. *Gastroenterology* 1996; **110**: 1564–78.
- 8 Katouzian F, Sblattero D, Not T *et al.* Dual sugar gut-permeability testing on blood drop in animal models. *Clin. Chim. Acta* 2005; **352**: 191–7.

**ALTERATION OF METHOTREXATE BILIARY  
AND RENAL ELIMINATION DURING  
EXTRAHEPATIC AND INTRAHEPATIC  
CHOLESTASIS IN RATS**

Brcakova E, Fuksa L, Cermanova J, Kolouchova G, Hroch M, Hirsova P, Martinkova J, Staud F and Micuda S (2009) *Alteration of methotrexate biliary and renal elimination during extrahepatic and intrahepatic cholestasis in rats*. Biol Pharm Bull 32 (v tisku).

## Komentář k článku

Cholestáza je porucha toku žluči, následkem které může dojít k poškození transportu látek v hepatocytech a intrahepatálních žlučovodech (intrahepatální cholestáza) nebo k blokadě žlučovodů (extrahepatální cholestáza). Dochází k jaterní a systémové kumulaci potenciálně toxických látek, jako jsou žlučové kyseliny a bilirubin. Ve snaze kompenzovat vzniklou situaci se v hepatocytech aktivují spontánní anticholestatické mechanismy. Zahrnují snížení exprese bazolaterálních transportérů pro vychytávání látek do hepatocytů (Ntcp, Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2) a kanalikulárních efluxních proteinů (Mrp2, Bcrp) společně s indukcí bazolaterálních efluxních transportérů (Mrp3–6, Osta/β). Během extrahepatální cholestázy dochází následně ke zvýšení exprese kanalikulárních efluxních proteinů v ledvinách (Mrp2), což podporuje exkreci toxických látek do moči. Během cholestázy navozené podáním LPS (lipopolysacharidu) dochází k podobným změnám v expresi transportních proteinů jako při extrahepatální cholestáze. Tyto změny jsou vyvolány zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů TNF-α, IL-1β a IL-6 v Kupfferových buňkách a produkcí oxidu dusnatého Kupfferovými buňkami a hepatocyty. Hepatocyty reagují na produkci cytokinů změnou genové exprese především na transkripční úrovni.

Metotrexát je klinicky významné cytostatikum a imunosupresivum, které již bylo recentně použito pro terapii primární biliární cirhózy. Eliminace metotrexátu je významně ovlivněna aktivitou transportních systémů (Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2, Mrp2–4 a Bcrp), která je během cholestázy změněna. Farmakodynamika a toxicita metotrexátu je závislá na jeho plazmatické koncentraci a následně přímo spojena s jeho eliminací v játrech a ledvinách. Cílem studie bylo detailně popsat změny farmakokinetiky metotrexátu během extrahepatální a intrahepatální cholestázy.

*In vivo* studie byla provedena za použití potkaního modelu akutní a chronické extrahepatální cholestázy (podvaz žlučovodu v trvání jednoho a sedmi dnů) a intrahepatální cholestázy (aplikace lipopolysacharidu izolovaného ze *Salmonella Typhimurium*). Farmakokinetické parametry metotrexátu po dosažení koncentrace v ustáleném stavu byly hodnoceny jeden, resp. sedm dnů po podvazu žlučovodu a 18 hodin po aplikaci lipopolysacharidu.

Biliární a celková clearance metotrexátu byla snižena u obou modelů cholestázy. Naproti tomu extrahepatální cholestáza neovlivnila renální clearance léčiva, ale intrahepatální cholestáza vedla k jejímu snížení. Biochemická analýza séra a exprese

hlavních transportérů odpovědných za transport metotrexátu potvrdily cholestázou navozené změny v játrech a částečně objasnily změny farmakokinetických parametrů metotrexátu.

Tato studie poprvé popisuje významné změny ve farmakokinetice metotrexátu během obstrukční a intrahepatální cholestázy. I přes fakt, že některé změny exprese transportních proteinů korelují se změnami farmakokinetiky, nesrovnalosti v charakteru příslušných kinetických výsledků a dat ze studií exprese naznačují důležitost kinetických studií pro určení finálního efektu cholestázy na eliminaci léčiva.

## Alteration of Methotrexate Biliary and Renal Elimination during Extrahepatic and Intrahepatic Cholestasis in Rats

Eva BRČÁKOVÁ,<sup>a</sup> Leos FUKSA,<sup>a</sup> Jolana CERMANOVÁ,<sup>a</sup> Gabriela KOLOUCHOVÁ,<sup>a</sup> Milos HROCH,<sup>a</sup> Petra HIRSOVÁ,<sup>a</sup> Jirina MARTINKOVÁ,<sup>a</sup> Frantisek STAUD,<sup>b</sup> and Stanislav MICUDA\*<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague; Simkova 870, 500 38 Hradec Kralove, Czech Republic; <sup>b</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague; Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic.

Received October 13, 2008; accepted September 15, 2009; published online September 17, 2009

Methotrexate (MTX), an important anticancer and immunosuppressive agent, has been suggested for the treatment of primary biliary cirrhosis. However, the drug's pharmacodynamics and toxicity is dependent on its concentrations in plasma which in turn are directly related to MTX's elimination in the liver and kidney. Therefore, the aim of this study was to evaluate changes in MTX biliary and renal excretion during either intrahepatic or obstructive cholestasis in rats. The steady state pharmacokinetic parameters of MTX were evaluated in rats one (BDO1) or seven (BDO7) days after bile duct obstruction (BDO) or 18 h after administration of lipopolysaccharide (LPS). In comparison to the respective control groups, biliary and total clearances of MTX were decreased to 12% and 49% in the BDO1 group, to 5% and 56% in the BDO7 animals, and to 42% and 43% in the LPS group, respectively. Renal clearance of MTX was unchanged in BDO groups, but decreased to 23% of controls in the LPS animals. The serum biochemistry and expression of main hepatic MTX transporters (Mrp2, Mrp3, Mrp4, Bcrp, Oatp1a1, Oatp1a4 and Oatp1b2) confirmed the pathological cholestatic changes in the liver and partly elucidated the cause of changes in MTX pharmacokinetic parameters. In conclusion, this study is the first describing marked alteration of MTX hepatic and renal elimination induced by cholestasis in rats. Moreover, the reported changes in MTX pharmacokinetics and respective transporter expression suggest important mechanistic differences between the two widely used cholestatic models.

**Key words** methotrexate; cholestasis; pharmacokinetic; conjugated bilirubin; drug transporter

Cholestasis is a reduction in bile flow, which may result either from the failure of the secretory transport in hepatocytes or ductular cells (intrahepatic cholestasis), or from blockage of the biliary tract outside the liver (extrahepatic cholestasis). The consequence is hepatic and systemic accumulation of potentially toxic biliary compounds such as bilirubin, which is associated with progressive liver damage and jaundice. In an effort to limit hepatic impairment produced by intracellular accumulation of these anionic compounds, spontaneous anticholestatic defense mechanisms develop in hepatocytes.<sup>1)</sup> They comprise down-regulation of sinusoidal uptake transporters (Ntcp—sodium taurocholate cotransporting polypeptide, Oatps—organic anion transporting proteins) and canalicular efflux transporters (Mrp2—multidrug resistance associated protein 2, Bcrp—breast cancer resistance protein) together with induction of basolateral export pumps (e.g. Mrp3 and Mrp4—multidrug resistance-associated protein 3 and 4).<sup>1)</sup> During extrahepatic cholestasis, the compensatory mechanism also includes changes in the kidneys, where efflux transporters (e.g. Mrp2) for the organic anions are up-regulated, and thus facilitate the excretion of toxic substrates into urine.<sup>2)</sup> However, these adaptive changes are too weak to prevent ongoing liver injury.<sup>3)</sup>

Lipopolysaccharide (LPS)-induced cholestasis is associated with changes in the expression of hepatic transporters in the similar manner as during extrahepatic cholestasis. These changes are thought to be mediated by proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ ) and IL-6 (interleukin 6) produced by Kupffer cells, and formation of nitric oxide in Kupffer cells and hepatocytes, as a result of LPS-induced NF- $\kappa$ B activation.<sup>4)</sup> Hepatocytes responds to these cytokines by the alteration of

gene expression, mainly at the transcriptional level.<sup>5)</sup>

Moreover, serious liver impairment produced either by acute toxic insult (intrahepatic endotoxin-induced cholestasis) or long-term severe cholestatic damage, may also be associated with alteration of renal elimination,<sup>6,7)</sup> an effect ascribed to the reduced glomerular filtration and impairment of proximal tubular cells.<sup>7,8)</sup> Hence, pharmacokinetics of compounds that are substrates for the abovementioned transporters could be altered during cholestasis by several mechanisms. This is especially important for drugs which are considered for the treatment of cholestatic diseases.<sup>9)</sup> In such cases, changes in the pharmacokinetics of the drug could be partly predicted from the results of the detailed studies of transporter expression in the liver and kidneys and from *in vitro* studies in isolated cells. Nevertheless, the existence of other mechanisms involved in the pathophysiology of cholestasis such as paracellular leakage through an impaired blood–biliary barrier (tight-junction connection of hepatocytes) or decreased perfusion of organs<sup>10)</sup> makes such predictions less accurate and raises the need for data from *in vivo* kinetic studies.

