

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

ZMĚNA TVORBY ŽLUČE V DŮSLEDKU NEDOSTATKU ŽELEZA

Alternation of bile production due to iron depletion

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Alena Prašnická

Vypracovala:

Marie Šimková

Hradec Králové, 2019

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

V Hradci Králové dne:

Podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat mé školitelce Mgr. Aleně Prašnické za její ochotu, vstřícný přístup, cenné rady a čas strávený nad konzultacemi a úpravou mé diplomové práce. Poděkování patří i celému kolektivu Ústavu farmakologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové, kde jsem měla možnost pracovat na této práci. Děkuji také své rodině a přátelům, kteří mi byli oporou v průběhu celého studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studentka: Marie Šimková

Školitel: Mgr. Alena Prašnická

Název diplomové práce: Změna tvorby žluče v důsledku nedostatku železa

Úvod: Játra mají nezaměnitelnou funkci při tvorbě a sekreci žluče. Tato tekutina slouží jako hlavní exkreční cesta pro některé endogenní a exogenní látky. Další vlastností jater je také schopnost ukládat látky, které jsou nezbytné pro správnou funkci organismu, jako je například železo. Ukazuje se, že právě železo by mohlo mít vliv na tvorbu a sekreci žluče.

Cíl práce: Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda má nedostatek železa vliv na syntézu a metabolismus žluče, a to především žlučových kyselin, a na změny exprese příslušných transportérů.

Metody: Samci potkanů kmene Wistar ($n=6$ v každé skupině, 250 ± 20 g) byli rozděleni do dvou skupin: kontrolní skupina (Chow diet) krmena standardní dietou a skupina s deplecí železa (ID), která byla krmena dietou s nízkým obsahem železa po dobu 21 dní. Pro zjištění změny toku žluče byla sbírána žluč po dobu 120 min během *in vivo* kinetické studie. Analýza exprese transportérů pro žluč a enzymů, zodpovědných za *de novo* syntézu žlučových kyselin, byla provedena na úrovni mRNA (qRT-PCR) a proteinu (Western blot).

Výsledky: Deplece železa vedla u potkanů ke zvýšenému toku žluče. Tento efekt je způsoben up-regulací enzymů zodpovědných za *de novo* syntézu žlučových kyselin. Tato změna nebyla doprovázena up-regulací hlavních apikálních transportérů (Bsep, Mrp2), ale došlo k up-regulaci basolaterálního transportéru pro žlučové kyseliny (Ntcp).

Závěr: Z předkládané práce vyplývá, že deplece železa má choleretický účinek. Tento efekt je zřejmě způsoben up-regulací enzymů důležitých pro *de novo* syntézu žlučových kyselin, avšak není doprovázen změnou exprese transportérů.

Klíčová slova: železo, žlučové kyseliny

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Student: Marie Šimková

Supervisor: Mgr. Alena Prašnická

Title of diploma thesis: Alternation of bile production due to iron depletion

Introduction: Liver has an irreplaceable role in the production and secretion of bile. This body fluid serves as the main excretion way of some endogenous and exogenous substances. Another liver property is the ability to store substances essential for correct functions of the body, e.g. iron. It has been shown that iron could have an impact on the bile production and secretion.

Aim: The aim of this diploma thesis was to discover an impact of iron depletion on the bile synthesis and metabolism, especially on bile acids, and the way it affects transporters expression.

Methods: Male Wistar rats (n=6 in each group, 250 ± 20 g) were divided into two groups: control group (Chow diet) fed with standard diet and iron depletion group (ID), fed with iron depletion diet for 21 days. To investigate the changes in bile flow, the bile had been collected for 120 min during *in vivo* clearance study. The analysis of the changes in expression of bile transporters and enzymes responsible for *de novo* bile acid synthesis was performed at the mRNA (qRT-PCR) and protein (Western blot) levels.

Results: Iron depletion led to the increase of bile flow in rats. The effect was caused by up-regulation of enzymes involved in bile acid *de novo* synthesis. However, there were no changes in the expression of the main apical transporters (Bsep, Mrp2), but the up-regulation of basolateral transporter for bile acids (Ntcp) was observed.

Conclusions: The results from this study have shown that iron depletion in rats has choleric effect. This effect is probably caused by up-regulation of enzymes involved in bile acid *de novo* synthesis, nevertheless without any changes in expression of the transporters.

Keywords: iron, bile acids

Seznam zkratek

| | |
|--------------------|--|
| ABC | ATP-binding cassette |
| ASBT | Apical sodium-dependent bile acid transporter |
| BSEP | Bile salt export pump |
| CA | Kyselina cholová |
| CAR | Constitutive androstane receptor |
| CDCA | Kyselina chenodeoxycholová |
| CYP | Izoformy cytochromu P450 |
| CYP27A1 | Sterol-27-hydroxyláza |
| CYP7A1 | Cholesterol-7 α -hydroxyláza |
| CYP8B1 | Sterol-12 α -hydroxyláza |
| DCA | Kyselina deoxycholová |
| DMT1 | Divalent metal transporter |
| FGF | Fibroblast growth factor |
| FXR | Farnesoid X receptor |
| Gapdh | Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza |
| HMG-CoAR | Hydroxymethylglutaryl-CoA-reduktáza |
| HNF4- α | Hepatocyte nuclear factor- α |
| ID | Iron depletion |
| IRE | Iron responsive element |
| IRP | Iron regulatory protein |
| LCA | Kyselina lithocholová |
| LXR | Liver X receptor |
| MDR | Multidrug resistance protein |
| MRP | Multidrug resistance-associated protein |
| NTCP | Sodium taurocholate cotransporting polypeptide |
| OATP | Organic anion transporting protein |
| OST α/β | Organic solute transporter α/β |
| PGC1- α | Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α |
| PXR | Pregnane X receptor |

| | |
|---------------------|--|
| qRT-PCR | Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction |
| RXR | Retinoid X receptor |
| SHP | Small heterodimer partner |
| SLCO | Solute carrier organic anion |
| SULT2A1 | Izoforma sulfottransferázy |
| TfR | Transferrinový receptor |
| UDCA | Kyselina ursodeoxycholová |
| UGT1A1 | Izoforma UDP-glukuronyl-N-transferázy |
| VDR | Vitamine D receptor |
| α/β -MCA | Kyselina α/β -muricholová |

Obsah

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Úvod | 10 |
| 2 | Játra..... | 11 |
| 2.1 | Stavba jater..... | 11 |
| 3 | Žluč..... | 14 |
| 3.1 | Složení žluče | 14 |
| 3.2 | Sekrece žluče..... | 15 |
| 3.3 | Membránové transportní proteiny hepatocytů | 17 |
| 3.3.1 | Basolaterální transportéry hepatocytů | 18 |
| 3.3.1.1 | NTCP/Ntcp..... | 18 |
| 3.3.1.2 | OATP/Oatp | 18 |
| 3.3.1.3 | OST α ,OST β /Ost α , Ost β | 19 |
| 3.3.1.4 | MRP/Mrp | 19 |
| 3.3.1.5 | ABCA1/Abca1 | 20 |
| 3.3.2 | Apikální transportéry hepatocytů..... | 20 |
| 3.3.2.1 | MDR3/Mdr2..... | 20 |
| 3.3.2.2 | MDR1/Mdr1..... | 21 |
| 3.3.2.3 | BSEP/Bsep | 21 |
| 3.3.2.4 | MRP2/Mrp2 | 22 |
| 3.3.2.5 | ABCG5/ABCG8 – Abcg5/Abcg8..... | 22 |
| 4 | Žlučové kyseliny | 24 |
| 4.1 | Struktura..... | 24 |
| 4.2 | Syntéza žlučových kyselin | 26 |
| 4.2.1 | Syntéza primárních žlučových kyselin | 26 |
| 4.2.1.1 | Klasická (neutrální) cesta..... | 27 |
| 4.2.1.2 | Alternativní (kyselá) cesta..... | 27 |
| 4.2.2 | Syntéza sekundárních a terciárních žlučových kyselin..... | 28 |
| 4.3 | Enterohepatální oběh..... | 28 |
| 4.4 | Regulace syntézy žlučových kyselin..... | 30 |
| 4.4.1 | Role nukleárních receptorů..... | 30 |
| 4.4.1.1 | FXR – Farnesoid X receptor | 30 |
| 4.4.1.2 | PXR – Pregnane X receptor | 31 |
| 4.4.1.3 | CAR – Constitutive androstane receptor..... | 32 |
| 4.4.1.4 | VDR- Vitamin D receptor | 32 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5 | Železo | 34 |
| 5.1 | Oxido-redukční vlastnosti | 34 |
| 5.2 | Metabolismus železa | 35 |
| 5.2.1 | Absorpce železa | 35 |
| 5.2.1.1 | Nehemové železo | 35 |
| 5.2.1.2 | Hemové železo | 35 |
| 5.2.2 | Distribuce a transport železa | 36 |
| 5.2.2.1 | Ferroportin..... | 36 |
| 5.2.2.2 | Transferrin..... | 36 |
| 5.2.3 | Zásoba a uchování železa | 37 |
| 5.3 | Regulace homeostázy železa..... | 38 |
| 5.3.1 | Buněčná regulace homeostázy železa..... | 38 |
| 5.3.2 | Systémová regulace homeostázy železa | 40 |
| 5.4 | Nedostatek železa..... | 42 |
| 5.5 | Železo a žlučové kyseliny | 43 |
| 6 | Cíl diplomové práce | 44 |
| 7 | Metodika..... | 45 |
| 7.1 | Pokusná zvířata | 45 |
| 7.2 | <i>In vivo</i> studie | 45 |
| 7.3 | qRT-PCR..... | 45 |
| 7.4 | Western blot | 47 |
| 7.5 | Statistická analýza dat | 48 |
| 8 | Výsledky..... | 49 |
| 8.1 | <i>In vivo</i> studie - Tok žluče | 49 |
| 8.2 | Analýza enzymů odpovědných za <i>de novo</i> syntézu žlučových kyselin..... | 50 |
| 8.3 | Analýza apikálních transportérů odpovědných za sekreci žluče..... | 53 |
| 8.4 | Analýza basolaterálních transportérů odpovědných za sekreci žluče | 56 |
| 9 | Diskuze | 59 |
| 10 | Závěr | 61 |
| 11 | Literatura..... | 62 |

1 Úvod

Žluč je tělní tekutina vznikající v játrech, secernovaná do žlučových cest, odkud je vylučována do duodena. Jedná se o hlavní cestu exkrece řady endogenních látek, např. cholesterolu, a některých xenobiotik. Mezi základní komponenty žluče patří žlučové kyseliny. Jejich syntéza probíhá v játrech z molekuly cholesterolu. Žlučové kyseliny představují hlavní hnací sílu pro sekreci žluče. Do žlučových cest jsou přenášeny prostřednictvím transportních proteinů v apikální membráně hepatocytů, zatímco transport mezi sinusoidální krví a hepatocyty zajišťují basolaterální transportéry. Konstantní množství žlučových kyselin podléhá přísné kontrole, jelikož změny v jejich syntéze a vylučování by mohly vést ke vzniku řady onemocnění (cholestáza, žlučové kameny, cirhóza jater atp.) (Boyer 2013; Li a Chiang 2014).

