

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd



**Změna exprese transportních proteinů během
intrahepatální cholestázy u potkanů**

Alteration of transport proteins expression during
intrahepatic cholestasis in rats

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Eva Doleželová, Ph.D.

Vypracoval:

Jan Kolouch

Hradec Králové

2013

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

Podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval všem svým blízkým, kteří mě podporovali během celého studia a byli mi oporou i při vypracování této práce. Můj největší dík patří PharmDr. Evě Doleželové, PhD., mé školitelce, která mi svým odborným dohledem, cennými radami a velice přátelským přístupem pomohla při sestavování této práce.

Dále bych chtěl poděkovat Prof. MUDr. Vladimíru Geršlovi, CSc. a Doc. MUDr. Stanislavovi Mičudovi, Ph.D. za možnost pracovat v kolektivu Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové. V neposlední řadě bych rád poděkoval Ing. Hance Laštůvkové za asistenci a odborné rady při praktických činnostech spojených s touto prací.

Abstrakt

Jan Kolouch

Změna exprese transportních proteinů během intrahepatální cholestázy u potkanů

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce:

Cílem diplomové práce bylo ověření cholestatického poškození jater prostřednictvím biochemické analýzy plazmy a analýzy exprese hlavních jaterních transportních proteinů (Ntcp, Oatp1a4, Bsep, Mrp2, Mrp3, Mrp4) pro uptake a eflux látek na úrovni mRNA.

Metody:

Potkani kmene Wistar (n = 6, v každé skupině; 280 – 320 g), byli rozděleni do dvou skupin: kontrolní skupina (LPS-K) a skupina LPS (lipopolysacharid podaný jednorázově i.p., 4 mg/kg). Vzorky krve a jater byly odebrány 12 hodin po aplikaci LPS. Biochemická analýza plazmy byla provedena pomocí Cobas Integra ® 800 a GC/MS. Změny exprese transportních proteinů na úrovni mRNA byly hodnoceny qRT-PCR.

Výsledky:

V porovnání s kontrolou byla ve skupině LPS pozorována významně zvýšená plazmatická koncentrace žlučových kyselin a zvýšená aktivita enzymů ALP a GMT. U žlučových kyselin došlo ke zvýšení koncentrace na 818 %, aktivita ALP byla zvýšená na 311 % a aktivita GMT na 2167 %. Intrahepatální cholestáza vedla k významnému poklesu exprese jaterních transportních proteinů na úrovni mRNA – Ntcp na 4,6 %, Oatp1a4 na 2,2 %, Mrp2 na 1,7 % a Bsep na 25 %.

Závěr:

Z výsledků diplomové práce vyplývá, že lipopolysacharidem indukovaná cholestáza je velice úzce spjata s uvedenými změnami biochemických parametrů a expresí mRNA transportních proteinů.

Abstract

Jan Kolouch

Alteration of transport proteins expression during intrahepatic cholestasis in rats

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background:

The aim of the diploma thesis was the verification of cholestatic liver injury by biochemical analysis of plasma and analysis of the main efflux and uptake hepatic transporters (Ntcp, Oatp1a4, Bsep, Mrp2, Mrp3, Mrp4) at the mRNA level.

Methods:

Wistar rats (n = 6, in each group; 280 – 320 g) were divided into two groups: Control group (LPS-K) and LPS group (lipopolysaccharide was administered at once i.p., 4mg/kg). Blood and liver samples were collected 12 hours after LPS administration. Biochemical analysis of plasma was performed by Cobas Integra ® 800 and GC/MS. Changes of mRNA expression of the transporters were evaluated by qRT-PCR.

Results:

In comparison to control group, LPS group showed significantly elevated plasmatic levels of the bile acids and also elevated activity of ALP and GMT. Plasmatic levels of bile acids were elevated to 818%, activity of ALP was elevated to 311% and activity of GMT to 2167%. Intrahepatic cholestasis led to the significant decrease of mRNA levels – Ntcp to 4.6%, Oatp1a4 to 2.2%, Mrp2 to 1.7% and Bsep to 25%.

Conclusion:

According to the results of this study, it is apparent, that LPS-induced cholestasis is linked up with the mentioned modulations of transporter's mRNA levels and biochemical markers.

Obsah

PODĚKOVÁNÍ.....	3
ABSTRAKTY	4
OBSAH.....	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
ÚVOD	10
1. MORFOLOGIE A FYZIOLOGIE JATER.....	13
1.1. Morfologie jater.....	13
1.1.1. <i>Hepatocyty</i>	14
1.2. Fyziologie jater.....	15
1.2.1. <i>Tvorba a sekrece žluči</i>	15
1.2.2. <i>Metabolismus sacharidů, proteinů a lipidů</i>	16
1.2.3. <i>Imunitní funkce jater</i>	17
1.2.4. <i>Zásobní funkce jater</i>	17
1.2.5. <i>Eliminační funkce jater</i>	18
2. TRANSPORTNÍ SYSTÉMY V JÁTRECH.....	19
2.1. Bazolaterální transportní proteiny	19
2.1.1. <i>NTCP</i>	19
2.1.2. <i>OATP</i>	19
2.1.3. <i>OAT</i>	20
2.1.4. <i>OCT</i>	20
2.1.5. <i>MRP</i>	20
2.1.6. <i>OSTα/β</i>	21
2.2. Kanalikulární transportní proteiny	22
2.2.1. <i>BSEP</i>	22
2.2.2. <i>MRP2</i>	22
2.2.3. <i>MDR1</i>	22
2.2.4. <i>MDR3</i>	23
2.2.5. <i>BCRP</i>	23
3. CHOLESTÁZA	24
3.1. Klinický obraz cholestázy	24
3.2. Laboratorní hodnoty cholestázy	25
3.3. Extrahepatální cholestáza	25
3.4. Intrahepatální cholestáza	25

3.5. Terapie cholestázy	27
3.5.1. Kyselina Ursodeoxycholová.....	27
3.5.2. Rifampicin	28
3.5.3. S-adenosyl-L-methionin	28
3.5.4. Fenobarbital.....	28
3.5.5. Terapie pruritu.....	28
4. JATERNÍ TRANSPORTNÍ SYSTÉMY A CHOLESTÁZA	30
4.1. Adaptivní odpověď transportních proteinů při cholestáze	30
5. ZADÁNÍ – CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	33
6. METODIKA	34
6.1. Pokusná zvířata	34
6.2. Biochemická analýza.....	34
6.3. qRT-PCR.....	35
6.4. Statistická analýza	35
7. VÝSLEDKY	36
7.1. Biochemická analýza.....	36
7.2. qRT-PCR.....	36
8. DISKUZE	38
9. ZÁVĚR	41
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42

Seznam použitých zkratek

ABC	„ATP binding cassette“
Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A
ALP	Alkalická fosfatáza
ALT	Alaninaminotransferáza
ASBT	„Apical sodium-dependent bile acid transporter“
AST	Aspartátaminotransferáza
BCRP	„Breast cancer resistance protein“
BSEP	„Bile salt export pump“
BRIC	Benigní rekurentní intrahepatální cholestáza
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CAR	„Constitutive androstane receptor“
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
CYP	Cytochrom P
ECC	Extrahepatální cholangiokarcinom
FXR	„Farnesoid X receptor“
GADPH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GMT	γ -glutamyltransferáza
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A
HNF	„Hepatocyte nuclear factor“
HO-1	Hemoxygenáza 1
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
i.p.	Intraperitoneální cesta podání
iNOS	Indukce NO-syntházy
LPS	Lipopolysacharid
MDR	„Multidrug resistance protein“
MRP	„Multidrug resistance-associated protein“
NTCP	„Na ⁺ -taurocholate co-transporting polypeptide“
OAT	„Organic anion transporter“
OATP	„Organic anion transporting polypeptides“
OCT	„Organic cation transporters“

OST α/β	„Organic solute transporter α/β “
PBC	Primární biliární cirhóza
PFIC2	Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 2
PSC	Primární sklerotizující cholangitida
PXR	„Pregnane X receptor“
RT-PCR	„Reverse transcriptase – polymerase chain reaction“
SAME	S-adenosyl-L-methionin
SLC	„Solute carrier“
SULT	Sulfotransferáza
UDCA	Ursodeoxycholová kyselina
UGT	Uridin difosfát-glukuronosyltransferáza

Poznámka

Zkratky uvedených transportních proteinů a biotransformačních enzymů jsou popisovány velkými písmeny u lidí a malými písmeny vyskytují-li se u potkanů.

Úvod

Cholestáza, nebo-li porucha sekrece žluči do duodena je závažné jaterní onemocnění, které se vyskytuje čím dál častěji napříč celou naší společností. Mnohá cholestatická jaterní onemocnění jsou v prvotních stádiích plně reverzibilní. Naproti tomu, při chronických stavech dochází k poškození funkce a integrity hepatocytů, což vede k irreverzibilním změnám jaterní tkáně a může vyústit až v transplantaci jater [1].

Při cholestáze dochází k mnohým patofyziologickým změnám, jejichž identifikace otevírá nové možnosti nejen v léčbě, ale také v diagnostice a celkovém hodnocení klinického stavu pacienta. Ke klíčovým změnám patří modulace transportních proteinů a jejich funkce, což následně vede k poruše tvorby žluče. Pro detailní pochopení molekulárního mechanismu vzniku cholestázy jsou důležité nejen změny exprese jednotlivých transportérů, ale také změny regulace jednotlivých dílčích mechanismů, podílejících se na tvorbě žluči [2].

Detailní studium a pochopení jednotlivých procesů jaterních cholestatických onemocnění je spojeno s rozvojem hepatologie v České republice. Základy hepatologie jako samostatného oboru byly položeny ve třicátých letech 20. století. Tato doba byla zasvěcená zejména výzkumu metabolických a patologických pochodů v játrech. Velké pokroky začaly po druhé světové válce, přičemž k nejvýznamnějším centřům rozvoje tehdejší doby patřila hlavně nemocniční pracoviště v Praze, Brně, Hradci Králové, Karlových Varech a Olomouci. Velice zásadním krokem bylo založení Hepatologické sekce a později Hepatologické společnosti J. E. Purkyně, která umožnila pravidelné a odborné vzdělávání řady specialistů. Důležitým mezníkem pro rozvoj hepatologie bylo založení Centra kardiovaskulární a transplantační chirurgie v Brně, které se jako první v České republice začalo zabývat transplantací jater. Toto specializované pracoviště funguje již přes 30 let [3a].

Dalším důležitým transplantačním centrem umožňujícím transplantaci jater je v současné době Institut Klinické a Experimentální Medicíny (IKEM) v Praze. V IKEMu probíhá i klinický výzkum související s cholestázou, jako např. úloha žlučových proteinů a jejich význam v patologii cholesterolové cholelithiázy a studium genetických vlivů na rozvoj jaterních onemocnění [3a].

Již od šedesátých let 20. století probíhá ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové detailní výzkum experimentální hepatologie na zvířatech. Předním oborem tohoto pracoviště je studium regenerace jaterní tkáně a možné metody, jak zmírnit progresi

jaterních onemocnění. Probíhá zde studium energetického metabolismu, proliferačních dějů a stavu mikroorganel hepatocytů a možnosti náhrady jater při jejich akutním selhání [3a].

V posledním desetiletí nastal výrazný pokrok v pochopení adaptačních anticholestatických reakcí, což s sebou přineslo nové možnosti v terapii tohoto onemocnění. Současná léčba již není založena jen na empirických podkladech, ale na schopnosti zasáhnout do jednotlivých regulačních mechanismů. Tímto způsobem jsou posíleny adaptační reakce, čímž je zmírněna progresse tohoto onemocnění [1].

Cholestatická jaterní onemocnění vykazují zvyšující se incidenci, která je způsobena jednak polékovým poškozením, zánětlivým onemocněním jaterní tkáně, ale také hormonálními změnami v období klimakteria. Podíl na zvyšující se incidenci cholestázy je také přičítán chronickým cholestatickým onemocněním, především primární biliární cirhóze (PBC) a primární sklerotizující cholangitidě (PSC) [3d].

Z epidemiologického hlediska se cholestáza vyskytuje jak mezi muži, tak mezi ženami. Avšak extrahepatální, těhotenská a lékově navozená cholestáza se častěji vyskytuje u žen. U novorozenců, kojenců a předčasně narozených dětí, může dojít k propuknutí tohoto onemocnění zejména kvůli nevyvinutosti jater. Další rizikovou skupinu představují pacienti dlouhodobě závislí na parenterální výživě či pacienti, kteří prodělali mnoho septických stavů [4].