Recently methotrexate (MTX), a folate antagonist, has been used for the treatment of primary biliary cirrhosis, the cholestatic condition characterized by pathophysiological changes similar to those described in experimental models of cholestasis.<sup>11,12)</sup> Moreover, widespread use of the agent in cytostatic or immunosuppressive therapy also increases the probability of its administration in other types of cholestatic diseases. Importantly, elimination of MTX from the organism is significantly influenced by the activity of several transport proteins in the liver, expression of which is profoundly altered by cholestasis (e.g. Organic anion transport polypep-

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: micuda@lfhk.cuni.cz



ptide 1a1 (Oatp1a1), Slco1a1; Organic anion transport polypeptide 1a4 (Oatp1a4), Slco1a4; Organic anion transport polypeptide 1b2 (Oatp1b2); Oatp1b2, Slco1b2; members of the multidrug resistance-associated protein subfamily Mrp2, Mrp3, Mrp4, (Abcc2, Abcc3, Abcc4); and Breast cancer resistance protein—Bcrp, Abcg2).<sup>13–15</sup> As the outcome of MTX therapy is highly determined by its pharmacokinetics, an increase in its disposition is associated with the symptoms of drug toxicity. This is commonly seen with impaired MTX elimination as the consequence of the drug–drug interaction produced by inhibition of involved transport proteins at the basolateral and apical membranes of hepatocytes and proximal tubular cells.<sup>16</sup>

The aim of the present study was to describe changes in the pharmacokinetics of MTX during cholestasis in rats. A detailed clearance study of MTX was performed using the *in vivo* rat model of both intrahepatic (lipopolysaccharide-induced) and extrahepatic (bile duct obstruction-induced; acute and chronic) cholestasis with special focus paid to biliary excretion. In parallel, the kinetics of endogenous conjugated bilirubin was evaluated in the same animals to further extend the information about disposition of this organic anion in these two models of cholestasis in rats. Verification of cholestatic liver impairment was performed by serum biochemistry and analysis of mRNA and protein expression of the principal anionic drug uptake and efflux transporters which are at the same time main transporters for MTX (Mrp2, Mrp3, Mrp4, Bcrp, Oatp1a1, Oatp1a4, and Oatp1b2) in the liver.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials** Methotrexate was purchased from Ebewe Pharma (Ebewe Pharma GmbH, Nfg. KG, Austria). Mouse monoclonal antibodies M<sub>2</sub>III5 and BXP-21, directed to the Mrp2 (170–180 kDa) and Bcrp (70 kDa) were obtained from Signet Laboratories, Inc. (Dedham, MA, U.S.A.). Rabbit polyclonal antibodies anti-Oatp1a4, anti-Oatp1a1 and anti-Mrp4, directed to the Oatp1a4 (75 kDa), Oatp1a1 (80 kDa) and Mrp4 (150 kDa) were obtained from Millipore (Billerica, MA, U.S.A.) and Mrp4 from Abcam plc (Cambridge, U.K.). Mouse monoclonal antibody M<sub>3</sub>II-21 directed to Mrp3 (180–190 kDa) was obtained from Alexis Co. (Lausen, Switzerland). Goat polyclonal antibody anti-Oatp1b2 directed to Oatp1b2 (85 kDa) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, U.S.A.). As the loading control for Western blot, rabbit polyclonal anti- $\beta$ -actin antibody (42–45 kDa) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). Horseradish peroxidase-linked sheep anti-mouse and donkey anti-rabbit immunoglobulin G were purchased from GE Healthcare (Prague, Czech Republic) and horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-goat immunoglobulin G was obtained from Pierce Biotechnology (Rockford, U.S.A.). All other reagents and supplies were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) and Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany), respectively, and were of the highest purity available.

**Animal Model** Male Wistar rats ( $n=6$  in each group) weighing 280 to 330 g (Konarovice, Czech Republic) were used throughout the study. In these animals, extrahepatic cholestasis was induced by bile duct obstruction (BDO)

under general anesthesia (pentobarbital sodium 50 mg/kg body weight intraperitoneally (i.p.)). The cannula was inserted into the bile duct, closed and fixed subcutaneously. Obstruction lasted for either one (BDO1) or seven days (BDO7). Intrahepatic cholestasis was induced by the administration of endotoxin (lipopolysaccharide isolated from *Salmonella Typhimurium*; 4 mg/kg i.p.) 18 h before the experiment. Control rats were either sham-operated (the bile duct was only manipulated and left unobstructed) or injected i.p. with physiological saline (LPS-control). Rats were housed under controlled environmental conditions (12-h light–dark cycle; temperature,  $22\pm^{\circ}\text{C}$ ) with a freely available commercial food diet and water. The study protocol was approved by the animal welfare committee of the Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove.

**In Vivo Clearance Study** Under the anesthesia induced by pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), the bile duct was either cannulated (sham-operated and LPS/LPS-control animals) or its obstruction was removed (BDO animals) by cutting the free tip of the biliary cannula, and bile was consequently collected at 10 min intervals. In addition, all rats were cannulated with polyethylene tubes in the right jugular vein for drug administration, the left carotid artery for blood sampling, and the urinary bladder for urine collection. Body temperature was maintained at  $37^{\circ}\text{C}$  with a heated platform.

To elucidate the effect of cholestasis on clearance parameters of MTX, all rats (both control and cholestatic animals) were infused with methotrexate solution (0.65 mM in 2.5% mannitol) into the right jugular vein as a bolus of 10 mg/kg, followed by constant infusion at a rate of  $15\text{ ml/h}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Perfusor Compact; Braun, Prague, Czech Republic) to attain a steady-state plasma concentration ( $C_{ss}$ ). After  $C_{ss}$  of MTX was achieved (60 min after administration of MTX infusion), bile and urine samples were collected at 10 and 20 min intervals, respectively, over 1 h. Blood samples were taken at the midpoint of the bile and urine collection periods. Plasma samples were obtained by centrifugation of the blood samples at  $3000g$  for 5 min. The volume of bile and urine samples was measured gravimetrically, with specific gravity assumed to be 1.0. All plasma, bile and urine samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. At the end of the experiments, animals were exsanguinated and the liver and kidneys were immediately removed, frozen by liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

**Analytical Procedures** The concentrations of MTX in plasma, urine and bile were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) after deproteination of samples according to a previously described method.<sup>17</sup> Briefly, the instrument was an Agilent 1100 series (Agilent, Palo Alto, CA, U.S.A.) chromatograph provided with a fluorescence detector (excitation, 350 nm; emission, 430 nm). Separation was achieved at  $30^{\circ}\text{C}$  using a Gemini C<sub>18</sub>, 110A,  $4.6\times 150\text{ mm}$  column and a Gemini C<sub>18</sub>,  $4\times 3\text{ mm}$  pre-column (Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.). The mobile phase flowing at the rate of 0.6 ml/min was ammonium acetate and acetonitrile (87%:13%, v/v). The concentrations of bilirubin and creatinine in plasma, bile and urine were measured on Cobas Integra<sup>®</sup> 800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

**Pharmacokinetic Analysis** Pharmacokinetic parameters—total body clearance ( $CL_{\text{Tot}}$ ), biliary clearance ( $CL_{\text{Bile}}$ )



December 2009

and renal clearance ( $CL_R$ ) of MTX and conjugated bilirubin—were calculated by the following equations:

$$CL_{Tot} = I/C_{ss} \quad (1)$$

$$CL_{Bile} = R_{Bile}/C_{ss} \quad (2)$$

$$CL_R = R_R/C_{ss} \quad (3)$$

where  $I$  is the infusion rate ( $\text{nmol}/\text{min} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),  $C_{ss}$  is the plasma concentration at steady state ( $C_{ss}$  of methotrexate—60–120 min after the initiation of MTX infusion— $\mu\text{M}$ ),  $R_{Bile}$  is the biliary excretion rate at steady state ( $\text{nmol}/\text{min} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and  $R_R$  is the renal excretion rate at steady state. The glomerular filtration rate (GFR) was evaluated as the clearance of endogenous creatinine ( $CL_{CR}$ ). The renal clearance ratio of methotrexate was calculated as  $(CL_R/f_u) \cdot CL_{CR}^{-1}$ , where  $f_u$  represents the unbound fraction of the drug. Each parameter was calculated using the mean value of three points during 60 min of steady state.

**Real Time RT-PCR Analysis** Total RNA was isolated from liver and kidney tissue samples using TRIzol reagent (Invitrogen, U.S.A.) and converted into cDNA *via* an iScript reverse transcription kit (Bio-Rad Laboratoires, Hercules, U.S.A.). 10 ng cDNA were loaded into one reaction, all performed in triplicate. The amplification was completed using the *TaqMan*<sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mix, pre-designed *TaqMan*<sup>®</sup> Gene Expression Assay kit for the following genes: *Mrp2* (Abcc2, Rn00563231\_m1), *Bcrp* (Abcg2, Rn00710585\_m1), *Mrp3* (Abcc3, Rn00589786\_m1), *Mrp4* (Abcc4, Rn01465702\_m1), *Oatp1a1* (Slco1a1, Rn00755148\_m1), *Oatp1a4* (Slco1a4, Rn00756233\_m1), *Oatp1b2* (Slco1b2, Rn00668623\_m1), and GAPDH rat endogenous control kit (4352338E) all provided by Applied Biosystems (Foster City, U.S.A.). The time-temperature profile used in the “fast” mode was: 95 °C for 20 s; 40 cycles: 95 °C for 3 s, 60 °C for 30 s. The relative expression ratio was then calculated according to Pfaffl, 2001:

$$R = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta Ct_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{E_{\text{housekeeping}}^{\Delta Ct_{\text{housekeeping}}(\text{control-sample})}}$$

where  $E_{\text{target}}$  and  $E_{\text{housekeeping}}$  are the effectivity values determined from the calibration curve slopes for each gene, and  $\Delta Ct_{\text{target}}$  and  $\Delta Ct_{\text{housekeeping}}$  are the differences in threshold values ( $Ct$ ) between control and cholestatic samples for each of the targets, *i.e.* *Mrp2*, *Bcrp*, *Mrp3*, *Mrp4*, *Oatp1a1*, *Oatp1a4*, *Oatp1b2* and the housekeeping (*GAPDH*) gene.

**Membrane Preparation** Kidneys and livers were minced in ice-cold Tris-sucrose buffer (10 mmol/l Tris-HCl, 250 mmol/l sucrose, pH 7.6), containing 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatin, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  benzamide, and 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and then homogenized with a motor-driven teflon homogenizer (Braun Melsungen, Germany) operating at 1500 rpm. A membrane-enriched microsomal pellet was obtained from the postnuclear supernatant after a 100000 *g* ultracentrifugation at 4 °C for 23 min. The pellet was resuspended in Tris-HCl buffer (50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4, protease inhibitors). The protein concentration was determined with the BCA assay (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.) and samples were stored at -80 °C.

**Immunoblot Analysis** Crude membrane-containing homogenates (100  $\mu\text{g}$  of liver or 50  $\mu\text{g}$  of kidney proteins) from livers and kidneys were incubated with sample buffer at room temperature for 30 min and separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 6.25% polyacrylamide gels. After the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.), the membrane was blocked for 1 h with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST). The membrane was then incubated with primary antibodies at the following concentrations: M2III6, M<sub>3</sub>II-21 and BXP-21 at 1:500; anti-Oatp1a1 and anti-Oatp1a4 at 1:5000, horseradish peroxidase-linked sheep anti-mouse antibody at 1:1000 or 1:500, donkey anti-rabbit IgG antibody at 1:5000 and rabbit anti-goat at 1:1000. After washing with TBST buffer, the membranes were developed using enhanced chemiluminescent reagent (GE Healthcare, Prague, Czech Republic) and subjected to autoluminography for 1–5 min. The immunoreactive bands on the exposed films were scanned with a densitometer ScanMaker i900 (UMAX, Prague, Czech Republic) and semiquantified using the QuantityOne imaging software (Bio-Rad). Equal loading of proteins onto the gel was confirmed by immunodetection of beta-actin.