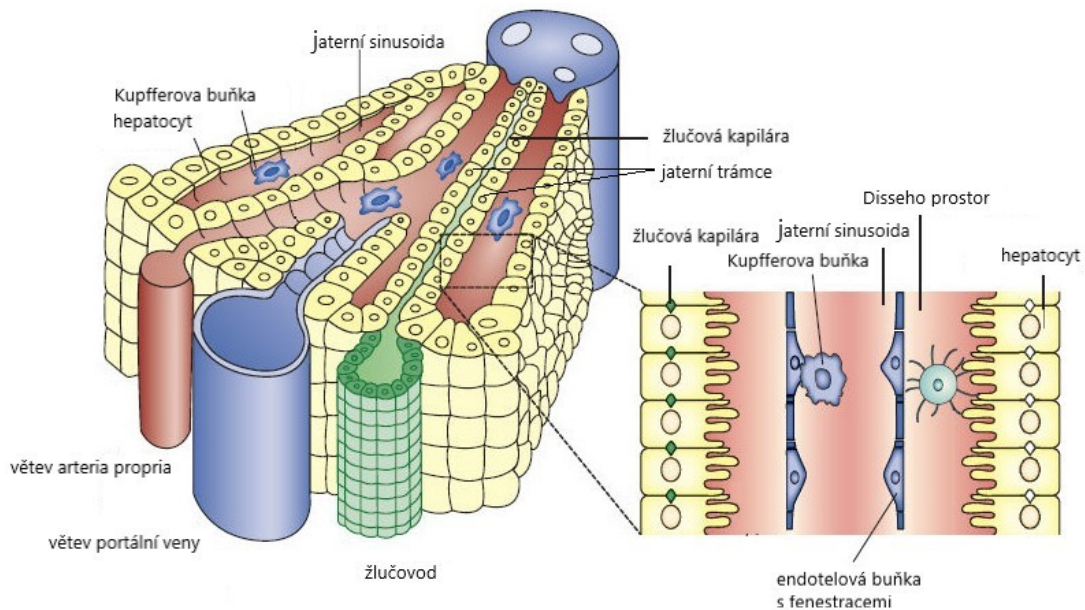
Játra mají také důležitou roli pro vychytávání a ukládání železa - nezbytného stopového prvku v organismu. Nedostatkem železa a anémií trpí velké procento populace (Anderson a Frazer 2017). Bylo prokázáno, že nízká hladina železa snižuje hladinu cholesterolu v séru (Kamei et al. 2010). Proto by mohla mít deplece železa dopad na produkci žluče a homeostázu žlučových kyselin.

2 Játra

Játra jsou nepárový orgán nacházející se pod bránicí v pravé části břišní dutiny. Jsou největší žlázou v lidském těle. Jejich hmotnost činí asi 1,5 kg u dospělého člověka. Játra mají ústřední roli v energetickém metabolismu, biotransformaci a detoxikaci xenobiotik i řady endogenních látek. Mezi další funkce patří tvorba a sekrece cholesterolu a žluče, imunitní funkce, zásobní funkce (mimo jiné zásobárna železa), endokrinní funkce, tvorba a zánik červených krvinek, hemokoagulace a termoregulace (Švíglerová a Slavíková 2008; Hůlek a Urbánek 2018).

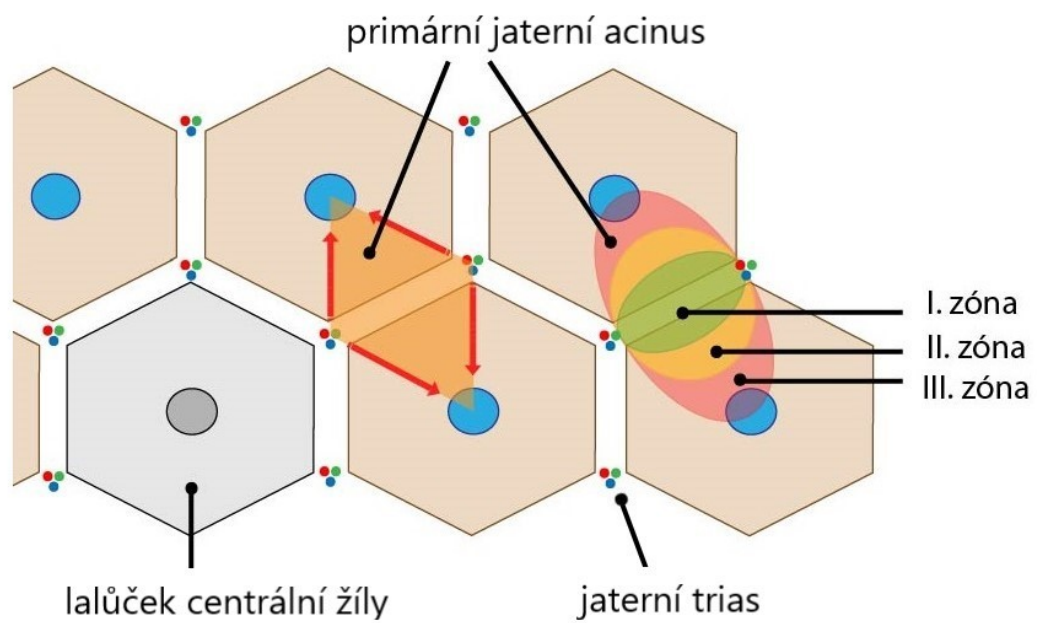
2.1 Stavba jater

Jaterní tkáň je tvořena jaterními buňkami – hepatocyty. Hepatocyty jsou polarizované buňky, jejichž krevní pól komunikuje s krví protékající jaterními sinusoidy. Membrána na této straně buněk je označována jako basolaterální (sinusoidální). Žlučový pól je krytý apikální (kanalikulární) membránou, odkud je secernována žluč do žlučové kapiláry. Hepatocyty tvoří řady buněk, tzv. jaterní trámce, které se radiálně sbíhají do středu k centrální véně. Mezi trámci probíhají cévy, kterými proudí krev k centrální véně. Tyto cévy charakteru kapilár se označují jako jaterní sinusoidy, které se od běžných kapilár liší absencí bazální membrány a přítomností tkáňových makrofágů – Kupfferových buněk. Jaterní sinusoidy přivádějí krev k jaterním trámčům. V endotelu sinusoid se nachází fenestrace, které zvyšují propustnost kapilár i pro větší molekuly. Mezi trámci a jaterními sinusoidy vzniká mezera – Disseho prostor, kterým odtéká plazma do lymfatických cest. Dva k sobě přiléhající trámce formují žlučovou kapiláru, jejíž stěna je tvořena apikální membránou sousedících hepatocytů (Obr.1) (Švíglerová a Slavíková 2008; Čihák a Grim 2002). Spojení sousedních hepatocytů je utěsněno těsnými spoji (*tight junctions*), které zabraňují kontaktu krve se žlučí, omezují paracelulární transport látek, zabraňují zpětné difuzi žlučových kyselin a makromolekul ze žluče, zároveň však umožňují průchod menším iontům (Na^+ , Mg^{2+}) (Boyer 2013).



Obr. 1: Část základní morfologické struktury jater – lalůčku centrální žíly. Převzato a upraveno z (Adams a Eksteen 2006).

Základní funkční jednotkou jater je primární jaterní acinus zobrazený na Obr. 2. Na jeho průřezu připomíná dva k sobě přilehlé trojúhelníky, jejichž vzdálené vrcholy jsou tvořeny centrální venou. Jaterní acinus se skládá z hepatocytů, které jsou zásobeny stejnou venou a arterií circumlobularis, které probíhají na spojnici trojúhelníků společně se žlučovodem. Acinus je rozdělen do tří neohraničených zón podle intenzity metabolických procesů. Zóna I je nejbližší přívodným cévám. Hepatocyty zde mají největší přívod kyslíku a živin. Zóna III se nachází nejbližší k centrálním venám, kde je koncentrace kyslíku a živin nižší (Švíglerová a Slavíková 2008; Čihák a Grim 2002; Hůlek a Urbánek 2018).



Obr. 2: Základní morfologická a funkční struktura jaterního acinu. Převzato a upraveno z (Fontana et al. 2014).

3 Žluč

Žluč je izoosmotická tekutina vznikající v játrech, secernovaná do žlučových cest, odkud je vedena do duodena. Je cestou exkrece některých xenobiotik (např. fenytoin, sartany) i endogenních látek, např. bilirubinu, proteinů a cholesterolu, pro který funguje jako hlavní cesta eliminace. Pomáhá neutralizovat kyselý pH v duodenu díky přítomnosti hydrogenuhličitanů, další obsažené ionty přispívají k udržení iontové homeostázy ve střevě. Ve střevech se významně účastní trávicích procesů. Podílí se i na obranyschopnosti a integritě sliznic prostřednictvím IgA a stimuluje imunitní systém ve střevech (Brodanová et al. 1998).