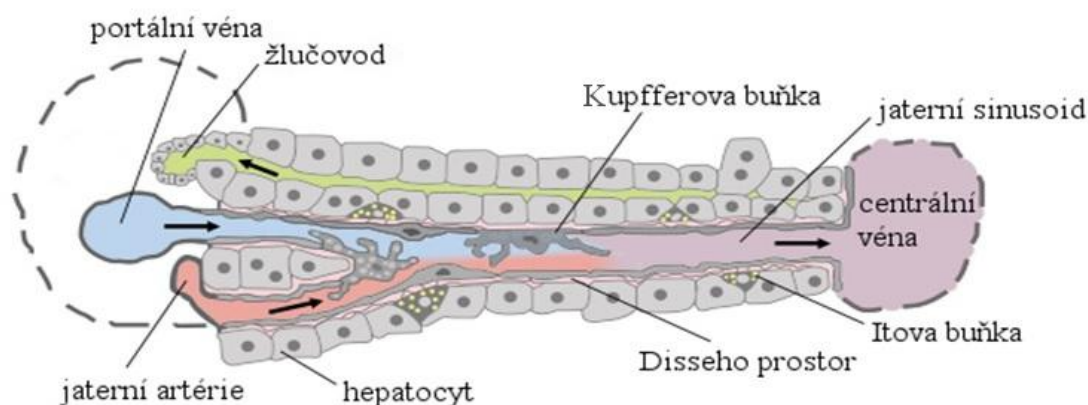
Teoretická část

1. Morfologie a fyziologie jater

Játra jsou životně nezbytným orgánem s vysokou metabolickou aktivitou. S játry je spjata řada mechanismů, které se zásadně podílejí na udržení homeostázy organismu. Hmotnost tohoto orgánu se pohybuje v rozmezí 1400 – 1800 g u mužů a 1200 – 1400 g u žen. Tento orgán se anatomicky rozděluje na čtyři laloky, tj. *lobus dexter*, *lobus sinister*, *lobus caudatus* a *lobus quadratus*. Povrch jater je tvořen tenkou vazivovou vrstvou – capsulla Glissoni (Glissonovo pouzdro), která následně přechází v list peritonea [5a] [6].

1.1 Morfologie jater

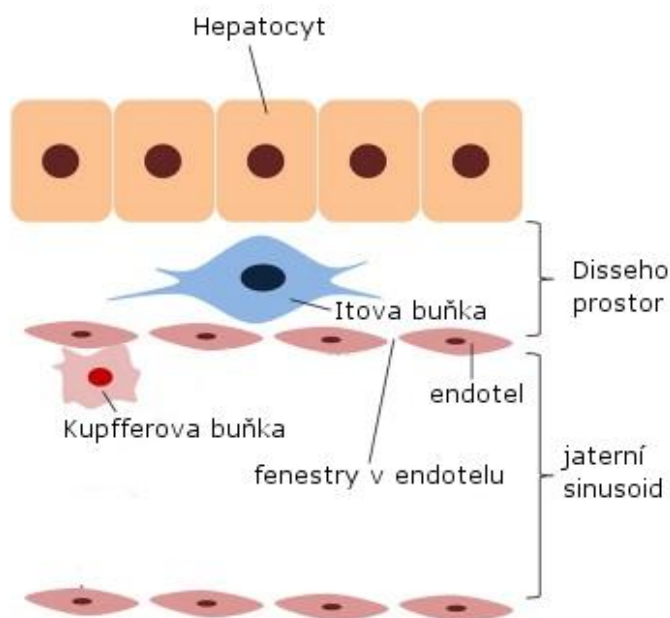
Základní strukturální jednotkou jaterní tkáně je jaterní buňka – hepatocyt. Hepatocyty jsou uspořádány do trámců, které jsou tvořeny dvěma řadami těsně k sobě přiléhajících buněk. Soubory trámců se hvězdicovitě sbíhají k centrální véně. Prostory uvnitř trámců jsou tvořeny intralobulárními žlučovody. V oblastech mezi trámci se vytváří jaterní sinusoidy, které jsou vystlány fenestrovaným endotelem a přes štěrbinovitý Disseho prostor umožňují kontakt hepatocytů s krví. Krev je přiváděna portální vénou a jaterní artérií, přičemž portální vena přivádí do jater krev s vysokým obsahem živin a nízkým obsahem kyslíku, naproti tomu jaterní artérie přivádí jak kyslík, tak živiny v poměrně vysokém množství (Obr. 1) [3b] [5a].



Obr. 1. Schéma strukturálního uspořádání jednotlivých buněk v jaterním parenchymu. Červeně je znázorněna arteriální krev, modře portální krev a fialově smíšená krev. Zeleně je znázorněn tok žluči. Převzato a upraveno z <http://tissupath.com.au/education-medical-student-liver/> (19.9.2012).

V jaterním parenchymu se kromě základní strukturální jednotky – hepatocytů dále nachází Kupfferovy buňky, které jsou součástí mononukleárního fagocytárního systému.

Tyto buňky mají vysokou fagocytární aktivitu a jsou schopny zachytit cizorodé látky. Jedná se o látky spjaté s potenciálním rizikem toxicity. K dalším, avšak neméně důležitým jednotkám, se řadí Itovy buňky, jejichž hlavním úkolem je ukládání lipidů a vitamínu A (obr. 2) [3b] [7].



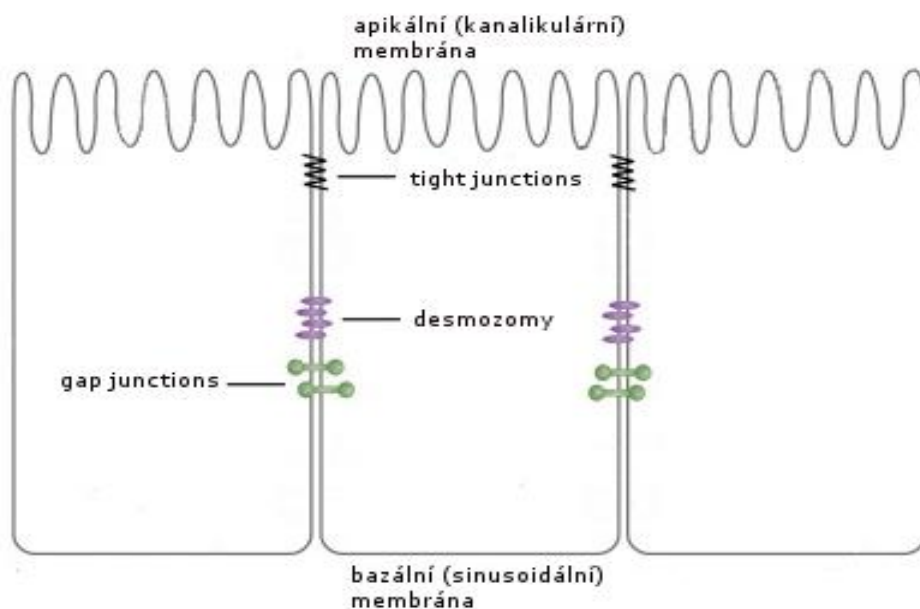
Obr. 2. Schematické zobrazení struktury jaterního sinusoidu. Převzato a upraveno z [8].

1.1.1. Hepatocyty

Hepatocyty tvoří parenchymatickou jaterní tkáň a představují přibližně dvě třetiny celkové buněčné populace v játrech. Tyto buňky jsou charakterizovány přítomností dvou buněčných membrán. Jedná se o sinusoidální (bazolaterální) membránu a kanalikulární (apikální) membránu. Bazolaterální membrána směřuje do štěrbinovitého Disseho prostoru a je charakterizována přítomností mikrokloků, které zvětšují její povrch a usnadňují transport látek mezi krví a hepatocyty [3b] [9]. Transport látek z krve do hepatocytu je uskutečněn mechanismem pasivní difúze (malé nenabitě molekuly) nebo facilitované difúze (s transportním proteinem), která je důležitá zejména pro velké nebo nabitě molekuly. Kanalikulární membrána má signifikantně menší (přibližně 4x) povrch než membrána sinusoidální. Tato membrána vytváří lem žlučového kanálku a transportem látek právě přes tuto membránu se vytváří žluč [5a].

Další velice důležitou strukturou je hematobiliární membrána (obr. 3), která je tvořena „gap-junctions“ (šterbinovité spoje) a „tight-junctions“ (těsné spoje). Šterbinovité spoje slouží k mezibuněčné komunikaci, zatímco těsné spoje umožňují pohyb roztoků,

iontů a vody, čímž zásadně přispívají k tvorbě žluči [5a]. „Tight junctions“ vytváří bariéru mezi krví a žlučí a zabraňují přechodu látek ze žluči zpět do krve. Další významnou strukturou pro tvorbu žluči je perikanalikulární síť aktin – myosin, která díky kontrakcím usnadňuje tok žluči z pericentrálního do periportálního regionu [7].



Obr. 3. Schematické zobrazení hematobiliární bariéry hepatocytu. Desmozomy spojují dvě sousední membrány a zajišťují tak jejich integritu. Převzato a upraveno z [10].

1.2. Fyziologie jater

Játra jsou orgánem, v němž je lokalizována řada životně důležitých procesů. Jedná se o metabolismus sacharidů, lipidů a proteinů, tvorbu a sekreci žluči, imunitní funkci, eliminaci xenobiotik, zásobní funkci a další [3b] [5a] [6].

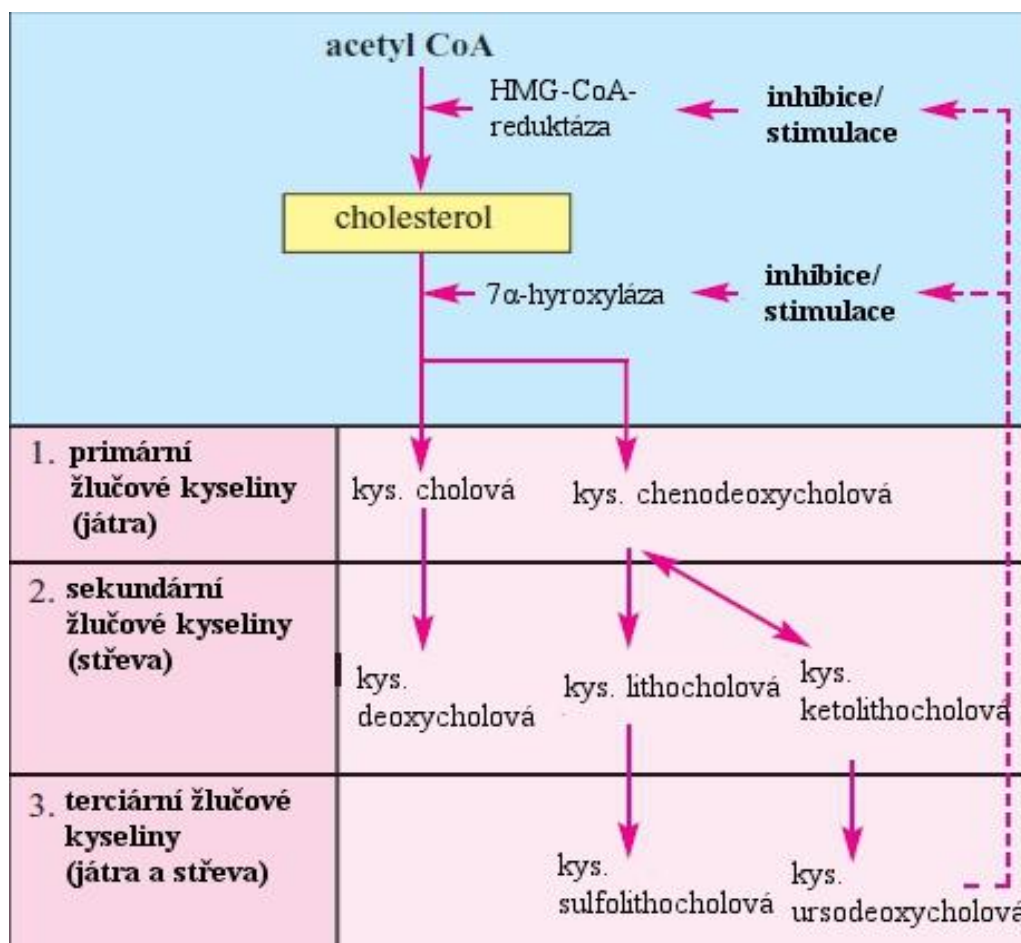
1.2.1. Tvorba a sekrece žluči

Žluč je izoosmotická tekutina hrající nezastupitelnou roli ve fyziologii trávení. Je vylučována hepatocyty do žlučových kanálků a následně je modifikována jak v intrahepatálních, tak extrahepatálních cestách. Po příslušných úpravách dochází k jejímu skladování a zahušťování ve žlučníku, odkud je vylučována do duodena [3c].