**Statistical Analysis** Experiments were carried out in 6 animals per group. All experimental data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical significance was examined in groups of control and cholestatic animals with unpaired *t*-test using Graphpad Prism 5.0 software (Graphpad Software, Inc., San Diego, California, U.S.A.). A difference of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

**Effect of Cholestasis on *in Vivo* Steady-State Pharmacokinetics of Methotrexate** The effect of extrahepatic (1 or 7 d after BDO) and intrahepatic (18 h after administration of LPS) cholestasis on the steady-state pharmacokinetics of MTX is presented in Table 1. Time course of MTX plasma concentrations, biliary excretion rate and urinary excretion rate are shown in Fig. 1. Biliary and urinary flow were not significantly different between experimental and control groups. Cholestasis produced rise in MTX plasma  $C_{ss}$  (Fig. 1A) to 220%, 201% and 247% in the BDO1, BDO7, and LPS group, respectively. Analysis of elimination organ kinetics showed marked decrease in the biliary excretion rate of MTX to 19% and 8% of control values 1 and 7 d after BDO, respectively, but no change was observed in LPS animals (Fig. 1B). Nevertheless, calculation of MTX biliary clearance demonstrated its reduction in all cholestatic groups to 12%, 5% and 42% in BDO1, BDO7, and LPS animals, respectively. MTX urinary excretion (Fig. 1C) was significantly increased in both BDO groups (to 250% and 249% in rats 1 and 7 d after BDO, respectively), which was, however, not associated with significant increase in MTX renal clearance. Urinary excretion and renal clearance of MTX were both decreased in LPS animals and were 55% and 23% of control values, respectively. In agreement, the glomerular filtration rate remained unchanged in BDO1 and BDO7 rats, but was significantly decreased in the LPS group to 32% of control values, which corresponded to extend of reduction of  $CL_R$  in

Table 1. Effect of Cholestasis on Pharmacokinetic Parameters of MTX in Rats

	MTX					
	Sham1	BDO1	Sham7	BDO7	LPS-C	LPS
Urine flow rate (ml/min)	21±4.5	33±7.6	18±3.1	25±3.6	23±4.6	20±4.6
Bile flow rate (ml/min)	26±1.3	21±3.1	25±1.6	31±3.6	27±1.5	27±3.2
$R_R$ (nmol/ml·kg <sup>-1</sup> )	53±3.6	132±6.6***	56±2.0	140±14***	98±4.5	54±9.4**
$R_{Bile}$ (nmol/ml·kg <sup>-1</sup> )	124±4.9	23±11***	145±4.3	11±3.7***	116±8.8	110±12
Plasma $C_{ss}$ (μM)	14±0.9	31±4.1**	15±0.4	30±5.0*	11±0.7	27±4.1**
$CL_R$ (ml/min·kg <sup>-1</sup> )	4.3±0.5	4.7±0.5	3.9±0.4	5.0±0.6	9.3±0.6	2.1±0.4***
$CL_{Bile}$ (ml/min·kg <sup>-1</sup> )	8.9±0.5	1.1±0.6***	9.7±0.5	0.5±0.2***	11±0.6	4.5±0.6***
$CL_{Tot}$ (ml/min·kg <sup>-1</sup> )	13±0.8	5.9±0.8***	11±0.3	6.2±0.9***	17±0.9	6.7±0.9***
$CL_{CR}$ (ml/min·kg <sup>-1</sup> )	7.7±0.9	10±1.4	6.0±1.2	4.2±0.8	10±0.9	3.2±0.7***
$f_u$	0.7±0.1	0.9±0.02*	0.6±0.1	0.9±0.02***	0.6±0.04	0.7±0.03
$CL_R/f_u$	7.1±1.3	5.3±0.6	6.7±1.0	5.5±0.6	15±1.7	2.9±0.6***
$CL_R/f_u \cdot CL_{CR}^{-1}$	1.0±0.2	0.6±0.04	1.6±0.4	1.8±0.6	1.6±0.02	1.0±0.2
Total plasma protein (g/l)	50±1.2	49±0.9	48±1.2	53±2.4	49±0.6	50±2.1
Plasma albumin (g/l)	28±1.3	29±1.3	28±1.3	30±1.6	29±0.5	28±1.1
Selected serum liver biochemical tests in control and cholestatic rats						
ALT (IU/l)	0.9±0.1	16±3.2**	0.7±0.1	2.4±0.3***	0.8±0.1	1.6±1.0
AST (IU/l)	2.1±0.1	22±3.9***	1.7±0.3	8.5±1.1***	1.3±0.1	2.6±0.8

Values are means±S.E.M. ( $n=6$ , in each group). Sham1, Sham7 and LPS-C—control rats (1 and 7 d sham-operated or pretreated with physiological saline), BDO1 and BDO7—common bile duct obstruction lasting for 1 or 7 d, LPS—administration of LPS. Significantly different from control value (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ ).  $R_{Bile}$ —biliary excretion rate of MTX,  $R_R$ —renal excretion rate of MTX,  $CL_R$ —renal clearance of MTX,  $CL_{Bile}$ —biliary clearance of MTX,  $CL_{Tot}$ —total clearance of MTX,  $CL_{CR}$ —glomerular filtration rate evaluated as clearance of endogenous creatinine,  $f_u$ —unbound fraction of MTX.

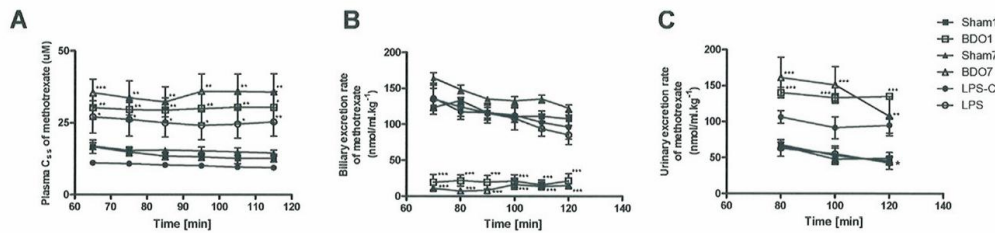


Fig. 1. Time-Course of MTX Plasma Concentrations (A), Biliary Excretion Rate (B) and Urinary Excretion Rate (C) Measured during Steady-State (60 min after Administration of MTX Infusion)

Sham1, Sham7 and LPS-C—control rats (1 and 7 d sham-operated or pretreated with physiological saline), BDO1 and BDO7—common bile duct obstruction lasting for 1 or 7 d, LPS—administration of LPS. Values are means±S.E.M. ( $n=6$ , in each group). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , compared with controls.

LPS animals. At the same time, total plasma protein, and albumin concentrations, and MTX unbound fraction in plasma were not affected by either type of cholestasis.

#### Effect of Cholestasis on Conjugated Bilirubin Kinetics

The influence of intrahepatic and extrahepatic cholestasis on pharmacokinetics (supposing steady-state conditions) of endogenous conjugated bilirubin is presented in Fig. 2. Plasma concentrations of conjugated bilirubin rose to 9873% and 14456% after 1 or 7 d of BDO, respectively, and increased to 173% in LPS rats, but the difference was not significant (Fig. 2A). The rate of urinary excretion of the conjugated bilirubin increased to 627% 1 d after BDO and recovered to control values 7 d after BDO. In the LPS group, the urinary excretion rate remained unchanged (Fig. 2B). The biliary excretion rate of the conjugated bilirubin increased to 677%, 733% and 467% in BDO1, BDO7 and LPS animals, respectively (Fig. 2C). Importantly, the ratios of conjugated bilirubin excretory parameters to serum concentrations revealed a profound drop in renal as well as biliary clearance values in all cholestatic groups except for biliary clearance in the LPS group (Figs.

2D, E). Changes in the liver function as shown by serum biochemical tests are summarized in Table 1. ALT and AST activities were significantly increased 1 and 7 d after BDO, but a non-significant increase was observed in LPS animals.

#### Characterization of Quality of Cholestatic Model Used by Measurement of mRNA Expression of Main Drug Transporters

The mRNA levels of selected molecules in the liver and kidneys as evaluated by qRT-PCR are shown in Fig. 3A (livers) and Fig. 4A (kidneys). In the liver, Mrp2 mRNA levels decreased to 86%, 66% and 62% compared with controls in BDO1, BDO7 and LPS rats, respectively. Unlike in BDO1 and BDO7 animals, where the liver Bcrp mRNA levels declined to 37% and 44%, respectively, mRNA levels increased to 491% in the LPS group. In contrast, liver Mrp3 expression increased in all cholestatic groups to 189%, 970% and 304% in BDO1, BDO7 and LPS rats, respectively. Liver Mrp4 mRNA levels increased to 172% in BDO1 group with no significant increase in BDO7 and LPS animals (116% and 115%, respectively). The mRNA expression of the liver Oatp1a1, Oatp1a4 and Oatp1b2 decreased to 44%,



December 2009

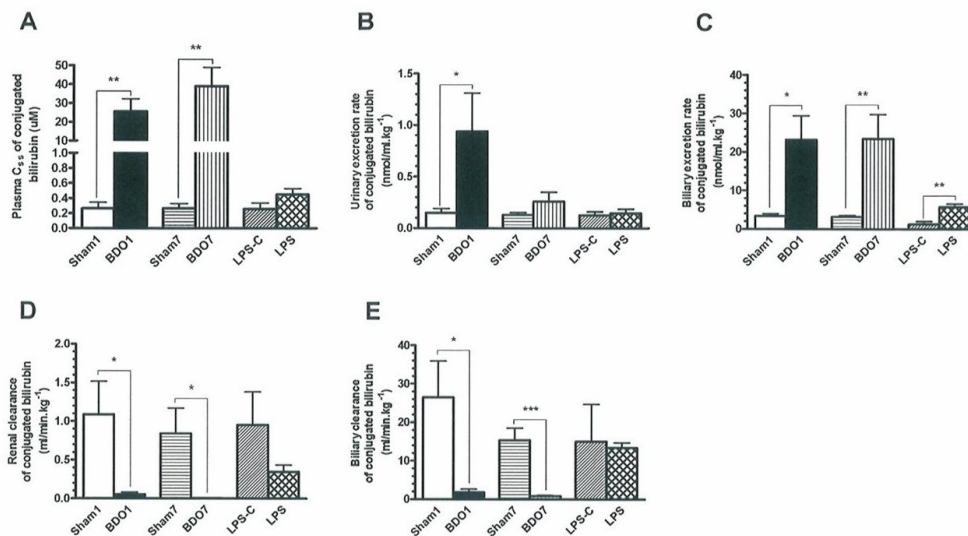


Fig. 2. Effect of Cholestasis on the Endogenous Conjugated Bilirubin Kinetics in Rats

Respective panels describe plasma concentrations, urinary and biliary excretion rate, renal and biliary clearance, in control (1 and 7 d sham-operated, LPS-control), and cholestatic (BDO1, BDO7, LPS) rats. Sham1, Sham7 and LPS-C-control rats (1 and 7 d sham-operated or pretreated with physiological saline), BDO1 and BDO7—common bile duct obstruction lasting for 1 or 7 d, LPS—administration of LPS. Values are means  $\pm$  S.E.M. ( $n=6$ , in each group). \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ , compared with controls.