3.1 Složení žluče

Mezi základní komponenty žluče patří žlučové kyseliny, cholesterol a fosfolipidy. Žlučové kyseliny jsou amfipatické látky s detergentními účinky, které ve střevech emulgují tuky, aktivují střevní a pankreatické enzymy a usnadňují tak zpracování a vstřebání živin, vitaminů rozpustných v tucích (A, D, E, K) a vápníku (Brodanová et al. 1998). Slouží také jako signální molekuly a ovlivňují metabolické dráhy v těle. Mají význam pro udržování homeostázy cholesterolu, který je výchozí molekulou pro jejich syntézu. Konverzí cholesterolu na žlučové kyseliny mohou zabránit akumulaci cholesterolu, triglyceridů a toxických metabolitů a tím předejít poškození jater a dalších orgánů. Na druhou stranu mohou působit také toxicky a způsobovat zánět a apoptózu. Narušení jejich homeostázy může vést ke vzniku cholestatických jaterních onemocnění, dyslipidemií, ztukovatění neboli steatóze jater, kardiovaskulárním onemocněním a diabetu (Li a Chiang 2014).

Cholesterol slouží jako stavební prvek membrán buněk, je také výchozí molekulou pro řadu dalších substancí – steroidních hormonů, vitamínu D, oxysterolů a žlučových kyselin (Ledvina et al. 2004). Ačkoliv je pro tělo nezbytný, jeho přebytek vede k poškození cévního endotelu, ateroskleróze a rozvoji kardiovaskulárních onemocnění. Žluč je jeho hlavní cestou exkrece z těla (Boyer 2013). Biliární sekrece se podílí na regulaci hladiny cholesterolu v krvi, čímž pomáhá předcházet ateroskleróze. Na druhou stranu nadměrné vylučování cholesterolu do žluče přispívá k tvorbě žlučových kamenů (Dijkers a Tietge 2010).

Fosfolipidy patří mezi složené lipidy, jejichž struktura obsahuje estery alkoholu s vyššími mastnými kyselinami a navázaný fosfor (z k. fosfatidové nebo k. fosforečné). Fosfolipidy se skládají z hydrofilní a hydrofobní části, díky kterým mají molekuly amfifilní vlastnosti. V těle slouží jako důležité stavební jednotky biomembrán (Ledvina et al. 2004) a jsou nezbytnou součástí žluče (ve žluči nejvíce zastoupeny fosfatidylcholinem) (Boyer 2013). Spolu se žlučovými kyselinami a cholesterolem tvoří ve žlučových cestách smíšené micely. Micely mají hydrofilní povrch a hydrofobní jádro, ve kterém se rozpouští hydrofobní látky. Jejich tvorbou je zajištěno uchování cholesterolu v tekuté formě a snížení detergentního působení žlučových kyselin na epitel žlučových cest (Boyer 2013).

Dalšími složkami jsou voda, mastné kyseliny, bilirubin, ionty a malé množství proteinů, např. IgA. Ve žluči jsou exkretovány také metabolity některých endogenních látek, xenobiotik a oxidovaný glutathion (Brodanová et al. 1998; Švíglerová a Slavíková 2008). Glutathion je tripeptid s významnými oxidoredukčními vlastnostmi. Existuje v redukované formě (GSH), která má antioxidační účinky a významně se podílí na zneškodňování reaktivních forem kyslíku a dalších oxidantů za vzniku oxidované formy (GSSG). GSSG může být zpětně recyklován na GSH pomocí enzymu NADPH. V játrech se také účastní konjugáčnických reakcí druhé fáze biotransformace látek (Matouš et al. 2010; Murray et al. 2002). Mimo tyto funkce má vliv na sekreci žluči, viz dále (Trauner a Boyer 2003).

3.2 Sekrece žluče

Žluč je produkována hepatocyty a secernována do žlučového kanálku přes jejich kanalikulární membrány. Jednotlivé složky žluče mohou být do žlučových cest dopraveny různými typy transportních mechanismů. Komponenty jako žlučové kyseliny a další organické soluty (např. cholesterol, fosfolipidy) přestupují aktivním transportem, tj. proti koncentračnímu gradientu za pomoci transportních proteinů. Po jejich přenosu je vytvořen osmotický a elektrochemický gradient, který iniciuje prostup dalších složek. Na základě osmózy se do žluče dostává např. voda, která proudí přes semipermeabilní membránu tvořenou těsnými spoji. Vzniklý elektrochemický gradient pak podněcuje pasivní difuzi anorganických iontů (Trauner a Boyer 2003; Hundt et al. 2019).

Dle tvorby gradientu lze sekreci žluče dělit na:

- a) Sekrece závislá na žlučových kyselinách - gradient tvoří soli žlučových kyselin, jde o hlavní hnací sílu pro osmotický proces a sekreci žluče.
- b) Sekrece nezávislá na žlučových kyselinách - gradient tvoří jiné organické sloučeniny, zejména redukovaný glutathion a bikarbonáty. Tento mechanismus má na sekreci žluče menší podíl (Trauner a Boyer 2003).

Játra denně vyprodukují asi 900 ml žluče. Jde o tzv. jaterní žluč. Její složení a množství se při průchodu žlučovými cestami mění. Ve žlučníku a žlučových cestách dochází ke zpětnému vstřebání iontů a vody, žluč se koncentruje a vzniká tzv. žlučnicková žluč. Jaterní žluč je bohatá na ionty Na^+ , Cl^- , HCO_3^- . Žlučnicková žluč obsahuje více K^+ a Ca^{2+} , zatímco koncentrace Na^+ , Cl^- a HCO_3^- je menší. Díky nižšímu množství bikarbonátů pH žlučnickové žluče klesá. Naopak koncentrace žlučových kyselin, fosfolipidů, cholesterolu a bilirubinu je ve žlučnickové žluči 10-20krát vyšší kvůli zpětné resorpci vody (Švíglerová a Slavíková 2008). Složení jaterní a žlučnickové žluče je porovnáno v Tabulce 1.

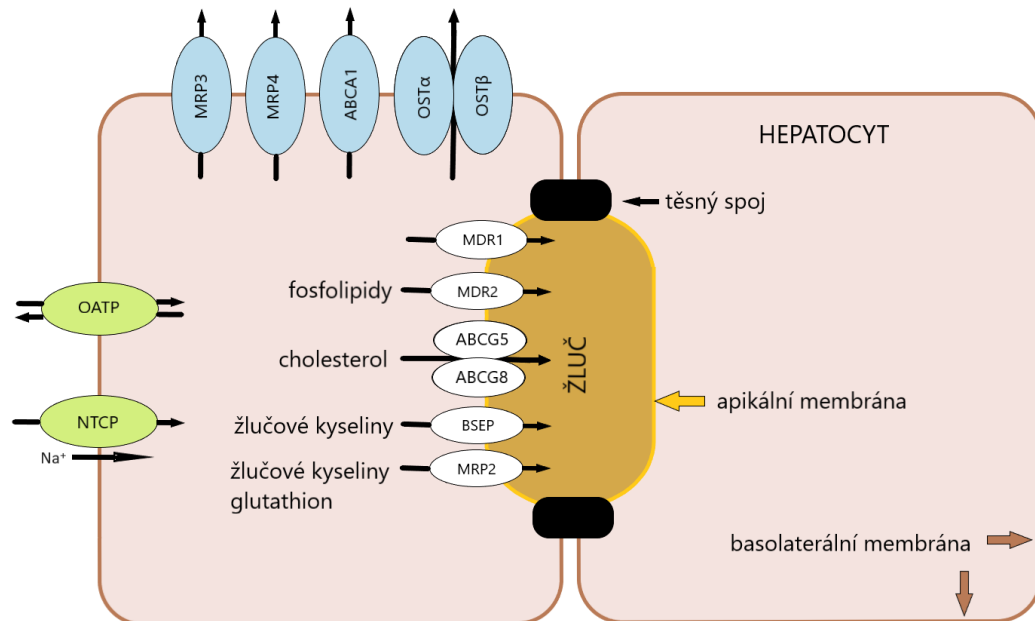
Tabulka 1: Složení jaterní a žlučnickové žluče

| komponenty žluče | jaterní žluč (mmol/l) | žlučnicková žluč (mmol/l) |
|------------------|-----------------------|---------------------------|
| Na^+ | 165 | 28 |
| K^+ | 5 | 10 |
| Ca^{2+} | 3 | 12 |
| Cl^- | 90 | 15 |
| HCO_3^- | 45 | 8 |
| žlučové kyseliny | 35 | 310 |
| lecitin | 1 | 8 |
| cholesterol | 3 | 25 |
| bilirubin | 1,5 | 15 |
| pH | 8,2 | 6,5 |

Převzato a upraveno podle (Švíglerová a Slavíková 2008).

3.3 Membránové transportní proteiny hepatocytů

Membránové transportní proteiny slouží pro přenos svých substrátů přes membrány buněk. Membrány hepatocytů obsahují řadu transportérů, jež můžeme rozdělit dle lokalizace na basolaterální a apikální (Trauner a Boyer 2003). Jejich přehled a umístění znázorňuje Obr. 3.



Obr. 3: Přehled transportních proteinů v membránách lidského hepatocytu. Schéma nakreslené podle (Trauner a Boyer 2003; Klaassen a Aleksunes 2010). MRP3, *Multidrug resistance-associated protein 3*; MRP4, *Multidrug resistance-associated protein 4*; ABCA1, efluxní basolaterální transportér pro cholesterol; OST α/β , *Organic solute transporter α/β* ; OATP – *Organic anion transporting protein*; NTCP, *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide*; MDR 1, *Multidrug resistance protein 1*; MDR 2, *Multidrug resistance protein 2*; ABCG5/8, apikální transportér pro cholesterol; BSEP, *Bile salt export pump*; MRP 2, *Multidrug resistance-associated protein 2*

3.3.1 Basolaterální transportéry hepatocytů

Basolaterální transportéry jsou proteiny zabudované v basolaterální (sinusoidální) membráně hepatocytů, které slouží pro přenos látek ze sinusoidální krve do intracelulárního prostoru jaterních buněk (Trauner a Boyer 2003). V případě efluxních transportérů probíhá tok v opačném směru, tedy z hepatocytů do krve (Köck a Brouwer 2012).