Mezi hlavní komponenty žluči patří žlučové kyseliny, cholesterol, fosfolipidy, bilirubin a elektrolyty [3c]. Důležitou roli mají žlučové kyseliny, které jsou syntetizovány z cholesterolu, za vzniku primárních žlučových kyselin [3c] [5b] [11b]. Konkrétně se jedná o kyselinu cholovou a chenodeoxycholovou, které vznikají za účasti enzymu cholesterol-7 α -hydroxylázy. Syntetizované kyseliny jsou konjugovány s glycinem nebo taurinem, čímž

se zvýší jejich rozpustnost ve vodě [5b] [11b].

Tyto kyseliny jsou transportovány do duodena, kde probíhají reakce dehydroxylační, za vzniku kyseliny deoxycholové a lithocholové a reakce dehydrogenační, za vzniku kyseliny ketolithocholové (jedná se o tzv. sekundární žlučové kyseliny). Lithocholová kyselina podléhá přeměně (v játrech) na sulfolithocholovou kyselinu a ketolithocholová kyselina se metabolizuje na kyselinu ursodeoxycholovou (v játrech i ve střevě) [5b]. Více než 95 % žlučových kyselin je zpětně reabsorbováno z terminálního ilea do jater [12].



Obr. 4. Schéma metabolismu žlučových kyselin. Přerušovaně je znázorněna zpětnovazebná regulace syntézy žlučových kyselin, přičemž při nadbytku kyseliny ursodeoxycholové dochází k inhibici jak 7α-hydroxylázy, tak HMG-CoA reduktázy a celkově tedy inhibici syntézy žlučových kyselin. Převzato a upraveno z [5b].

1.2.2. Metabolismus sacharidů, proteinů a lipidů

Játra zastávají velice důležitou funkci v řízení metabolismu živin. V případě metabolismu sacharidů se jedná o glukostatickou funkci, tj. udržení hladiny glukózy ve fyziologických mezích [3b]. Při zvýšené hladině glukózy v krvi dochází k jejímu zvýšenému vychytávání z krve a dále je podpořena syntéza glykogenu. Na druhé straně může nastat stav, kdy hladina glukózy klesne pod fyziologickou mez a dochází ke

stimulaci glykogenolýzy a glukoneogeneze [11a].

V případě metabolismu proteinů se jedná o jednotlivé procesy, díky kterým jsou játra schopna syntetizovat prakticky všechny neesenciální aminokyseliny a zároveň degradovat většinu esenciálních aminokyselin (valin, leucin a izoleucin nepodléhají katabolickým procesům v játrech a slouží jako zdroj energie v kosterní svalovině) [11c]. Degradace aminokyselin v játrech probíhá dvěma základními reakcemi – transaminace a oxidační deaminace [11c]. Na druhé straně jsou v játrech syntetizovány proteiny, zejména důležitá je tvorba téměř všech plazmatických proteinů (kromě von Willebrandova faktoru a imunoglobulinů) [3c].

V jaterním metabolismu lipidů se uplatňují procesy, mezi něž patří β -oxidace mastných kyselin, syntéza ketolátek, syntéza lipoproteinů, lipogeneze a syntéza a odbourávání cholesterolu. β -oxidace mastných kyselin je proces, který je zdrojem molekul acetyl-CoA, jež následně vstupuje do citrátového cyklu a je zdrojem energie v podobě ATP [3c] [11b]. Dalším významným mechanismem probíhajícím v játrech je syntéza lipoproteinů. V neposlední řadě dochází v játrech k tvorbě triglyceridů, které jsou syntetizovány z mastných kyselin a glycerolu. Triglyceridy slouží především jako zásobárna energie, dále plní např. funkci termoregulační a ochrannou [11c].

1.2.3. Imunitní funkce jater

Játry prochází řada látek jak exogenní tak endogenní povahy. Na jedné straně se může jednat o látky patogenní a tedy pro organismus nebezpečné a na druhé straně lze hovořit o látkách pro tělo potřebných, např. vitamíny rozpustné v tucích [3c] [6].

Endotelové buňky jaterních sinusoidů mohou za určitých okolností fungovat jako buňky prezentující antigen a podílet se tak na specifické imunitní odpovědi na daný patogen. Na druhé straně důležitou úlohu hrají Kupfferovy buňky, které jednak vykazují vysokou fagocytární aktivitu, což zodpovídá za nespecifickou imunitu, ale také jsou schopny buď podpořit nebo utlumit aktivaci T-lymfocytů, které jsou spjaty se specifickou imunitní odpovědí [3c] [6].

1.2.4. Zásobní funkce jater

Játra jsou zásobárnou mnoha pro organismus nezbytných látek jako je např. vitamín A, D a B12. Dále jsou rezervoárem mědi, která je součástí enzymů, např. cytochrom-c-oxidázy. Dále je zde také přítomné železo, které je uskladněno ve formě feritinu a hemosiderinu, přičemž množství sérových hladin feritinu odpovídá celkovým

mobilizovatelným zásobám železa v těle. Hemosiderin je vytvářen z feritinu a umožňuje vazbu přebytečného železa v organismu [3c] [5b].

1.2.5. Eliminační funkce jater

Játra jsou velice důležitým orgánem, který eliminuje z organismu potencionálně toxické látky endogenní (např. žlučové kyseliny) či exogenní povahy (např. xenobiotika jako je alkohol, léčiva, bakteriální toxiny a další) [5b]. Jedná se zejména o látky lipofilní povahy, které se špatně rozpouštějí ve vodném prostředí a nemohou být tedy vyloučeny žlučí nebo močí [3c] [5b]. Z tohoto důvodu podléhají biotransformaci, kdy dojde k jejich přeměně na polární hydrofilní produkty, které jsou následně z organismu eliminovány[3c].

Biotransformace zahrnuje dvě základní fáze. V první fázi probíhají reakce typu oxidace (nejčastěji), redukce a někdy hydrolýza, díky nimž se vytváří polárnější produkty. Během těchto reakcí dochází k zpřístupnění nebo zavedení funkčních skupin (-OH, -NH₂, -SH, -COOH) do molekuly biotransformované látky. Velká část zmíněných reakcí probíhá za účasti enzymového systému cytochrom P-450 [3c].

Druhá fáze je podstatně rychlejší než fáze první, přičemž dochází ke konjugaci produktů z první fáze s látkami endogenního původu, např. kyselinou glukuronovou, glutaminem, glycinem, serinem, kyselinou sírovou, kyselinou octovou nebo kyselinou merkapturovou. Tyto reakce jsou katalyzovány pomocí různých enzymatických systémů, nejčastěji se jedná o transferázy. Mezi nejvýznamnější enzymy patří UDP-glukuronosyltransferáza, dále sulfotransferáza, N-acetyltransferáza, methyltransferáza a další [3c] [5b].

2. Transportní systémy v játrech

Játra jsou důležitým orgánem, který sehraává nezastupitelnou roli v exkreci endogenních a exogenních látek. Lipofilní látky jsou transportovány prostou nebo facilitovanou difúzí. Transport látek polárních a také některých lipofilních je umožněn pomocí specifických transportních proteinů, které jsou zakotveny v sinusoidální a kanalikulární membráně [13] [14]. Tyto proteiny se řadí buď do nadrodiny SLC („solute carrier“) nebo se jedná o nadrodinu ABC („ATP-binding cassette“). Transportéry z SLC nadrodiny jsou lokalizovány na bazolaterální membráně a jedná se o jednosměrné či obousměrné transportní systémy, které umožňují přenos látek z krve do cytosolu hepatocytu [13] [14]. Naproti tomu transportéry z ABC nadrodiny jsou lokalizovány jak na kanalikulární membráně, kdy zajišťují transport látek do žluči, tak na bazolaterální membráně, kde umožňují transport látek z cytosolu hepatocytu do sinusoidální krve [13] [14].

2.1. Bazolaterální transportní proteiny

Transportní proteiny lokalizované na bazolaterální membráně umožňují transport látek z krve do hepatocytu. Podle jednotlivých substrátů se transportéry člení do příslušných skupin [14].

2.1.1. NTCP (SLC10A1)

NTCP („Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide“) je transportní protein, který umožňuje transport konjugovaných a částečně i nekonjugovaných žlučových kyselin. Přenos žlučových kyselin je závislý na kotransportu taurocholátu se sodnými ionty ve stechiometrickém poměru 1:2. Mezi další substráty tohoto transportního proteinu patří např. trijodtyronin, tyroxin a estron-3-sulfát [13].

2.1.2. OATP (SLCO)

OATP („Organic anion transporting polypeptides“) je skupinou proteinů, která zastupuje důležitou roli při transportu mnoha léčiv. Substráty těchto proteinů jsou nejčastěji látky povahy organických aniontů, nicméně umožňují také přenos kationtů II. typu, např. chinidinu. Tyto transportéry jsou nezávislé na koncentraci sodných kationtů a umožňují obousměrný přenos látek přes sinusoidální membránu. Transportní mechanismus je založen na antiportu bikarbonátu, glutathionu a/nebo

glutation-S-konjugátu (tyto substráty jsou vylučovány do krve) a organických látek, které jsou vychytávány z krve do hepatocytů [13] [15]. Mezi nejvýznamnější transportéry této rodiny patří OATP1A2 (SLCO1A2), OATP1B1 (SLCO1B1), OATP1B3 (SLCO1B3) a OATP2B1 (SLCO2B1). Nejdůležitější roli zastupuje protein OATP1B1, který se podílí na přenosu řady léčiv (např. rifampin, pravastatin, atorvastatin, valsartan a další) do hepatocytu a dále je hlavním proteinem, účastnícím se na vychytávání žlučových kyselin z krve [14] [15].

2.1.3. OAT (SLC22A)

Rodina OAT („Organic anion transporters“) zahrnuje transportní proteiny, které umožňují přenos endogenních či exogenních organických aniontů oběma směry. Mezi jejich substráty patří např. prostaglandiny, salicyláty, tetracyklín nebo řada nesteroidních antiflogistik [16]. Nejdůležitějším transportérem v játrech je OAT2 (SLC22A7). Mezi další zástupce, které jsou exprimovány v játrech patří OAT4 (SLC22A11) a OAT5 (SLC22A10) [13].

2.1.4. OCT (SLC22A)

OCT („Organic cation transporters“) zastupují skupinu transportních proteinů, díky které je umožněn obousměrný přenos menších organických kationtů. Hlavním zástupcem této skupiny je OCT1 (SLC22A1). Mezi substráty tohoto proteinu patří např. acetylcholin, progesteron, chinidin, verapamil, acyklovir a další [14]. V neposlední řadě se k této rodině proteinů řadí OCT2 (SLC22A2), který je na rozdíl od OCT1 a OCT3 dominantně exprimován v ledvinách. K dalším významným členům této skupiny se řadí OCT3 (SLC22A3) [13] [17].