78% and 63% in BDO1, 53%, 57% and 53% in BDO7 and 17%, 19% and 5% in LPS rats, respectively. Compared with control animals, kidney Mrp2 and Mrp3 mRNA levels increased to 172% and 156% in BDO1, 168% and 287% in BDO7, and 288% and 156% in LPS rats, respectively. Kidney Mrp4 mRNA levels increased to 209% in LPS group, decreased to 68% in BDO7 animals and remained unchanged in BDO1 group. Kidney Oatp1a1 mRNA levels decreased in all cholestatic groups to 80%, 80% and 37% in BDO1, BDO7 and LPS rats, respectively. No mRNA of Bcrp, Oatp1a4, and Oatp1b2 transporters was detected in the kidneys.

**Characterization of Quality of Cholestatic Model Used by Measurement of Protein Expression of Main Drug Transporters** Protein quantification was performed in total membrane fractions of the liver and kidneys from control (1 and 7 d sham-operated or pretreated with physiological saline), BDO1, BDO7, and LPS rats (Figs. 3B, 4B). The relative amount of protein was expressed as a percentage of the respective control animal values. In the liver, Mrp2 protein expression was unchanged 1 d after BDO, while a decrease to 49% and 84% of control values was observed 7 d after BDO and in LPS rats, respectively. The amount of liver Bcrp protein decreased to 56% and 70% in the BDO1 and BDO7 group, respectively, but remained unchanged in LPS animals. Expression of liver Mrp3 protein decreased to 71% and 75% 1 d after BDO and in the LPS group, respectively, but increased to 190% 7 d after BDO. Liver Mrp4 protein expression decreased in all cholestatic groups to 65%, 55% and 82% in BDO1, BDO7 and LPS animals, respectively. Oatp1a1 protein levels in liver increased to 125% and 157% in BDO1 and BDO7 rats, respectively. Liver Oatp1a4 protein levels significantly decreased to 74% and 28% after 1 and 7 d of BDO, respectively. LPS pretreatment had no influence on

Oatp1a1 and Oatp1a4 levels. Liver Oatp1b2 protein levels decreased to 70% and 50% in BDO7 and LPS, but remained unchanged in BDO1 group. In the kidneys, the amount of Mrp2 protein increased to 3869% and 661% of controls after 1 and 7 d of BDO, respectively. Conversely, LPS caused a decrease in kidney Mrp2 protein content to 87%. The level of Mrp3 protein in the kidney was unchanged in BDO1 group, decreased to 71% in LPS rats, and increased to 251% 7 d after BDO. Kidney Mrp4 and Oatp1a1 protein levels decreased in all cholestatic groups to 68% and 57% in BDO1, 35% and 46% in BDO7 and 73% and 64% in LPS rats, respectively. No Bcrp, Oatp1a4, and Oatp1b2 protein was detected in the kidneys.

## DISCUSSION

In the present study, we investigated the influence of cholestasis on the pharmacokinetics of MTX in rats (Table 1, Fig. 1). Intrahepatic (LPS-induced) or obstructive cholestasis was induced in respective groups of animals as confirmed by changes in serum biochemical parameters and liver transporter expression. According to the type of cholestasis, administration of MTX was associated with the differential alteration of  $CL_{\text{Bile}}$  and  $CL_{\text{R}}$  of MTX. While acute or chronic bile duct obstruction was associated with a drop in  $CL_{\text{Bile}}$  of MTX and a slight compensatory rise in its  $CL_{\text{R}}$ , pretreatment with LPS decreased the capacity of both excretory mechanisms with more pronounced impairment of MTX  $CL_{\text{R}}$ . Significant changes were seen in endogenous conjugated bilirubin kinetics (Fig. 2).

In humans, the biliary excretion is finally responsible for elimination of 10–30% of applied MTX dose.<sup>13)</sup> Nevertheless, the real contribution of hepatic transporters seems to be much higher because the median ratio of biliary/renal excre-

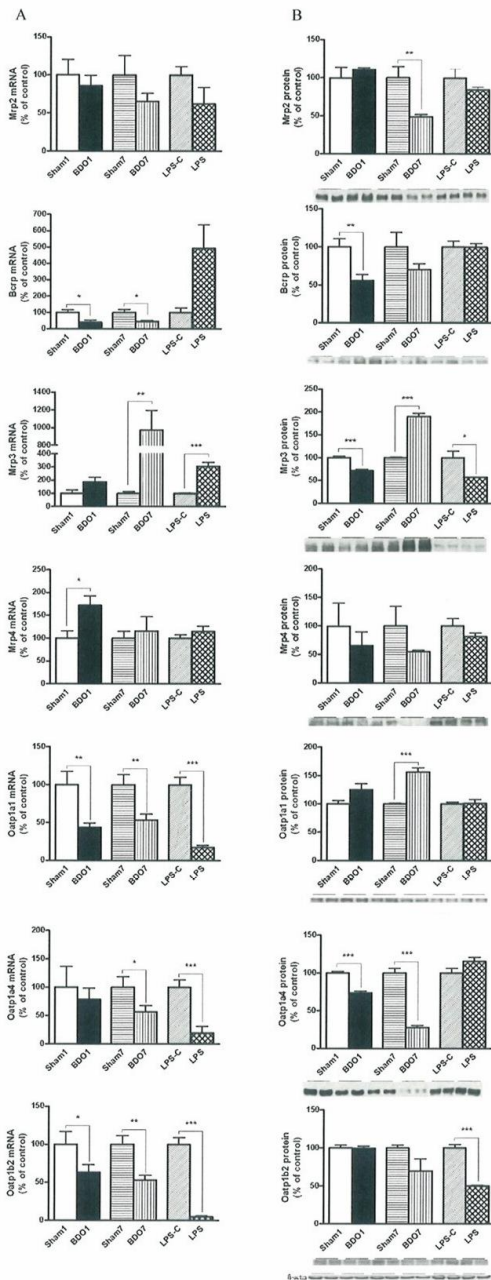


Fig. 3. mRNA (A) and Protein (B) Expression of MRP2, Bcrp, MRP3, MRP4, Oatp1a1, Oatp1a4 and Oatp1b2 in Liver

mRNA and proteins were isolated from control and cholestatic rat livers and analyzed by RT-PCR and Western blot, respectively. mRNA data normalized to those of GAPDH and protein data after densitometric analysis are expressed as a percentage of controls, as described in the Materials and Methods. Data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=6$ , in each group). Sham1, Sham7 and LPS-C-control rats (1 and 7 d sham-operated or pretreated with physiological saline), BDO1 and BDO7—common bile duct obstruction lasting for 1 or 7 d, LPS—administration of LPS. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , compared with controls. For the Western blot images: top: densitometric analysis (controls=100%); bottom: representative western blots. Equal loading of protein was confirmed by beta-actin.

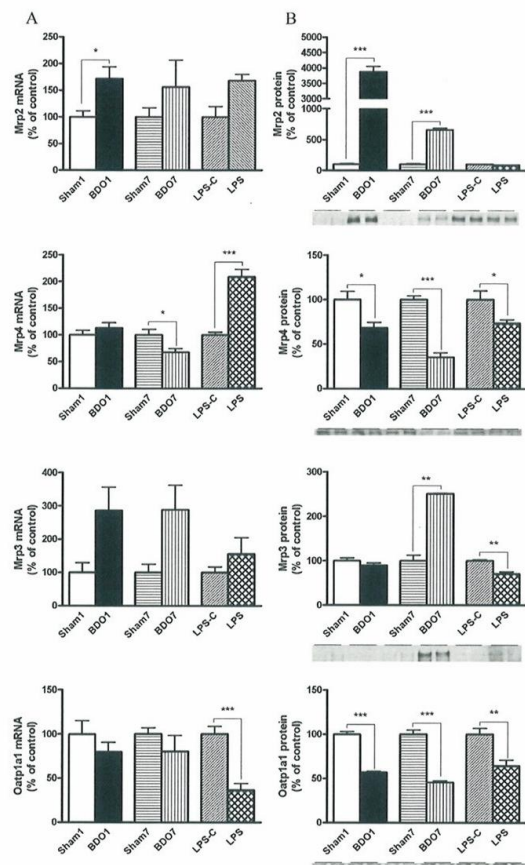


Fig. 4. mRNA (A) and Protein (B) Expression of MRP2, MRP3, MRP4 and Oatp1a1 in Kidneys

mRNA and proteins were isolated from control and cholestatic rat kidney and analyzed by RT-PCR and Western blot, respectively. mRNA data normalized to those of GAPDH and protein data after densitometric analysis are expressed as a percentage of controls, as described in the Materials and Methods. Data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=6$ , in each group). Sham1, Sham7 and LPS-C-control rats (1 and 7 d sham-operated or pretreated with physiological saline), BDO1 and BDO7—common bile duct obstruction lasting for 1 or 7 d, LPS—administration of LPS. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , compared with controls. No expression of Bcrp, Oatp1b2 or Oatp1a4 protein was detected in the kidneys. For the Western blot images: top: densitometric analysis (controls=100%); bottom: representative Western blots.

tion of MTX in humans was 0.94, which indicates extensive entero-hepatic cycling and active reabsorption of the drug from GIT.<sup>19)</sup> Indeed, oral administration of resin colestimide, which binds MTX effectively *in vitro*, markedly accelerated MTX elimination in patients undergoing high-dose intravenous MTX treatment.<sup>20)</sup> As a consequence, alteration of this pathway by chronic cholestasis might have much deeper impact on MTX accumulation than expected. Nevertheless, only a few kinetic studies have previously directly demonstrated that extrahepatic cholestasis is associated with marked impairment of biliary excretion of xenobiotics.<sup>21–23)</sup> Dietrich *et al.* reported a significant reduction of biliary excretion of the food-derived carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine 1 and 6 weeks after bile duct obstruction in rats.<sup>21)</sup> In similar studies, Chen *et al.* and Rodriguez-Garay *et al.* showed an acute decrease of biliary excretion of



December 2009

sulfobromophthalein and ciprofloxacin after 1–7 d of obstruction of the bile duct.<sup>23,24</sup> Our results with MTX comply with these observations. We noticed a marked decrease in  $R_{\text{Bile}}$  and  $CL_{\text{Bile}}$  of MTX, which produced a considerable reduction in its systemic clearance (Table 1). In comparison, we observed a less intensive reduction in  $CL_{\text{Bile}}$  of MTX in endotoxin-induced cholestasis. Importantly, the extent of the reduction agrees with previous studies using LPS where authors indicated similar decreases in biliary excretion of other organic anions such as taurocholate, temocapril, and doxorubicin.<sup>25,26</sup> Importantly, the changes in MTX hepatic kinetics are only in partial agreement with observed alterations of the main MTX transporting proteins, and the relationship is influenced by type of cholestasis (Fig. 3).

