

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd



Vliv resveratrolu na tok žluče
Influence of resveratrol on bile flow

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Eva Doleželová, Ph.D.

Vypracovala:

Kristýna Paclíková

Hradec Králové 2016

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

Podpis:

Předně bych chtěla poděkovat své školitelce PharmDr. Evě Doleželové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vstřícný přístup při vypracování této práce. Dále patří dík prof. MUDr. Stanislavu Mičudovi, Ph.D. a celému kolektivu Ústavu farmakologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové za možnost zde pracovat. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem svým blízkým, kteří mi byli oporou v průběhu celého studia i při vypracování této diplomové práce.

Abstrakt

Kristýna Paclíková

Vliv resveratrolu na tok žluče

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce:

Ochranný účinek resveratrolu je prokázán u řady experimentálních modelů cholestázy, ale jeho účinek na produkci žluče u zdravých jedinců zatím studován nebyl. Vzhledem k tomu, že je resveratrol v populaci často užíván, cílem diplomové práce bylo zjištění jeho účinku na tok žluče u zdravých jedinců a následné objasnění mechanismu tohoto děje.

Metody:

Potkani kmene Wistar ($n = 6$, v každé skupině, 280 – 320 g) byli rozděleni do dvou skupin: Kontrolní skupina (Kontrola) a skupina, které byl podáván resveratrol (10mg/kg/den, p.o.) po dobu 28 dní (RES). Pro zjištění produkce žluče byla provedena *in vivo* kinetická studie. Analýza exprese transportních proteinů byla provedena na úrovni mRNA a proteinu metodou qRT-PCR a Western blot.

Výsledky:

Resveratrol vedl ke zvýšení kumulativního toku žluče. Analýza exprese transportních proteinů na úrovni mRNA a proteinu ukázala, že k této změně dochází v důsledku posttranskripční indukce kanalikulárních transportérů, Bsep a Mrp2. Současně vedl resveratrol k indukci Mrp4 proteinu, exprimovaného na bazolaterální membráně hepatocytů.

Závěr:

Z výsledků studie vyplývá, že choleretický účinek orálně podávaného resveratrolu je způsoben zvýšenou expresí kanalikulárních efluxních transportérů u zdravých potkanů.

Abstract

Kristýna Paclíková

Influence of resveratrol on bile flow

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background:

Protective effect of resveratrol is shown in many experimental models of cholestasis, but its effect on bile production in healthy individuals has not been studied yet. As the use of resveratrol is frequent in population, the aim of this thesis was to investigate the effect of resveratrol on the bile flow in healthy animals and the clarification of the mechanism of this effect.

Methods:

Wistar rats (n = 6, in each group, weighing 280 to 320 g) were divided into two groups: control group (Control) and the group of rats administered with resveratrol (10mg/kg/day, p.o.) for 28 days (RES). *In vivo* clearance study was performed to analyze bile production. Analysis of mRNA and protein expression of the transport proteins was performed by qRT-PCR and Western blot.

Results:

Resveratrol led to a significant increase in the cumulative bile flow. Analysis of mRNA and protein expression of the transport proteins revealed that bile flow is changed due to posttranscriptional induction of canalicular transporters Bsep and Mrp2. Simultaneously, resveratrol led to induction of Mrp4 efflux protein, expressed at the basolateral membrane of hepatocytes.

Conclusion:

The results of this study show that the choleric effect of orally administered resveratrol is caused by increased expression of the canalicular efflux transporters in healthy rats.

OBSAH

Abstrakt	4
Abstract	5
Obsah	6
1 Úvod	8
2 Játro	9
2.1 Cévní zásobení jater.....	9
2.2 Morfologická struktura jater.....	9
2.3 Jaterní funkce.....	13
3 Transportní systémy v játrech	15
3.1 SLC transportní proteiny.....	16
3.1.1 NTCP.....	17
3.1.2 OAT.....	17
3.1.3 OATP.....	17
3.1.4 OCT.....	17
3.1.5 OST α/β	18
3.2 ABC transportní proteiny.....	18
3.2.1 BSEP.....	18
3.2.2 MRP.....	19
3.2.3 MDR.....	20
3.2.4 BCRP.....	20
4 Žluč	21
4.1 Žlučové cesty (intrahepatální a extrahepatální).....	21
4.2 Složení a tvorba žluče.....	21
5 Resveratrol	24
5.1 Výskyt.....	24

5.2	Chemická struktura a vlastnosti	25
5.3	Účinky v organismu	26
5.3.1	Farmakokinetické vlastnosti	26
5.3.2	Resveratrol jako aktivátor AMPK a sirtuinů	27
5.3.3	Antioxidační, protizánětlivá a protinádorová aktivita	28
5.3.4	Resveratrol a kardiovaskulární choroby	29
5.3.5	Resveratrol a játra	29
6	Cíl diplomové práce	32
7	Metodika	33
7.1	Chemikálie	33
7.2	Pokusná zvířata	33
7.3	<i>In vivo</i> kinetická studie	33
7.4	qRT-PCR	34
7.5	Western blot	35
7.6	Statistická analýza dat	37
8	Výsledky	38
8.1	<i>In vivo</i> kinetická studie	38
8.2	qRT-PCR	39
8.3	Western blot	40
9	Diskuze	45
10	Závěr	47
11	Seznam použitých zkratk	48
12	Seznam použité literatury	50

1 ÚVOD

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilben) je sekundární rostlinný metabolit (tzv. fytoalexin), který se v rostlinách syntetizuje ve zvýšené míře jako součást obranné reakce při ohrožení. Svět se o jeho existenci dozvěděl v roce 1940, kdy byl izolován z kořenu Kýchavice velkokvěté (*Veratrum grandiflorum Loes.fil.*). Resveratrol se ve větším množství nachází i v červeném víně, borůvkách, červeném zelí, ořechách a dalších plodech a rostlinách (1).

Vysoká koncentrace resveratrolu v červeném víně je spojena s tzv. francouzským paradoxem, kdy epidemiologická data z jižní Francie zaznamenávají nižší výskyt kardiovaskulárních chorob navzdory vysokému příjmu tuků v dietě tamních obyvatel (2).

Významný je jeho inhibiční účinek v oblasti oxidačního stresu a účinek protizánětlivý, v posledních letech se některé studie zabývají i jeho vlivem na metabolismus tuků. Tyto účinky byly již zkoumány v *in vitro* a preklinických studiích v oblasti rakoviny, kardiovaskulárních chorob, neuroprotektivní aktivity, zánětu, obezity, diabetu mellitu, metabolického syndromu, antivirového účinku a dalších (3-8). Některé studie se též zabývaly vlivem resveratrolu na jaterní onemocnění, při kterých je zvýšen oxidační stres, je přítomen zánět nebo je narušen lipidový metabolismus (9-17).

Protektivní účinek resveratrolu byl prokázán např. u experimentálních modelů cholestatického poškození jater (10) (17) nebo poškození jaterní tkáně vlivem akumulace tuků (11-16). Nejsou však studie, které by popisovaly hepatoprotektivní účinek u zdravých jedinců.

2 JÁTRA

Játra (lat. *hepar*) hrají klíčovou úlohu v energetickém a intermediárním metabolismu lidského organismu. Vykonávají širokou řadu funkcí jako je biotransformace xenobiotik a endogenních látek, s ní související detoxikace, tvorba a vylučování žluče, účast v imunitních reakcích a vaskulární funkce. Játra jsou společně s ledvinami nejdůležitějším vylučovacím orgánem odpadních metabolitů (18a) (19).

U dospělého člověka zaujímají játra přibližně 3 % celkové tělesné hmotnosti. Společně s mozkem patří mezi největší orgány lidského těla. Jsou parenchymatického původu, uložena převážně volně intraperitoneálně a jsou úzce vázaná na bránici. S dýchacími pohyby tak mohou svou polohu měnit až o několik centimetrů (18b). Jsou uložena ve vazivovém pouzdře (*capsula hepatis Glissoni*) (20).

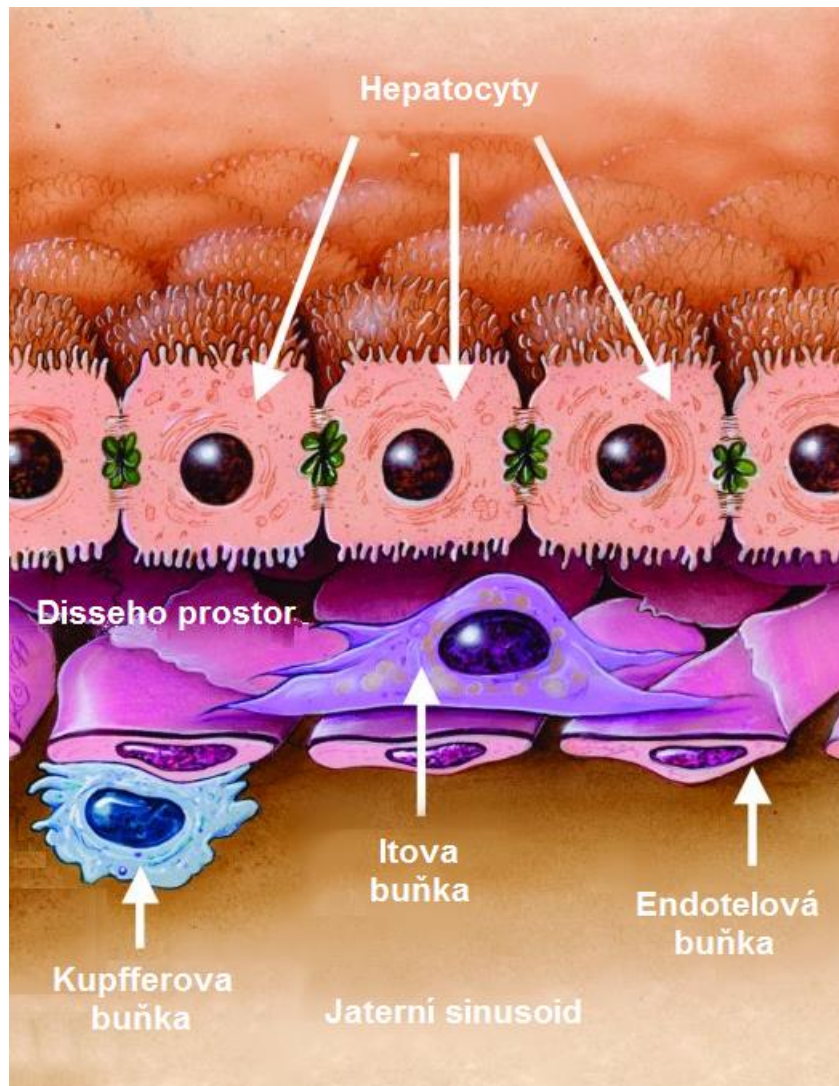
2.1 Cévní zásobení jater

V oblasti hilu vstupuje do jater vrátnicová žíla (*vena portae*), přinášející neokysličenou krev z kapilárních řečišť trávicího traktu, slinivky břišní a sleziny, a jaterní tepna (*arteria hepatica propria*). Z jater vystupují v místě hilu žlučovody (*ductus hepaticus dexter et sinister*) s lymfatickými cévami (19) (20).

Krev vtéká z vrátnicové žíly přes segmentové žíly do interlobulárních žil v portobiliárním prostoru a poté pomocí cirkumlobulárních venul vtéká do sinusoid. Okysličená krev z jaterní tepny protéká přes segmentové tepny také do portobiliárního prostoru do interlobulárních tepen, ty následně ústí přes cirkumlobulární arterioly též do sinusoid. V sinusoidách se tedy mísí neokysličená krev vrátnicové žíly s okysličenou krví jaterní tepny. Sinusoidální krev pak odtéká do centrálních žil jaterních lalůček. Přeš další systém žil se odkysličená krev z jater dostává do jaterních žil (*venae hepaticae*), které ústí do dolní duté žíly (*vena cava inferior*) (19).

2.2 Morfologická struktura jater

Jaterní tkáň je tvořena několika druhy buněk. Hlavní podíl (60 - 80 % jaterních buněk) tvoří parenchymové hepatocyty. Ostatní přibližně jedna třetina neparenchymových buněk zahrnuje buňky endotelové – LSEC („Liver sinusoidal endothelial cells“), Kupfferovy buňky a Itovy buňky (Obr. 1) (18a).



Obr. 1. Uspořádání parenchymových a neparenchymových jaterních buněk. Převzato a upraveno z (88).

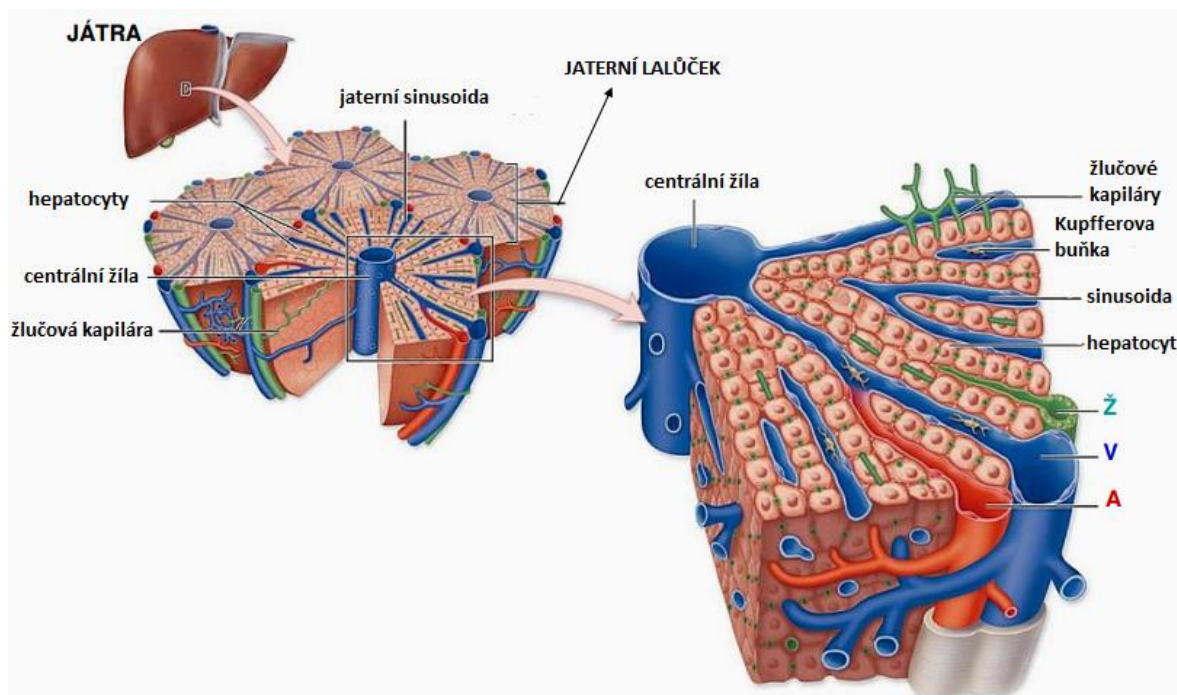
Povrch hepatocytu je tvořen membránou, která nemá ve svém průběhu jednotné vlastnosti. Přibližně 37 % povrchu tvoří bazolaterální (sinusoidální) membrána, která má absorpční a sekreční funkci a sousedí bezprostředně s Disseho prostorem. Na této membráně jsou přítomny četné mikroklky, které zlepšují transport látek mezi hepatocyty a krví jaterních sinusoid. Kolem 15 % celkového povrchu hepatocytu tvoří kanalikulární (apikální) membrána, jenž představuje exkretční pól buňky. Membrána zde vytváří stěny žlučových kapilár, do kterých jsou transportovány žlučové komponenty. Zbylá část povrchu je tvořena hladkou intercelulární štěrbinou, která je spojena s Disseho prostorem a je oddělena od kanalikulární membrány těsnými spoji („tight junctions“). Tyto spoje umožňují průnik vody a kationtů a vytváří bariéru mezi krví a žlučí, čímž zabraňují

přestupu látek ze žluči zpět do krve. Komunikace mezi hepatocyty je též zprostředkována pomocí štěrbinovitých spojů („gap junctions“) (21a).