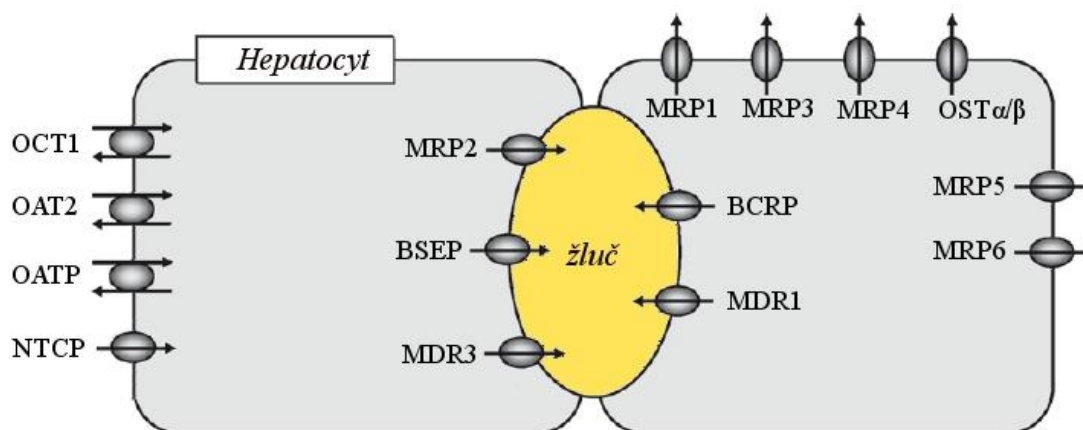
2.1.5. MRP (ABCC)

MRP („Multidrug resistance-associated protein“) jsou rodinou proteinů, která se řadí k nadrodině ABC („ATP-binding cassette“) transportérů. V současné době je prozkoumáno a identifikováno 9 transportních proteinů, tj. MRP1–9. Tyto transportní systémy zajišťují jednosměrný transport látek z hepatocytu do sinusoidální krve. Výjimku tvoří MRP2, který je lokalizován na kanalikulární membráně a zastupuje důležitou roli v exkreci řady substrátů do žluči [14]. MRP1 (ABCC1) je převážně skladován v nitrobuněčných vezikulech a v játrech je exprimován v poměrně malé míře. Všechny substráty tohoto proteinu jsou konjugovány s glutationem [13]. MRP3 (ABCC3) je

transportním proteinem, který umožňuje transport žlučových kyselin, methotrexátu a dalších substrátů. Za fyziologických podmínek je jeho exprese poměrně nízká, nicméně při vrozených defektech v biliární exkreci či cholestáze, dochází ke zvýšení exprese tohoto proteinu [13]. MRP4 (ABCC4) a MRP5 (ABCC5) jsou proteiny, které zajišťují přenos cyklických sloučenin cAMP („cyklický adenosinmonofosfát“) a cGMP (cyklický guanosinmonofosfát). MRP4 (ABCC4) vykazuje zvýšenou expresi při zároveň snížené expresi BSEP (lokalizován na kanalikulární membráně) transportéru. Tímto mechanismem dochází ke zvýšenému vylučování žlučových kyselin do sinusoidální krve [13]. MRP6 (ABCC6) je lokalizován jak na sinusoidální, tak kanalikulární membráně a to v poměrně vysoké míře, nicméně jeho hlavní funkce stále není plně objasněna. MRP7 (ABCC10) je distribuován do řady tkání, např. pankreatu, prodloužené míchy, plic nebo trakčníku. Pomocí MRP7 (ABCC10) je umožněn transport některých leukotrienů a metabolitů estradiolu. MRP8 (ABCC11) je lokalizován v játrech, ledvinách, ovariích či mozku a zajišťuje přenos cyklických nukleotidů, jeho funkce je tedy podobná s MRP5 (ABCC5), nicméně v játrech vykazuje podstatně nižší výskyt [13] [18]. MRP9 (ABCC12) je zatím nejméně prozkoumaným transportérem z této rodiny. Je lokalizován v mozku, kosterní svalovině a ovariích [18].

2.1.6. OST α/β (SLC51)

OST α/β („Organic solute transporter α/β “) je transportér, který je exprimován jednak v játrech, ale také v terminálním ileu. V játrech zajišťuje alternativní cestu vylučování žlučových kyselin a dalších organických aniontů do krve. V terminálním ileu spolupracuje s ASBT („Apical sodium-dependent bile salt transporter“) a umožňuje tak enterohepatální cirkulaci žlučových kyselin [19].



Obr. 5. Lokalizace transportních proteinů v hepatocytu. Převzato a upraveno z [2].

2.2. Kanalikulární transportní proteiny

Kanalikulární (apikální) transportní proteiny umožňují transport xenobiotik, metabolitů a produktů endogenního metabolismu do žluči. Jedná se o jednosměrné proteiny z ABC („ATP-binding cassette“) nadrodiny [14].

2.2.1. BSEP (ABCB11)

BSEP („Bile salt export pump“) je transportním proteinem, který zajišťuje transport konjugovaných a nekonjugovaných žlučových kyselin z hepatocytu do žluči. Mezi další substráty tohoto proteinu patří např. pravastatin a vinblastin [14]. Mutace jeho genu byla prokázána u pacientů s progresivní familiární intrahepatální cholestázou typu 2 (PFIC2), při které je zvýšená koncentrace žlučových kyselin v krvi a zároveň snížená koncentrace žlučových kyselin ve žluči. Některá léčiva např. glibenklamid a troglitazon se vážou přímo na tento protein a způsobují inhibici jeho exprese a funkce. Po podání těchto léčiv vzniká lékově navozená cholestáza [20].

2.2.2. MRP2 (ABCC2)

MRP2 („Multidrug resistance-associated protein“) zajišťuje transport řady organických aniontů přes kanalikulární membránu do žluče. Mezi substráty tohoto proteinu patří žlučové kyseliny, glutathion, glukuronidovaný bilirubin nebo léčiva, např. anthracyklíny, methotrexát, cisplatin a další [21]. Mutace v genu MRP2 proteinu má za následek deficit transportéru na kanalikulární membráně hepatocytu a vede k rozvoji Dubin-Johnsonova syndromu, který se projevuje konjugovanou hyperbilirubinémií [22]. U pacientů trpících tímto geneticky podmíněným onemocněním je zvýšená exprese MRP3 proteinu, který umožňuje kompenzaci nedostatečné biliární exkrece organických aniontů [13].

2.2.3. MDR1 (ABCB1)

MDR1 („Multidrug resistance protein 1“) nebo-li P-glykoprotein zastupuje transportní systém, který plní funkci jednak ochrannou (hematoencefalická bariéra, placenta, testikulární bariéra), ale také exkreční (hepatocyty, enterocyty, buňky proximálních tubulů ledvin) [14]. Tento transportér umožňuje přenos široké řady substrátů, přičemž se nejčastěji jedná o hydrofobní kationty jako např. digoxin, fexofenadin, chinidin a v neposlední řadě také mnoho zástupců ze skupiny chemoterapeutik (daunorubicin, doxorubicin, paklitaxel a další). Zvýšená exprese tohoto proteinu je jedním z mechanismů,

které vedou k rezistenci rakovinotvorných buněk vůči výše zmíněným chemoterapeutikům [13].

2.2.4. MDR3 (ABCC4)

Mezi hlavní funkce MDR3 („Multidrug resistance protein 3“) transportéru se řadí zejména schopnost transportovat fosfolipidy (např. fosfatidylcholin) do žluči. Díky přítomnosti fosfolipidů ve žluči je umožněna tvorba micel a následně emulgace tuků v duodenu. Mutace tohoto genu byla pozorována u pacientů s progresivní familiární intrahepatální cholestázou typu 3 (PFIC-3) [23].

2.2.5. BCRP (ABCG2)

BCRP („Breast cancer resistance protein“) byl poprvé objeven v nádorových buňkách, ve kterých zajišťuje rezistenci vůči řadě cytostatik jako např. anthracyklíny (doxorubicin, daunorubicin), mitoxantron a kamptotecin. Tento transportér je široce distribuován v orgánech, které sehrávají velice důležitou roli ve farmakokinetice cytostatik. Jedná se o tenké střevo, placentu, hematoencefalickou bariéru a kanalikulární membránu v hepatocytech [24]. Mezi další funkce tohoto proteinu patří biliární exkrece sulfatovaných konjugátů steroidů a xenobiotik jako např. rosuvastatin, cimetidine, methotrexát a další [14] [25].

3. Cholestáza

Cholestáza je porucha tvorby a vylučování žluče do duodena. Příčina může být lokalizována od úrovně hepatocytu až po Vaterovu papilu. V případě, že je porucha lokalizována v játrech, jedná se o intrahepatální cholestázu. V druhém případě, kdy je porucha lokalizována mimo játra, jedná se o cholestázu extrahepatální. Toto onemocnění vede ke hromadění jednotlivých složek žluči v játrech a následně dochází k jejich kumulaci v krevní plazmě [3d].

Z klinického hlediska se cholestázy rozdělují do čtyř skupin:

- nezánětlivé cholestázy – hlavními příčinami jsou hormony, léky, sepse, intrahepatální cholestáza těhotných, dědičné poruchy sekrece žluči
- zánětlivé cholestázy – zejména cholestatické virové hepatitidy, alkoholická cholestáza
- cholestázy při poškození žlučvodů – primární biliární cirhóza (PBC), primární sklerózující cholangitida (PSC), syndrom mizejících žlučvodů
- mechanické cholestázy – příčinami jsou tumory, konkrementy, striktury a extraluminální komprese

Na vzniku akutní cholestázy se velmi často podílejí septické stavy, léčiva a hormony. Naproti tomu, chronická cholestáza je spjata s primární biliární cirhózou (PBC), primární sklerotizující cholangitidou (PSC) a léčivy. V četnosti cholestáz převažují extrahepatální cholestázy [1] [3d] [5c].

3.1. Klinický obraz cholestázy

Z klinického hlediska je cholestáza spjata s různými stupni žloutenky, která je spojena se zvýšenou sérovou hladinou konjugovaného bilirubinu. Dalším často se vyskytujícím příznakem je pruritus, jehož přítomnost se může objevit již v raných stádiích cholestázy [5c] [26] [27]. Mechanismus vzniku pruritu byl v minulosti přičítán zejména zvýšené koncentraci žlučových kyselin v krevní plazmě, nicméně podle nejnovějších poznatků se za potencionální příčinu cholestatického pruritu označuje enzym autotaxin, který uvolňuje kyselinu lysofosfatidovou [28]. U chronických cholestáz se vyskytují xantheasmata, jejichž příčinou vzniku je dlouhodobě zvýšená sérová hladina cholesterolu.

Nejčastěji se jedná o xanthelasma palpebrarum, což jsou červenohnědá až žlutá, ostře ohraničená depozita cholesterolu, vyskytující se na očních víčkách. Dále se při cholestatických onemocněních vyskytuje acholická stolice se steatoreou [5c].

3.2. Laboratorní hodnoty cholestázy

Při cholestáze jsou zvýšené sérové hladiny ALP („alkalická fosfatáza“), GMT („ γ -glutamyltransferáza“), 5'-nukleotidázy, konjugovaného bilirubinu, žlučových kyselin a cholesterolu. Při zvýšené koncentraci žlučových kyselin v krevní plazmě dochází k poškození buněčných membrán a zároveň k inhibici tvorby a sekrece žlučových kyselin do duodena [3d] [26]. Při poškození hepatocytů dochází ke vzrůstu sérových hladin transamináz ALT a AST [29].

3.3. Extrahepatální cholestáza

Extrahepatální (obstrukční) cholestáza je nejčastěji způsobena tumory, konkrementy, strikturami a/nebo extraluminální kompresí [3d].

V případě tumorů se nejčastěji jedná o extrahepatální cholangiokarcinom (ECC). ECC je spjat s mutací novotvorby buněk žlučového epitelu a papil, které směřují do žlučovodu. Z patofyziologického hlediska dochází ke zvýšení exprese cyklin-dependentního inhibitoru p21 a protoonkogenu cyklin D1. ECC může být lokalizován v ductus cysticus, ductus hepaticus communis nebo v ductus choledochus [30].

Při tvorbě konkrementů, navozujících extrahepatální cholestázu se nejčastěji jedná o cholelithiázu. Tvorba žlučových kamenů je založena na patologických změnách metabolismu cholesterolu, žlučových kyselin a bilirubinu, přičemž vzniká nepoměr mezi koncentracemi těchto složek. S tímto onemocněním se setkáváme buď přímo ve žlučníku nebo v extrahepatálních žlučových cestách, tj. ductus hepaticus communis, ductus cysticus a ductus choledochus [31].

Striktury či extraluminální komprese jsou nejčastěji spojeny s pankreatitidou. Toto onemocnění je způsobeno převážně nadměrnou konzumací alkoholu nebo tvorbou žlučových kamenů v ductus choledochus [32].

3.4. Intrahepatální cholestáza

K nejčastějším příčinám intrahepatální cholestázy patří primární biliární cirhóza (PBC), primární sklerotizující cholangitida (PSC), septické stavy, léčiva, alkohol a dále např. cholestáza v těhotenství [3d] [5c].