3.3.1.1 NTCP/Ntcp¹

NTCP/Ntcp (*Sodium taurocholate cotransporting polypeptide, SLC10A1/Slc10a1*) je nejvýznamnější basolaterální transportní systém pro žlučové kyseliny, které přenáší v jejich konjugované formě. Funguje na bázi kotransportu, kdy Na⁺ proudí do buňky na základě koncentračního gradientu. Spolu se dvěma sodnými ionty je přenášena jedna molekula konjugované žlučové kyseliny. Koncentrační gradient je udržován Na⁺/K⁺ ATPázou, která je taktéž zabudována v basolaterální membráně (Pellicoro a Faber 2007; Dawson et al. 2009).

3.3.1.2 OATP/Oatp

OATP/Oatp (*Organic anion transporting protein*) transportéry patří do nadrodiny *SLCO/Slco* (*Solute carrier organic anion*) přenašečů. Jelikož bylo objeveno množství izoform, bylo nutné zavést přehlednější nomenklaturu. Transportéry OATP/Oatp jsou proto dělené do rodin a podrodin na základě shody sekvence aminokyselin. Rodinu tvoří zástupci s více než 40% shodou v sekvenci (rodina OATP1/Oatp1, OATP2/Oatp2...), podrodiny se shodují z více než 60 % (OATP1A/Oatp1a, OATP1B/Oatp1b...) (Hagenbuch a Meier 2004). Představitelé OATP/Oatp transportérů v lidských a myších tkáních se mohou lišit. V basolaterální membráně lidských hepatocytů najdeme především OATP2B1 (*SLCO2B1*), OATP1A2 (*SLCO1A2*), OATP1B1 (*SLCO1B1*) a OATP1B3 (*SLCO1B3*). U myši jsou typické Oatp1a1 (*Slco1a1*), Oatp1a4 (*Slco1a4*), Oatp1b2 (*Slco1b2*, ten je orthologem lidských *SLCO1B1* a *SLCO1B3*). Jde o transportéry substrátově nespecifické, obecně přenáší organické látky steroidní struktury, látky s peptidovým řetězcem, anionty nebo některé kationty. Mezi endogenní ligandy patří

¹V návaznosti na doporučenou nomenklaturu jsou v diplomové práci uváděny názvy lidských proteinů a genů velkými písmeny, myší geny a proteiny jsou psány malým písmem s velkým počátečním písmenem. Geny jsou zvýrazněny kurzívou.

především nekonjugované ale i konjugované žlučové kyseliny, bilirubin a steroidní konjugáty. Slouží také pro transport léčiv (např. statiny, ACEi, sartany) a mohou značně zasahovat do jejich farmakokinetiky (Kalliokoski a Niemi 2009; Klaassen a Aleksunes 2010). Na rozdíl od NTCP/Ntcp nepotřebují k přenosu přítomnost Na^+ a transfer umožňují v obou směrech. Jejich funkce může být ovlivněná pH extracelulárního prostředí, kdy nižší pH podporuje přenos ligandů (Klaassen a Aleksunes 2010).

3.3.1.3 OST α , OST β /Ost α , Ost β

OST α a OST β (*Organic solute transporter α/β , OST α /OST β*) se nachází v hojném počtu v lidských hepatocytech a cholangiocytech, naopak myši Ost α v hepatocytech detekovány nebyly. Mimo játra se vyskytují zejména v ileu a také v proximálních tubulech u obou živočišných druhů (Ballatori et al. 2009). Mezi jejich substráty patří žlučové kyseliny, sulfátované estrony, digoxin a prostaglandin E2 (Klaassen a Aleksunes 2010). Pro přenos látek musí nejdříve vytvořit heterodimer OST α /OST β - Ost α /Ost β . Transport je založen na mechanismu usnadněné difuze, může tedy probíhat v obou směrech v závislosti na elektrochemickém gradientu přenášené látky (Ballatori et al. 2009). Zatímco ve střevech jsou významnými transportéry za fyziologických podmínek, kde slouží k přenosu molekul z enterocytů do portální krve, v játrech hrají roli hlavně při cholestáze, kdy fungují jako efluxní transportéry a snižují zvýšenou koncentraci žlučových kyselin v hepatocytech (Kosters a Karpen 2008).

3.3.1.4 MRP/Mrp

MRP/Mrp (*Multidrug resistance-associated proteins, ABCC/Abcc*) transportéry tvoří skupinu přenašečů, která spadá do rodiny ABC (*ATP-binding cassette*). ABC transportéry obsahují domény vázající ATP a umožňují jejich hydrolýzu za vzniku ADP. Rozkladem molekuly vzniká energie, která je spotřebována na přenos substrátu přes membránu. Uskutečňuje se ve většině případů proti koncentračnímu gradientu (Klaassen a Aleksunes 2010). Na basolaterální membráně nacházíme zástupce MRP3/Mrp3 a MRP4/Mrp4 jako významné efluxní transportéry (Köck a Brouwer 2012).

MRP3/Mrp3 (*Multidrug resistance-associated protein 3, ABCC3/Abcc3*) lze nalézt v hepatocytech, cholangiocytech, enterocytech nebo v renálních buňkách na basolaterální membráně. Jeho exprese se zvyšuje při cholestáze, např. při defektu

apikálního MRP2 u pacientů s Dubin-Johnsonovým syndromem. Zprostředkovává eflux konjugátů s kyselinou glukuronovou do sinusoidální krve. Za patologických podmínek se tedy přenesené látky vyskytují ve větší míře v krvi a zvyšuje se jejich renální exkrece na úkor hepatobiliárního vylučování (Köck a Brouwer 2012).

MRP4/Mrp4 (*Multidrug resistance-associated protein 4, ABCC4/Abcc4*) je podobně jako MRP3/Mrp3 up-regulován za cholestatických podmínek, čímž pravděpodobně přispívá k ochraně jater před kumulací toxických látek. Transportuje žlučové kyseliny a steroidní látky ve formě sulfatovaných konjugátů, také cyklické nukleotidy cAMP a cGMP. Slouží i pro transport xenobiotik, mezi něž patří některá antivirotika (adefovir, ganciklovir), antihypertenziva (thiazidová diuretika, sartany) a cytostatika (methotrexát, 6-merkaptopurin) (Köck a Brouwer 2012).

3.3.1.5 ABCA1/Abca1

ABCA1/Abca1 (*ABCA1/Abca1*) je protein z nadrodiny ABC, známý také jako CERP (*Cholesterol efflux regulatory protein*), který provádí eflux cholesterolu z hepatocytu, a tím brání intracelulární akumulaci cholesterolu. Najdeme ho také na basolaterální membráně enterocytů. Mutace genu *ABCA1* vede ke vzniku Tangierovy choroby, což je autozomálně recesivní onemocnění, při kterém se nevytváří HDL (*high density lipoprotein*). Dochází ke kumulaci cholesterolu v různých tkáních (plíce, střeva) a stolici. Pacienti mají sníženou plazmatickou koncentraci cholesterolu, fosfolipidů a HDL. Játra kompenzačně zvyšují syntézu cholesterolu. Biliární sekrece cholesterolu, žlučových kyselin a fosfolipidů při absenci ABCA1 však narušená není (Klaassen a Aleksunes 2010).

3.3.2 Apikální transportéry hepatocytů

Apikální transportéry se nachází na apikální (kanalikulární) membráně hepatocytů a jsou zodpovědné za sekreci endogenních látek a xenobiotik do žlučového kanálku (Trauner a Boyer 2003).

3.3.2.1 MDR3/Mdr2

Dalšími zástupci ABC nadrodiny jsou transportéry MDR/Mdr (*Multidrug resistance protein, ABCB/Abcb*). MDR3 (*Multidrug resistance protein 3, ABCB4*) se

nachází zejména v játrech. Myší játra obsahují homolog *Mdr2* (*Abcb4*). Transportují fosfolipidy přes kanalikulární membránu hepatocytů do žluče. Přenesené fosfolipidy pak v tekutině společně se žlučovými kyselinami formují micely, které brání jejich toxickému působení (Klaassen a Aleksunes 2010). Transportér se tímto významně podílí na ochraně před toxickým vlivem žlučových kyselin, což dokazují studie na myších postrádajících *Mdr2* gen, u kterých byly zaznamenány zvýšené markery zánětu a proliferace žlučových cest a poškození jater (Mauad et al. 1994). Mutace lidského *MDR3* genu vede ke vzniku dědičné autosomálně recesivní progresivní familiární intrahepatální cholestáze 3. typu, při které dochází k narušení toku žlučových kyselin, aniž by byly patrné patologické změny ve struktuře jater a žlučových cest (de Vree et al. 1998).

3.3.2.2 MDR1/Mdr1

MDR1/Mdr1 (Multidrug resistance protein 1, *ABCB1*, u myší *Abcb1a/Abcb1b*), zvaný také jako P-glykoprotein (Klaassen a Aleksunes 2010), se nachází v různých tkáních. Nejhojněji je zastoupen v tlustém střevě, tenkém střevě, dále také ledvinách, v hematoencefalické bariéře, testikulární bariéře, placentě a játrech. Přenáší pestrou škálu substrátů, mezi nimi amfifilní objemné kationty léčiv, steroidní látky, hydrofobní peptidy a glykolipidy. Významně ovlivňuje farmakokinetiku endogenních látek a některých léčiv. Snižuje jejich absorpci ze střeva, upravuje jejich distribuci (např. snižuje průchod přes hematoencefalickou bariéru) a zvyšuje jejich eliminaci v játrech a ledvinách (Köck a Brouwer 2012). Jeho efluxní schopnosti jsou také spojovány s mnohočetnou lékovou rezistencí nádorových buněk, kdy je nádor schopný odolávat účinkům cytostatik (Klaassen a Aleksunes 2010; Holčáková et al. 2014).

3.3.2.3 BSEP/Bsep

BSEP/Bsep (*Bile salt export pump*, *ABCB11/Abcb11*) je známý také jako SPGP (*Sister of P-glycoprotein*). Patří do ABC nadrodiny a je lokalizován výhradně v apikální membráně hepatocytů. Je značně substrátově specifický, do žluče přenáší monovalentní soli konjugovaných žlučových kyselin, pro něž je primárním transportérem do žlučového kanálku. Snižování jeho exprese vede k akumulaci žlučových kyselin v hepatocytech, cholestáze a poškození jater. Existují dědičná onemocnění s mutací genu *BSEP*, např. progresivní familiární intrahepatická cholestáza 2. typu (Köck a Brouwer 2012).