As described previously, MTX is taken from the blood into hepatocytes via the Oatps (mostly by Oatp1a4). The canalicular transport of MTX from hepatocytes into bile is accomplished by the Mrp2 and Bcrp transporters.<sup>13,15</sup> Mrp3 and Mrp4 are efflux proteins expressed at the basolateral membrane of hepatocytes and mediates backward transport of MTX from hepatocytes to blood.<sup>27,28</sup> Thus, spectrum of involved rat transporters closely resembles those mediating hepatic elimination of MTX in humans.<sup>13,15,29–33</sup> The down- or up-regulation of these transporters during either intrahepatic or extrahepatic cholestasis has been suggested to be a compensatory mechanism protecting the liver against the damage produced by cumulating endobiotics.<sup>1,5</sup> Regarding obstructive cholestasis, present data united the mRNA and protein expression of the evaluated transporters in one study. Observed changes in expression of selected transporters were similar to previous reports.<sup>21,34,35</sup> confirming the correctness of the cholestatic model used, and supporting the detected alteration of MTX biliary kinetics. Expression of transporter protein corresponded in our study with mRNA levels suggesting transcriptional regulation of the expression during extrahepatic cholestasis (Fig. 3).

In contrast to obstructive cholestasis, administration of LPS produced changes in hepatic transporter expression mostly at the mRNA level, where the down- or up-regulation of respective molecules comply with the results of previous studies (Fig. 3).<sup>5,34</sup> However, at the protein level, only Mrp3 and Oatp1b2 were affected. Regarding other protein expression, only a few data are available describing the influence of LPS on the level of transporter protein expression in addition to the mRNA level. Therein, authors observed, as in our study, decreased Oatp1a1, Oatp1a4 and Oatp1b2 mRNA but unchanged protein, except decreased Oatp1b2 protein level.<sup>4</sup> Our findings regarding Bcrp and Mrp3 protein expression are new. The discrepancies between transporters mRNA, protein expression and the reduction of *in vivo* MTX  $R_{\text{Bile}}/CL_{\text{Bile}}$  after LPS administration await elucidation (Table 1). Nevertheless recently demonstrated retrieval of Mrp2 from canalicular membrane of hepatocyte after administration of LPS may help to explain the observation.<sup>36</sup> Formerly, the same effect was also described during extrahepatic cholestasis.<sup>37</sup>

We observed a rise in  $R_{\text{R}}$  of MTX in BDO animals. Although these data comply with the previously suggested increase in urinary excretion of certain anionic compounds such as bilirubin, *p*-aminohippurate, pravastatin or temocapril during obstructive cholestasis,<sup>2,38,39</sup> recalculation of this parameter of MTX to renal clearance using plasma con-

centrations, which are increased too, bring only insignificant increase in  $CL_{\text{R}}$  of the drug (Table 1). This proves that increased renal expression of efflux transporters such as Mrp2 (Fig. 4) cannot compensate anion systemic accumulation during obstructive cholestasis. On the other hand, induction of efflux transporters such as Mrp2 may protect the kidney tubular cells from the accumulation of methotrexate under cholestatic condition, which may contribute to nephroprotective effect of short-term obstructive cholestasis observed previously.<sup>40</sup> Decreased mRNA and protein expression of Mrp4, another efflux transporter localized at brush border membrane of proximal tubular cells, observed in our study was shown also previously.<sup>41</sup> The increased expression of Mrp3, a basolateral transporter, seen in renal tubuli of our animals, may contribute to this effect. Although the functional consequence needs further elucidation, this finding is supported by a similar increase in renal Mrp3 detected in hyperbilirubinemic rats with inherited deficiency of Mrp2.<sup>42</sup> Unlike in extrahepatic cholestasis, we observed reduced protein expression of Mrp2 and Mrp3 in the kidneys of LPS-administered animals, thus providing novel data that support previously described histological findings of impaired proximal tubular cells during endotoxemia.<sup>6,7</sup> In addition, glomerular filtration was profoundly reduced in LPS administered animals similarly as described previously.<sup>7,8</sup> As a consequence, the marked reduction of MTX renal clearance seen in our study may be attributable not only to altered transporter expression but especially to reduced kidney perfusion. This effect could be caused by induction of cytokine production in kidneys after LPS administration.<sup>43</sup>

The kinetic parameters of conjugated bilirubin, an endogenous Mrp2 substrate, are commonly used to evaluate the severity of cholestasis (Fig. 2). In the present study, shown in Fig. 2C, we identified increased  $R_{\text{Bile}}$  of the compound in both types of cholestasis, which complies with previous report.<sup>2</sup> However, when the measurements were corrected to the serum concentration of conjugated bilirubin, we observed a marked reduction of the parameter ( $CL_{\text{Bile}}$ ) in bile duct-obstructed rats while only an insignificant decrease was detected after LPS administration (Fig. 2E). This corroborates the reduced transporter expression, and suggests this mechanism as the main cause of increased plasma concentrations of conjugated bilirubin in obstructive cholestasis (Fig. 2A). Because no relevant kinetic data are available as yet, we could only compare them with our previous report, which demonstrated similar results.<sup>44</sup> Regarding the  $R_{\text{R}}$  of conjugated bilirubin, Tanaka *et al.* demonstrated an increase 24 h after bile duct obstruction, as also seen in the present study (Fig. 2B). However, again, correction of  $R_{\text{R}}$  of conjugated bilirubin to its plasma concentrations revealed marked reduction of  $CL_{\text{R}}$  in BDO animals (Fig. 2D). Although the exact mechanism of this effect is not known because studies of transporter expression does not reflect the situation, animal and human studies point to the harmful effect of increased bilirubin serum concentration on proximal tubular cells during cholestasis.<sup>45,46</sup> In agreement with this, the absence of increased bilirubin concentration in plasma of LPS-administered animals (Fig. 2A) was associated with only a moderate decrease in the renal clearance of the compound (Fig. 2D), in which reduction of glomerular filtration may take place.<sup>47</sup>

In conclusion, the results of the present study demonstrate



for the first time the marked alteration of methotrexate (MTX) pharmacokinetics during obstructive and LPS-induced cholestasis in rats. Moreover, detailed analysis of endogenous conjugated bilirubin kinetics in the study provides information about its excretory parameters in two widely used animal models of cholestasis. The reliability of cholestatic models was verified by serum biochemistry and study of expression of major drug transporting proteins, which provide also partial explanations for mechanism responsible for the observed functional changes. Despite the fact that some expression changes correlate with the kinetics, the existence of discrepancies in the quantity and character of the respective kinetic and expression results suggests the importance of kinetic data for assessment of the final effects of cholestasis on drug elimination. Finally, although we are aware about limits of our animal models for prediction of clinical behavior of the drug, based on results of kinetic studies presented herein, increased accumulation of MTX might be expected in patients with cholestasis.

**Acknowledgements** This study was supported by grants from the Ministry of Education No. 1P05OC062 and No. 0021620820. We gratefully acknowledge the skillful technical assistance of Jitka Hajkova, Hana Krupickova, and Ivana Tothova.