PBC je autoimunitní progresivní onemocnění, které je spjato s postupným poškozením žlučových cest a může vést až k jaternímu selhání. Patofyziologie tohoto onemocnění je založena na nestandardní imunitní reakci, přičemž spouštěcím faktorem mohou být vlivy prostředí nebo infekce u geneticky predisponovaných pacientů. Typickým laboratorním ukazatelem je přítomnost antimitochondriálních protilátek. Jedná se zejména o anti-M2 protilátku, která se váže na enzymový komplex pyruvátdehydrogenázy [33].

PSC je chronické cholestatické jaterní onemocnění, charakterizované zánětem a obliterující fibrózou intrahepatálních, ale také extrahepatálních cest. Patofyziologie tohoto onemocnění je založena na autoimunitní reakci, toxicitě žlučových kyselin a genetických predispozicích [34]. Toto onemocnění je velice často doprovázeno ulcerózní kolitidou nebo Crohnovou chorobou. K nejčastějším komplikacím se řadí kolorektální karcinom a cholangiokarcinom [35].

Cholestáza při sepsi je nejčastěji způsobena účinky G- bakterií na imunitní systém. Aktivní substancí navozující příslušné imunitní reakce je lipopolysacharid, který je součástí buněčné stěny bakterií [36]. Lipopolysacharid navozuje zvýšenou produkci prozánětlivých cytokinů jako např. TNF- α („Tumor necrosis factor α “), IL-1 β (interleukin 1 β) a IL-6 (interleukin 6) a dále oxidu dusnatého, jehož koncentrace jsou zvýšeny mechanismem indukce NO-syntházy v hepatocytech a Kupfferových buňkách [27].

Lékově navozená cholestáza se nezdívka vyskytuje společně s jaterním poškozením. Léčiva, která se vylučují přímo do žluče, jsou potenciálními kandidáty na vznik cholestázy. Patofyziologie tohoto typu cholestázy je založena na toxickém působení buď přímo léčiv samotných nebo jejich metabolitů. Při akutní lékově navozené cholestáze většinou příznaky vymizí s vysazením léčiva, naproti tomu u chronického průběhu – toxické účinky přetrvávají i po ukončení terapie. Toto onemocnění může být způsobeno řadou léčiv, např. cyklosporin A, glibenklamid, pioglitazon, troglitazon, tiklopidin a další [26] [37].

Alkoholem navozená cholestáza je spojena s alkoholickou hepatitidou, která je z klinického hlediska charakterizována žloutenkou a progresivním zánětlivým jaterním onemocněním. Patofyziologie tohoto onemocnění je založena jednak na toxickém účinku alkoholu na jaterní tkáň, ale také na aktivaci imunitního systému. Alkohol je metabolizován střevní mikroflórou, přičemž díky jeho metabolitům je zvýšena permeabilita těsných spojů („tight-junctions“). Následně je umožněna prezentace jednotlivých bakteriálních komponent imunitnímu systému. Důležitou roli sehrává lipopolysacharid, jehož účinkem dochází k produkci prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1

a IL-6 [38].

Estrogeny jsou spjaty s intrahepatální cholestázou navozenou jednak během těhotenství, ale také po užívání perorálních kontraceptiv [26]. Těhotenská cholestáza začíná ve druhém či třetím trimestru těhotenství a končí přibližně 2 až 3 týdny po porodu. Patofyziologie tohoto onemocnění je založena na účinku progesteronu a metabolitu ethinylestradiolu, tj. estradiol-17 β -D-glukuronidu na transportní proteiny [26] [39].

3.5. Terapie cholestázy

Cílem terapie cholestázy je minimalizovat následky spojené se zvýšenou koncentrací jednotlivých složek žluče v systémové cirkulaci a v hepatocytech. Zvýšená koncentrace žlučových kyselin indukují apoptózu a nekrózu hepatocytů, čímž jsou navozena chronická onemocnění jater. V některých případech může docházet k úniku žlučových kyselin do peribiliárních prostorů s následným vznikem zánětu a fibrotizace [1].

K hlavním cílům farmakoterapie cholestázy se řadí:

- stimulace sekrece jednotlivých složek žluči do systémové cirkulace s následnou exkrecí ledvinami – zde se uplatňuje především kyselina ursodeoxycholová
- stimulace metabolismu hydrofobních komponent žluči na více hydrofilní, tj. méně toxické – důležitou roli sehrává rifampicin
- ochrana cholangiocytů před toxickým působením žluče – uplatňuje se kyselina ursodeoxycholová
- inhibice apoptózy – kyselina ursodeoxycholová
- inhibice fibrózy – kys. 6 α -ethyl chenodeoxycholová [1]

3.5.1. Kyselina ursodeoxycholová (UDCA)

Podávání UDCA je v podstatě jedinou účinnou léčbou, která byla potvrzena v řadě klinických studiích a zároveň nevykazuje závažnější vedlejší účinky při dlouhodobé aplikaci [1]. V současné době se UDCA používá k léčbě různých cholestatických onemocněních, zejména se jedná o primární biliární cirhózu (PBC), primární sklerotizující cholangitidu (PSC) a intrahepatální cholestázu v těhotenství [40].

Mechanismus účinku UDCA spočívá ve zvýšení exprese jaterních transportérů BSEP, MDR3 a MRP2, lokalizovaných na kanalikulární membráně [1]. UDCA je relativně hydrofilní žlučová kyselina, čímž zvyšuje podíl hydrofilních žlučových kyselin v žluči a následně vede ke snížení toxického účinku na epitel žlučových cest. Dále dochází

k poklesu kumulace žlučových kyselin a v neposlední řadě je inhibována apoptóza hepatocytů [1] [40].

U některých pacientů je léčba pomocí UDCA nedostatečná a je nutné přistoupit k adjuvantní terapii. V těchto případech se UDCA kombinuje s glukokortikoidy, zejména s budesonidem [30] [41].

3.5.2. Rifampicin

Rifampicin je rifamycinové antibiotikum, které je agonistou PXR („Pregnane X receptor“), díky čemuž dochází k indukci CYP3A4 a inhibici CYP7A1, který je jedním z klíčových enzymů při syntéze žlučových kyselin. Indukcí CYP3A4 je urychlena hydroxylace hydrofobních žlučových kyselin, čímž dochází ke snížení jejich toxicity. Dále je navozena zvýšená exprese MRP2 [3d] [42].

Dlouhodobá léčba rifampicinem vykazuje riziko hepatotoxicity, případně lékově navozené hepatitidy. Proto je nutné pacienty pečlivě vybírat a pravidelně monitorovat. Rifampicin je velice často používán při terapii pruritu, který je přítomen u řady cholestatických onemocnění [1] [43].

3.5.3. S-adenosyl-L-methionin (SAME)

SAME je léčivem, které bylo zkoušeno u intrahepatální cholestázy v těhotenství, ale také u PBC, cholestáz provázejících akutní hepatitidy nebo u jaterních cirhóz. Hlavní terapeutický efekt je založen na antioxidačních účincích a zlepšení membránové fluidity. Nicméně v současné době chybí další důkazy o významném terapeutickém efektu [3d].

3.5.4. Fenobarbital

Fenobarbital je silným agonistou CAR („Constitutive androstane receptor“) nukleárního receptoru, který ovlivňuje jadernou transkripci. Toto léčivo bylo testováno u pacientů s PBC a vedlo jednak ke snížení sérových hladin bilirubinu a žlučových kyselin, ale také k útlumu pruritu. Při dlouhodobém podávání fenobarbitalu se ovšem objevují významné nežádoucí účinky v podobě sedace a tvorby neaktivních metabolitů vitamínu D [3d].

3.5.5. Terapie pruritu

V terapii pruritu se velice často uplatňují sekvestranty, zejména cholestyramin. Toto léčivo váže ve střevě žlučové kyseliny a zabraňuje jejich vstřebávání. U pruritů

rezistentních na léčbu sekvestranty se užívá rifampicin. V některých případech se v léčbě uplatňují antagonisté opiátových receptorů, nejčastěji naloxon, nalmefen a naltrexon. V neposlední řadě se využívá antipruginózního účinku některých antidepresiv, jako např. sertralinu [3d].

4. Jaterní transportní systémy a cholestáza

Při cholestáze dochází k změnám exprese nebo funkce jednotlivých transportních proteinů. Tyto změny mohou být buď primárně vrozené nebo sekundárně získané. U primárně vrozených změn je příčinou cholestázy mutace genu, který kóduje expresi příslušného transportéru. V těchto případech se nejčastěji jedná o různé typy progresivní familiární intrahepatální cholestázy (PFIC), benigní rekurentní intrahepatální cholestázy (BRIC) nebo cystické fibrózy. Tyto onemocnění se vyskytují poměrně zřídka a nejčastěji se manifestují v dětství a jsou charakteristická závažným průběhem [3d] [19].

Naproti tomu sekundárně získané změny exprese nebo funkce transportérů jsou ve většině navozeny až jako následek cholestázy, která je spojena např. s PBC, PSC, ECC, cholelithiázou a další. V některých případech mohou látky s cholestatickým efektem primárně inhibovat expresi nebo funkci daných transportérů, díky čemuž je navozena cholestáza. Mezi látky s cholestatickým efektem patří např. cyklosporin A, rifamycin, glibenklamid a další [19].

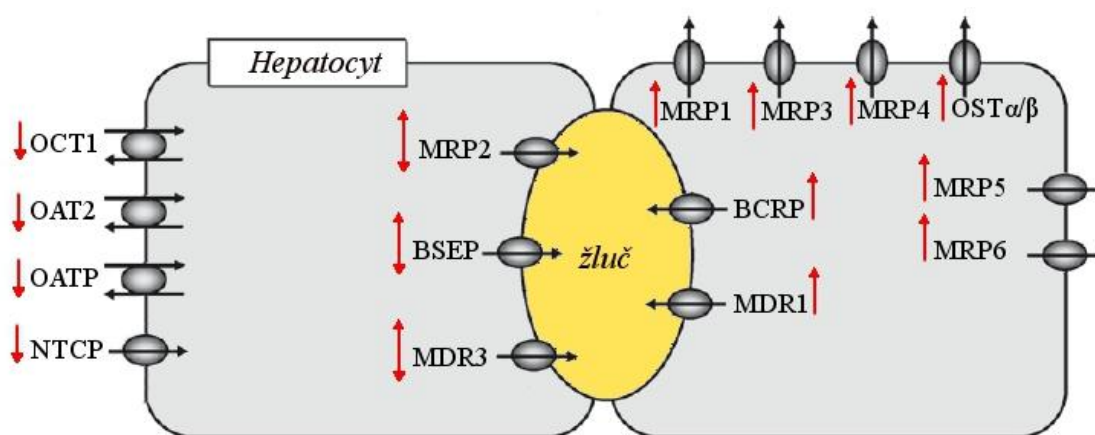
4.1. Adaptivní odpověď transportních proteinů při cholestáze

Adaptační změny při cholestáze zajišťují ochranu hepatocytů před toxickým působením jednotlivých složek žluči, zejména žlučových kyselin a bilirubinu. K těmto změnám se řadí jednak změny exprese transportérů v hepatocytech, ale také indukce/inhibice enzymů, podílejících se na metabolismu žlučových kyselin [19] [44].

Při cholestáze dochází k inhibici zejména CYP7A1 a CYP8B1 (isofomy cytochromu P 450), které katalyzují syntézu žlučových kyselin. Dále dochází k indukci enzymů, podílejících se na biotransformaci žlučových kyselin. K enzymům fáze I biotransformace patří CYP3A4 a CYP2B6. Mezi enzymy fáze II biotransformace patří UGT2B4 (UDP-glukuronosyltransferáza 2B4) a SULT2A1 (SULT je sulfotransferáza 2A1). Díky indukci těchto enzymů je snížena toxicita a zároveň urychlena exkrece žlučových kyselin [2] [44].

Další anticholestaticky působící reakcí je změna exprese transportérů na bazolaterální a kanalikulární membráně. Snížená exprese bazolaterálních transportérů NTCP a OATP se vyskytuje u cholestáz extrahepatálních a cholestáz při septických stavech [2] [26]. U cholestáz spojených s expozicí prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α byla prokázána snížená exprese OAT2 a OCT1 [45]. V pozdních stádiích PBC dochází

k indukci transportérů MRP1, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6 a OST α/β , které zajišťují transport žlučových kyselin a bilirubinu do systémové cirkulace a jejich následnou exkreci ledvinami. U pacientů s PBC dochází ke zvýšené expresi BCRP a MDR1 proteinu. Naproti tomu nebyly u těchto pacientů pozorovány žádné změny v expresi BSEP, MRP2 a MDR3 proteinů [44] [46] [47]. Exprese BSEP a MRP2 je u většiny cholestatických onemocnění zachována, ale v některých případech, zejména u cholestázy při septických stavech a lékově navozené cholestázy může být jejich exprese snížena [2].