Hepatocyty jsou k sobě těsně připojeny v řadě po dvou, a tvoří tak trámčitý epitel. Trámce mohou spolu vytvářet anastomózy, tedy funkční spojení (20). Základní morfologickou jednotkou jater, která je tvořena převážně jaterními trámci se považuje jaterní lalůček – lobulus (Obr. 2). V játrech dospělého člověka lze nalézt 50 000 - 100 000 těchto lalůčků. Jednotlivý lobulus je cylindrický nepravidelný šestiboký útvar o průměru až 2 mm (18a). V jeho středu je situována centrální žíla (*vena centralis*), od níž jsou centrifugálně uspořádány trámce jaterních buněk. Mezi trámci jsou jaterní sinusoidy, drobné bohatě fenestrované krevní kapiláry, jenž přivádějí krev bohatou na živiny z vratnicové žíly a okysličenou krev s živinami z jaterní tepny. Oba druhy krví protékají jaterním lalůčkem radiálně, v sinusoidách se mísí a slévají se do centrální žíly (20).

Mezi hepatocyty a endotelovými buňkami sinusoid je lokalizován Disseho prostor. Do tohoto subendoteliálního prostoru se dostává přefiltrované plazma ze sinusoid. Disseho prostor je označován za počátek lymfatických jaterních cest (18b). Uvnitř trámců mezi membránami dvou sousedních hepatocytů jsou umístěny nejdrobnější intercelulární žlučové kapiláry (*canaliculi biliferi*), které se skrz krátké přímé Heringovy kanálky napojují na interlobulární žlučovody v portobiliárních prostorech (18b).

Portobiliární prostor je místo, kde se stýkají tři jaterní lalůčky. Je to centrum další funkčně oddělené jednotky – portálního lalůčku (*lobulus venae interlobularis*) (Obr. 3). Má trojúhelníkovitý tvar, přičemž vrcholy útvaru tvoří centrální žíly třech přilehlých jaterních lalůčků. Centrálně uloženým portobiliárním prostorem pak prochází interlobulární tepna (*arteria interlobularis*) a interlobulární žíla (*vena interlobularis*) s interlobulárním žlučovodem (*ductus bilifer interlobularis*) (20). Seskupení těchto tří systémů se v některých pracích označuje jako Glissonova trias (18b) (19) (21a). Cévy a žlučovod jsou vzájemně propletené a obalené vazivem, které vychází až z Glissonova pouzdra, jenž obaluje celý orgán (18b).



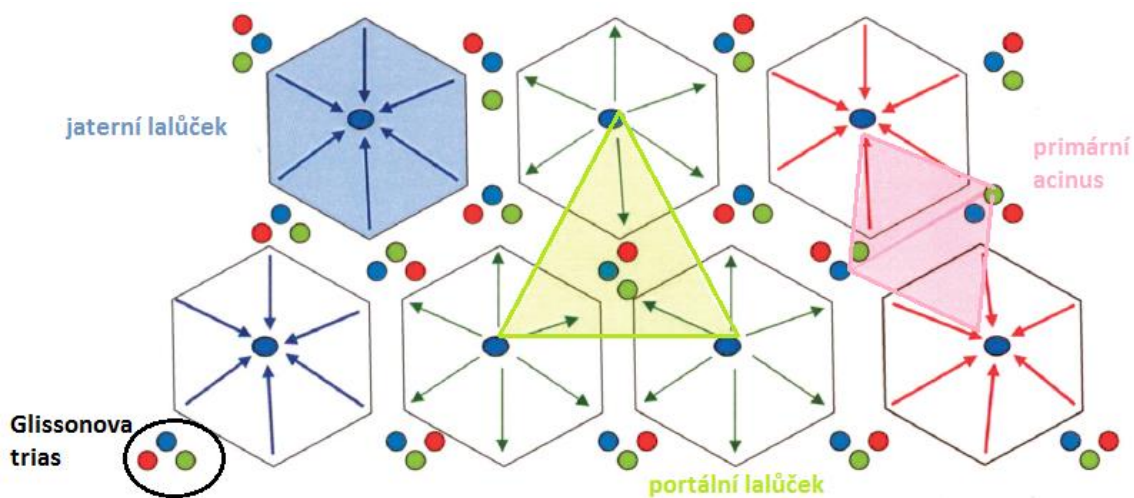
Obr. 2. Uspořádání jaterních lalůček a detail jaterního lalůčku. **Ž** – žlučovod, **V** – větev vrátnicové žíly, **A** – větev jaterní tepny. Převzato a upraveno z (22).

V pořadí třetí funkčně oddělenou jednotkou jater je primární jaterní acinus. Je tvořen dvěma pomyslnými trojúhelníky, jejichž horní vrcholy jsou centrální žíly dvou sousedních hepatocytů (Obr. 3). Tento prostor je zásobován jednou cirkumlobulární žílou. Střed primárního acinu přichází jako první do styku s okysličenou krví s živinami a také s případnými toxickými látkami, proto bývá z parenchymatické jaterní tkáně za patologických okolností nejvíce postižen (20).

V Disseho prostoru jaterních lalůček jsou uloženy buňky hvězdčovitěho typu, Itovy buňky, nazvané po japonském anatomovi Itó Tošio (23). Ve svých lipidových kapénkách strádají buňky významná depozita vitamínu A (21a). Při poškození buněk vlivem patologických procesů mění svůj charakter na buňky podobné myofibroblastům a významně se podílí na fibrotizaci tkáně při jaterní cirhóze (18a).

Imunitní funkce zastávají v játrech mimo jiné Kupfferovy buňky. Jedná se o specifické makrofágy, které jsou součástí mononukleárního fagocytárního systému (MFS). Jaterní tkáň zbavují starých buněk, cizích částic, mikrobů a dalších potenciálně škodlivých faktorů. Jsou součástí jaterních sinusoid, přičemž nejvyšší aktivity dosahují na periferii jaterních lalůček v centrech primárních acinů (21a).

Výstelky žlučových cest jsou tvořeny speciálními epitelovými buňkami zvanými cholangiocyty (18a).



Obr. 3. Tři funkční jednotky jaterní tkáně a Glissonova trias. Převzato a upraveno z (18a).

2.3 Jaterní funkce

Játra jako hlavní orgán tělesného metabolismu plní řadu nezastupitelných funkcí. Jsou centrem biotransformace endogenních a exogenních látek. Mají glukostatickou funkci, udržují přiměřenou hladinu glukózy v krvi a v souvislosti s tím v nich probíhá metabolismus sacharidů jak ve směru anabolickém, kdy je syntetizován glykogen, tak ve směru katabolickém při metabolismu glukózy. Probíhá v nich metabolismus aminokyselin, detoxikace amoniaku a syntéza některých proteinů. V neposlední řadě v nich také probíhá lipidový metabolismus a tvorba žluče (18a). V játrech též dochází k metabolismu bilirubinu – odpadního produktu hemu (21b).

Biotransformace, jakožto přeměna chemické struktury látky v živém organismu působením enzymů, je důležitým krokem pro eliminaci potenciálně škodlivé látky z organismu. Do jater se krevním řečištěm dostávají většinou látky lipofilního charakteru, které nemohou být vyloučeny močí nebo žlučí, a pomocí biotransformace nabývají hydrofilní formy. Biotransformace probíhá ve dvou fázích. Ve fázi I dochází k oxidaci nebo méně často redukci či hydrolýze dané sloučeniny. Molekula tak získává polární funkční skupinu (např. $-OH$, $-COOH$, NH_2 apod.). Reakce jsou ve většině případů katalyzovány monooxygenázovým systémem cytochromu P-450. Fáze II je charakterizována konjugací vzniklé molekuly s endogenní sloučeninou. Nejčastěji se jedná

o glukuronidaci – konjugaci s kyselinou glukuronovou (derivát glukózy) katalyzovanou UDP-glukuronyltransferázou. Konjugace je také možná s některými aminokyselinami (glycin, serin, glutamin), kyselinou sírovou, kyselinou octovou či S-adenosylmethioninem. Výsledné metabolity jsou obvykle inaktivní, vysoce hydrofilní a mohou se tedy vyloučit společně s močí nebo žlučí (18a) (21b).

3 TRANSPORTNÍ SYSTÉMY V JÁTRECH

Transport látek v jaterních buňkách má velký význam. V hepatocytech jsou přemísťovány látky endogenního a exogenního původu několika způsoby. Jednak dochází k transportu látek přes bazolaterální (sinusoidální) membránu hepatocytů, následně jsou látky transportovány v cytosolu jaterní buňky a po intracelulární degradaci či biotransformaci jsou vylučovány ven z buňky přes kanalikulární (apikální) membránu hepatocytu (18a).

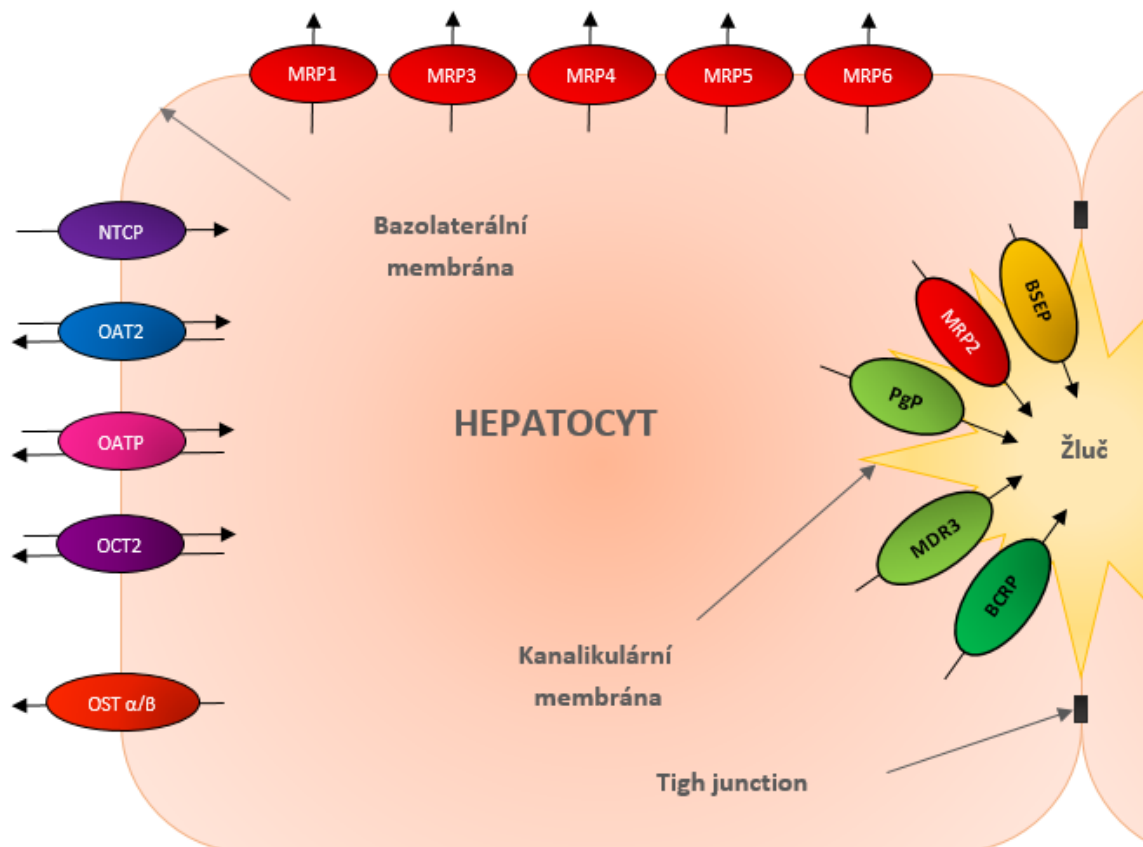
Hepatocyty jakožto epitelové buňky jsou vybaveny několika druhy transportních mechanismů. Mezi důležité transportní systémy patří iontové pumpy zprostředkovávající aktivní transport nejhodněji zastoupených iontů tělních buněk a udržující stálé koncentrace iontů pro zachování homeostázy. Iontové pumpy jsou lokalizovány na bazolaterální membráně hepatocytů. Transport Na^+ směrem z buňky a současný transport K^+ směrem do buňky zajišťuje sodno-draselná pumpa (Na^+/K^+ -ATPáza). Využívá energii z hydrolyzy ATP na ADP k aktivnímu transportu těchto iontů a k zachování nízké koncentrace sodíku a vysoké koncentrace draslíku uvnitř buňky. Podobně zachovává kalciová pumpa nízkou koncentraci Ca^{2+} uvnitř buňky (18a) (24).

Přenos glukózy není v jaterních buňkách závislý na inzulinu. Je zprostředkován přenašečem GLUT2 mechanismem facilitované difúze (18a).

Přenos látek se liší v závislosti na rozpustnosti dané látky ve vodě či v tucích. Látky lipofilní jsou přenášeny převážně prostou či facilitovanou difúzí, pro transport hydrofilních molekul pak existují specifické přenašeče - tzv. transportní proteiny. V jaterních buňkách jsou zastoupeny dvě nadrodiny těchto proteinů, nadrodina SLC („Solute carrier“) a ABC („ATP-binding cassette“)(Obr. 4). Mají význam nejen v transportu látek endogenního původu, ale rovněž se významně podílí na transportu exogenních látek (25).