3.3.2.4 MRP2/Mrp2

MRP2/Mrp2 (*Multidrug resistance-associated protein 2, ABCC2/Abcc2*) pochází z MRP rodiny a je umístěný na apikální membráně hepatocytů, enterocytů, buňkách placenty a ledvin. V játrech obstarává biliární exkreci žlučových kyselin, oxidovaného a redukovaného glutathionu a jeho konjugátů, bilirubinu a dalších látek v podobě glukuronidovaných a sulfatovaných konjugátů. Při deficitu MRP2 je narušena sekrece glukuronidovaného bilirubinu do žluče. K zabránění akumulace substrátu v hepatocytech se kompenzačně zvyšuje exprese efluxního proteinu MRP3, který exportuje konjugáty bilirubinu přes sinusoidální membránu do krve, a tak zapříčiní vznik hyperbilirubinémie. Tento patologický stav vzniká u pacientů s Dubin-Johnsonovým syndromem, kteří mají vrozenou mutaci genu *MRP2* (Köck a Brouwer 2012).

3.3.2.5 ABCG5/ABCG8 – Abcg5/Abcg8

Sekreci cholesterolu do žluče zajišťují proteiny ABCG5/Abcg5 (*ABCG5/Abcg5*) a ABCG8/Abcg8 (*ABCG8/Abcg8*) po vytvoření heterodimerní struktury. Vyskytují se také ve střevě, kde snižují absorpci substrátů, a v cholangiocytech. Mimo cholesterol přenáší i rostlinné steroly. Mutace jejich genu vede k autozomálně recesivnímu onemocnění sitosterolémie, které se projevuje xanthomy a je spojeno s rozvojem aterosklerózy v nízkém věku (Klaassen a Aleksunes 2010).

Tabulka 2 poskytuje přehled transportérů v hepatocytech, jejich funkci a substráty.

Tabulka 2: Přehled transportních proteinů v hepatocytech pro základní komponenty žluče.

| Transport cholesterolu | | | | |
|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|--|---------------------------------------|
| <i>transportér</i> | <i>gen</i> | <i>membrána</i> | <i>substrát</i> | <i>Funkce</i> |
| ABCG5/8 | <i>ABCG5/8</i> | apikální | cholesterol | sekrece do žluče |
| ABCA1 | <i>ABCA1</i> | basolaterální | cholesterol | eflux z hepatocytu do krve |
| LDL-R | <i>LDLR</i> | basolaterální | LDL částice | vychytávání LDL cholesterolu z plazmy |
| SR-B1 | <i>SR-B1</i> | basolaterální | HDL částice | vychytávání HDL cholesterolu z plazmy |
| Transport žlučových kyselin | | | | |
| <i>transportér</i> | <i>gen</i> | <i>membrána</i> | <i>substrát</i> | <i>Funkce</i> |
| BSEP | <i>ABCB11</i> | apikální | solí ŽK | sekrece do žluče |
| MRP2 | <i>ABCC2</i> | apikální | bilirubin, glutathion, LČ, divalentní ŽK | sekrece do žluče |
| OATPs | <i>OATP</i> | basolaterální | nekonjug. ŽK, konjug. ŽK, bilirubin, steroidní konjugáty, LČ | Influx i eflux z hepatocytu |
| NTCP | <i>SLC10A1</i> | basolaterální | konjug. ŽK | influx do hepatocytu |
| OST α/β | <i>OSTα/β</i> | basolaterální | konjug. ŽK. | eflux z hepatocytu do krve |
| MRP3 | <i>ABCC3</i> | basolaterální | konjugáty endogenních a exogenních látek s k. glukuronovou | eflux z hepatocytu do krve |
| MRP4 | <i>ABCC4</i> | basolaterální | konjugáty endogenních a exogenních látek s k. sírovou | eflux z hepatocytu do krve |
| Transport fosfolipidů | | | | |
| <i>transportér</i> | <i>gen</i> | <i>membrána</i> | <i>substrát</i> | <i>Funkce</i> |
| MDR3 | <i>ABCB4</i> | apikální | fosfolipidy | sekrece do žluče |

Upraveno podle (Klaassen a Aleksunes 2010).

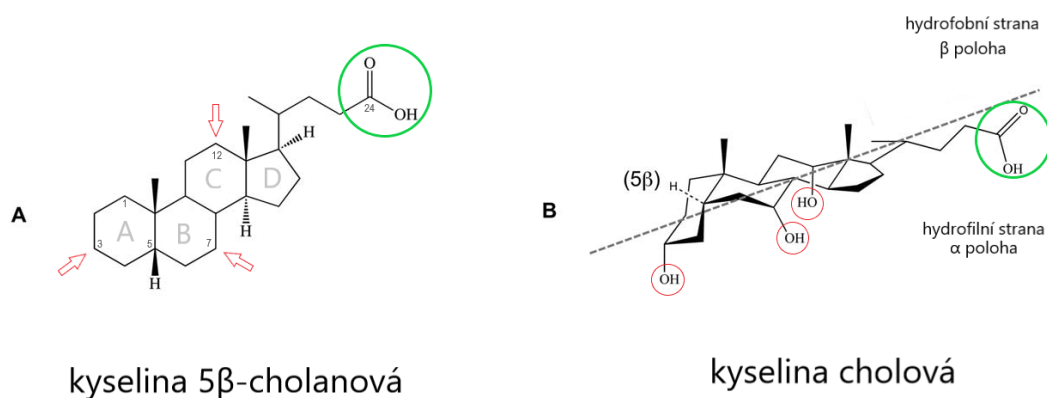
LČ, léčiva; ŽK, žlučové kyseliny

4 Žlučové kyseliny

4.1 Struktura

Žlučové kyseliny jsou molekuly steroidní povahy. Jde o hydroxyderiváty kyseliny cholan-24-ové, která vychází ze struktury cholanu (C₂₄). Základem je steroidní jádro, které je utvořeno spojením tří šestiuhlíkatých kruhů A, B, C a jednoho pětiuhlíkatého kruhu D. Kruhy A a B mají *cis*-konfiguraci, vodík na C₅ je většinou v poloze β (Li a Chiang 2014). Karboxylová skupina se nachází v postranním řetězci na C₂₄, hydroxylové skupiny se váží na steranové jádro do poloh C₃, C₇, C₁₂ (viz Obr. 4, struktura A) (Monte et al. 2009).

Žlučové kyseliny jsou amfifilní struktury. Hydrofobní část představuje steroidní jádro. Hydrofilní část vytváří karboxylová skupina společně s hydroxylovými skupinami, které jsou orientovány převážně do pozice α (viz Obr. 4, struktura B). Díky amfifilním vlastnostem fungují žlučové kyseliny jako detergenční agens. (Chiang2013a)

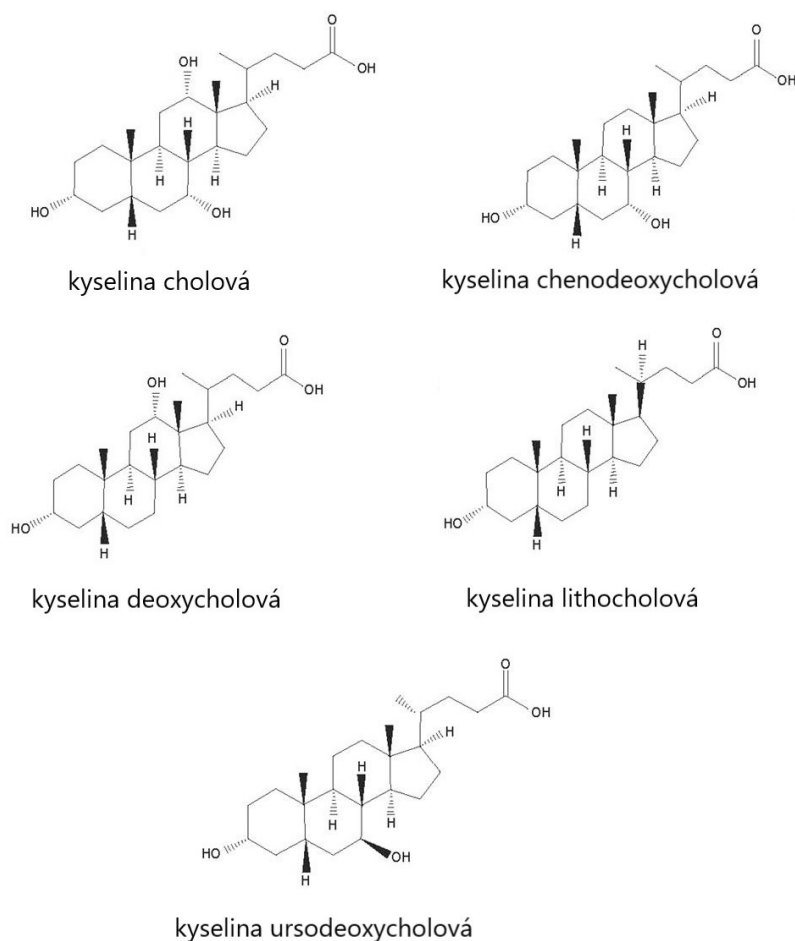


Obr. 4: Výchozí struktura žlučových kyselin (A), prostorové uspořádání kyseliny cholové (B). Převzato a upraveno z (Marin et al. 2015).

V organismu se vyskytují většinou ve formě konjugátů, které vznikají reakcí karboxylové skupiny s aminokyselinami glycínem nebo taurínem. Poměr konjugátů s glycínem a taurínem je asi 3:1. U myši tvoří konjugáty z 95 % taurin. Díky konjugaci jsou molekuly lépe ionizovány za fyziologického pH. Jsou tedy lépe rozpustné, podléhají

menší pasivní absorpci, méně precipitují s Ca^{2+} a jsou odolnější vůči pankreatickým karboxypeptidázám. Tvorbou solí konjugovaných žlučových kyselin se tyto vlastnosti ještě zvyšují (Chiang 2013a).