Obr. 6. Změna exprese transportérů při cholestáze. Převzato a upraveno z [2].

Významnou úlohu v adaptivní regulaci cholestázy mají nukleární receptory. Zejména se jedná o FXR („Farnesoid X receptor“), PXR („Pregnane X receptor“) a CAR („Constitutive androstane receptor“). Aktivací FXR receptoru žlučovými kyselinami dochází k indukci exprese BSEP, MDR3 a MRP2. Naproti tomu je snížena exprese NTCP a CYP7A1 a CYP8B1 [42] [48]. PXR váže řadu xenobiotik a jeho aktivací je navozena zvýšená exprese MRP3 a CYP enzymů, zejména CYP3A [1]. Aktivací CAR jsou indukovány enzymy (např. SULT2A1), které se podílejí na biotransformačních reakcích a v neposlední řadě je také zvýšena exprese MRP4 [1] [42].

Experimentální část

5. Zadání – cíle diplomové práce

Cílem předložené diplomové práce bylo ověření cholestatického poškození jater prostřednictvím biochemické analýzy plazmy a analýzy exprese hlavních jaterních transportních proteinů (Ntcp, Oatp1a4, Bsep, Mrp2, Mrp3, Mrp4) pro uptake a eflux látek na úrovni mRNA.

6. Metodika

6.1. Pokusná zvířata

Pokusným modelem byli potkani kmene Wistar, kteří vážili 280 – 320 g (Konárovice, Česká Republika). Potkani byli rozděleni do dvou skupin:

- **LPS-K** - kontrolní skupina s i.p. aplikací fyziologického roztoku (n = 6)
- **LPS** - zvířata s i.p. aplikací lipopolysacharidu (n = 6)

LPS skupině zvířat byl podán lipopolysacharid izolovaný ze *Salmonella Typhimurium*, v dávce 4 mg/kg i.p. a následně za 12h byla zvířata usmrcena exsanguinací z břišní aorty. Aplikací endotoxinu byla navozena intrahepatální cholestáza. Po ukončení experimentu byla játra okamžitě vyjmuta, zchlazena tekutým dusíkem a uložena při -80 °C. Vzorky plazmy byly získány centrifugací vzorků krve při 3000 g po dobu 5 min a následně zamraženy při -80 °C.

Během celého experimentu byla zvířata umístěna v Centrálním vivariu Lékařské fakulty v Hradci Králové, při podmínkách: 12h střídavý režim světlo/tma s dostatečným příjmem vody a potravy a za teploty vzduchu $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Všechny experimenty byly schváleny etickou komisí Lékařské fakulty v Hradci Králové a řádně provedeny v souladu s pokyny uvedenými ve vyhlášce č. 207/2004 Sb. o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

6.2. Biochemická analýza

Během experimentu byla měřena koncentrace bilirubinu a aktivita GMT, AST, ALT, ALP v plazmě na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové pomocí přístroje Cobas Integra® 800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) podle instrukcí udaných výrobcem. Jednotlivé frakce žlučových kyselin byly vyhodnocovány na Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze pomocí přístroje GC/MS (plynová chromatografie HP6890/hmotnostní spektrometrie HP5973 od Agilent, USA). V úvodu byly žlučové kyseliny extrahovány methanolem a vodou a následně proběhla hydrolyzace konjugovaných žlučových kyselin. V další fázi byly volné žlučové kyseliny extrahovány od hydrolyzátu a následně methylovány a sializovány.

6.3. qRT-PCR

Exprese *Ntcp*, *Oatp1a4*, *Bsep*, *Mrp2*, *Mrp3* a *Mrp4* mRNA byla studována pomocí metody qRT-PCR za použití 7500HT Fast Real-Time PCR systému (Applied Biosystems, Foster City, USA). RNA byla izolována z potkaních jater pomocí TRIzol reagentu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) pomocí přístroje QIAcube (QIAGEN, USA). Koncentrace RNA byla stanovena měřením absorbance při 260 nm a její čistota poměrem absorbance při 260 a 280 nm za použití NanoDrop ND-1000 spektrofotometru (BioTech a.s., ČR). Následně byla RNA převedena do cDNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription KITu (Applied Biosystems, Foster City, USA). Celková reakční směs obsahovala 50 ng analyzované cDNA. Amplifikace jednotlivých vzorků byla uskutečněna v triplikátorech pomocí TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix a TaqMan® Gene Expression Assay pro *Ntcp* (*Slc10a1*, Rn00566894_ml), *Oatp1a4* (*Slco1a4*, Rn00756233_ml), *Bsep* (*Abcb*, Rn00582179_ml), *Mrp2* (*Abcc2*, Rn00563231_ml), *Mrp3* (*Abcc3*, Rn00589786_ml) a *Mrp4* (*Abcc4*, Rn01465702_ml), přičemž vše bylo dodáno firmou Applied Biosystems (Foster City, USA). Teplotní profil ve „fast“ módu byl 95 °C po dobu 20s; 40 cyklů: 95 °C po dobu 3 s a 60 °C po dobu 30 s. K normalizaci byly použity 2 referenční geny *geNorm* podle [49], GAPDH („Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza“) (4352338E, Applied Biosystems, Foster City, USA), a *Ywhaz* (Tyrozin 3-monooxygenáza/tryprofan 5-monooxygenáza aktivační protein, zeta polypeptid) (GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, CR). Hodnoty exprese každého vzorku byly získány pomocí dříve popsané metody [50]. Nejprve byla data normalizována geometrickým průměrem exprese GAPDH a *Ywhaz* a následně byla stanovena relativní exprese mezi kontrolní a cholestatickou skupinou porovnáním normalizovaných dat.

6.4. Statistická analýza

Data získaná z experimentů jsou vyhodnocena jako průměr ± SEM (střední chyba průměru) pro 6 zvířat v obou skupinách. Statistická analýza výsledků byla provedena nepárovým t-testem pomocí GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, Kalifornie, USA). Za statisticky významnou byla považována hodnota $p < 0,05$.

7. Výsledky

7.1. Biochemická analýza

Výsledky biochemické analýzy plazmy jsou uvedeny v tabulce 1. Všechny uvedené parametry vykazovaly zvýšené hodnoty u skupiny zvířat s aplikací lipopolysacharidu (LPS) v porovnání s kontrolní skupinou (LPS-K). Statisticky významně zvýšené hodnoty byly zjištěny u žlučových kyselin, ALP a GMT. U žlučových kyselin došlo ke zvýšení koncentrace na 818 %, aktivita ALP byla zvýšená na 311 % a aktivita GMT na 2167 %.

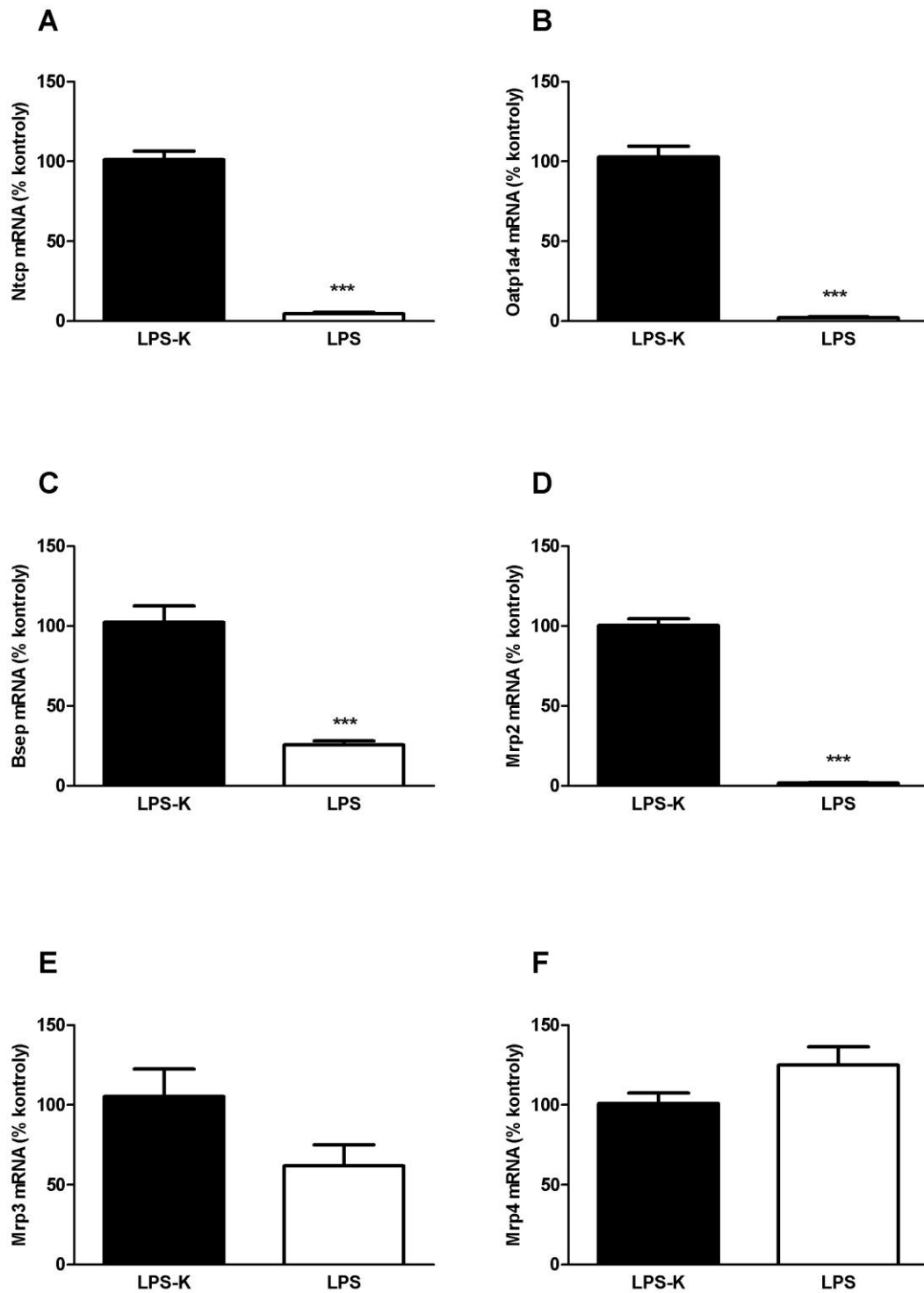
Tab. 1: Biochemická analýza plazmy.

	LPS-K	LPS
Celkový bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	2,5 \pm 0,22	9,3 \pm 3,4
Konjug. bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	1,2 \pm 0,17	3,0 \pm 1,6
Žlučové kyseliny ($\mu\text{mol/l}$)	7,7 \pm 1,4	63 \pm 12 ^{***}
ALT ($\mu\text{kat/l}$)	0,59 \pm 0,027	15 \pm 8,2
AST ($\mu\text{kat/l}$)	2,2 \pm 0,37	16 \pm 7,7
ALP ($\mu\text{kat/l}$)	1,8 \pm 0,055	5,6 \pm 0,71 ^{***}
GMT ($\mu\text{kat/l}$)	0,012 \pm 0,0017	0,26 \pm 0,050 ^{***}

Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SEM. LPS-K, kontrolní skupina zvířat; LPS, skupina zvířat s aplikací lipopolysacharidu (n = 6 v každé skupině); *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

7.2. qRT-PCR

Výsledky PCR analýzy mRNA jsou zobrazeny na obrázku 7. Statisticky významné snížení hladiny mRNA na 4,6 % bylo pozorováno u Ntcp transportéru a dále u Oatp1a4 transportéru na 2,2 % v porovnání s LPS-K skupinou (Obr. 7 A/B). U obou kanalikulárních proteinů byla pozorována snížená hladina mRNA. Hladina Bsep mRNA byla snížena na 25 %, hladina Mrp2 mRNA na 1,7 % v porovnání s kontrolní skupinou zvířat (Obr. 7 C/D). U Mrp3 a Mrp4 bazolaterálních transportních proteinů nebyla prokázána signifikantní změna hladiny mRNA u LPS skupiny zvířat oproti LPS-K skupině (Obr. 7 E/F).