Transkripční faktory FXR („Farnesoid X receptor“), PXR („Pregnane X receptor“), CAR („Constitutive androstane receptor“) a PPAR- α („Peroxisome proliferator-activated receptor α “) se řadí mezi nukleární receptory, které hrají významnou úlohu jako transkripční faktory genů, kódujících membránové transportní proteiny. Obvykle jsou aktivovány žlučovými kyselinami nebo jinými endogenními molekulami či xenobiotiky. Aktivací FXR dochází ke zvýšení exprese transportních proteinů BSEP („Bile salt export pump“) a MRP2 („Multidrug resistance-associated protein 2“). PXR indukuje expresi

MRP2 a MDR1 („Multidrug resistance protein 1“). Aktivace CAR zvyšuje expresi MRP3 a MRP4 („Multidrug resistance-associated protein 3, 4“). Stimulace PPAR- α vede k expresi MDR3 („Multidrug resistance protein 3“) (25).



Obr. 4. Lokalizace jaterních transportních proteinů na membránách hepatocytu. Převzato a upraveno z (26).

3.1 SLC transportní proteiny

SLC („Solute carriers“) transportní proteiny jsou zastoupeny hojně v tkáních celého těla s významnou expresí v játrech, ledvinách a mozku. Zajišťují vychytávání látek ze sinusoidální plasmy. Zapojují se do přenosu převážně polárních a amfipatických organických sloučenin. Transport látek probíhá ve směru koncentračního gradientu. Jsou lokalizovány na bazolaterální membráně hepatocytů (27) (28).

3.1.1 NTCP (SLC10A1)

Konjugované žlučové kyseliny, které byly resorbovány ve střevě zpět do krve, se znovu dostávají do hepatocytu přes bazolaterální membránu ze sinusoidální krve pomocí NTCP („Na⁺ taurocholate cotransporting polypeptide“) transportéru. Mimo žlučových kyselin přenáší NTCP i hormony štítné žlázy (trijodtyronin, tyroxin), dehydroepiandrosteron či estron-3-sulfát (27).

3.1.2 OAT (SLC22A)

Pomocí OAT („Organic anion transporters“) jsou obousměrně přenášeny organické anionty endogenního i exogenního původu. Hlavní význam v játrech má OAT2. Ostatní členové jsou taktéž částečně lokalizovány v játrech, ale nemají v nich tak důležitou funkci jako v jiných tkáních (ledviny, plíce, mozková tkáň) (27).

3.1.2.1 OAT2 (SLC22A7)

Mezi substráty tohoto transportního proteinu patří z endogenních molekul např. prostaglandin E₂ či nukleosidové deriváty. OAT2 zajišťuje transport indometacinu, methotrexátu nebo salicylátů (29).

3.1.3 OATP (SLCO)

Rodina OATP („Organic anion-transporting polypeptides“) má velký význam při vychytávání některých léčiv. Například inhibitory HMG-CoA reduktázy (atorvastatin, rosuvastatin) používané při léčbě hypercholesterolemie, se dostávají do hepatocytu těmito transportéry:

- OATP1B1 (SLCO1B1)
- OATP1B3 (SLCO1B3)
- OATP2B1 (SLCO2B1) (27)

3.1.4 OCT (SLC22A)

Membránový přenos organických kationtů zajišťují OCT („Organic cation transporters“). Stejně jako přenašeče aniontů umožňují obousměrný transport. Na bazolaterální membráně jsou exprimovány OCT1 (SLC22A1) a OCT3 (SLC22A3). Z endogenních molekul OCT1 přenáší acetylcholin nebo progesteron. Z léčiv jsou pomocí

tohoto proteinu přenášeny např. metformin, desipramin či některá antivirotika (aciklovir, ritonavir) (27).

3.1.5 OST α/β (SLC51)

Jedná se o heterodimerní transportér. Přenos zprostředkovaný OST α/β („Organic solute transporter α/β “) je nezávislý na Na⁺ a saturovatelný. Mechanismem transportu je facilitovaná difúze, která umožňuje přenos substrátů oběma směry v závislosti na elektrochemickém gradientu. Mezi substráty transportního proteinu patří kromě sekundárních žlučových kyselin také estron-3-sulfát, prostaglandin E₂ či digoxin. Protein je lokalizován nejen v játrech, ale také v terminálním ileu, kde se v těsné spolupráci s transportérem ASBT („Apical sodium-dependent bile salt transporter“) podílí na enterohepatálním oběhu žlučových kyselin (30).

3.2 ABC transportní proteiny

Přenašeče rodiny ABC („ATP binding cassettes transporters“) jsou velké proteinové komplexy zabudované do membrány buňky. Jsou přítomny v celém organismu v četném zastoupení. Transport širokého spektra molekul zprostředkovávají za využití ATP. Jsou exprimovány hlavně v ledvinách, gastrointestinálním traktu a játrech. V tkáních jako jsou varlata, placenta nebo mozek mají protektivní funkci. Transportéry rodiny MRP (kromě MRP2) zprostředkovávají eflux na bazolaterální membráně. Ostatní ABC transportní proteiny uvedené v této kapitole jsou lokalizovány na kanalikulární membráně hepatocytu (27).

3.2.1 BSEP (ABCB11)

BSEP („Bile salt export pump“) je transportní protein zodpovědný za přenos žlučových kyselin v konjugované i nekonjugované formě do kanalikulárního prostoru (25). Tím ovlivňuje na žlučových kyselinách závislý tok žluče (18a). Sekundární žlučové kyseliny (konjugované formy) mají však k tomuto transportéru podstatně vyšší afinitu než primární (volné formy). Inhibice BSEP, vyvolána např. lékově (cyklosporin, rifamycin, rifampicin, glibenklamid), souvisí se sníženou sekrecí žlučových solí a v některých případech k rozvoji cholestázy (31) (32).

3.2.2 MRP (ABCC)

3.2.2.1 *MRP1 (ABCC1)*

Transportní protein MRP1 („Multidrug resistance-associated protein 1“) je v lidském organismu přítomen prakticky ve všech tkáních. V játrech je exprimován ve snížené míře, avšak při cholestatickém poškození pro zvýšení regenerace jater se jeho exprese zvyšuje. Je lokalizován na bazolaterální membráně hepatocytů, kde se podílí na efluxu xenobiotik (např. doxorubicin, daunorubicin, vinkristin) či endogenních látek (např. leukotrien C₄, konjugáty glutathionu). Velký význam má při ochraně tkání před xenobiotiky, s čím souvisí i problematika efluxu cytostatik v nádorových buňkách při terapii a následná snížená akumulace léčiva nutná pro správný terapeutický efekt (25) (33).

3.2.2.2 *MRP2 (ABCC2)*

Na rozdíl od ostatních membránových proteinů rodiny MRP, je MRP2 („Multidrug resistance-associated protein 2“) lokalizován na kanalikulární membráně hepatocytu a přenáší tak sloučeniny do žluči. Mezi jeho substráty patří především glutathion, čímž ovlivňuje na žlučových kyselinách nezávislý tok žluče (34). Dále se mezi substráty MRP2 řadí např. leukotrien C₄ nebo bilirubin-glukuronid (35).

3.2.2.3 *MRP3 (ABCC3)*

Ve zdravých játrech je exprese MRP3 („Multidrug resistance-associated protein 3“) snížena, ale při cholestáze je exprimován mohutněji. Kromě bazolaterální membrány hepatocytů je lokalizován i na bazolaterální membráně střevního epitelu a cholangiocytů. Má majoritní podíl na efluxu konjugovaných žlučových kyselin z portálního oběhu (33).

3.2.2.4 *MRP4 (ABCC4)*

MRP4 („Multidrug resistance-associated protein 4“) zprostředkovává transport 3',5'-cyklických nukleotidů, konkrétně cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) a cGMP (cyklický guanosinmonofosfát) (25). Také transportuje konjugáty žlučových kyselin (34).

3.2.3 MDR (ABCB)

3.2.3.1 MDR1 (ABCB1)

Tento nejvíce prozkoumaný transportér přenáší primárně hydrofobní kationty. Mezi typické substráty MDR1 („Multidrug resistance protein 1“; P-glykoprotein) patří protinádorová léčiva (např. paclitaxel, vinblastin, vinkristin a další), opioidy (např. methadon, morfin) a celá řada dalších léčiv (25). Významnou mírou se podílí na rezistenci nádorových buněk vůči chemoterapeutikům (36).

3.2.3.2 MDR3 (ABCB4)

MDR3 („Multidrug resistance protein 3“) je exportní pumpa fosfolipidů s lokalizací na kanalikulární membráně hepatocytu (33). Transportér Mdr2 je jeho homolog u potkanů.

3.2.4 BCRP (ABCG2)

Kromě kanalikulární membrány hepatocytu je BCRP („Breast cancer resistance protein“) lokalizován též v placentě, tenkém střevě, v prsní tkáni a dalších tkáních. Jedná se o transportér, který zajišťuje eflux lipofilních látek ven z buňky. Má velký význam v rezistenci nádorových buněk vůči léčivům (např. doxorubicin, metotrexát, topotekan). V játrech zajišťuje BCRP transport steroidních sulfátů a xenobiotik do žluči (25) (37).

4 ŽLUČ

Tvorba a vylučování žluče patří mezi nejvýznamnější funkce jater. Je nezbytná při trávení a vstřebávání tuků a exkreci látek, které nejsou vyloučeny ledvinami (18a). Po tvorbě žluče v hepatocytech a její úpravě ve žlučových vývodech se žluč dostává do žlučníku (*vesica fellea*), kde je skladována a zahušťována. Následně je ze žlučníku transportována do duodena (38).

4.1 Žlučové cesty (intrahepatální a extrahepatální)

Tok žluče začíná její aktivní sekrecí z hepatocytů do drobných žlučových kapilár (*canaliculi biliferi*) mezi dvěma jaterními buňkami. Tyto kapiláry představují intralobulární start vývodního systému žlučovodů (19). Žluč teče odstředivým směrem do Heringových kanálek na periferii jaterních lalůček. Tyto kanálky jsou vystlány jednovrstevným kubickým epitelem. V tomto místě se žluč dostává z jaterního lalůčku do portobilárního prostoru, následně do interlobulárních žlučovodů (*ductuli biliferi interlobularis*), kterých větve se spojují do větších jaterních žlučovodů (*ductus hepaticus dexter et sinister*), které opouštějí játra a mění se tak na extrahepatální žlučové cesty. Oba jaterní žlučovody se spojují v jeden společný jaterní žlučovod (*ductus hepaticus communis*) (18b).

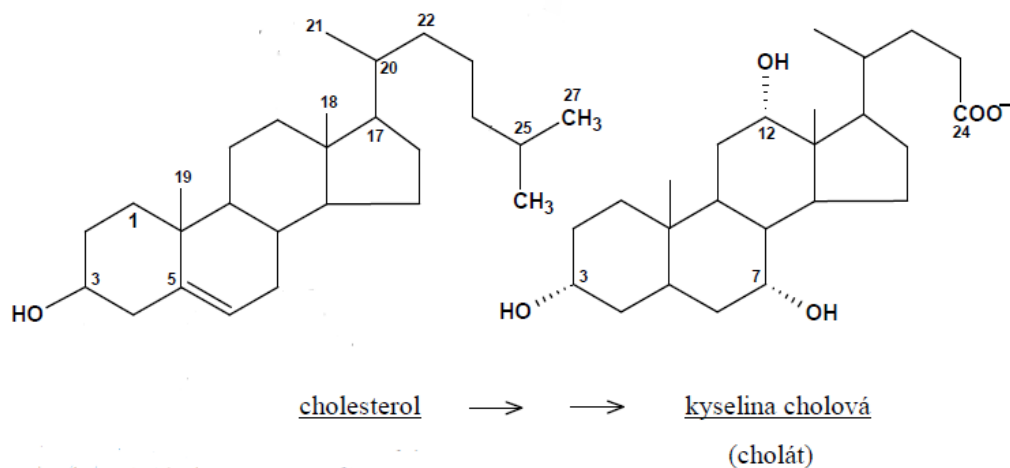
4.2 Složení a tvorba žluče

Hlavní podíl ve žluči tvoří voda. Mezi stálé pevné složky žluči patří žlučové kyseliny, fosfolipidy, mastné kyseliny, bilirubin, cholesterol, glutathion, stopové proteiny a elektrolyty (18a).

Sekrece žluči je osmotický proces řízený aktivní exkrecí žlučových kyselin a dalších organických solutů z hepatocytů do žlučových kapilár následovanou pasivním přítokem vody a elektrolytů přes těsné spoje („tight junctions“) (33). To znamená, že sekrece žluči je závislá na žlučových kyselinách („bile salt-dependent bile flow“) nebo nezávislá na žlučových kyselinách („bile salt-independent bile flow“) (34). Transport žlučových kyselin z hepatocytu přes kanalikulární membránu do žluči je zprostředkován transportérem BSEP (18a) (25). Méně významná je sekrece žluči nezávislá na žlučových kyselinách, kde osmotickou hnací sílu poskytují jiné organické látky (např. glutathion), ty jsou transportovány do žluči pomocí MRP2 (18a).

Tvorba žlučových kyselin patří mezi procesy, jimiž organismus eliminuje cholesterol. Žlučové kyseliny však nejsou jen odpadní produkty, ale jsou také důležité při procesu trávení lipidů v tenkém střevě. Zlepšují absorpci tuků jejich emulgací. Důležitou roli mají žlučové kyseliny i u vstřebávání vitamínů rozpustných v tucích (39).

Jak již bylo zmíněno výše, prekurzorem žlučových kyselin je cholesterol. Cholesterol prochází při své degradaci na žlučovou kyselinu několikanásobnou hydroxylací. Tyto procesy jsou katalyzovány mikrozomální cholesterol-7 α -hydroxylázou (CYP7A1) (18a) (39). Aktivita tohoto enzymu je regulována mechanismem zpětné vazby, kdy žlučové kyseliny po zpětné absorpci ve střevě a průchodu enterohepatální cirkulací znovu vstupují do jater (21a).



Obr. 5. Molekulové schéma vzniku kyseliny cholové z cholesterolu. Převzato a upraveno z (39).

Z cholesterolu vznikají v lidských jaterních buňkách dvě primární žlučové kyseliny. Kyselina cholová (3 α , 7 α , 12 α -trihydroxyderivát) a kyselina chenodeoxycholová (3 α , 7 α -dihydroxyderivát) (Obr. 5) (39).

Po syntéze žlučových kyselin dochází k jejich konjugaci s glycinem či taurinem a následně k jejich exkreci do žluče. Soli žlučových kyselin mají amfifilní charakter a jsou schopné tvořit s látkami tukové povahy micely (18a) (21b). Uvnitř micelárního útvaru mohou hromadit další lipofilní látky jako je cholesterol, fosfolipidy (lecitin), mastné kyseliny nebo vitamíny rozpustné v tucích (38).