## REFERENCES

- Zollner G., Trauner M., *Wien. Med. Wochenschr.*, **156**, 380—385 (2006).
- Tanaka Y., Kobayashi Y., Gabazza E. C., Higuchi K., Kamisako T., Kuroda M., Takeuchi K., Iwasa M., Kaito M., Adachi Y., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **282**, G656—G662 (2002).
- Wagner M., Halilbasic E., Marschall H. U., Zollner G., Fickert P., Langner C., Zatloukal K., Denk H., Trauner M., *Hepatology*, **42**, 420—430 (2005).
- Aoki K., Nakajima M., Hoshi Y., Sano N., Kato S., Sugiyama Y., Sato H., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 412—420 (2008).
- Cherrington N. J., Slitt A. L., Li N., Klaassen C. D., *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 734—741 (2004).
- Heemskerck S., van K. A., van den B. L., Poelen G. J., Wouterse A. C., Dijkman H. B., Russel F. G., Masereeuw R., *Pflugers Arch.*, **454**, 321—334 (2007).
- Zhao Y. L., Cen X. B., Ito M., Yokoyama K., Takagi K., Kitaichi K., Nadai M., Ohta M., Takagi K., Hasegawa T., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1522—1528 (2002).
- Ando H., Nishio Y., Ito K., Nakao A., Wang L., Zhao Y. L., Kitaichi K., Takagi K., Hasegawa T., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 3462—3467 (2001).
- Boyer J. L., *J. Hepatol.*, **46**, 365—371 (2007).
- Takakuwa Y., Kokai Y., Sasaki K., Chiba H., Tobioka H., Mori M., Sawada N., *Cell Tissue Res.*, **307**, 181—189 (2002).
- Babatin M. A., Sanai F. M., Swain M. G., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **24**, 813—820 (2006).
- Zollner G., Fickert P., Silbert D., Fuchsichler A., Marschall H. U., Zatloukal K., Denk H., Trauner M., *J. Hepatol.*, **38**, 717—727 (2003).
- Breedveld P., Zelcer N., Pluim D., Sonmez O., Tibben M. M., Beijnen J. H., Schinkel A. H., van T. O., Borst P., Schellens J. H., *Cancer Res.*, **64**, 5804—5811 (2004).
- Chen C., Scott D., Hanson E., Franco J., Berryman E., Volberg M., Liu X., *Pharm. Res.*, **20**, 31—37 (2003).
- Masuda M., Iizuka Y., Yamazaki M., Nishigaki R., Kato Y., Ni'inuma K., Suzuki H., Sugiyama Y., *Cancer Res.*, **57**, 3506—3510 (1997).
- Grim J., Chladek J., Martinkova J., *Clin. Pharmacokinet.*, **42**, 139—151 (2003).
- Fuksa L., Breakova E., Cermanova J., Hroch M., Chladek J., Kolouchova G., Malakova J., Martinkova J., Staud F., Micuda S., *Biopharm. Drug Dispos.*, **5**, 289—299 (2008).
- Shen D. D., Azarnoff D. L., *Clin. Pharmacokinet.*, **3**, 1—13 (1978).
- Hendel J., Brodhagen H., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **26**, 103—107 (1984).
- Makino K., Kochi M., Nakamura H., Kuroda J., Honda Y., Ushio Y., Kuratsu J., *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, **45**, 650—652 (2005).
- Dietrich C. G., Geier A., Wasmuth H. E., Matern S., Gartung C., de Waart D. R., Elferink R. P., *Gut*, **53**, 1850—1855 (2004).
- Pastor A., Collado P. S., Gonzalez-Gallego J., *Life Sci.*, **68**, 69—79 (2000).
- Rodriguez-Garay E. A., Rodriguez G. P., Pisani G., Taborda M., Vigiainco R. A., *Pathophysiology*, **11**, 7—15 (2004).
- Chen C. Y., Shiesh S. C., Wu M. C., Lin X. Z., *Am. J. Gastroenterol.*, **94**, 2408—2411 (1999).
- Hidemura K., Zhao Y. L., Ito K., Nakao A., Tatsumi Y., Kanazawa H., Takagi K., Ohta M., Hasegawa T., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 1636—1642 (2003).
- Hojo M., Sano N., Takikawa H., *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **18**, 815—821 (2003).
- Konig J., Nies A. T., Cui Y., Leier I., Keppler D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1461**, 377—394 (1999).
- Kitamura Y., Hirouchi M., Kusuhara H., Schuetz J. D., Sugiyama Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **327**, 465—473 (2008).
- Borst P., de W. C., van de W. K., *Pflugers Arch.*, **453**, 661—673 (2007).
- Jedlitschky G., Hoffmann U., Kroemer H. K., *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2**, 351—366 (2006).
- Konig J., Seithel A., Gradhand U., Fromm M. F., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **372**, 432—443 (2006).
- Shibayama Y., Ushinohama K., Ikeda R., Yoshikawa Y., Motoya T., Takeda Y., Yamada K., *Cancer Sci.*, **97**, 1260—1266 (2006).
- Ueda K., Kato Y., Komatsu K., Sugiyama Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **297**, 1036—1043 (2001).
- Donner M. G., Warskulat U., Saha N., Haussinger D., *Biol. Chem.*, **385**, 331—339 (2004).
- Trauner M., Arrese M., Soroka C. J., Ananthanarayanan M., Koepffel T. A., Schlosser S. F., Suchy F. J., Keppler D., Boyer J. L., *Gastroenterology*, **113**, 255—264 (1997).
- Zinchuk V., Zinchuk O., Okada T., *Microsc. Res. Tech.*, **67**, 65—70 (2005).
- Paulusma C. C., Kothe M. J., Bakker C. T., Bosma P. J., van B. I., van M. J., Bolder U., Tytgat G. N., Oude Elferink R. P., *Hepatology*, **31**, 684—693 (2000).
- Brandoni A., Quaglia N. B., Torres A. M., *Pharmacology*, **68**, 57—63 (2003).
- Takada Y., Tachizawa H., Kurihara H., Takayanagi M., Sasamoto T., Akashi M., Aiso M., Takamori Y., Sano N., Takikawa H., *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, **11**, 125—128 (2004).
- Leung N., Croatt A. J., Haggard J. J., Grande J. P., Nath K. A., *Kidney Int.*, **60**, 1047—1057 (2001).
- Denk G. U., Soroka C. J., Takeyama Y., Chen W. S., Schuetz J. D., Boyer J. L., *J. Hepatol.*, **40**, 585—591 (2004).
- Kuroda M., Kobayashi Y., Tanaka Y., Itani T., Mifuji R., Araki J., Kaito M., Adachi Y., *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **19**, 146—153 (2004).
- Li Y. Y., Wong L. Y., Cheung B. M., Hwang I. S., Tang F., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **32**, 1110—1118 (2005).
- Micuda S., Breakova E., Fuksa L., Cermanova J., Osterreicher J., Hroch M., Mokry J., Pejchal J., Martinkova J., Staud F., *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **20**, 404—412 (2008).
- Bairaktari E., Liamis G., Tsolas O., Elisaf M., *Hepatology*, **33**, 1365—1369 (2001).
- Kaler B., Karram T., Morgan W. A., Bach P. H., Yousef I. M., Bomzon A., *Ren. Fail.*, **26**, 507—516 (2004).
- Elias M. M., Comin E. J., Garay E. A., *Clin. Sci. Mol. Med.*, **53**, 193—196 (1977).

# **SOUHRN**

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

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

V rámci této dizertační práce byly studovány oba mechanismy odpovědné za tvorbu a sekreci žluče – transportní proteiny a hematobiliární bariéra. Dále byly studovány akutní a chronickou obstrukční cholestázou navozené změny exprese transportérů a integrity hematobiliární bariéry a změny farmakokinetiky léčiv, které jsou substráty pro vybrané transportní proteiny. V první studii jsme se zaměřili na sledování změn biliární a renální exkrece rhodaminu 123, substrátu P-glykoproteinu (P-gp), u potkanů s akutní a chronickou obstrukční cholestázou navozenou podvazem žlučovodu v trvání jednoho a sedmi dnů. Již v mnoha studiích byla potvrzena zvýšená exprese P-gp na úrovni mRNA i proteinu během obstrukční cholestázy. Jde prakticky o jediný známý kanalikulární efluxní transportér, jehož exprese je během tohoto patologického stavu indukovaná. Jedním z možných vysvětlení je pokles koncentrace jeho substrátů v hepatocytech a následně i na kanalikulární membráně v důsledku snížené exprese bazolaterálních „Organic cation transporter 1“ (Oct1) a „Organic anion transporting polypeptide 1a4“ (Oatp1a4) transportérů pro vychytávání látek z krve. Tento fakt by mohl i částečně vysvětlit

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

Druhá práce se zabývá sledováním změn permeability hematobiliární bariéry za použití rhamnózo/melibiózového permeabilitního testu během akutní obstrukční cholestázy navozené u potkanů podvazem žlučového vodu v trvání jednoho dne. Biliární exkrece obou cukrů byla zvýšená během prvních 60 minut experimentu (z celkových 240 minut) po jejich i.v. aplikaci. V případě kumulativní biliární exkrece byl poměr rhamnóza/melibióza zvýšený během celého experimentu. Biliární exkrece byla v porovnání s renální eliminací obou cukrů zanedbatelná. V případě i.v. aplikace rhamnózy probíhá exkrece především ledvinami s 65% podílem u potkanů a 74% podílem u lidí. Předpokládá se, že zbytek aplikované dávky rhamnózy je metabolizován na rozdíl od melibiózy, která metabolismu nepodléhá. V naší studii činila exkrece rhamnózy 62 % z podané dávky a exkrece melibiózy 71 % z podané dávky s vysoce převažujícím podílem renální exkrece. U obou cukrů nebyla exkrece do moče ovlivněna akutní cholestázou. Z poměru koncentrace

plazma/žluč rhamnózy vyplývá, že rhamnóza prochází hepatocyty podobně jako enterocyty prostřednictvím pasivní difúze a že se rychle vyrovnávají její koncentrace mezi plazmou a nově vytvořenou žlučí. Z výsledků studie vyplývá, že námi zvolený permeabilitní test je vhodný pro studium změny integrity hematobiliární bariéry během akutní cholestázy u potkanů. Tento test prokázal, že hematobiliární bariéra je více propustná během akutní cholestázy a toto poškození lze spolehlivě měřit během prvních 60 minut po podání obou cukrů.

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



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

## **SUMMARY**

The liver is a unique organ with a number of vital functions. Pivotal one is its participation on bile formation and secretion, import, detoxification and excretion of endogenous substances and xenobiotics.

Bile formation is essential for both absorption of lipids in intestine and excretion of various endogenous compounds and xenobiotics (e.g. bile acids, bilirubin, cholesterol, phospholipids and drugs). This function is markedly impaired during extrahepatic and intrahepatic cholestasis with partial or complete stoppage of bile flow. Consequently, hepatic and further systemic accumulation of toxic biliary constituents, such as bile acids and bilirubin, occurs. In an effort to compensate this situation, spontaneous anti-cholestatic mechanisms are activated, which provide alternative excretory routes for toxic accumulating compounds (e.g. renal elimination of bile acids and xenobiotics into urine). These mechanisms include changes in the expression, localization and function of respective transporters in liver and kidneys. Another mechanism with a significant impact on bile formation and transport of compounds between bile and blood is blood-biliary barrier formed by connection of hepatocytes by „tight-junctions“ and „gap-junctions“. While „gap-junctions“ exchange substances among cells, „tight-junctions“ represent the real blood-biliary barrier and are, together with transporters, necessary for the bile formation. „Tight-junctions“ regulate transport of water, solutes and ions through the paracellular spaces of hepatocytes.

In this work both mechanisms responsible for bile formation and secretion – transporters and blood-biliary barrier – were studied. Furthermore, acute and chronic cholestasis induced changes in transporter expression and integrity of blood-biliary barrier were evaluated. In addition, changes in pharmacokinetics of drugs, acting as substrates of selected transporters, were examined, too. In the first study, we focused on the evaluation of biliary and renal excretion of rhodamine 123, a substrate of P-glycoprotein (P-gp), during acute and chronic extrahepatic cholestasis in rats induced by 1 and 7 days lasting bile duct obstruction. Recently, many studies have confirmed increased expression of P-gp at both mRNA and protein level during obstructive cholestasis. P-gp is the only efflux transporter expressed at the canalicular membrane of hepatocytes with increased expression during cholestasis. One of the explanations is a decline in its substrate concentration in hepatocytes due to down-regulation of basolateral uptake transporters – “Organic cation transporter 1“ (Oct1) and “Organic anion transporting polypeptide 1a4“ (Oatp1a4). This fact could partially explain the disagreement between increased expression of P-gp protein and unchanged or even decreased biliary excretion of rhodamine123.