Obr. 7. Změny hladin mRNA Ntcp, Oatp1a4, Bsep, Mrp2, Mrp3 a Mrp4 transportních proteinů. LPS-K, kontrolní skupina zvířat; LPS, skupina zvířat s aplikací lipopolysacharidu (n = 6 v každé skupině); data vyjádřena jako průměr ± SEM; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

8. Diskuze

Cholestáza je jaterní onemocnění, nejčastěji charakterizované narušeným fyziologickým tokem žluči. Tento patologický stav je spojen se strukturálními a/nebo biochemickými změnami v játrech či žlučových cestách, při kterých dochází k modulaci funkce a/nebo exprese jednotlivých mechanismů podílejících se na tvorbě žluči [44].

Během cholestázy dochází k zásadním změnám transportních systémů lokalizovaných na membránách hepatocytu, jejichž správná funkce je velice úzce spjata s fyziologickým tokem žluči. Pozorování patologických stavů těchto transportérů umožňuje detailní pochopení a identifikaci alternativních mechanismů při cholestatických jaterních onemocněních [2].

V této diplomové práci byl sledován vliv lipopolysacharidu, endotoxinu izolovaného ze *Salmonella Typhimurium* na jednotlivé transportní proteiny. Současně byly sledovány změny biochemických parametrů v plazmě během intrahepatální cholestázy.

Intrahepatální cholestáza navozená aplikací lipopolysacharidu zásadně ovlivňuje biochemické parametry plazmy. Při cholestatických jaterních onemocněních dochází ke kumulaci jednotlivých složek žluče, přičemž v naší studii jsme sledovali plazmatické hladiny celkového a konjugovaného bilirubinu a žlučových kyselin [27]. Zvýšená hladina žlučových kyselin poškozuje jaterní tkáň a vede k produkci reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS). Naproti tomu, zvýšená plazmatická hladina jak konjugovaného, tak nekonjugovaného bilirubinu působí protektivně proti vzniklému oxidačnímu stresu v játrech a do jisté míry kompenzuje toxický účinek žlučových kyselin [51]. Při cholestáze dochází k indukci hemoxygenázy-1 (HO-1), která je klíčovým enzymem při syntéze bilirubinu. Avšak nadměrná indukce tohoto enzymu může jaterní tkáň významně poškodit [51] [52].

Aplikace lipopolysacharidu vedla v této studii k poškození jaterní tkáně, což vysvětluje pozorovanou zvýšenou aktivitu transamináz, respektive ALT a AST u LPS skupiny zvířat. AST enzym není přítomen pouze v játrech, ale také např. v srdeční svalovině, ledvinách, mozku a dalších. Naproti tomu ALT je převážně lokalizován v játrech a jeho zvýšení je více specifické. Ve výsledku je tedy nutné podotknout, že pro důkaz jaterního poškození je relevantní zvýšení plazmatických hladin obou transamináz [53] [54].

Dalším významným biochemickým parametrem v naší studii byl enzym ALP, jehož zvýšená aktivita je jedním z hlavních ukazatelů cholestázy. Tento enzym je lokalizován na

apikálním pólu hepatocytů a cholangiocytů a je v přímém kontaktu s transportéry, které zastupují zásadní roli ve tvorbě žluči. Navzdory klinické a patologické významnosti, funkce a role tohoto enzymu v progresi cholestatických jaterních onemocněních je stále neznámá [55].

GMT je biochemický ukazatel, který je lokalizován dominantně v játrech a společně se zvýšenou aktivitou ALP deklaruje cholestatická jaterní poškození. Samotná zvýšená aktivita ALP nemusí nutně svědčit pouze pro onemocnění jater, ale může poukazovat na onemocnění v dalších orgánech, ve kterých se tento enzym nachází, tj. v kostech, tenkém střevě, ledvinách, leukocytech a dalších [54] [56].

Lipopolysacharid zvyšuje produkci prozánětlivých cytokinů, jako např. IL-1 β , TNF- α a IL-6 v Kupfferových buňkách a současně je zvýšena produkce oxidu dusnatého (NO) prostřednictvím indukce NO-syntházy (iNOS) v hepatocytech a Kupfferových buňkách. Tyto cytokiny jsou považovány za hlavní mediátory snížení hladin mRNA Ntcp, Oatp1a4, Mrp2 a Bsep transportérů. Rozsáhlé studie [57]-[63] prokázaly, že snížení hladin transportérů je velice významně spjato se sníženou funkcí nebo množstvím nukleárních transkripčních faktorů, jako např. HNF-1 α , HNF-4 α („Hepatocytes nuclear factors“) nebo nukleárních receptorů (PXR, FXR, CAR) [27].

HNF-1 se vyskytuje ve dvou izoformách, tj. HNF-1 α a HNF-1 β . HNF-1 α se predominantně vyskytuje v játrech, ale dále také v epiteliálních buňkách proximálních tubulů ledvin, žaludku, tenkém střevě a dalších. HNF-1 α se přímo podílí na regulaci exprese Ntcp a Oatp transportérů a dále zastupuje významnou roli v regulaci exprese FXR, který se podílí na transkripční regulaci Bsep, Mrp2 a Mdr3. Významnou roli v regulaci exprese HNF-1 zastupuje HNF-4, který negativní zpětnou vazbou inhibuje prvý jmenovaný nukleární faktor [23] [42].

Při cholestáze dochází ke kumulaci žluče v játrech, přičemž jsou aktivovány anticholestatické obranné reakce, které mají za cíl snížit její množství v tomto orgánu. Dochází k indukci bazolaterálních transportních proteinů, jako např. Mrp3, Mrp4 a Osta β , avšak zánětlivé stavy mohou indukci transportérů utlumit. Tento jev by mohl vysvětlovat mírné snížení hladiny mRNA Mrp3 [64]. Transportér Mrp4 vykazoval mírně zvýšenou hladinu mRNA, jak již bylo publikováno dříve [25].

V této studii byla pozorována snížená hladina Ntcp a Oatp1a4 mRNA, což je na jednu stranu zapříčiněno účinkem prozánětlivých cytokinů a zároveň se jedná o obrannou reakci s cílem zamezit nadměrnému vychytávání žlučových kyselin do hepatocytů, což následně snižuje jejich kumulaci v játrech. Dále byla působením lipopolysacharidu

pozorována snižená hladina Bsep a Mrp2 mRNA, čímž dochází k významnému omezení možnosti transportu žluče přes kanalikulární membránu a jejímu následnému vyloučení do duodena. Významnou roli zde sehrávají bazolaterální transportní proteiny, zejména Mrp 1, 3, 4, 5 a 6 a také OST α/β , které poskytují alternativní cestu vylučování žluče z jater a její následnou eliminaci ledvinami. V této studii nebyla sledována změna exprese všech efluxních bazolaterálních proteinů, nicméně lze předpokládat, že by aplikace lipopolysacharidu vedla k indukci jejich exprese [44] [46] [65] [66].

9. Závěr

V této diplomové práci jsme se zabývali vlivem cholestatického poškození jater na biochemické parametry v plazmě a změny exprese hlavních jaterních transportérů pro uptake (Ntcp, Oatp1a4) a eflux (Bsep, Mrp2, Mrp3, Mrp4) látek na úrovni mRNA.

Z biochemické analýzy plazmy vyplývá, že aplikace lipopolysacharidu navodila cholestatické jaterní poškození, které se projevilo statisticky významně zvýšenými hladinami žlučových kyselin a aktivitami enzymů ALP a GMT. Uvedené změny biochemických parametrů jasně prokazují přítomnost cholestázy.

Dále byl sledován vliv lipopolysacharidu na expresi mRNA jednotlivých transportérů. Byl pozorován statisticky významný pokles hladin mRNA Ntcp, Oatp1a4, Bsep a Mrp2 transportních proteinů. Snížená exprese mRNA zmíněných transportérů odpovídá cholestatickému poškození jater.

Závěrem lze konstatovat, že biochemickou analýzou plazmy a PCR analýzou exprese mRNA v hepatocytech bylo prokázáno cholestatické poškození jater.

Seznam použité literatury

- 1) MAREČEK Z. Farmakoterapie jaterní cholestázy. *Remedia*. 2007, vol. 17, no. 4, s. 316-322.
- 2) WAGNER M., ZOLLNER G. a TRAUNER M. New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *J Hepatol*. 2009, vol. 51, No. 3, s. 565-580.
- 3a) EHRMANN J. a HŮLEK P. *Hepatologie: Historie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s. 2010, s. 3-15.
- 3b) EHRMANN J. a HŮLEK P. *Hepatologie: Makroanatomie jater*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s. 2010, s. 17-24.
- 3c) EHRMANN J. a HŮLEK P. *Hepatologie: Fyziologie jater*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s. 2010, s. 25-36.
- 3d) EHRMANN J. a HŮLEK P. *Hepatologie: Cholestáza*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s. 2010, s. 151-164.
- 4) <http://emedicine.medscape.com/article/927624-overview#a0199> (7.1.2013)
- 5a) KUNTZ E. a KUNTZ H. D. *Hepatology: Morphology of the liver*. 3. vyd. Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 2008, s. 16-33.
- 5b) KUNTZ E. a KUNTZ H. D. *Hepatology: Biochemistry and Functions of the Liver*. 3. vyd. Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 2008, s. 36-76.
- 5c) KUNTZ E. a KUNTZ H. D. *Hepatology: Cholestasis*. 3. vyd. Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 2008, s. 236-250.
- 6) TROJAN S. *Lékařská fyziologie: Fyziologie jater*. 4. vyd. Praha: Grada Publishing a.s. 2003, s. 414-416.
- 7) TRAUNER M., MEIER P. J. a BOYER J. L. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med*. 1998, vol. 339, No. 17, s. 1217-1227.

- 8) IKEDA H. a YATOMI Y. Autotaxin in liver fibrosis. *Clin Chim Acta*. 2012, vol. 413, No. 23-24, s. 1817-1821.
- 9) WANG L. a BOYER J. L. The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes. *Hepatology*. 2004, vol. 39, No. 4, s. 892-899.
- 10) LEE N. P., POON T. P., SHEK F.H., IO N.G. a LUK J. M. Role of cadherin-17 in oncogenesis and potential therapeutic implications in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 2010, vol. 1806, No. 2, s. 138-145.
- 11a) LEDVINA M., STOKLASOVÁ A. a CERMAN J. Biochemie pro studující medicíny: *Metabolismus sacharidů*. Praha: Karolinum, 2005, s. 94-133.
- 11b) LEDVINA M., STOKLASOVÁ A. a CERMAN J. Biochemie pro studující medicíny: *Metabolismus lipidů, steroidů a lipoproteinů*. Praha: Karolinum, 2005, s. 134-185.
- 11c) LEDVINA M., STOKLASOVÁ A. a CERMAN J. Biochemie pro studující medicíny: *Degradace bílkovin a metabolismus aminokyselin*. Praha: Karolinum, 2005, s. 187-218.
- 12) ZARRINPAR A. a LOOMBA R. Review article: the emerging interplay among the gastrointestinal tract, bile acids and incretins in the pathogenesis of diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012, vol. 36, No. 10, s. 909-921.
- 13) CHANDRA P. a BROUWER K. L. The complexities of hepatic drug transport: Current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res*. 2004, vol. 21, No. 5, s. 719-735.
- 14) FUNK C. The role of hepatic transporters in drug elimination: Molecular Characterization, Function, and Regulation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008, vol. 4, No. 4, s. 363-379.
- 15) HAGENBUCH B. a MEIER P. J. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch*. 2004, vol. 447, No. 5, s. 653-665.