Po transportu žluči do střeva se část primárních žlučových kyselin v ileu absorbuje zpět a pomocí enterohepatálního oběhu se dostává opět do jater. Absorpce zpět do oběhu probíhá v terminálním ileu pomocí kotransportu se sodíkem (18a).

Část žlučových kyselin setrvává ve střevě a pomocí enzymů anaerobních bakterií, které z polohy 7 α odštěpují -OH skupinu, se z nich stávají sekundární žlučové kyseliny. Z kyseliny cholové vzniká kyselina deoxycholová a z kyseliny chenodeoxycholové pak lithocholová (39). 7 α -dehydrogenací a oxidací kyseliny chenodeoxycholové vzniká kyselina ketolithocholová. První dvě zmíněné sekundární žlučové kyseliny se konjugují s glycinem a taurinem. Žluč tak obsahuje jak primární, tak sekundární žlučové kyseliny (21b).

V játrech se po aktivní sekreci z hepatocytů a další modifikaci v intrahepatálních a extrahepatálních cestách získává tzv. jaterní žluč, které se denně vytvoří kolem 0,9 litru. Přibližně polovina je odvedena do žlučníku, kde dochází k jejímu zahuštění (39). Během několika hodin dochází ve žlučníku k resorpci až 90 % vody. Tato resorpce je zprostředkována Na⁺/K⁺-ATPázou. Dále zde dochází k úpravě pH. Výměnou H⁺ za Na⁺ klesá pH žluči z 8,2 na 6,5 (40).

Výsledná žluč, která vytéká do duodena, je směsí jaterní žluči a koncentrované žluči ze žlučníku. Denně se jí vytvoří asi 0,5 litru (18a).

5 RESVERATROL

5.1 Výskyt

První zmínka o resveratrolu pochází z roku 1940, kdy byl izolován z kořenové části Kýchavice velkokvěté (*Veratrum grandiflorum* Loes.fil.) pocházející z Číny (41). Později byl resveratrol nalezen i v Křídlatce japonské (*Polygonum cuspidatum*), rostlině hojně využívané v tradiční čínské a japonské medicíně (42). Do dnešní doby byl resveratrol nalezen ve více než 300 rostlinách, přičemž řada z nich je součástí běžné lidské stravy. Patří mezi ně rostliny bobulovité včetně vinné révy, borůvky nebo kakaa, některé ořechy, zelenina a ovoce (1).

V osmdesátých letech minulého století bylo věnováno více pozornosti izolaci resveratrolu z Révy vinné (*Vitis vinifera* L.) a byly tak získány ucelenější poznatky o této sloučenině (43). Nejvyšší koncentraci resveratrolu obsahují slupky červených hroznů. Nižší koncentrace látky se nachází v červeném víně a ve víně bílém. Konkrétní koncentrace volného resveratrolu ve vybraných rostlinách ukazuje Tab. 1 (1).

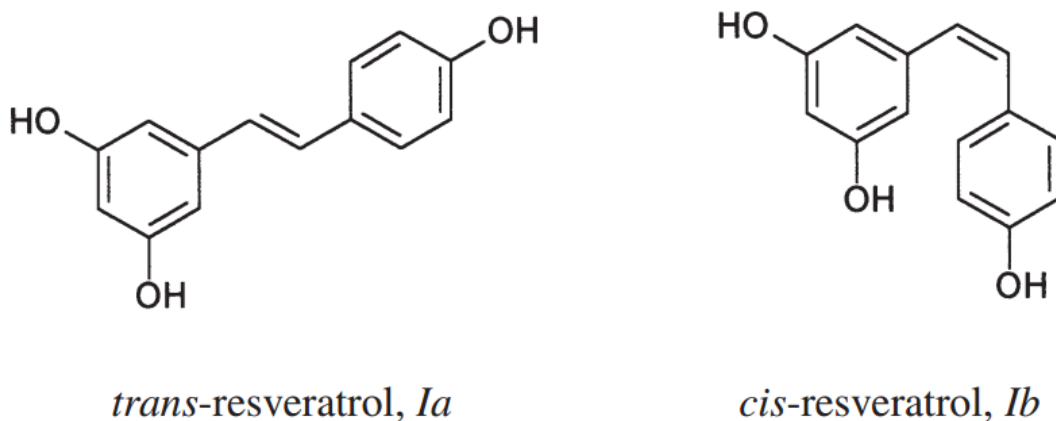
Tab. 1. Koncentrace resveratrolu ve vybraných jedlých rostlinách. Převzato a upraveno z (1).

Rostlina	Latinský název (čeleď)	Resveratrol (mg/kg)
Réva vinná (červené víno)	<i>Vitis vinifera</i> L. (Vitaceae)	2-6 (mg/l)
(bílé víno)		0,2-0,6 (mg/l)
Kapusta růžičková	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gemmifera</i> (Brassicaceae)	2,6
Zelí červené	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata convar. rubra</i> (Brassicaceae)	2,4
Podzemnice olejná (burské oříšky)	<i>Arachis hypogaea</i> L. (Fabaceae)	1,9
Řepa červená	<i>Beta vulgaris</i> L. (Chenopodiaceae)	1,8
Brokolice	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> (Brassicaceae)	1,8
Cibule žlutá	<i>Allium cepa</i> L. (Liliaceae)	1,5
Cibule červená	<i>Allium cepa</i> L. (Liliaceae)	1,1

5.2 Chemická struktura a vlastnosti

Systematický název sloučeniny je 3,4',5 – trihydroxystilben (Obr. 6). V rostlině se vyskytuje v podobě dvou geometrických izomerů (cis a trans), přičemž převažující a také více studovaný je trans-izomer, jelikož je stabilnější (44). Látka se v rostlinném materiálu objevuje také v podobě glukosidů, přičemž glukosový zbytek je vázán v poloze 3 (piceid) nebo v poloze 4' (resveratrolsid). Resveratrol je v rostlinném těle také součástí větších molekul oligomerů neboli tzv. konstitutivních stilbenů. Přesněji se jedná o dimery a trimery (viniferiny, amurensiny apod.) (1).

Fytoalexiny jsou sekundární metabolity rostlin, které se v rostlinném těle syntetizují ve značně zvýšené míře při ohrožení organismu (1). Stimulem může být například narušení povrchu rostliny mechanickým vlivem či UV zářením nebo atak patogenními mikroorganismy. Fytoalexiny se syntetizují a kumulují v oblastech stresu jako součást obranné reakce rostlinného organismu (1) (45). Resveratrol patří mezi základní fytoalexiny patogenní infekce. Musí však být přítomen ve vysoké koncentraci, aby byl zajištěn plný antifungální účinek (46).



Obr. 6. Molekuly resveratrolu v trans a cis uspořádání. Převzato z (1).

5.3 Účinky v organismu

Resveratrol je jednou z nejvíce prostudovaných molekul červeného vína (47). V srpnu roku 2010 proběhla v dánském městě Helsingør 1. světová konference shrnující dosavadní poznatky o resveratrolu („1st International Conference on Resveratrol and Health“) (48).

Resveratrol vstoupil do povědomí světa na počátku 90. let minulého století, kdy francouzský vědec Serge Renaud představil svůj poznatek tzv. francouzského paradoxu. Ve své studii zaznamenal skutečnost, že lidé žijící v severní Francii trpí méně často akutní srdeční ischemií, navzdory vysokému příjmu tuků v potravě. Tento fakt spojil s tamní častou konzumací červeného vína, kde je vysoký obsah resveratrolu. Spojením souvislostí dospěl k závěru, že právě resveratrol má významné účinky na kardiovaskulární systém (2).

5.3.1 Farmakokinetické vlastnosti

Dle chemické struktury je resveratrol málo rozpustný ve vodě ($<0.05\text{mg/ml}$), což má vliv na jeho absorpci. Je rozpustný v organických rozpouštědlech (např. ethanol). Jeho molekula má schopnost tvořit široké spektrum organických molekulárních komplexů a reakcí hydroxylových skupin s alifatickými molekulami lze zvýšit jeho buněčnou absorpci bez ztráty účinku (47).

V gastrointestinálním traktu je resveratrol absorbován ve střevě pomocí pasivní difúze či tvorbou komplexů s membránovými přenašeči. V krevním řečišti se může resveratrol vyskytovat ve třech formách. Jako volná molekula, ve formě glukuronidu nebo sulfátu. Volná forma resveratrolu může být vázána na albumin nebo plazmatické lipoproteiny (např. LDL). Tyto komplexy jsou před vstupem přes buněčnou membránu disociovány a volná molekula resveratrolu následně vstupuje do buňky sama (47).

V játrech je resveratrol metabolizován UDP-glukuronyltransferázou a sulfotransferázou. Výsledné produkty jsou konjugované glukuronidy a sulfáty, jež jsou vylučovány do žluče, následně do střeva a enterohepatálním oběhem se mohou dostat znovu do jater. Vzhledem k rychlému metabolismu resveratrolu jsou jeho metabolity v plazmě přítomny v daleko vyšší koncentraci než volný resveratrol. Díky β -glukuronidázám (51) si však zanechávají určitou biologickou aktivitu (49). Produkty látkové přeměny resveratrolu se vylučují do moči a stolice (50).

Farmakokinetické studie v klinické a preklinické praxi vykazují interindividuální rozdíly v biologické dostupnosti resveratrolu. Bylo zjištěno, že k této rozdílnosti významně přispívá úloha střevní mikroflóry. Studie na laboratorních potkanech popisuje, že orálně aplikovaný resveratrol má biodostupnost 20 % (52), zatímco v klinické studii se popisuje 75 % absorpce, ale následně velice nízká biodostupnost pod 1 % (53). Obecně má resveratrol nízkou biodostupnost kvůli jeho rychlému metabolismu na glukuronidy a sulfáty (50). Průměrné eliminační poločasy činí 130 min u laboratorních potkanů a 180 minut u lidí (54). Srovnání dostupnosti po jednotlivém podání a čtrnáctidenním podávání neukázalo, že by byla absorpce limitována saturací (54). U vysokých dávek (5 g) došlo po opakovaném podávání po dobu 29 dnů k signifikantní kumulaci metabolitů v plazmě oproti jednorázové dávce (55).

Vzhledem k širokému spektru a vícenásobnému mechanismu účinku resveratrolu není stále stanovena konkrétní účinná dávka. Obvyklé dávky, které byly použity ve studiích, jsou v rozmezí 0,1 - 1000 mg/kg (54). Ve studii, kde byla potkanům podávána vysoká koncentrace resveratrolu (3000 mg/kg) po čtyři týdny, byla zaznamenána renální toxicita (56). V klinické praxi je resveratrol považován za velmi dobře tolerovanou látku, avšak v opakovaných dávkách 2,5 g nebo 5 g již po 2-4 dnech způsoboval u zdravých dobrovolníků gastrointestinální nežádoucí účinky (bolest břicha, nevolnost, průjem). Jako bezpečná dávka bez nežádoucích účinků byla v této studii stanovena dávka 1 g (55).

5.3.2 Resveratrol jako aktivátor AMPK a sirtuinů

AMPK (AMP-aktivovaná protein kináza) je enzym, který hraje roli v buněčném energetickém metabolismu. Vyskytuje se v buňkách jater, mozku nebo kosterního svalstva. Jeho aktivací dochází ke stimulaci β -oxidace, ketogeneze, inhibici syntézy cholesterolu, triacylglycerolů a dalších procesů souvisejících s lipidovým buněčným metabolismem (57). K aktivaci AMPK dochází prostřednictvím její fosforylace na p-AMPK. Při tom dojde k uvolnění velkého množství NAD^+ a předpokládaným mechanismem tak dojde k aktivaci sirtuinu 1 (58) (59).

Sirtuiny se řadí mezi enzymy s deacetylační funkcí a jejich aktivita závisí na NAD^+ , jedná se tedy o NAD^+ -dependentní deacetylázy. Rodina sirtuinů je zapojena do četných buněčných procesů (např. apoptóza, oprava DNA či genová represe) (60). Někteří zástupci sirtuinů jsou také spojeni s buněčným stárnutím a související dlouhověkostí jak

samotné buňky, tak celého organismu. U savců existují sirtuiny v sedmi různých izoformách (SIRT1-7). Exprese sirtuinů je indukována při sníženém příjmu živin, tzv. kalorické restrikci (54). Resveratrol je první objevená sloučenina, která je schopna napodobovat kalorickou restrikci stimulací sirtuinů, resp. sirtuinu 1 („Silent mating type information regulation 2 homolog“; SIRT1) (60).

Bylo pozorováno, že resveratrol může prodloužit život některých organismů, jako např. kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* mechanismem aktivace sirtuinů podobným kalorické restrikci (61). V klinické praxi zatím studie tohoto typu nebyly provedeny, nicméně účinek resveratrolu v souvislosti s aktivací sirtuinů se projevuje v oblastech metabolismu, např. u diabetu či obezity. Ve studii Timmers a kol. bylo pozorováno, že po kontinuálním měsíčním podávání resveratrolu obézním mužům došlo k metabolickým změnám, které napodobují účinky kalorické restrikce. Snižoval se v jejich organismech obsah intrahepatálních lipidů, hladiny glukózy, triglyceridů, alaninaminotranferázy (ALT) a mediátorů zánětu v krevním oběhu (3). V pilotní studii resveratrolu (1000-2000 mg/den) užívaného staršími lidmi s porušenou glukózovou tolerancí došlo ke zlepšení inzulínové citlivosti a snížila se hodnota postprandiální glykémie (4).

Prostřednictvím aktivace SIRT1 resveratrol také snižuje neurodegeneraci, což má potenciální význam v léčbě a prevenci Alzheimerovy choroby, Amyotrofické laterální sklerózy a dalších neurodegenerativních chorob (5).

5.3.3 Antioxidační, protizánětlivá a protinádorová aktivita

Oxidační stres se podílí na patogenezi řady onemocnění, jako je diabetes, kardiovaskulární a neurodegenerativní choroby či nádorové onemocnění. Hraje důležitou roli i v procesu stárnutí. Jeho antioxidační aktivita byla stanovena při inkubaci s izolovanými mitochondriemi potkaních nervových buněk, kdy se ukázalo, že inhibuje mitochondriální respiraci. (6)

Studie zabývající se protinádorovým účinkem resveratrolu se věnovaly různým typům nádorového bujení. Byly provedeny studie rakoviny plic, jater, žaludku, prsu, kolorektálního karcinomu, rakoviny jícnu a další. Hlavním buněčným cílem se stal SIRT1, který zprostředkovává apoptózu buňky, avšak některá data ukazují, že disponuje signifikantní tumor-supresorovou aktivitou (7).

Výsledky mnohých studií ukazují, že resveratrol působí proti zvýšeným hladinám cytokinů (IL-1, IL-6, TNF- α) při zánětlivých procesech a také snižuje hladinu COX-2 (cyklooxygenáza-2) (62) (63) (64).