Comparison of rhodamine 123 renal and hepatic excretion showed that this compound is eliminated mostly by the kidney with only approximately 23% of the eliminated amount being excreted into bile. Decreased bile production and biliary excretion of rhodamine 123 during acute cholestasis and preserved bile excretion during chronic cholestasis are in disagreement with increased P-gp expression in livers. Physicochemical properties of the drug could partly explain this fact since rhodamine 123 is a fluorescent dye which exhibits a positive charge. Despite the assumption that it enters the cells by passive diffusion, partial water solubility at physiological pH eventuated the potential contribution of active transport at the basolateral membrane of hepatocytes via Oct1 transporter. Other explanation could be increased accumulation of endogenous and exogenous substances such as bilirubin and bile acids, which cross the basolateral membrane of hepatocytes mostly by passive diffusion and consequently activate nuclear receptors that regulate P-gp expression (CAR, PXR). Rhodamine 123 is actively excreted into urine via P-gp and P-gp expression changes are accompanied with P-gp-mediated renal tubular secretory clearance changes. During acute cholestasis, the net tubular secretion clearance and expression of P-gp protein were preserved, which complies with the reported nephroprotective effect of cytokines released from the liver. Decreased renal excretion and renal clearance of rhodamine 123 during chronic cholestasis may be explained by down-regulation of P-gp expression. In this study, the employed model of extrahepatic cholestasis with reconstituted bile flow offers possibility to investigate functional consequences of cholestasis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of endogenous substances and xenobiotics.

In the second study, we investigated changes in permeability of blood-biliary barrier using rhamnose/melibiose test during acute obstructive cholestasis induced by 1 day lasting bile duct obstruction. Biliary excretion of both sugars was increased during the first 60 min (from total 240 min) after i.v. application of the compounds. Regarding cumulative biliary excretion, the melibiose/rhamnose ratio was increased throughout the whole experiment. Biliary excretion of both sugars was negligible in comparison with their renal elimination. When administered rhamnose intravenously to mammals, it is eliminated primarily by the kidneys with 65% and 75% contribution in rats and humans, respectively. In comparison to rhamnose, melibiose is not supposed to be metabolised. In this study, total excretion of rhamnose and melibiose was 62% and 71%, respectively, with highly prevailing urinary excretion. Renal clearance was not influenced by cholestasis. Plasma to bile concentration ratios of rhamnose suggested that passive diffusion of this sugar through

hepatocytes occurs similarly to that of enterocytes and that rhamnose quickly equilibrates between plasma and new formed bile. In conclusion, the used dual-sugar permeability test is convenient to describe the alteration of the blood-biliary barrier during acute cholestasis in rats. This test demonstrated that the blood-biliary barrier becomes leaky during acute cholestasis and this impairment could be measured during the first 60 min after administration of both sugars.

The third study was focused to description of changes in the pharmacokinetics of methotrexate (MTX) using the *in vivo* model of extrahepatic (bile duct obstruction for 1 and 7 days) and intrahepatic cholestasis (lipopolysaccharide administration, LPS) in rats. Simultaneously, we analyzed changes in the expression of main transporters responsible for MTX transport at both mRNA and protein level. Moreover, kinetics of conjugated bilirubin, an endogenous substrate of Mrp2, was evaluated to qualify the severity of cholestasis. In humans, 10–30% of applied dose of MTX is excreted by bile. Nevertheless, the contribution of hepatic transporters seems to be higher because the ratio of MTX biliary/renal excretion in humans is 0.94. This indicates extensive entero-hepatic cycling and active reabsorption of the drug from gastrointestinal tract. Some kinetic studies demonstrated that biliary excretion of drugs is impaired during extrahepatic cholestasis. This was confirmed in this study as well, when biliary excretion and biliary clearance of MTX was decreased and led to significant reduction of its systemic clearance. In comparison to obstructive cholestasis, reduction of MTX biliary clearance was less intensive during intrahepatic cholestasis. Expression changes of MTX transporters in livers partly corresponded to alterations of MTX biliary excretion. MTX transporters include (1) for uptake into hepatocytes – “Organic anion transporting polypeptide 1a1, 1a4 and 1b2“ (Oatp1a1, Oatp1a4 and Oatp1b2); (2) for efflux into bile – “Multidrug resistance-associated protein 2“ (Mrp2) and “Breast cancer resistance protein“ (Bcrp); (3) for efflux from hepatocytes into plasma – “Multidrug resistance-associated protein 3 and 4“ (Mrp3 and Mrp4). Protein expression of transporters corresponds with that of mRNA suggesting transcriptional regulation of the expression during extrahepatic cholestasis. Administration of LPS produced changes in hepatic transporter expression mostly at the mRNA level. Only Oatp1b2 and Mrp3 were influenced at the protein level. Although we observed a rise in renal excretion of MTX, renal clearance was only slightly increased. This proves that increased expression of efflux transporters such as Mrp2 in kidneys cannot compensate systemic accumulation of anionic compounds during obstructive cholestasis. On the other hand, induction of Mrp2 may protect the kidney proximal tubular cells from the

accumulation of MTX during acute cholestasis and thus contribute to nephroprotective effect. The increased expression of Mrp3 may make for this effect. Intrahepatic cholestasis led to down-regulation of Mrp2 and Mrp3 transporters in kidney proximal tubular cells. In addition, glomerular filtration was reduced in LPS-induced cholestasis and the reduction of MTX renal clearance may be attributable not only to altered transporter expression but especially to reduced kidney perfusion. This effect could be caused by increased cytokine production. Changes in MTX pharmacokinetics and respective transporter expression alterations suggest important differences between the two widely used cholestatic models.

## **SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ**

## 1. Původní práce publikované v odborných časopisech

**Brcakova E**, Fuksa L, Cermanova J, Kolouchova G, Hroch M, Hirsova P, Martinkova J, Staud F and Micuda S (2009) Alteration of methotrexate biliary and renal elimination during extrahepatic and intrahepatic cholestasis in rats. *Biol Pharm Bull* 32 (v tisku) **IF** = 1,765

Fuksa L, **Brcakova E**, Cermanova J, Hroch M, Chladek J, Kolouchova G, Malakova J, Martinkova J, Staud F and Micuda S (2008) Amiodarone modulates pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rats. *Biopharm Drug Dispos* 29:289-299. **IF** = 1,542

Micuda S, **Brcakova E**, Fuksa L, Cermanova J, Osterreicher J, Hroch M, Mokry J, Pejchal J, Martinkova J and Staud F (2008) P-glycoprotein function and expression during obstructive cholestasis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20:404-412. **IF** = 2,080

Cermanova J, Fuksa L, **Brcakova E**, Hroch M, Kucera O, Kolouchova G, Hirsova P, Malakova J, Staud F, Martinkova J, Cervinkova Z and Micuda S (2009) Up-regulation of renal Mdr1 and Mrp2 transporters during amiodarone pretreatment in rats. *Pharmacol Res.* **IF** = 3,287

Micuda S, Fuksa L, **Brcakova E**, Osterreicher J, Cermanova J, Cibicek N, Mokry J, Staud F and Martinkova J (2008) Zonation of multidrug resistance-associated protein 2 in rat liver after induction with dexamethasone. *J Gastroenterol Hepatol* 23:e225-e230. **IF** = 2,275

Fuksa L, Mičuda S, Cermanová J, **Brčáková E** a Štaud F. Fyziologická funkce MRP2. *Československá fyziologie* 55, 57-65. 2006.

Nachtigal P, Pospisilova N, Vecerova L, Micuda S, **Brcakova E**, Pospeschova K and Semecky V (2009) Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *J Atheroscler Thromb* 16:265-274. **IF** = 2,625

Nachtigal P., Vecerova L., Pospisilova N., Micuda S., **Brcakova E.**, Navarro Hernandez E., Pospeschova K. and Semecky V (2009) Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 24: 1499-1506. **IF** = 2,194



Prochazka E, Soukup T, Hroch M, Fuksa L, **Brcakova E**, Cermanova J, Kolouchova G, Urban K, Mokry J and Micuda S (2009) Methotrexate released in vitro from bone cement inhibits human stem cell proliferation in S/G2 phase. *Int Orthop*. **IF** = 1,235

Micuda S, Sispera L, Hodac M, Parizek P, Fuksa L, **Brcakova E**, Cerman J, Cermanova J and Martinkova J (2007) Diurnal variation of 6beta-hydroxycortisol in cardiac patients. *Physiol Res* 56:307-313. **IF** = 1,505

Micuda S, Fuksa L, Mundlova L, Osterreicher J, Mokry J, Cermanova J, **Brcakova E**, Staud F, Pokorna P and Martinkova J (2007) Morphological and functional changes in p-glycoprotein during dexamethasone-induced hepatomegaly. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:296-303. **IF** = 2,038

Tomsik P, Sispera L, Rezacova M, Niang M, Stoklasova A, Cerman J, Knizek J, **Brcakova E**, Cermanova J and Micuda S (2008) Increased melibiose/rhamnose ratio in bile of rats with acute cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol* 23:1934-1940. **IF** = 2,275

Cibickova L, Hyspler R, Micuda S, Cibicek N, Zivna H, Jun D, Ticha A, **Brcakova E**, Palicka V (2009) The influence of simvastatin, atorvastatin and high-cholesterol diet on acetylcholinesterase activity, amyloid beta and cholesterol synthesis in rat brain. *Steroids* 74: 13-19. **IF** = 2,588

## 2. Abstrakty z mezinárodních konferencí

### **Prague Hepatology Meeting (Prague, Czech Republic, September 18-20, 2008)**

**Brcakova E**, Fuksa L, Cermanova J, Kolouchova G, Hroch M, Hirsova P, Martinkova J, Staud F, Micuda S: Methotrexate biliary and renal elimination is impaired during cholestasis in rats. *Čes a Slov Gastroent a Hepatol* 2008; 62(Suppl 2): 97.

Micuda S, Safka V, **Brcakova E**, Fuksa L, Cermanova J, Kolouchova G, Martinkova J, Staud F, Hulek P: Alteration of multiple cytokine profiles in patients with hepatopulmonary syndrome – a pilot study. *Čes a Slov Gastroent a Hepatol* 2008; 62(Suppl 2): 102.