Žlučové kyseliny mohou být rozděleny na primární – k. cholová (CA, *cholic acid*) a chenodeoxycholová (CDCA, *chenodeoxycholic acid*), sekundární – k. deoxycholová (DCA, *deoxycholic acid*) a lithocholová (LCA, *lithocholic acid*), terciární – k. ursodeoxycholová (UDCA, *ursodeoxycholic acid*). Jejich struktury jsou znázorněny na Obr. 5. V lidské žluči jsou nejvíce zastoupeny CA, CDCA a DCA (Chiang 2013a). U myši je rozložení žlučových kyselin odlišné. CDCA je dále hydroxylována za vzniku kyseliny α -muricholové ($3\alpha, 6\beta, 7\alpha$; α -MCA, *α -muricholic acid*) a β -muricholové ($3\alpha, 6\beta, 7\beta$; β -MCA, *β -muricholic acid*), což molekule zvyšuje hydrofilitu a snižuje toxicitu. Myšimi hlavními primárními žlučovými kyselinami jsou tedy α - a β -MCA a CA (Chiang 2017).

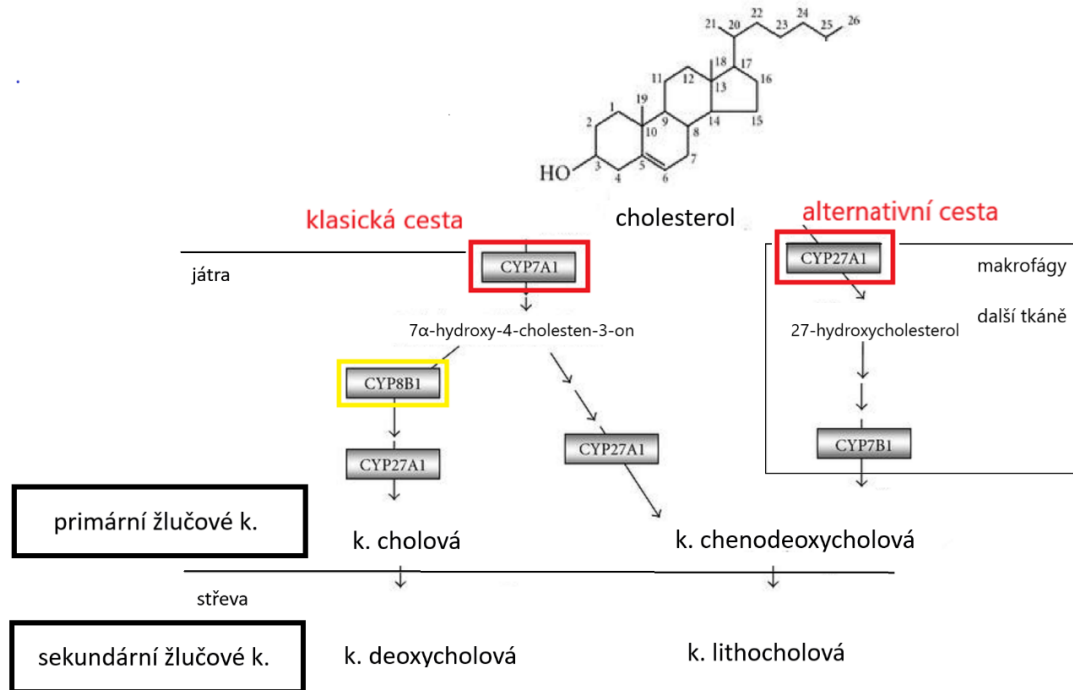


Obr. 5: Struktury žlučových kyselin primárních (k. cholová a chenodeoxycholová), sekundárních (k. deoxycholová a lithocholová) a terciární (k. ursodeoxycholová). Převzato a upraveno z (Perez a Briz 2019).

4.2 Syntéza žlučových kyselin

4.2.1 Syntéza primárních žlučových kyselin

Primární žlučové kyseliny jsou produktem katabolismu cholesterolu v játrech. Denně je syntetizováno *de novo* 200-600 mg žlučových kyselin. Při přeměně cholesterolu dochází k hydroxylaci, nasycení dvojně vazby, epimerizaci hydroxylových skupin a odštěpení 3 uhlíků z postranního řetězce (Li a Chiang 2014). Do reakcí je zapojeno 17 různých enzymů, nejvýznamnější z nich jsou cholesterol-7 α -hydroxyláza (CYP7A1), sterol-12 α -hydroxyláza (CYP8B1) a sterol-27-hydroxyláza (CYP27A1). Reakce se odehrávají v cytosolu, endoplazmatickém retikulu, mitochondriích a peroxizomech (Chiang 2013a). Biosyntéza probíhá dvěma možnými cestami, které jsou zjednodušeně znázorněny na Obr. 6.



Obr. 6: Schéma zjednodušeně zobrazuje syntézu žlučových kyselin, která může probíhat dvěma cestami. Výchozí molekulou je vždy cholesterol. Při klasické cestě se jako první enzym uplatňuje cholesterol-7 α -hydroxyláza - CYP7A1, což je klíčový enzym, který limituje rychlost biosyntézy. Alternativní cesta začíná hydroxylací katalyzovanou sterol-27-hydroxylázou - CYP27A1. Produktem obou cest je primární kyselina CDCA. V případě klasické cesty ještě vzniká primární CA díky enzymu sterol-12 α -hydroxyláze - CYP8B1, která je odpovědná za dodržení stabilního poměru syntézy CA a CDCA.

Vlivem bakteriální mikroflóry jsou ve střevech konvertovány na sekundární žlučové kyseliny DCA a LCA. Převzato a upraveno z (Li a Chiang 2009).

4.2.1.1 Klasická (neutrální) cesta

V lidském těle je 90 % žlučových kyselin tvořeno touto cestou. Jedná se o hlavní cestu biosyntézy žlučových kyselin v lidském těle (Li a Chiang 2014). V prvních krocích dochází k modifikaci steroidního jádra, poté následuje oxidativní odštěpení uhlíků z postranního řetězce (Chiang 2002).

Syntéza začíná přeměnou cholesterolu na 7 α -hydroxycholesterol v endoplazmatickém retikulu, kterou katalyzuje mikrozomální enzym CYP7A1. CYP7A1 patří mezi cytochromy P450. Vyskytuje se výhradně v hepatocytech. Jde o klíčový enzym pro syntézu žlučových kyselin, neboť je zodpovědný za rychlost přeměny cholesterolu na žlučové kyseliny. Ovlivňování exprese genu *CYP7A1* patří mezi nejvýznamnější mechanismy regulace homeostázy žlučových kyselin. Žlučové kyseliny usměrňují jeho expresi negativní zpětnou vazbou. Způsobují jeho represí po aktivaci nukleárního receptoru FXR (*Farnesoid X receptor*). Opačný vliv má cholesterol, který skrze aktivaci nukleárního receptoru LXR (*Liver X receptor*) enzym up-reguluje. Avšak tento mechanismus se uskutečňuje pouze v potkaních hepatocytech, ne v lidských. Také hormony a exogenní sloučeniny působí na *CYP7A1*, např. fenobarbital přes aktivaci CAR (*Constitutive androstane receptor*) nebo rifampicin přes aktivaci PXR (*PregnaneX receptor*) potlačují jeho transkripci (Monte et al. 2009).

Následuje několik reakcí, jejichž výslednou molekulou je CDCA. Pro tvorbu CA je nezbytný mikrozomální enzym CYP8B1, který je katalyzátorem hydroxylace na C₁₂. Bez CYP8B1 by byla tvořena pouze CDCA. CYP8B1 je tedy zodpovědný za poměr CA a CDCA v celkovém množství nově vzniklých žlučových kyselin, zatímco CYP7A1 je zásadní pro celkovou tvorbu primárních žlučových kyselin (Li a Chiang 2014).

4.2.1.2 Alternativní (kyselá) cesta

Za fyziologických podmínek má tato cesta asi 10% podíl na celkové syntéze žlučových kyselin (Li a Chiang 2014). V případě pacientů s jaterním onemocněním však význam této cesty biosyntézy roste, jelikož neutrální cesta je potlačena zánětlivou reakcí (Zhou a Hylemon 2014).

Na rozdíl od klasické cesty zde nejdříve dochází k odštěpení uhlíků z postranního řetězce, posléze je modifikován steroidní skelet (Chiang 2002). První krok katalyzuje mitochondriální enzym CYP27A1, který se nachází nejen v játrech, ale i v ostatních tkáních a makrofázích. Počáteční reakce se tedy odehrávají i mimo hepatocyty, odkud mohou být vzniklé oxysteroly dopraveny do jater. Konečná úprava a vznik žlučových kyselin však vždy probíhá v hepatocytech. Produktem je pouze CDCA (Chiang 2009).

Rychlost biosyntézy nezávisí na prvním katalyzátoru CYP27A1, nýbrž je podmíněna dostupným množstvím výchozího substrátu – cholesterolu. Mitochondriální membrána obsahuje pouze malé množství cholesterolu, proto limitujícím prvkem přeměny je jeho transport k membráně mitochondrií (Zhou a Hylemon 2014).

4.2.2 Syntéza sekundárních a terciárních žlučových kyselin

Sekundární žlučové kyseliny vznikají ve střevech z primárních kyselin aktivitou bakteriální mikroflóry. Nejprve musí být primární žlučové kyseliny dekonjugovány, následující reakce vedou k 7 α -dehydroxylaci. CA je metabolizována na DCA, z CDCA vzniká LCA. LCA je toxická, ale velká část odchází se stolicí. Malé množství se dostává do jater, kde je konjugací se sulfáty detoxifikována, nevstřebatelné konjugáty jsou vyloučeny do žluče a exkretovány stolicí. Terciární UDCA vzniká po 7 β -epimerizaci CDCA. Díky změně konfigurace hydroxylové skupiny je UDCA hydrofilnější a méně toxická (Brodanová et al. 1998; Zhou a Hylemon 2014).