Řada studií se zabývala testováním resveratrolu jako fytoestrogenu (65) (66) (67) (68). Vzhledem k tomu, že je resveratrol schopný se vázat na estrogenové receptory (ER- α a ER- β), což vychází z jeho struktury, která je podobná 17- β -estradiolu či syntetickým estrogenům (diethylstilbestrol) (47).

5.3.4 Resveratrol a kardiovaskulární choroby

Resveratrol je významnou molekulou zkoumanou v oblasti kardiovaskulárních chorob. Jako jeden z prvních účinků v této oblasti byl hodnocen účinek protidestičkový ve studii Bertelli *et al.* (69). Potom se hodnotil mimo jiné vliv resveratrolu na hypertenzi, hladiny plazmatických lipoproteinů jako faktorů aterosklerózy (HDL („High density lipoprotein“), LDL („Low density lipoprotein“)) a na remodelaci srdečního svalů po akutní ischemické chorobě srdeční (stanovení hladiny ANP (Atriální natriuretický peptid)). Kardioprotektivní účinky jsou zprostředkovány skrz účinek na mediátory zánětu a endoteliální funkce (70).

Jako přímé i nepřímé molekulární cíle zprostředkovávající pozitivní účinky resveratrolu na kardiovaskulární choroby byly mimo jiné identifikovány SIRT1 a AMPK. Resveratrol zvyšuje expresi SIRT1 a AMPK (54).

5.3.5 Resveratrol a játra

Mezi klinické účinky resveratrolu na jaterní úrovni patří jeho antioxidační, protizánětlivý, antikarcinogenní a antifibrotický efekt společně se schopností modulovat lipidový metabolismus (49).

Podáváním resveratrolu v dávce 1000 mg/den po dobu čtyř týdnů zdravým dobrovolníkům se ukázalo, že resveratrol působí jako inhibitor některých izoenzymů cytochromu P-450, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 a CYP3A4. U jedinců s nízkou bazální aktivitou metabolických enzymů fáze II (resp. (UGT) UDP-glukuronyltransferáza a (GST) glutathion-S-transferáza) došlo ke zvýšení aktivity těchto enzymů (71).

5.3.5.1 *Resveratrol při oxidačním poškození jater*

Studie hodnotící účinek resveratrolu při uměle navozené obstrukční cholestáze u laboratorních potkanů a myší, prokázaly jeho antioxidační, antiproliferativní a antifibrotické účinky. Pro cholestázu je charakteristický zánět, který provází zvýšená proliferace epitelových buněk žlučových, jaterní fibróza a infiltrace neutrofilů.

Výsledky studií ukazují, že resveratrol snižuje plasmatické koncentrace biochemických markerů - bilirubinu, ALT (alaninaminotransferáza) a AST (aspartátaminotransferáza), jenž se při poškození jaterních buněk kumulují v plazmě. Vede také ke snížení koncentrace prozánětlivých cytokinů IL-1 α , IL-6 a TNF- α (9) (10).

V preklinické studii byl potkanům s navozenou obstrukční cholestázou vedoucí k oxidačnímu stresu podáván resveratrol (10 mg/kg/den, i.p.) po dobu 28 dní (9). V další preklinické studii, kde byl potkanům injekčně podáván ethanol k navození lipidové peroxidace, byl resveratrol zvířatům podáván (5000 mg/kg/den, p.o.) po dobu 6 týdnů (72). V obou studiích vedlo podávání resveratrolu ke snížení hladiny malondialdehydu (MAD), který je tvořen jako sekundární produkt oxidačního stresu a slouží jako marker peroxidace lipidů (9) (72).

Resveratrol podáván potkanům (10 mg/kg/den, i.p.) při oxidačním stresu po 28 dní naopak zvýšil hladiny glutathionu, což je důležitý buněčný antioxidant (9).

5.3.5.2 *Resveratrol u NAFLD*

NAFLD („Non-alcoholic fatty liver disease“) je onemocnění definované jako kumulace tuku v jaterní tkáni (> 5 % váhy jaterní tkáně na histologickém obrazu). Jedná se o spektrum patologických změn jaterní tkáně, do které se řadí prostá jaterní steatóza, nealkoholová steatohepatitida („Non-alcoholic steatohepatitis“; NASH), fibróza a cirhóza, která může vyústit až v hepatocelulární karcinom. Pro NAFLD je charakteristické ukládání triglyceridů (TAG) v hepatocytech, což zvyšuje jejich náchylnost k poškození a zánětu. Onemocnění obvykle progreduje, přičemž u NASH je již přítomen zánět (73). Terapeutické možnosti jsou zatím omezeny. Zahrnují především režimová opatření, léky snižující inzulinovou rezistenci (glitazony) nebo vitamín E. Alternativní léčebné možnosti jsou proto dále zkoumány (74).

Několik *in vivo* studií se věnovalo zkoumání účinku resveratrolu u NAFLD (11-15). Studie vycházely z předpokladu, že resveratrol má antioxidační a protizánětlivé účinky zprostředkované pomocí aktivace AMPK a SIRT1. V posledních letech bylo prokázáno, že je schopný zasahovat do lipidového metabolismu a snižuje hladiny TAG (75). Mezi předpokládané mechanismy, kterými resveratrol zasahuje do jaterního metabolismu tuků, patří právě aktivace AMPK a SIRT1.

Aktivace AMPK v játrech ukončuje anabolické procesy (např. syntéza cholesterolu a TAG) snižováním aktivity SREBP-1c a FAS. SREBP („Sterol regulatory element-binding protein“) je transkripční faktor, který je důležitý pro syntézu cholesterolu a mastných kyselin. FAS („Fatty acid synthase“) je enzym katalyzující syntézu mastných kyselin. Aktivace AMPK podporuje zároveň katabolické procesy (např. β -oxidaci mastných kyselin) inaktivací ACC („Acetyl-CoA carboxylase“) (76) (77) (78). SIRT1 se v játrech účastní kontroly energetického metabolismu pomocí deacetylace a aktivace jaderných receptorů (např. PPAR α). Společně s AMPK reguluje SREBP-1c a LXR („liver X receptor“, jaterní X receptor), které řídí metabolismus cholesterolu a lipidů (74).

Resveratrol zvyšuje expresi SIRT1 na úrovni proteinu i mRNA v jaterní tkáni (13) (16), zvyšuje aktivaci AMPK (14) (15) (16), snižuje expresi SREBP-1c a FAS (14) (16) a inhibuje ACC (12) (15) (16), čímž přispívá ke snížení TAG a lipidových depotů v játrech. Ukázalo se, že dlouhodobé (6 týdnů) podávání resveratrolu vede k chronické aktivaci AMPK a tudíž ke snížené kumulaci TAG v jaterní tkáni potkanů s uměle navozenou NAFLD (79).

V klinické studii s pacienty s NAFLD, bylo po p.o. podávání resveratrolu v dávce 500 mg/den po dobu 12 týdnů a úpravě životního stylu prokázáno významné snížení aktivity jaterní ALT, snížení koncentrace zánětlivých cytokinů a dalších faktorů jaterní steatózy (80).

6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zjištění účinku resveratrolu na tok žluče u zdravých jedinců a následné objasnění mechanismu tohoto děje.

7 METODIKA

7.1 Chemikálie

Trans-resveratrol byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA). Provozní materiál a ostatní chemikálie byly zakoupeny od firem Bio-Rad Laboratories (Herkules, CA, USA) a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

7.2 Pokusná zvířata

Při experimentu byli použiti laboratorní potkani – samci kmene Wistar (Konárovice, Česká republika) o hmotnosti 280 – 320 g. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin:

- **Kontrola** - kontrolní skupina, které byl podáván fyziologický roztok; n = 6
- **RES** - skupina s podáním resveratrolu v dávce 10 mg/kg, p.o.; n = 6

Fyziologický roztok (Kontrola) i resveratrol (RES) byly podávány po dobu 28 dní jedenkrát denně žaludeční sondou.

Po dobu celého experimentu byla laboratorní zvířata umístěna v Centrálním viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za definovaných podmínek (střídavý světelný režim 12 hodin světlo a 12 hodin tma, teplota vzduchu 22 ± 2 °C, dostatečný příjem potravy a vody). Veškeré experimenty byly provedeny v souladu s pokyny uvedenými ve vyhlášce č. 207/2004 Sb. o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat, potom co byly řádně schváleny etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

7.3 *In vivo* kinetická studie

V průběhu kinetické studie byla zvířata pod celkovou anestezií navozenou i.p. jednorázovým podáním pentobarbitalu (50 mg/kg). Zvířatům byl zakanylován žlučovod. Vzorky žluči byly sbírány do předem zvážených zkumavek ve 30 minutových intervalech (po 30, 60, 90 a 120 minutách). Umístěním zvířat na vyhřívaných deskách byla udržována jejich tělesná teplota na 37 °C. Zvířata byla v závěru experimentu usmrcena exsanguinací z břišní aorty. Játra byla vyjmuta a ihned zchlazena tekutým dusíkem. Vzorky jater i žluče byly následně uchovávány při teplotě -80 °C.

7.4 qRT-PCR

Pro stanovení genové exprese *Ntcp*, *Oatp1a1*, *Oatp1a4*, *Oatp1b2*, *Mrp3*, *Mrp4*, *Bsep* a *Mrp2* byla využita metoda qRT-PCR pomocí Applied Biosystems 7500 HT Fast Real-Time PCR systému (Life Technologies, Foster City, USA). Ze vzorků potkaních jater byla izolována RNA homogenizací v TRI reagentu (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA). Měření absorbance při 260 nm za použití NanoDrop ND-1000 spektrofotometru (BioTech a.s., ČR) byla stanovena přesná koncentrace RNA a také čistota RNA poměrem absorbance při 260 a 280 nm. Za použití High Capacity cDNA Reverse Transcription KITu (Life Technologies, Foster City, USA) byla RNA přepsána do cDNA. Reakční směs obsahovala 12,5 ng analyzované DNA. Každý vzorek byl amplifikován v triplikátech pomocí TaqMan® Fast Universal PCR Master Mixu a Taq-Man® Gene Expression Assay mixu pro jednotlivé geny – Tab. 2. Časově-teplotní profil použitý ve „fast“ modu byl: 95 °C po dobu 20 s; 40 cyklů: 95 °C po dobu 3 s, 60 °C po dobu 30 s. Poměr relativní exprese byl poté vypočítán podle (81):

$$R = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta C_{\text{target}}(\text{kontrola-vzorek})}}{E_{\text{housekeeping}}^{\Delta C_{\text{housekeeping}}(\text{kontrola-vzorek})}}$$

kde E_{target} a $E_{\text{housekeeping}}$ jsou hodnoty efektivity určené ze sklonu kalibrační křivky pro každý gen, ΔC_{target} a $\Delta C_{\text{housekeeping}}$ jsou rozdíly prahových hodnot (C_t) mezi kontrolními a RES vzorky pro každý z genů, tj. *Ntcp*, *Oatp1a1*, *Oatp1a4*, *Oatp1b2*, *Mrp3*, *Mrp4*, *Bsep* a *Mrp2*, a referenční gen (GAPDH).

Tab. 2 TaqMan® Gene Expression Assay kity (Life Technologies) použité pro kvantitativní real time RT-PCR.

Symbol genu	Transportér	Katalogové číslo Life Technologies
Slc10a1	Ntcp	Rn00566894_m1
Slco1a1	Oatp1a1	Rn00755148_m1
Slco1a4	Oatp1a4	Rn00756233_m1
Slco1b2	Oatp1b2	Rn00668623_m1
Abcc3	Mrp3	Rn01452854_m1
Abcc4	Mrp4	Rn01465702_m1
Abcb11	Bsep	Rn00582179_m1
Abcc2	Mrp2	Rn00563231_m1
Abcg2	Bcrp	Rn00710585_m1
Abcb4	Mdr2	Rn00562185_m1
Gapdh		4352338E

7.5 Western blot

Játra byla homogenizována ve vychlazeném Tri-sukrózovém pufru (10 mmol/l Tris-HCl, 250 mmol/l sukrózy, pH 7,6), který obsahoval inhibitory proteáz (0,5 mg/ml leupeptinu, 0,5 mg/ml pepstatinu, 2 mg/ml aprotininu, 50 mg/ml benzamidinu a 40 mg/ml fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF)) za pomoci Magna Lyseru (Roche Diagnostics GmbH, Německo) 2 x 30s při 6000 rpm. Peleta obohacené membránové frakce byla získána ze supernatantu po ultracentrifugaci (100 000 g, při 4 °C po 23 min). Následně byla peleta resuspendována v Tris-HCl pufru (50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4, inhibitory proteáz). Koncentrace proteinu byla stanovena BCA metodou (BCA Protein Assay Kit, Rockford, IL, U.S.A.) a vzorky byly uchovány při -80 °C až do analýzy. Vzorky byly inkubovány se vzorkovým pufrům (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) při pokojové teplotě po dobu 30 min. Následně byly proteiny separovány pomocí SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis) s použitím gelu o koncentraci 6,25 % (pro proteiny

o velikosti 150-200 kDa) a gelu o koncentraci 7,5 % (pro proteiny o velikosti 50-80 kDa). Poté byly proteiny přeneseny na PVDF (polyvinylidenfluoridovou) membránu (Millipore, NY, USA). Po dobu jedné hodiny byla membrána ponořena v 5 % roztoku odtučněného mléka s TRIS pufrům (0,05 % Tween 20) (TBS-T), kdy byla nespecifická vazebná místa blokována laktoglobuliny. Membrány byly inkubovány s primární a sekundární protilátkou při pokojové teplotě po dobu 1 h v koncentracích uvedených v Tab. 3. Následně byla membrána promyta v roztoku TBS-T a pomocí chemiluminiscenčního činidla (ECL kit, Amerham-Pharmacia, Buckinghamshire, Velká Británie) byla provedena detekce. Expozicí filmu (Foma, Hradec Králové, Česká republika) byl získán obraz, který byl naskenován kalibrovaným denzitometrem ScanMaker i900 (UMAX, Praha, ČR) a následně kvantifikován pomocí softwaru QuantityOne 36 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Jako endogenní kontrola byla stanovena exprese β -aktinu.