### **The IX<sup>th</sup> World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics (Quebec, Canada, July 27-August 1, 2008)**

**Brcakova E**, Fuksa L, Cermanova J, Hajkova J, Kolouchova G, Hroch M, Chladek J, Staud F, Martinkova J, Micuda S: Modulation of multiple cytokine profile during lipopolysaccharide-induced alteration of methotrexate pharmacokinetics in rats. *Proceedings of The IXth World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, Quebec, Canada, July 2008.*

Fuksa L, **Brcakova E**, Kolouchova G, Cermanova J, Hroch M, Kucera O, Staud F, Martinkova J, Cervinkova Z, Micuda S: The effects of amiodarone on rhodamine-123 transport in rats. *Proceedings of The IXth World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, Quebec, Canada, July 2008.*

### **Membrane Transporters in Disease and Drug Development (Bern, Switzerland, August 12-16, 2007)**

**Brcakova E**, Fuksa L, Micuda S, Cermanova J, Hroch M, Chladek J, Hajkova J, Lotkova H, Martinkova J, Cervinkova Z, Staud F: Azithromycin and Mrp2 – the effects on methotrexate kinetics in rats. *Proceedings of Bioparadigms conference “BioMedical Transporters 2007”*, Bern August 2007:47.

Fuksa L, **Brcakova E**, Micuda S, Cermanova J, Osterreicher J, Hroch M, Mokry J, Staud F, Martinkova J: Obstructive cholestasis and P-glycoprotein in rats. *Proceedings of*

Bioparadigms conference “BioMedical Transporters 2007”, Bern August 2007:51.

**EUFEPS Conference on Membrane Drug Transporters (Copenhagen, Denmark, September 25-27, 2006)**

**Brcakova E**, Micuda S, Fuksa L, Cermanova J, Osterreicher J, Hajkova J, Chladek J, Mokry J, Staud F, Martinkova J: Elimination of methotrexate during cholestasis in rats. Proceedings of EUFEPS Conference on Membrane Drug Transporters: Impact on Drug Discovery, Development, Regulation and Usage. Copenhagen, Denmark 2006: 69.

Fuksa L, Micuda S, **Brcakova E**, Cermanova J, Hroch M, Malakova J, Hajkova J, Staud F, Martinkova J: Modulation of Rhodamine-123 elimination in rats by P-glycoprotein inhibitor, amiodarone. Proceedings of EUFEPS Conference on Membrane Drug Transporters: Impact on Drug Discovery, Development, Regulation and Usage Copenhagen, Denmark 2006: 70.

### 3. Abstrakty z Českých a Slovenských konferencí

#### 59. Farmakologické dny (Bratislava, 2. – 4. září, 2009)

Kolouchová G, Hiršová P, **Brčáková E**, Fuksa L, Cermanová J, Hroch M, Mokřý J, Šišpera L, Mičuda S: Vliv pravastatinu na poškození jater v průběhu chronické extrahepatální cholestázy potkanů. Sborník abstrakt: 59. Farmakologické dny, Bratislava, září 2009

Hiršová P, Muchová L, Kolouchová G, **Brčáková E**, Fuksa L, Cermanová J, Víték L, Mičuda S: Model hodnocení mechanismů tvorby žluče během ethinylestradiolem indukované cholestázy - vliv modulace hemoxygenázy-1. Sborník abstrakt: 59. Farmakologické dny, Bratislava, září 2009

#### XXXVII. Májové Hepatologické dny (Karlovy Vary, 13. – 15. května, 2009)

**Brčáková E**, Fuksa L, Cermanová J, Kolouchová G, Hiršová P, Hroch M, Chládek J, Mokřý J, Martínková J, Mičuda S: Vliv resveratrolu na expresi transportních proteinů v játrech a ledvinách u potkanů s biliární cirhózou. Čes a Slov Gastroent a Hepatol 2009; 63(3): 150

Kolouchová G, Hiršová P, **Brčáková E**, Fuksa L, Cermanová J, Hroch M, Chládek J, Mokřý J, Martínková J, Mičuda S: Protizánětlivé látky modulují endotoxinem indukované poškození jater u potkanů. Čes a Slov Gastroent a Hepatol 2009; 63(3): 153

#### 58. Farmakologické dny (Praha, 3. – 5. září, 2008)

Fuksa L, **Brcakova E**, Cermanova J, Hroch M, Kolouchova G, Staud F, Martinkova J, Micuda S: Amiodarone modulates excretion of conjugated bilirubin in rats. Prague Medical Report / Vol. 109 (2008) Suppl., p. 36-37

Zivna H, Zivny P, Cermanova J, Hajkova J, **Brcakova E**, Fuksa L, Kolouchova G, Micuda S: Alteration of liver regeneration and choletesrol mechanisms in rats after partial hepatectomy and hypercholesterolemic diet. Prague Medical Report / Vol. 109 (2008) Suppl., p. 36-37

**XXXVI. Májové Hepatologické dny (Karlovy Vary, 14. – 16. května, 2008)**

**Brčáková E**, Fuksa L, Kolouchová G, Cermanová J, Osterreicher J, Hájková J, Chládek J, Štaud F, Martínková J, Mičuda S: Změny exprese a funkce transportních proteinů v játrech a ledvinách u potkanů s obstrukční cholestázou. Čes a Slov Gastroent a Hepatol 2008; 62 (2)

Kolouchová G, **Brčáková E**, Fuksa L, Cermanová J, Hájková J, Hroch M, Chládek J, Štaud F, Mičuda S: Změny eliminace metotrexátu a vzestup regulačních cytokinů v séru potkanů po aplikaci endotoxinu. Čes a Slov Gastroent a Hepatol 2008; 62 (2)

Fuksa L, **Brčáková E**, Kolouchová G, Cermanová J, Hroch M, Kučera O, Štaud F, Martínková J, Červinková Z, Mičuda S: Vliv amiodaronu na jaterní transport rhodaminu-123 u potkana. Čes a Slov Gastroent a Hepatol 2008; 62 (2)

**XIII. vědecká konference LF UK a FN (Hradec Králové, 21. leden, 2009)**

Brčáková E, Mičuda S, Fuksa L, Cermanová J, Kolouchová G, Hiršová P, Chládek J, Hroch M, Martínková J, Štaud F. Monitoring of changes in drug pharmacokinetics and dynamics due to impaired hepatic function. Abstracts from “The Thirteenth Scientific Conference of the Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital 21 January 2009, Hradec Králové”, Acta Medica 2009, vol 52, No1:33.

**57. Farmakologické dny (Olomouc, 12. – 14. září, 2007)**

Cermanová J, Mičuda S, **Brčáková E**, Fuksa L, Hroch M, Chládek J, Hájková J, Lotková H, Martínková J, Červinková Z, Štaud F: Influence of azithromycin on hepatobiliary and renal excretion of methotrexate in rats. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2007, 151 (Supplement 1): 14-16.

Mičuda S, Adamcová M, **Brčáková E**, Fuksa L, Cermanová J, Hájková J, Kolouchová G, Martínková J, Štaud F: Changes in cardiac troponin T during acute and chronic cholestasis in rats. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2007, 151 (Supplement 1): 57-58.

**XI. vědecká konference LF UK a FN (Hradec Králové, 23. leden, 2007)**

**Brcakova E**, Micuda S, Fuksa L, Cermanova J, Osterreicher J, Hajkova J, Chladek J, Mokry J, Staud F, Martinkova J: Influence of cholestasis on the Mrp2 activity in vivo. Abstracts from “The Eleventh Scientific Conference of the Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital 23 January 2007, Hradec Králové”, Acta Medica 2007, vol 50, No1

Micuda S, Fuksa L, **Brcakova E**, Cermanova J, Ancicova M, Chladek J, Hroch M,, Lotkova H, Martinkova J, Cervinkova Z, Stud F: Azithromycin and multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2). Abstracts from “The Eleventh Scientific Conference of the Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital 23 January 2007, Hradec Králové”, Acta Medica 2007, vol 50, No1

Fuksa L, Micuda S, **Brcakova E**, Cermanova J, Hroch M, malakova J, Staud F, Pokorna P, Martinkova J. Influence of amiodarone on P-gp-mediated rhodamine-123 biliary excretion in the rat. Abstracts from “The Eleventh Scientific Conference of the Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital 23 January 2007, Hradec Králové”, Acta Medica 2007, vol 50, No1:68.

**56. Farmakologické dny (Bratislava, 6. – 8. září, 2006)**

**Brčáková E**, Mičuda S, Fuksa L, Cermanová J, Osterreicher J, Hájková J, Chládek J, Mokry J, Štaud F, Martínková J: Adaptive changes of methotrexate elimination during extrahepatic and intrahepatic cholestasis in the rat. Sborník prací z 56. Farmakologických dnů, Bratislava 2006:85. (ISBN 80-89197-52-3).

Cermanová J, Mičuda S, **Brčáková E**, Fuksa L, Hájková J, Štaud F, Martínková J: Cholestatic liver injury: Consequences for bilirubin excretion from the organism. Sborník prací z 56. Farmakologických dnů, Bratislava 2006:87. (ISBN 80-89197-52-3)

Mičuda S, **Brčáková E**, Fuksa L, Cermanová J, Osterreicher J, Hroch M, Hájková J, Mokry J, Štaud F, Martínková J: Chronic cholestasis and P-glycoprotein. Sborník prací z 56. Farmakologických dnů, Bratislava 2006:118. (ISBN 80-89197-52-3)

Fuksa L, Micuda S, **Brcakova E**, Cermanova J, Hroch M, Malakova J, Hajkova J, Staud F,

Martinkova J. Effect of amiodarone treatment on P-gp-mediated transport in the rat. Sborník prací z 56. Farmakologických dnů, Bratislava 2006:96. (ISBN 80-89197-52-3)

Micuda S, Fuksa L, **Brcakova E**, Cermanova J, Ancicova M, Chladek J, Hajkova J, Lotkova H, Martinkova J, Cervinkova Z, Staud F. Azithromycin and mrp2. Sborník prací z 56. Farmakologických dnů, Bratislava 2006:117. (ISBN 80-89197-52-3)

**55. Farmakologické dny (Hradec Králové, 31. srpen – 2. září, 2005)**

Cermanova J, Fuksa L, Micuda S, **Brcakova E**, Chladek J, Martinkova J. Transport proteins and hepatorenal syndrome. Sborník prací z 55. Farmakologických dnů, Hradec Králové 2005