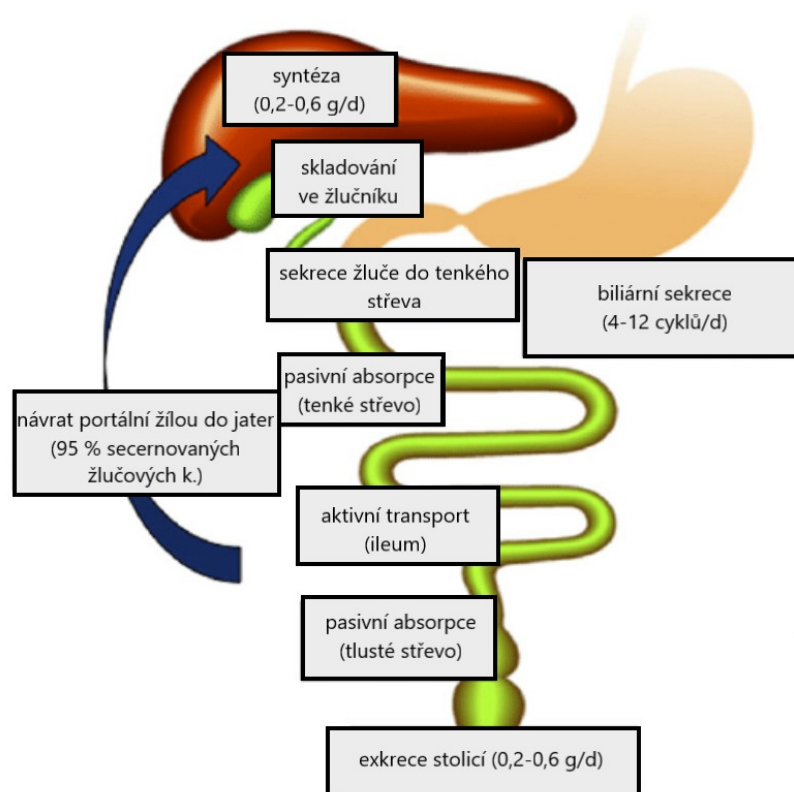
4.3 Enterohepatální oběh

Enterohepatální oběh žlučových kyselin je proces recyklace, kde se podstatná část (asi 95 %) secernovaných žlučových kyselin resorbuje ze střev do portální krve a vrací se zpět do jater. Cirkulace žlučových kyselin v gastrointestinálním traktu je zjednodušeně znázorněna na Obr. 7.

Žlučové kyseliny jsou z hepatocytů vylučovány ve formě konjugátů apikálními transportéry do žluče a jejím prostřednictvím vnikají do tenkého střeva. Konjugované žlučové kyseliny jsou resorbovány v terminálním ileu pomocí aktivního transportu, který zajišťuje protein ASBT/Asbt (*Apical sodium-dependent bile acid transporter*, *SLC10A/Slc10a*) v apikální membráně ileálních enterocytů. Přenáší hlavně konjugované,

v menší míře i nekonjugované kyseliny. K basolaterální membráně jsou dopraveny pomocí intestinálního proteinu vázající žlučové kyseliny, odkud pronikají přes basolaterální transportéry OST α /OST β do portální krve (Li a Chiang 2009). Dekonjugované kyseliny se vstřebávají především pasivní difuzí v tenkém a tlustém střevě. Nevstřebené žlučové kyseliny odchází stolicí v konjugované formě s glycinem nebo taurinem. Ztráty jsou nahrazeny *de novo* syntézou v játrech, aby bylo zachováno konstantní množství žlučových kyselin. Oběh se opakuje 4-12 x denně (Li a Chiang 2009; Trauner a Boyer 2003; Li a Chiang 2014).

Při průchodu žluče žlučovými cestami může být malé množství kyselin resorbováno také přes cholangiocyty. Některé žlučové kyseliny pronikají do systémové cirkulace, dostávají se do ledvin, kde dochází k tubulární reabsorpci a kyseliny jsou krví transportovány zpět do jater (Chiang 2013a).



Obr. 7: Pohyb žlučových kyselin v gastrointestinálním traktu. Převzato a upraveno z (Li a Chiang 2014).

4.4 Regulace syntézy žlučových kyselin

Žluč a žlučové kyseliny mají v organismu řadu důležitých funkcí. Zásahy do jejich syntézy a vylučování mohou vést ke vzniku různých onemocnění např. cholestáza, tvorba žlučových kamenů, cirhóza jater apod. (Zhou a Hylemon 2014). Proto je homeostáza žlučových kyselin složitě a velmi přesně regulována, a to jak na úrovni transkripce, tak i posttranskripčními mechanismy. Mezi hlavní regulátory transkripce patří nukleární receptory (Chiang 2002).

Přehled regulace transkripce CYP7A1, CYP8B1 a transportérů žluče poskytuje Tabulka 3.

4.4.1 Role nukleárních receptorů

Nukleární receptory fungují jako ligandem aktivované transkripční faktory, které se váží na responzivní elementy v promotoru cílových genů a inhibují nebo up-regulují jejich expresi. Pro homeostázu žlučových kyselin mají největší význam FXR, PXR, VDR (*Vitamin D receptor*) a CAR. Tyto receptory jsou hojně exprimovány v místech s vysokou koncentrací žlučových kyselin, tedy v játrech a ve střevech. Při cholestáze jsou nahromaděné žlučové kyseliny schopné receptory aktivovat, čímž zpětně usměrňují svoji zvýšenou hladinu. Hlavní regulační mechanismus spočívá ve změně transkripce mRNA *CYP7A1*, nicméně ovlivňovány jsou i další geny pro proteiny účastnící se syntézy, transportu a metabolismu (Juřica et al. 2016).

4.4.1.1 FXR – Farnesoid X receptor

Největší podíl na regulaci má FXR (Li a Chiang 2014). Jeho ligandem jsou žlučové kyseliny nebo jejich konjugáty (Juřica et al. 2016). Jejich afinita k receptoru klesá v řadě CDCA → DCA → CA → LCA. MCA působí antagonisticky, UDCA s receptorem neinteraguje (Schaap et al. 2014). Aktivovaný FXR se váže na responzivní element v podobě monomeru nebo jako heterodimer s RXR (*Retinoid X receptor*) na nukleární receptor SHP (*Small heterodimer partner*) viz dále (Juřica et al. 2016).

FXR působí na úrovni syntézy žlučových kyselin, kde způsobuje represi transkripce genů *CYP7A1* a *CYP8B1*. K represi dochází nepřímo, s využitím dalších signálních elementů. Popisovány jsou dva mechanismy:

1. Aktivovaný FXR v játrech up-reguluje nukleární receptor SHP. SHP inhibuje transkripční aktivitu LRH-1 (*Liver related homologue-1*) a nukleárního faktoru HNF4 α (*Hepatocyte nuclear factor-4 α*), čímž sníží jejich interakci s responzivními elementy na promotorech genů *CYP7A1* a *CYP8B1*. Kaskáda vede k potlačení transkripce zmíněných genů, což se projeví snížením syntézy žlučových kyselin (Marin et al. 2015).

2. Ve střevě vede aktivace FXR k transkripci intestinálního hormonu FGF19 (*Fibroblast growth factor 19*), u myši se vyskytuje ortholog Fgf15 (*Fibroblast growth factor 15*). FGF19 se portální venou dostává do jater, kde se váže na svůj receptor FGFR4 (*Fibroblast growth factor receptor 4*), který vytvoří komplex s transmembránovým proteinem β -Klotho. Komplex spouští signalizační kaskádu, která vyústí v inhibici *CYP7A1* a *CYP8B1*. (Schaap et al. 2014; Li a Chiang 2014; Marin et al. 2015).

Tento nukleární receptor reguluje v játrech a ileu expresi některých transportérů. V hepatocytech vyvolává represi basolaterálního transportéru NTCP, v enterocytech ASBT (myši a lidský, ne potkaní). Naopak up-regulované jsou apikální transportéry hepatocytů pro zvýšení sekrece žluče do žlučových cest - BSEP, MRP2, MDR2, ABCG5 a ABCG8, basolaterální efluxní transportéry OST α/β v hepatocytech i enterocytech a enzymy zajišťující konjugaci (Schaap et al. 2014; Li a Chiang 2014; Juřica et al. 2016).

4.4.1.2 PXR – Pregnane X receptor

PXR svou regulační funkci vykonává po vytvoření heterodimeru s RXR- α . Ze žlučových kyselin ho aktivuje pouze LCA a její metabolit 3-keto-LCA. Mimo zmíněné ligandy existuje řada dalších agonistů, mezi které patří glukokortikoidy, steroidní látky, makrolidová antibiotika a rifampicin (Juřica et al. 2016).

PXR snižuje syntézu žlučových kyselin potlačením exprese *CYP7A1*. V PXR způsobuje snížení exprese *CYP7A1* po vazbě na HNF4- α . HNF4- α za běžných podmínek tvoří komplex s PGC1- α (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α*) a společně stimulují transkripci *CYP7A1*. Po navázání PXR na HNF4- α nevzniká zmíněný komplex s PGC1- α , což vede k inhibici transkripce *CYP7A1*. Jde tedy o mechanismus potlačení exprese *CYP7A1* a snížení syntézy žlučových kyselin nezávisle na SHP (Schaap et al. 2014).

Hlavní funkce PXR spočívá v ochraně organismu před xenobiotiky (Juřica et al. 2016), jelikož zvyšuje expresi biotransformačních enzymů a tím podporuje jejich detoxifikaci. Indukuje enzymy 1. fáze metabolisme zajišťující oxidativní reakce (zástupci cytochromů P450 - CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP3A) a enzymy 2. fáze metabolisme katalyzující konjugační reakce (sulfotransferáza SULT2A1, UDP-glukuronyl-N-transferáza UGT1A1). Rychleji jsou metabolizovány nejen exogenní látky, ale také endobiotika, např. LCA. Snadnější vylučování je podpořeno i indukci kanalikulárního transportéru MRP2, mimo tento transportér indukuje i basolaterální OATP2 (Schaap et al. 2014).

Jelikož PXR umožňuje snižovat syntézu žlučových kyselin a zvyšovat jejich odbourávání, jsou agonisté PXR potenciálními adepty pro léčbu chronických zánětlivých onemocnění jater a střev (Schaap et al. 2014).