Tab. 3 Primární a sekundární protilátky použité pro Western blotu

Protein	Velikost v kDa	Původ	Zředění	Zředění sekundární protilátky
Ntcp	51	Santa Cruz	1:300	1:3000
Oatp1a4	75	Millipore	1:5000	1:5000
Mrp3	180-190	Alexis	1:500	1:500
Mrp4	150	Abcam	1:1000	1:1000
Mrp2	170-180	Signet Laboratories	1:500	1:1000
Bsep	160	Santa Cruz	1:300	1:2000
Sirt1	120	Cell Signaling	1:1000	1:2000
p-AMPK α	62	Cell Signaling	1:1000	1:2000
β -aktin	42-45	Sigma	1:5000	1:5000

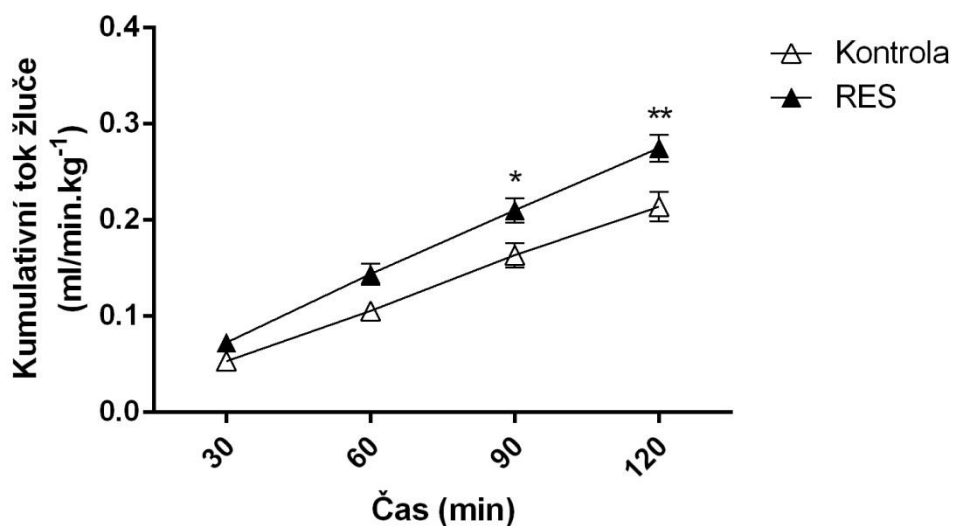
7.6 Statistická analýza dat

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

8 VÝSLEDKY

8.1 *In vivo* kinetická studie

Kumulativní tok žluče znázorňuje Obr. 7. Tok žluče byl hodnocen 24 h poté, co byla potkanům podána poslední dávka resveratrolu (RES) nebo fyziologického roztoku (Kontrola). Resveratrol vedl k signifikantnímu zvýšení kumulativního toku žluče, který byl sledován u potkanů po dobu 120 minut, což svědčí pro choleretický účinek dlouhodobě podávaného resveratrolu u zdravých potkanů.



Obr. 7. Časově závislé změny toku žluče. Data jsou vyjádřena jako průměry \pm SEM ($n = 6$ v každé skupině); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, v porovnání s Kontrolou.

8.2 qRT-PCR

Pro objasnění mechanismu odpovědného za pozorovaný účinek resveratrolu na tok žluče byly analyzovány hladiny mRNA u *Ntcp*, *Oatp1a1*, *Oatp1a4*, *Oatp1b2*, *Mrp3*, *Mrp4*, *Bsep* a *Mrp2* genů, které jsou odpovědné za tento proces. U zvířat, kterým byl podáván resveratrol, nedošlo k signifikantním změnám u žádného ze studovaných transportérů. To svědčí pro minimální vliv resveratrolu na transkripci uvedených drah v podávané dávce. mRNA expresi bazolaterálních a kanalikulárních transportních proteinů v játrech kontrolních potkanů a potkanů s resveratrolem znázorňuje Tab. 4.

Tab. 4. mRNA exprese bazolaterálních a kanalikulárních transportních proteinů v játrech kontrolních potkanů a potkanů s resveratrolem (RES).

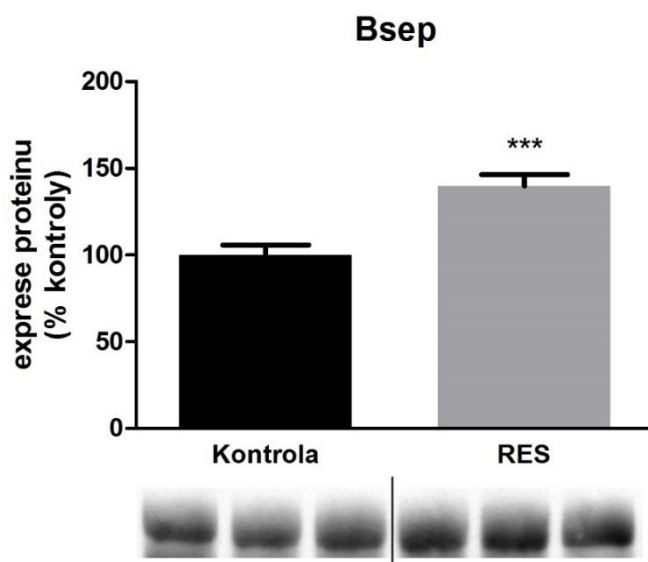
Cílový gen	Kontrola	RES
<i>Ntcp</i>	100 ± 12.4	127 ± 11
<i>Oatp1a1</i>	100 ± 7.9	99.7 ± 21.4
<i>Oatp1a4</i>	100 ± 13.0	99.9 ± 12.3
<i>Oatp1b2</i>	100 ± 18.0	100 ± 21.0
<i>Mrp3</i>	100 ± 11.0	146 ± 28.4
<i>Mrp4</i>	100 ± 11.8	96.4 ± 21.1
<i>Bsep</i>	100 ± 12.8	95.6 ± 15.3
<i>Mrp2</i>	100 ± 4.0	141 ± 26.9

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± SEM. (n = 6, v každé skupině).

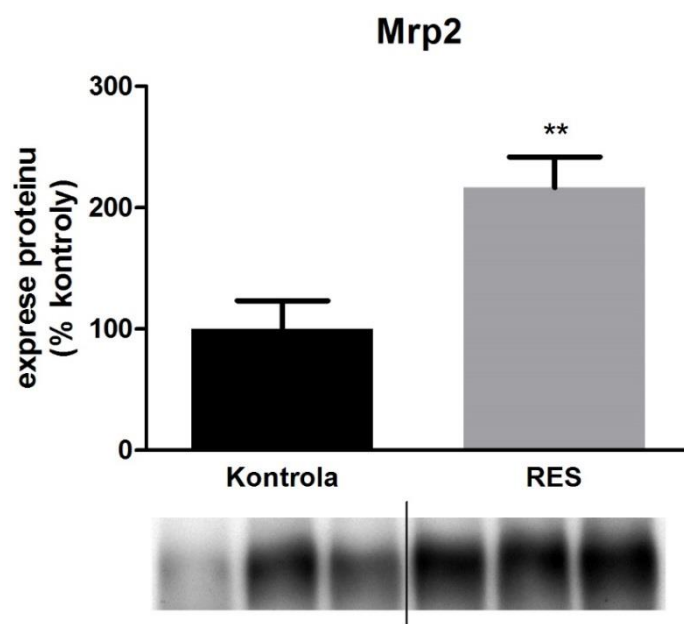
8.3 Western blot

Expres hlavních jaterních transportérů zodpovědných za tvorbu a vylučování žluče a Sirt1/AMPK cestu byla hodnocena metodou Western blot. Podávání resveratrolu signifikantně zvýšilo expresi jaterních ABC („ATP-binding cassette“) transportních proteinů Bsep (140 %, Obr. 8), Mrp2 (217 %, Obr. 9) a Mrp4 (181 %, Obr. 10). Expres Ntcp, Oatp1a4 a Mrp3 transportních proteinů nebyla změněna (Obr. 11, 12 a 13). Pro hodnocení vlivu resveratrolu v modulaci Sirt1/AMPK dráhy jako jeho hlavního mechanismu účinku v játrech byla hodnocena i expres Sirt1 a p-AMPK α proteinu. Resveratrol signifikantně zvýšil expresi obou proteinů - Sirt1 (138 %, Obr. 14) i p-AMPK α (122 %, Obr. 15). Potvrzení jednotné nanášky proteinů (β -aktin) znázorňuje Obr. 16.

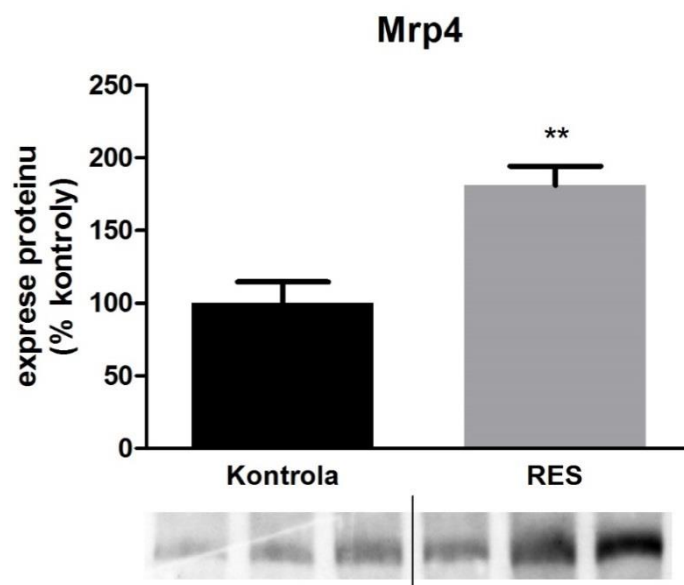
Hodnoty v obrázcích jsou vyjádřeny jako průměry \pm S.E.M. (n = 6, v každé skupině). Kontrola, kontrolní skupina potkanů; RES, skupina potkanů s resveratolem. Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Reprezentativní obrázky Western blotu jsou zobrazeny pod příslušnými grafy s denzitometrickou analýzou dat (kontrola = 100 %).



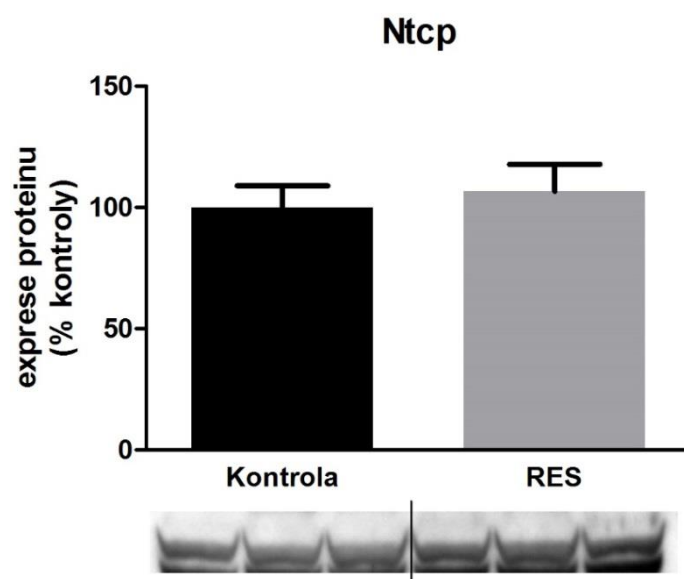
Obr. 8. Grafické znázornění výsledků Western blot analýzy Bsep transportéru.



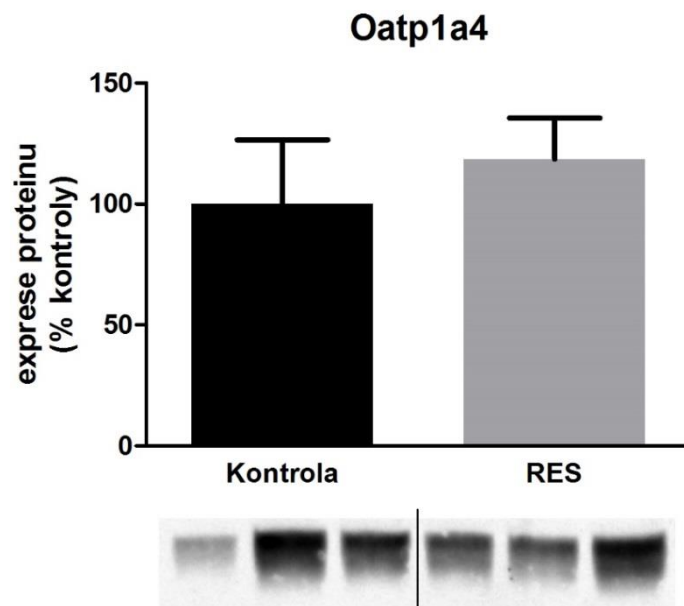
Obr. 9. Grafické znázornění výsledků Western blot analýzy Mrp2 transportéru.



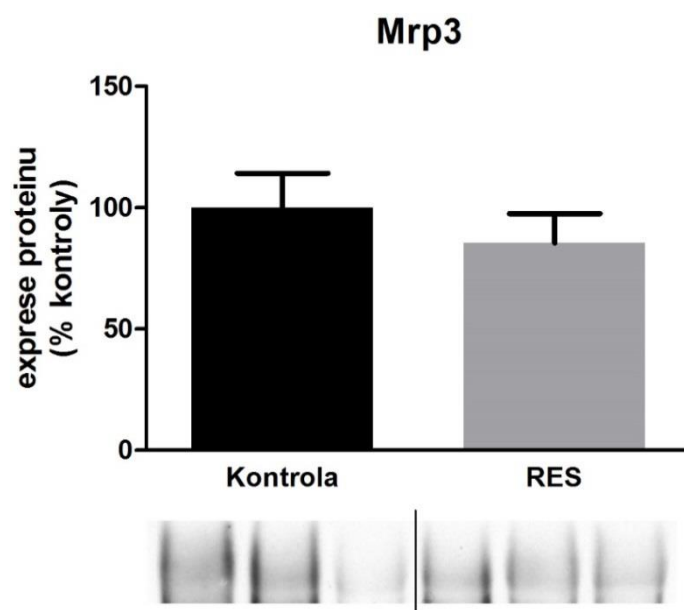
Obr. 10. Grafické znázornění výsledků Western blot analýzy Mrp4 transportéru.



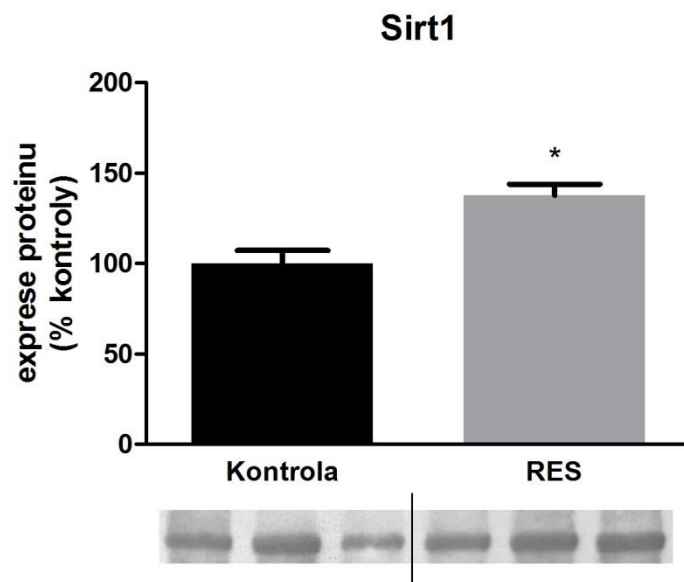
Obr. 11. Grafické znázornění výsledků Western blot analýzy Ntcp transportéru.