- 16) SEKINE T., MIYAZAKI H. a ENDOU H. Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006, vol. 290, No. 2, s. F251-F261.
- 17) AOKI M., TERADA T., KAJIWARA M., OGASAWARA K., IKAI I., OGAWA O., KATSURA T. a INUI K. Kidney-specific expression of human organic cation transporter 2 (OCT2/SLC22A2) is regulated by DNA methylation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008, vol. 295, No. 1, s. F165-F170.
- 18) SODANI K., PATEL A., KATHAWALA R. J. a CHEN Z. S. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer*. 2012, vol. 31, No. 2, s. 58-72.
- 19) ZOLLNER G. a TRAUNER M. Molecular mechanisms of cholestasis. *Wien Med Wochenschr*. 2006, vol. 156, No. 13-14, s. 380-385.
- 20) ALREFAI W. A. a GILL R. K. Bile Acid Transporters: Structure, Function, Regulation and Pathophysiological Implications. *Pharm Res*. 2007, vol. 24, No. 10, s. 1803-1823.
- 21) BORST P., ZELCER N. a VAN DE WETERING K. MRP2 and 3 in health and disease. *Cancer Lett*. 2006, vol. 234, No. 1, s. 51-61.
- 22) CEBECAUEROVA D., JIRASEK T., BUDISOVA L., MANDYS V., VOLF V., NOVOTNA Z., SUBHANOVA I., HREBICEK M., ELLEDER M. a JIRSA. M. Dual Hereditary Jaundice: Simultaneous Occurrence of Mutations Causing Gilbert's and Dubin-Johnson Syndrome. *Gastroenterology*. 2005, vol. 129, No. 1, s. 315-320.
- 23) TRAUNER M. a BOYER J. L. Bile salt transporters: Molecular characterization, function and regulation. *Physiol Rev*. 2003, vol. 83, No. 2, s. 633-671.
- 24) MAO Q. a UNADKAT J. D. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J*. 2005, vol. 7, No. 1, s. E118-E133.

- 25) BRCAKOVA E., FUKSA L., CERMANOVA J., KOLOUCHOVA G., HROCH M., HIRSOVA P., MARTINKOVA J., STAUD F. a MICUDA S. Alteration of methotrexate biliary and renal elimination during extrahepatic and intrahepatic cholestasis in rats. *Biol Pharm Bull.* 2009, vol. 32, No. 12, s. 1978-1985.
- 26) RODRIGUEZ-GARAY E. A. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol.* 2003, vol. 2, No. 4, s. 150-158.
- 27) AOKI K., NAKAJIMA M., HOSHI Y., SASO N., KATO S., SUGIYAMA Y., SATO H. Effect of aminoguanidine on lipopolysaccharide-induced changes in rat liver transporters and transcription factors. *Biol Pharm Bull.* 2008, vol. 31, No. 3, s. 412-420.
- 28) KREMER A.E., ELFERINK R. P. J. O. a BEUERS U. Cholestatisher Pruritus. *Der Hautarzt.* 2012, vol. 63, No. 7, s. 532-538.
- 29) ARAGON G. a YOUNOSSI Z. M. When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients. *Cleve Clin J Med.* 2010, vol. 77, No. 3, s. 195-204.
- 30) TURAGA K. K., TSAI S., WIEBE L. A., EVANS D. B. a GAMBLIN T. C. Novel Multimodality Treatment Sequencing for Extrahepatic (Mid and Distal) Cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2012, vol. 20, No. 4, s. 1230-1239.
- 31) RESHETNYAK V. I. Concept of the pathogenesis and treatment of cholelithiasis. *World J Hepatol.* 2012, vol. 4, No. 2, s. 18-34.
- 32) WANG G. J., GAO C. F., WEI D., WANG C. a DING S. Q. Acute pancreatitis: Etiology and common pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2009, vol. 15, No. 12, s. 1427-1430.
- 33) DUTKIEWICZ E. a KNAS M. Primary Biliary Cirrhosis (PBC). *Exp Clin Hep.* 2006, vol. 2, No. 3, s. 7-11.
- 34) LUTZ H. H. a TISCHENDORF J. J. Management of primary sclerosing cholangitis. *World J Hepatol.* 2011, vol. 3, No. 6, s. 137-141.

- 35) WORTHINGTON J., CHAPMAN R. Primary sclerosing cholangitis. *Orphanet J Rare Dis.* 2006, vol. 1, No. 41, s. 1-7.
- 36) MOSELEY R. H., WANG W., TAKEDA H., LOWN K., SHICK L., ANANTHANARAYANAN M. a SUCHY F. J. Effect of endotoxin on bile acid transport in rat liver: a potential model for sepsis-associated cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1996, vol. 271, No. 1, s. G137-G146.
- 37) PADDA M. S., SANCHEZ M., AKHTAR A. J. a BOYER J. L. Drug-induced cholestasis. 2011, vol. 53, No. 4, s. 1377-1387.
- 38) DHANDA A. D., LEE R. W. L., COLLINS P. L. a McCUNE C. A. Molecular targets in the treatment of alcoholic hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012, vol. 18, No. 39, s. 5504-5513.
- 39) PUSL T. a BEUERS U. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Orphanet J Rare Dis.* 2007, vol. 2, No. 26, s. 1-6.
- 40) WIEMUTH D., SAHIN H., LEFÈVRE C. M. T., WASMUTH H. E. a GRÜNDER S. Strong activation of bile acid-sensitive ion channel (BASIC) by ursodeoxycholic acid. *Channels.* 2013, vol. 7, No. 1, s. 38-42.
- 41) ANGULO P., JORGENSEN R. A., KEACH J. C., DICKSON E. R., SMITH C. a LINDOR K. D. Oral budesonide in the treatment of patients with primary biliary cirrhosis with a suboptimal response to ursodeoxycholic acid. *Hepatology.* 2000, vol. 31, No. 2, s. 318-323.
- 42) BOYER J. L. Nuclear Receptor Ligands: Rational and Effective Therapy for Chronic Cholestatic Liver Disease? *Gastroenterology.* 2005, vol. 129, No. 2, s. 735-740.
- 43) MARSCHALL H., WAGNER U. M., ZOLLNER G., FICKERT P., DICZFALUSY U., GUMHOLD J., SILBERT D., FUCHSBICHLER A., BENTHIN L., GRUNDSTRÖM R., GUSTAFSSON U., SAHLIN S., EINARSSON C. a TRAUNER M. Complementary Stimulation of Hepatobiliary Transport and Detoxification Systems by Rifampicin and

Ursodeoxycholic Acid in Humans. *Gastroenterology*. 2005, vol. 129, No. 2, s. 476-485.

44) ROMA M. G., CROCENZI F. A. a SÁNCHEZ POZZI E. A. Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clinical Sci (Lond)*. 2008, vol. 114, No. 9, s. 567-588.

45) VEE M. L., LECUREUR V., STIEGER B. a FARDEL O. Regulation of Drug Transporter Expression in Human Hepatocytes Exposed to the Proinflammatory Cytokines Tumor Necrosis-Alpha or Interleukin-6. *Drug Metab Dispos*. 2009, vol. 37, No. 3, s. 685-693.

46) LEE J. a BOYER J.L. Molecular alterations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders. *Semin Liver Dis*. 2000, vol. 20, No. 3, s. 373-384.

47) BARNES S. N., ALEKSUNES L. M., AUGUSTINE L., SCHEFFER G. J., GOEDKEN M. J., JAKOWSKI A. B., PRUIMBOOM-BREES I. M., CHERRINGTON N. J. a MANAUTOU J. E. Induction of Hepatobiliary Efflux Transporters in Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure Cases. *Drug Metab Dispos*. 2007, vol. 35, No. 10, s. 1963-1969.

48) TAKIKAWA H. Hepatobiliary transport of bile acids and organic anions. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2002, vol. 9, No. 4, s. 443-447.

49) VANDESOMPELE J., DE PRETER K., PATTYN F., POPPE B., VAN ROY N., DE PAEPE A. a SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002, vol. 3 No. 7, s. 1-12.

50) RADILOVA H., LIBRA A., HOLASOVA S., SAFAROVA M., VISKOVA A., KUNC F. a BUNCEK M. COX-1 is coupled with mPGES-1 and ABCC4 in human cervix cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 2009, vol. 330, No. 1-2, s. 131-140.

- 51) MUCHOVA L., VANOVA K., ZELENKA J., LENICEK M., PETR T., VEJRAZKA M., STICOVA E., VREMAN H. J., WONG R. J. a VITEK L. Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver: implications for bile acid-mediated oxidative stress. *J Cell Mol Med.* 2011, vol. 15, No. 5, s. 1156-1165.
- 52) FROH M., CONZELMANN L., WALBRUN, P., NETTER S., WIEST R., WHEELER M. D., LEHNERT M., UESUGI T., SCHOLMERICH J. a THURMAN R. G. Heme oxygenase-1 overexpression increases liver injury after bile duct ligation in rats. *World J Gastroenterol.* 2007, vol. 13, no. 25, s. 3478-3486.
- 53) CÖL R. a DURGUN Z. Effect of recombinant interleukin-10 on some haematological and biochemical parameters in a rat endotoxaemic model. *Acta Veterinaria Hungarica.* 2011, vol. 59, No. 2, s. 237-245.
- 54) LEE M. Basic skills in interpreting laboratory data: *Liver nad gastroenterology tests.* 4. vyd. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists. 2009, s. 235-318.
- 55) ALVARO D., BENEDETTI A., MARUCCI L., DELLE MONACHE M., MONTERUBBIANESI R., DI COSIMO E., PEREGO L., MACARRI G., GLASER S., LE SAGE G. a ALPINI G. The function of alkaline phosphatase in the liver: Regulation of intrahepatic biliary epithelium secretory activities in the rat. *Hepatology.* 2000, vol. 32, No. 2, s. 174-184.
- 56) PALMER M. Dr. Melissa Palmer's guide to hepatitis: *Part One - The Basics, chapter three - blood tests and imaging studies - learning what you need to know.* New York: Avery. 2004, s. 25-34.
- 57) GREEN M. R., BEIER D. a GOLLAN J. L. Regulation of Hepatocyte Bile Salt Transporters by Endotoxin and Inflammatory Cytokines in Rodents. *Gastroenterology.* 1996, vol. 111, No. 1, s. 193-198.
- 58) DENSON L. A., AULD K. L., SCHIEK D. S., McCLURE M. H., MANGELSDORF D. J. a KARPEN S. J. Interleukin-1 β Suppresses Retinoid Transactivation of Two Hepatic Transporter Genes Involved in Bile Formation. *J Biol Chem.* 2000, vol. 275, No. 12, s. 8835-8843.

- 59) KIM P. K., CHEN J., ANDREJKO K. M. a DEUTSCHMAN C. S. Intraabdominal sepsis down-regulates transcription of sodium taurocholate cotransporter and multidrug resistance-associated protein in rats. *Shock*. 2000, vol. 14, No. 2, s. 176-181.
- 60) HARTMANN G., KIM H. a PIQUETTE-MILLER M. Regulation of hepatic multidrug resistance gene expression by endotoxin and inflammatory cytokines in mice. *Int Immunopharmacol*. 2001, vol. 1, No. 2, s. 189-199.
- 61) HARTMANN G., CHEUNG A. K. Y. a PIQUETTE-MILLER M. Inflammatory Cytokines, but Not Bile Acids, Regulate Expression of Murine Hepatic Anion Transporters in Endotoxemia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002, vol. 303, No. 1, s. 273-281.
- 62) SIEWERT E., DIETRICH C. G., LAMMERT F., HEINRICH P. C., MATERN S., GARTUNG C. a GEIER A. Interleukin-6 regulates hepatic transporters during acute-phase response. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004, vol. 322, No. 1, s. 232-238.
- 63) GEIER A., MARTIN I. V., DIETRICH C. G., BALASUBRAMANIYAN N., STRAUCH S., SUCHY F. J., GARTUNG C., TRAUTWEIN C. a M. ANANTHANARAYANAN. Hepatocyte nuclear factor-4 α is a central transactivator of the mouse Ntcp gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008, vol. 295, No. 2, s. 226-233.
- 64) KOSTERS A. a KARPEN S. J. The Role of Inflammation in Cholestasis: Clinical and Basic Aspects. *Semin Liver Dis*. 2010, vol. 30, No. 2, s. 186-194.
- 65) ZINCHUK V., ZINCHUK O. a OKADA T. Experimental LPS-induced cholestasis alters subcellular distribution and affects colocalization of Mrp2 and Bsep proteins: A quantitative colocalization study. *Microsc Res Tech*. 2005, vol. 67, No. 2, s. 65-70.
- 66) LICKTEIG A. J., SLITT A. L., ARKAN M. C., KARIN M. a CHERRINGTON N. J. Differential Regulation of Hepatic Transporters in the Absence of Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 β , Interleukin-6, and Nuclear Factor- κ B in Two Models of Cholestasis. *Drug Metab Dispos*. 2007, vol. 35, No. 3, s. 402-409.