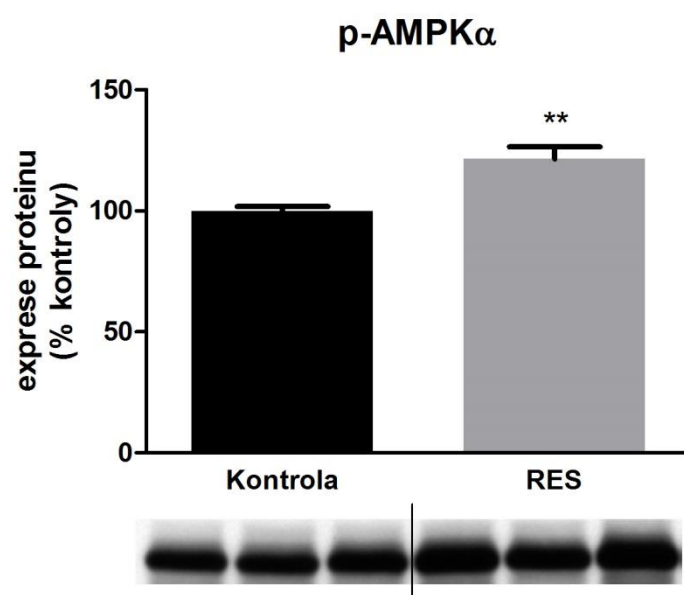
Obr. 12. Grafické znázornění výsledků Western blot analýzy Oatp1a4 transportéru.



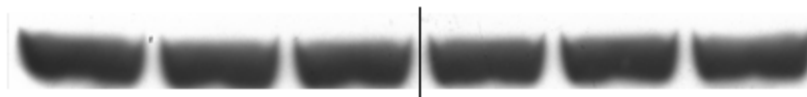
Obr. 13. Grafické znázornění výsledků Western blot analýzy Mrp3 transportéru.



Obr. 14. Grafické znázornění výsledků Western blot analýzy Sirt1 proteinu.



Obr. 15. Grafické znázornění výsledků Western blot analýzy p-AMPK α proteinu.



Obr. 16. Reprezentativní obrázek detekce β -aktinu.

9 DISKUZE

Resveratrol má v medicínské oblasti velký potenciál. Je velice rozšířený, přítomný ve snadno dostupných rostlinách (např. réva vinná, červené zelí, červená řepa). V klinické praxi je velmi dobře tolerovaný (1) (56). Jeho terapeutické využití je rozsáhlé, jelikož působí protektivně zejména při oxidačním stresu a zánětu, což jsou procesy, které jsou součástí patogeneze celé řady onemocnění včetně metabolických chorob či neurodegenerativních poruch. Slibné jsou jeho účinky i v oblasti hepatoprotekce (9) (10) (72). Mechanismy účinku resveratrolu však ještě nejsou zcela objasněny a vyžadují další zkoumání.

Mezi nejvýznamnější účinky resveratrolu patří jeho antioxidační a protizánětlivý účinek zprostředkovaný aktivací SIRT1 a p-AMPK (49) nebo schopnost modulovat lipidový metabolismus. Cesty, kterými resveratrol řídí metabolismus tuků, zatím nejsou zcela známé, nicméně se předpokládá aktivace AMPK/SIRT1 signalizační kaskády, která interaguje s nukleárními receptory (LXR, PXR, CAR) (82) (83) a dalšími cíli (SREBP-1c, FAS apod.) (74). Aktivací těchto drah tak dochází k potlačení anabolických procesů a naopak k podpoření katabolických pochodů (např. β -oxidace mastných kyselin, syntéza žlučových kyselin apod.) (76) (77) (78).

Z výsledků této studie vyplývá, že resveratrol zvýšil kumulativní tok žluče u zdravých potkanů. Tok žluče je osmotický proces, který je řízen transportem žlučových kyselin (tok závislý na žlučových kyselinách) či jiných organických látek, často glutathionu (tok nezávislý na žlučových kyselinách), následovaný pasivním přestupem vody a elektrolytů dle koncentračního spádu (18a) (34). Choleretický účinek resveratrolu je způsoben indukci kanikulárních efluxních transportérů Bsep a Mrp2, které jsou zodpovědné za tok žluče závislý resp. nezávislý na žlučových kyselinách.

Autoři Misra *et al.* 2003 a Perez *et al.* 2006 popisují, že zvýšená koncentrace cAMP a aktivace proteinkinázy A podporuje umístění a stabilizaci Bsep a Mrp2 na kanikulární membráně hepatocytů (84) (85). Resveratrol zvyšuje koncentraci cAMP aktivací AMPK/SIRT1 signalizační kaskády, což je v současnosti považováno za jeden z hlavních hepatoprotektivních mechanismů této látky (86). Lze předpokládat, že aktivace této kaskády je také důležitá pro pozorovaný účinek resveratrolu na transportní proteiny a tvorbu žluče u zdravých potkanů.

Resveratrol vedl také ke zvýšení exprese bazolaterálního transportéru Mrp4, který zajišťuje přenos žlučových kyselin zpět do krve a podílí se tak na homeostáze žlučových kyselin v hepatocytu. Zvýšená exprese právě tohoto transportéru a dalších (např. Bsep) může poukazovat na zvýšenou koncentraci žlučových kyselin v hepatocytu, tedy zvýšenou tvorbu žlučových kyselin prostřednictvím Cyp7a1 (cholesterol-7 α -hydroxyláza), čímž dochází ke zvýšené degradaci cholesterolu. Resveratrol by mohl tak svým účinkem ovlivňovat i metabolismus cholesterolu (74) (17).

Žlučové kyseliny působí jako agonisté nukleárních receptorů (FXR, PXR, CAR) a prostřednictvím těchto receptorů mohou ovlivňovat expresi membránových transportních proteinů. Obvykle tak regulují expresi jaterních transportérů jako kompenzační mechanismus během patologických stavů (např. intrahepatální a extrahepatální cholestáza) (25) (87), čímž zajišťují transport žlučových kyselin z hepatocytu. Aktivací FXR dochází také k inhibici Cyp7a1 a tím k supresi syntézy žlučových kyselin (87).

Je důležité též zmínit, že nukleární receptory fungují jako transkripční faktory a ovlivňují expresi membránových transportérů na úrovni transkripce. Analýza qRT-PCR v naší studii však signifikantní změny exprese mRNA nezaznamenala. Zvýšená exprese transportérů Bsep, Mrp2 a Mrp4 na úrovni proteinu u zdravých potkanů je tedy indukována posttranskripčně.

Souhrnně lze říci, že choleretický účinek resveratrolu je u zdravých potkanů způsobem zvýšenou expesí obou kanalikulárních transportních proteinů limitujících rychlost toku žluče, tj. Bsep, který je zodpovědný za tok žluče závislý na žlučových kyselinách a Mrp2, který je zodpovědný za tok žluče nezávislý na žlučových kyselinách. Resveratrol ovlivňuje tok žluče důsledkem aktivace AMPK/SIRT1 signalizační kaskády, jak potvrdila Western blot analýza, při které byla pozorována zvýšená exprese pAMPK α a Sirt1 proteinu.

10 ZÁVĚR

Diplomové práce se zabývala vlivem resveratrolu na tok žluče u zdravých potkanů s následným objasněním mechanismu tohoto děje.

In vivo kinetická studie prokázala choleretický účinek resveratrolu, protože látka vedla ke zvýšení kumulativního toku žluče.

Následně byl objasňován mechanismus tohoto efektu na molekulární úrovni, kdy byla zjišťována exprese jaterních transportních proteinů, které jsou odpovědné za tvorbu a sekreci žluče na úrovni mRNA a proteinu. Výsledky ukázaly, že resveratrol vedl ke zvýšené expresi transportérů Bsep, Mrp2 a Mrp4 na úrovni proteinu.

Závěrem lze konstatovat, že orálně podaný resveratrol zvyšuje tok žluče u zdravých potkanů jako důsledek zvýšené exprese kanalikulárních transportních proteinů.

11 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABC	„ATP binding cassette“
ACC	„Acetyl-CoA carboxylase“
ALT	Alaninaminotransferáza
AMPK	AMP-aktivovaná protein kináza
AST	Aspartátaminotransferáza
ATP	Adenosintrifosfát
BCRP	„Breast cancer resistance protein“
BSEP	„Bile salt export pump“
FXR	„Farnesoid X receptor“
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CAR	„Constitutive androstane receptor“
CYP	Isoformy cytochromu P450
Cyp7a1	Cholesterol-7 α -hydroxyláza
FAS	„Fatty acid synthase“
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
LDL	„Low density lipoprotein“
LXR	„Liver X receptor“
MDR	„Multidrug resistance protein“
MRP	„Multidrug resistance-associated proteins“
NAFLD	„Non-alcoholic fatty liver disease“
NASH	„Non-alcoholic steatohepatitis“

NTCP	„Na ⁺ -taurocholate cotransporting polypeptide“
OAT	„Organic anion transporter“
OATP	„Organic anion transporting polypeptide“
OCT	„Organic cation transporter“
OST α/β	„Organic solute transporter α/β “
PPAR- α	„Peroxisome proliferator-activated receptor α “
PXR	„Pregnane X receptor“
RT-PCR	„Reverse transcriptase-polymerase chain reaction“
SIRT1	„Silent mating type information regulation 2 homolog“
SLC	„Solute carrier“
SREBP	„Sterol regulatory element-binding protein“
TAG	Triacylglycerol, triglycerid
TNF- α	„Tumor necrosis factor α “

Poznámka

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

12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) ŠMIDRKAL, J., FILIP, V., MELZUCH, K., HANZLÍKOVÁ, I., BUCKIOVÁ, D., KRÍŠA, B. Resveratrol. *Chem. Listy* 95. 2001, s. 602-609.
- (2) RENAUD, S., DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*. 1992, roč. 339, č. 8808, s. 1523–1526.
- (3) TIMMERS, S., KONINGS, E., BILET, L. *et al.* Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metabolism*. 2011, roč. 14, č. 5, s. 612–622.
- (4) CRANDALL, J. P., ORAM, V., TRAFIRESCU, G., REID, M., KISHORE, P., HAWKINS, M., COHEN, H. W., BARZILAI, N. Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2012, roč. 67, č. 12, s. 1307–1312.
- (5) KIM, D., NGUYEN, M. D., DOBBIN, M. M., FISCHER, A., SANANBENESI, F., RODGERS, J. T., DELALLE, I., BAUR, J. A., SUI, G., ARMOUR, S. M., PUIGSERVER, P., SINCLAIR, D. A., TSAI, L. H. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *The EMBO Journal*. 2007, roč. 26, č. 13, s. 3169–3179.
- (6) ZINI, R., MORIN, C., BERTELLI, A., BERTELLI, A. A., TILLEMENT, J. P. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs under Experimental and Clinical Research*. 1999, roč. 25, č. 2-3, s. 87–97.
- (7) HAN, G., XIA, J., GAO, J., INAGAKI, Y., TANG, W., KOKUDO, N. Anti-tumor effects and cellular mechanisms of resveratrol. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 2015, roč. 9, č. 1, s. 1-12.
- (8) CAMPAGNA, M., RIVAS, C. Antiviral activity of resveratrol. *Biochemical Society Transactions*. 2010, roč. 38, č. 1, s. 50-53.
- (9) ARA, C., KIRIMLIOGLU, H., KARABULUT, A. B., COBAN, S., AY, S., HARPUTLUOGLU, M., KIRIMLIOGLU, V., YILMAZ, S. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in cholestasis. *Journal of Surgical Research*. 2005, roč. 127, č. 2, s. 112-117.

- (10) CHAN, C.-C., CHENG, L. Y., LIN, C. L., HUANG, Y. H., LIN, H. C., LEE, F. Y. The protective role of natural phytoalexin resveratrol on inflammation, fibrosis and regeneration in cholestatic liver injury. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011, roč. 55, č. 12, s. 1841-1849.
- (11) AHN, J., CHO, I., KIM, S., KWON, D., HA, T. Dietary resveratrol alters lipid metabolism-related gene expression of mice on an atherogenic diet. *Journal of Hepatology*. 2008, roč. 49, č. 6, s. 1019-1028.
- (12) GAO, M., LIU, D. Resveratrol suppresses T0901317-induced hepatic fat accumulation in mice. *The AAPS journal*. 2013, roč. 15, č. 3, s. 744-752.
- (13) TAURIAINEN, E., LUOSTARINEN, M., MARTONEN, E., FINCKENBERG, P., KOVALAINEN, M., HUOTARI, A., HERZIG, K.-H., LECKLIN, A., MERVAALA, E. Distinct effects of calorie restriction and resveratrol on diet-induced obesity and fatty liver formation. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2011, ID 525094.
- (14) SHANG, J., CHEN, L. L., XIAO, F. X., SUN, H., DING, H. C., XIAO, H. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2008, roč. 29, č. 6, s. 698-706.
- (15) RIVERA, L., MORÓN, R., ZARZUELO, A., GALISTEO, M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochemical Pharmacology*. 2009, roč. 77, č. 6, s. 1053-1063.
- (16) AJMO, J. M., LIANG, X., ROGERS, C. Q., PENNOCK, B., YOU, M. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008, roč. 295, č. 4, s. G833-G842.
- (17) WANG, T., ZHOU, Z.-X., SUN, L.-X., LI, X., XU, Z.-M., CHEN, M., ZHAO, G.-L., JIANG, Z.-Z., ZHANG, L.-Y. Resveratrol effectively attenuates α -naphthylisothiocyanate-induced acute cholestasis and liver injury through choleric and anti-inflammatory mechanisms. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2014, roč. 35, č. 12, 1527-1536.
- (18a) EHRMANN, J., HŮLEK P. a kol. Funkce jater. *Hepatologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, s. 25-36, ISBN 8024731185.

- (18b) EHRMANN, J., HŮLEK, P. a kol. Makroanatomie jater. *Hepatologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, s. 17-24, ISBN 8024731185.
- (19) LÜLLMANN-RAUCH, R. Žlázy trávicího systému. *Histologie*. 1. české vyd. Praha: Grada, 2012, s. 340-351, ISBN 978-80-247-3729-4.
- (20) KONRÁDOVÁ, V., UHLÍK, J., VAJNER, L. Trávicí systém. *Funkční Histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská, s.r.o., 2000, s. 153-186, ISBN 978-80-86022-80-3.
- (21a) KUNTZ, E., KUNTZ, H.-D. Morphology of the Liver. *Hepatology*. 3. vyd. Wurzburg : Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008, s. 16-33, ISBN 978-3-540-76838-8.
- (21b) KUNTZ, E., KUNTZ, H.-D. Biochemistry and Functions of the Liver. *Hepatology*. 3. vyd. Wurzburg : Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008, s. 36-74, ISBN 978-3-540-76838-8.
- (22) MESCHER, A. L. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 12. vyd. New York: McGraw-Hill Medical. 2010, 467 s. ISBN 978-0-07-127190-5.
- (23) ŠPIČÁK, J. Patofyziologické mechanismy fibrózy jater. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii*. 1. vyd. Praha: Grada, 2008, s. 8-19, ISBN 978-80-247-1783-8.
- (24) ALBERTS, B. Přenos látek přes membrány *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2004, s. 372-405, ISBN 80-902906-2-0.
- (25) CHANDRA, P., BROUWER, K. L. R.. The complexities of hepatic drug transport: Current knowledge and emerging concepts. *Pharmaceutical Research*. 2004, roč. 21, č. 5, s. 719-735.
- (26) KRAJCSI P. Drug-transporter interaction testing in drug discovery and development. *World Journal of Pharmacology*. 2013, roč. 2, č. 1, s. 35-46.
- (27) FUNK, C., BOYER J. L. The role of hepatic transporters in drug elimination: Molecular Characterization, Function, and Regulation. *Expert Opinion on Drug Metabolism*. 2008, roč. 4, č. 4, s. 363-379.

- (28) LIN, L., YEE, S. W., KIM, R. B., GIACOMINI, K. M. SLC transporters as therapeutic targets: Emerging opportunities. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2015, roč. 14, č. 8, s. 543–560.
- (29) SEKINE, T., MIYAZAKI, H., ENDOU, H. Molecular physiology of renal organic anion transporters. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2006, roč. 290, č. 2, s. F251-F261.
- (30) KOSTERS, A., KARPEN, S. J. Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica*. 2008, roč. 38, č. 7-8, s. 1043-1071.
- (31) MEIER, Y., PAULI-MAGNUS, C., ZANGER, U. M., KLEIN, K., SCHAEFFELER, E., NUSSLER, A. K., NUSSLER, N., EICHELBAUM, M., MEIER, P. J., STIEGER, B. Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-Transporter expression in human liver. *Hepatology*. 2006, roč. 44, č. 1, s. 62-74.
- (32) STIEGER, B., FATTINGER, K., MADON, J., KULLAK-UBLICK, G. A., MEIER, P. J. Drug-and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology*. 2000, roč. 118, č. 2, s. 422-430.
- (33) TRAUNER, M., BOYER, J. L. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiological reviews*. 2003, roč. 83, č. 2, s. 633-671.
- (34) BOYER, J. L. Bile formation and secretion. *Comprehensive Physiology*. 2013, roč. 3, s. 1035-1078.
- (35) KÖNIG, J., NIES, A. T., CUI, Y., KEPPLER, D. MRP2, the apical export pump for anionic conjugates. *ABC proteins: From Bacteria to Man*, Elsevier. 2003, s. 423-443.
- (36) LEHNE, G. P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer. *Current Drug Targets*. 2000, roč. 1, č. 1, s. 85-99.
- (37) MALIEPAARD, M., SCHEFFER, G. L., FANEYTE, I. F., VAN GASTELEN, M. A., PIJNENBORG, A. C., SCHINKEL, A. H., VAN DE VIJVER, M. J., SCHEPER, R. J., SCHELLENS, J. H. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Research*. 2001, roč. 61, č. 8, s. 3458-64.

- (38) KITTNAR, O. a kol. Fyziologie trávení a vstřebávání. *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4, s. 315-376.
- (39) LEDVINA, M., STOKLASOVÁ A., CERMAN J. Metabolismus lipidů, steroidů a lipoproteinů. *Biochemie pro studující medicíny*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-246-1414-4, s. 134-186.
- (40) TROJAN, S. Fyziologie trávení a vstřebávání. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5, s. 354-357.
- (41) TAKAOKA MJ. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.) *J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial University*. 1940, roč. 3, s. 1–16.
- (42) NONOMURA, S., KANAGAWA, H., MAKIMOTO, A. Chemical Constituents of Polygonaceous Plants. I. Studies on the Components of Ko-J O-Kon. (*Polygonum Cuspidatum* Sieb. Et Zucc.) *Yakugaku Zasshi*. 1963, č. 83, s. 988–990.
- (43) LANGCAKE, P., PRYCE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*. 1976, roč. 9, č. 1, s. 77–86.
- (44) TRELA, B. C., WATERHOUSE, A. L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, roč. 44, č. 5, s. 1253–1257.
- (45) FRITZEMEIER, K.-H.; KINDL, H. Coordinate induction by UV light of stilbene synthase, phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in leaves of Vitaceae. *Planta*. 1981, roč. 151, č.1, s. 48-52.
- (46) GRAYER, R. J., KOKUBUN, T. Plant-fungal interactions: The search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*. 2001, roč. 56, s. 253-263.
- (47) GAMBINI, J., INGLÉS, M., OLASO, G., LOPEZ-GRUESO, R., BONET-COSTA, V., GIMENO-MALLENCH, L., MAS-BARGUES, C., ABDELAZIZ, K. M., GOMEZ-CABRERA, M. C., VINA, J., BORRAS, C. Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in

- animal models and humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015, ID 837042.
- (48) VANG, O., AHMAD, N., BAILE, C. A. *et al.* What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PloS One*. 2011, roč. 6, č. 6.
- (49) CASAS-GRAJALES, S., MURIEL, P. Antioxidants in liver health. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. 2015, roč. 6, č. 3, s. 59-72.
- (50) WENZEL, E., SOMOZA, V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2005, roč. 49, č. 5, s. 472-481.
- (51) WANG, L. X., HEREDIA, A., SONG, H., ZHANG, Z., YU, B., DAVIS, C., REDFIELD, R. Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: Characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004, roč. 93, č. 19, s. 2448–2457.
- (52) KAPETANOVIC, I. M., MUZZIO, M., HUANG, Z., THOMPSON, T. N., MCCORMICK, D. L. Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2011, roč. 68, č. 3, s. 593-601.
- (53) WALLE, T., HSIEH, F., DELEGGE, M. H., OATIS, Jr. J. E., WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*. 2004, roč. 32, č. 12, s. 1377-1382
- (54) MALHOTRA, A., BATH, S., ELBARBRY, F. An Organ System Approach to Explore the Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Cytoprotective Actions of Resveratrol. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015, ID 803971.
- (55) BROWN, V. A., PATEL, K. R., VISKADURAKI, M. *et al.* Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Research*. 2010, roč. 70, č. 22, s. 9003-9011.

- (56) CROWELL, J. A., KORYTKO, P. J., MORRISSEY, R. L., BOOTH, T. D., LEVINE, B. S. Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicological Sciences*. 2004, roč. 82, č. 2, s. 614-619.
- (57) WINDER, W. W., HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1999, roč. 277, č. 1, s. E1–E10.
- (58) LEE, D. H. Sirt1 as a new therapeutic target in metabolic and age-related diseases. *Chonnam Medical Journal*. 2010, roč. 46, č. 2, s. 67-73.
- (59) PRICE, N. L., GOMES, A. P., LING, A. J. *et al.* SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell metabolism*. 2012, roč. 15, č. 5, s. 675-690.
- (60) VILLALBA, J. M., ALCAÍN, F. J. Sirtuin activators and inhibitors. *Biofactors*. 2012, roč. 38, č. 5, s. 349-359.
- (61) HOWITZ, K. T., BITTERMAN, K. J., COHEN, H. Y., LAMMING, D. W., LAVU, S., WOOD, J. G., ZIPKIN, R. E., CHUNG, P., KISIELEWSKI, A., ZHANG, L. L., SCHERER, B., SINCLAIR, D. A. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003, roč. 425, č. 6954, s. 191–196.
- (62) HONG, S.-W., JUNG, K. H., ZHENG, H. M., LEE, H. S., SUH, J. K., PARK, I. S., LEE, D. H., HONG, S. S. The protective effect of resveratrol on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Archives of pharmacal research*. 2010, roč. 33, č. 4, s. 601-609.
- (63) MARTÍN, A. R., VILLEGAS, I., SÁNCHEZ-HIDALGO, M., DE LA LASTRA, C. A. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *British Journal of Pharmacology*. 2006, roč. 147, č. 8, s. 873-885.
- (64) ŞENER, G., TOPALOĞLU, N., ŞEHIRLI, A. Ö., ERCAN, F., GEDIK, N. Resveratrol alleviates bleomycin-induced lung injury in rats. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2007, roč. 20, č. 6, s. 642-649.

- (65) ASHBY, J., TINWELL, H., PENNIE, W., BROOKS, A. N., LEFEVRE, P. A., BERESFORD, N., SUMPTER, J. P. Partial and weak oestrogenicity of the red wine constituent resveratrol: consideration of its superagonist activity in MCF-7 cells and its suggested cardiovascular protective effects. *Journal of Applied Toxicology*. 1999, roč. 19, č. 1, s. 39–45.
- (66) KOPP, P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the ‘French paradox’? *European Journal of Endocrinology*. 1998, roč. 138, č. 6, s. 619–620.
- (67) TURNER, R. T., EVANS, G. L., ZHANG, M., MARAN, A., SIBONGA, J. D. Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? *Endocrinology*. 1999, roč. 140, č. 1, s. 50–54.
- (68) GEHM, B. D., MCANDREWS, J. M., CHIEN, P.-Y., JAMESON, J. L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, roč. 94, č. 25, s. 14138–14143.
- (69) BERTELLI, A. A., GIOVANNINI, L., GIANNESI, D., MIGLIORI, M., BERNINI, W., FREGONI, M., BERTELLI, A. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *International Journal of Tissue Reactions*. 1994, roč. 17, č. 1, s. 1-3.
- (70) TOMÉ-CARNEIRO, J., LARROSA, M., GONZÁLES-SARRÍAS, A., TOMÁS-BARBERÁN, F. A., GARCÍA-CONESA, M. T., ESPÍN, J. C. Resveratrol and clinical trials: The crossroad from in vitro studies to human evidence. *Current Pharmaceutical Design*. 2013, roč. 19, č. 34, s. 6064-6093.
- (71) CHOW, H.-H. S., GARLAND, L. L., HSU, C.-H., VINING, D. R., CHEW, W. M., MILLER, J. A., PERLOFF, M., CROWELL, J. A., ALBERTS, D. S. Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study. *Cancer Prevention Research*. 2010, roč. 3, č. 9, s. 1168–1175.
- (72) KASDALLAH-GRISSA, A., MORNAGUI, B., AOUANI, E., HAMMAMI, M., GHARBI, N., KAMOUN, A., EL-FAZAA, S. Protective effect of resveratrol on

ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol and Alcoholism*. 2006, roč. 41, č. 3, s. 236-239.

- (73) ONYEKWERE, C. A., OGBERA, A. O., SAMAILA, A. A., BALOGUN B. O., ABDULKAREEM, F. B. Nonalcoholic fatty liver disease: Synopsis of current developments. *Nigerian Journal of Clinical Practice*. 2015, roč. 18, č. 6, s. 703-712.
- (74) HEEBØLL, S., THOMSEN, K. L., PEDERSEN, S. B., VILSTRUP, H., GEORGE, J., GRØNBÆK. Effects of resveratrol in experimental and clinical non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*. 2014, roč. 6, č. 4, s. 188-198.
- (75) AGUIRRE, L., PORTILLO, M. P., HIJONA, E., BUJANDA, L. Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, roč. 20, č. 23, s. 7366-80.
- (76) VIOLLET, B., ATHEA, Y., MOUNIER, R. *et al.* AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. 2009, roč. 14, s. 19-44.
- (77) ALBERDI, G., RODRÍGUEZ, V. M., MACARULLA, M. T., MIRANDA, J., CHURRUCA, I., PORTILLO, M. P. Hepatic lipid metabolic pathways modified by resveratrol in rats fed an obesogenic diet. *Nutrition*. 2013, roč. 29, č. 3, s. 562-567.
- (78) LI, Y., XU, S., MIHAYLOVA, M. M. *et al.* AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metabolism*. 2011, roč. 13, č. 4, s. 376-388.
- (79) HENRIKSEN, B. S., CURTIS, M. E., FILLMORE, N., CARDON, B. R., THOMSON, D. M., HANCOCK, C. R. The effects of chronic AMPK activation on hepatic triglyceride accumulation and glycerol 3-phosphate acyltransferase activity with high fat feeding. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2013, roč. 5, č. 29.
- (80) FAGHIHZADEH, F., ADIBI, P., RAFIEI, R., HEKMATDOOST, A. Resveratrol supplementation improves inflammatory biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition Research*. 2014, roč. 34, č. 10, s. 837-843.
- (81) PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001, roč. 29, č. 9, s. e45-e45.

- (82) LI, X., ZHANG, S., BLANDER, G., TSE, J. G., KRIEGER, M., GUARENTE, L. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Molecular Cell*. 2007, roč. 28, č. 1, s. 91-106.
- (83) BULER, M., AATSINKI, S. M., SKOUMAL, R., HAKKOLA, J. Energy sensing factors PGC-1 α and SIRT1 modulate PXR expression and function. *Biochemical Pharmacology*. 2011, roč. 82, č. 12, s. 2008-2015.
- (84) MISRA, S., VARTICOVSKI, L., ARIAS, I. M. Mechanisms by which cAMP increases bile acid secretion in rat liver and canalicular membrane vesicles. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2003, roč. 285, č. 2, s. G316-G324.
- (85) PÉREZ, L. M., MILKIEWICZ, P., ELIAS, E., COLEMAN, R., SÁNCHEZ POZZI, E. J., ROMA, M. G. Oxidative stress induces internalization of the bile salt export pump, Bsep, and bile salt secretory failure in isolated rat hepatocyte couplets: a role for protein kinase C and prevention by protein kinase A. *Toxicological Sciences*. 2006, roč. 91, č. 1, s. 150-158.
- (86) ZHANG, Y., CHEN, M. L., ZHOU, Y., YI, L., GAO, Y. X., RAN, L., CHEN, S. H., ZHANG, T., ZHOU, X., ZOU, D., WU, B., WU, Y., CHANG, H., ZHU, J. D., ZHANG, Q. Y., MI, M. T. Resveratrol improves hepatic steatosis by inducing autophagy through the cAMP signaling pathway. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2015, roč. 59, č. 8, s. 1443-1457.
- (87) BOYER, J. L. New perspectives for the treatment of cholestasis: Lessons from basic science applied clinically. *Journal of Hepatology*. 2007, roč. 46, č. 3, s. 351-371
- (88) FRIEDMAN, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, roč. 275, č. 4, s. 2247-2250.