4.4.1.3 CAR – Constitutive androstane receptor

CAR se podobně jako PXR zapojuje do biotransformace a exkrece xenobiotických a endogenních látek (např. LCA, bilirubin). Podobnost účinku je dána tím, že se CAR po vytvoření heterodimeru s RXR- α může vázat na shodné responzivní elementy, a tím ovlivňovat stejné geny. Up-reguluje např. geny pro enzymy 2. fáze biotransformace katalyzující konjugační reakce - sulfotransferázu SULT2A1, UDP-glukuronyl N-transferázu UGT1A1 nebo gen pro CYP3A4 (CYP3A4 v menší míře než PXR). Zvyšuje expresi genů pro transportéry MRP2 a MRP3. Na rozdíl od ostatních zmíněných nukleárních receptorů, CAR není aktivován žlučovými kyselinami, ačkoli vazba agonistů (např. fenobarbitalu) vede ke změnám v jejich metabolismu. Aktivovaný CAR prostřednictvím indukce biotransformačních enzymů zvyšuje hydrofilní vlastnosti LCA, čímž přispívá k její detoxifikaci (Schaap et al. 2014; Marin et al. 2015; Juřica et al. 2016).

4.4.1.4 VDR- Vitamin D receptor

VDR je lokalizován v různých tkáních lidského organismu, např. ve střevech, ledvinách, β -buňkách pankreatu, osteoblastech, adipocytech, monocytech nebo hepatocytech (ne v myších hepatocytech) (Schaap *et al.*, 2014; Li and Chiang, 2014; Juřica *et al.*, 2016). Typickým agonistou je kalcitriol ze žlučových kyselin LCA a její

metabolit 3-keto-LCA. Ligandy aktivují VDR i v nižších koncentracích než PXR. Aktivovaný VDR podporuje metabolizaci žlučových kyselin zvýšením exprese enzymů CYP3A4, CYP2B, CYP2C a SULT2A1 (Schaap et al. 2014; Li a Chiang 2014; Juřica et al. 2016). Některé studie popisují, že VDR ovlivňuje syntézu žlučových kyselin, mechanismus však není zcela objasněn (Li a Apte 2015). Schmidt *et al.*, 2010 ve studii na myších uvádí, že aktivace intestinálního VDR vede ke snížení exprese *Cyp7a1* v játrech prostřednictvím intestinálního Fgf15. Některé studie však poukazují na opačný vliv na syntézu, jelikož v játrech byla mRNA *Cyp7a1* zvýšena. Efekt je spojován se sníženou expresí SHP způsobenou aktivací VDR (Chow et al. 2014).

Tabulka. 3: Vliv nukleárních receptorů na membránové transportéry hepatocytů a na významné enzymy biosyntézy žlučových kyselin.

| receptor | gen | ovlivnění exprese | Agonista |
|----------|--------------------|-------------------|---|
| FXR | <i>CYP7A1</i> | ↓ | žlučové kyseliny CDCA > DCA > CA > LCA |
| | <i>CYP8B1</i> | ↓ | |
| | <i>CYP27A1</i> | ↓ | |
| | <i>NTCP</i> | ↓ | |
| | <i>ASBT</i> | ↓ | |
| | <i>BSEP</i> | ↑ | |
| | <i>OSTα/OSTβ</i> | ↑ | |
| | <i>MRP2</i> | ↑ | |
| | <i>MDR2</i> | ↑ | |
| | <i>ABCG5/ABSG8</i> | ↑ | |
| PXR | <i>MRP2</i> | ↑ | LCA, 3-keto-LCA, glukokortikoidy, steroidní látky (progesteron, pregnenolon), xenobiotika (např. makrolidy, rifampicin) |
| | <i>OATP2</i> | ↑ | |
| | <i>CYP7A1</i> | ↓ | |
| CAR | <i>MRP2</i> | ↑ | xenobiotika (např. fenobarbital) |
| | <i>MRP3</i> | ↑ | |
| | <i>CYP7A1</i> | ↓ | |
| VDR | <i>CYP7A1</i> | ↓ | LCA, 3-keto-LCA, kalcitriol |

Převzato a upraveno z (Li a Apte 2015). CA – kyselina cholová, CDCA – kyselina chenodeoxycholová, DCA – kyselina deoxycholová, LCA – kyselina lithocholová.

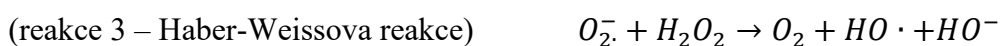
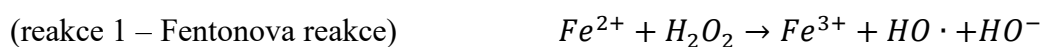
5 Železo

Železo je důležitým stopovým prvkem v lidském organismu. Jeho celkové množství v lidském těle se pohybuje okolo 4-5 g. 60-70 % zaujímá železo vázané v hemoglobinu v erythrocytech, 10-15 % tvoří tzv. funkční železo, což je železo navázané v myoglobinu, cytochromech a dalších proteinech. 20–30 % tvoří zásobní ferritin. Necelé 1 % nalezneme navázané na transportním proteinu transferrinu v systémové cirkulaci (Matouš et al. c2010).

5.1 Oxido-redukční vlastnosti

Železo se v organismu může vyskytovat ve dvou oxidačních stupních - Fe^{2+} a Fe^{3+} . Díky tomu se účastní mnoha oxido-redukčních reakcí, ve kterých jsou přenášeny elektrony. Jako součást některých enzymů pomáhá katalyzovat redoxní reakce, např. při Krebsově cyklu (akontáza, sukcinátdehydrogenáza), při detoxifikaci xenobiotik (cytochrom P450), při syntéze a opravě DNA (ribonukleotidreduktáza). Také se účastní přenosu elektronů při buněčném dýchání (cytochrom a, b, c). Je důležité pro transport kyslíku v krevním řečišti (hemoglobin) a pro zásobení svalů kyslíkem (myoglobin) (Horák et al. 2010; Cassat a Skaar 2013).

Schopnost oxidace a redukce nemusí být vždy užitečná, ale může vést k poškození organismu vlivem vznikajících reaktivních forem kyslíku, které způsobují oxidační stres. Nejznámější oxidační reakce je Fentonova reakce (reakce 1), kde volné železnaté kationty reagují s peroxidem vodíku za vzniku železitých iontů a reaktivních hydroxylových radikálů. Dokonce i nadměrné množství oxidované formy Fe^{3+} může mít na svědomí vznik radikálů. V přítomnosti redukčních činidel jako je superoxid, askorbát nebo redukovaný glutathion se Fe^{3+} redukuje na Fe^{2+} (reakce 2), železnatý kationt pak vstupuje do reakce s peroxidem vodíku (viz Fentonova reakce). Ve výsledku tedy vysoká koncentrace železitých iontů vede v přítomnosti redukčních činidel, která mají za běžných podmínek antioxidační účinky, k produkci hydroxylových radikálů. Tuto skutečnost shrnuje Haber-Weissova reakce (reakce 3) (Lawen a Lane 2013).



5.2 Metabolismus železa

5.2.1 Absorpce železa

Ze střev je železo absorbováno ve formě hemové (z masa, vnitřností) nebo nehemové (v cereáliích, zelenině) (Matouš et al. c2010). Mechanismy absorpce jsou pro zmíněné formy odlišné. Lepší vstřebatelnost má hemové železo, kterého se do krve dostává 20-40 % z podaného množství. Nehemové železo se vstřebává pouze z 10-20 % (Reichert et al. 2017). Průměrný člověk přijme ve stravě kolem 15-20 mg Fe/den, z čehož je organismus schopný využít asi 1-2 mg (Muñoz et al. 2009).

5.2.1.1 Nehemové železo

Nehemové železo je v potravě přítomné v oxidačních stavech Fe^{2+} a Fe^{3+} . Před membrány jsou transportovány pouze ionty Fe^{2+} , Fe^{3+} ionty musí být před vstupem do buňky redukovány. Redukce probíhá pomocí membránové reduktázy Dcytb (*Duodenal cytochrome b*), kofaktorem reakce je askorbát. Po konverzi jsou Fe^{2+} ionty přeneseny z lumen střev do enterocytu membránovým transportním přenašečem DMT1 (*Divalent metal transporter 1*), který mimo Fe^{2+} přenáší i další dvojmocné kationty (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}) (Muñoz et al. 2009). K transportní funkci potřebuje DMT1 kyselé prostředí, jelikož se jedná o symport kovu s H^+ . Proto k absorpci dochází především v horní části duodena, kde je pH stále kyselé díky HCl produkované v žaludku (Dev a Babitt 2017).

5.2.1.2 Hemové železo

Hemové železo přijímáme ve stravě ve formě hemoproteinů. Při nízkém žaludečním pH dochází k odštěpení proteinu. Ve střevech pak volný hem proniká přes apikální membránu enterocytu po vazbě na svůj transportní protein HCP1 (*Heme carrier protein 1*). Při deficitu železa jsou proteiny vystaveny na apikální membráně, při nadbytku zůstávají internalizovány uvnitř buňky. Po navázání dojde k endocytóze vzniklého komplexu a váčky jsou v cytoplazmě transportovány k endoplazmatickému retikulu. Zde se za katalýzy hemooxygenázy-1 uvolňuje Fe^{2+} a oxid uhelnatý, vzniká biliverdin, který je dále metabolizován na bilirubin (Horák et al. 2010; Lawen a Lane 2013).

5.2.2 Distribuce a transport železa

Osud železa v enterocyty závisí na aktuálních potřebách organismu. Železo může být uskladněno v enterocytech a při deskvamaci střevní buňky je exkretováno z organismu, nebo je absorbováno do krevního řečiště. Krví je poté roznášeno do ostatních tkání (Muñoz et al. 2009). Železo je nezbytné pro všechny typy buněk. Největší potřebu mají prekuzory erytrocytů v kostní dřeni, které ho využívají na stavbu hemoglobinu. Dodávka k cílovým buňkám je realizována po vazbě na transferrinové proteiny (transferrin, laktoferrin, ovoferrin) (Horák et al. 2010).

Při cirkulaci se železo musí nacházet ve své oxidované formě Fe^{3+} , pro průchod membránami buněk musí být redukováno na Fe^{2+} . Změny oxidačních stavů zajišťují enzymy ferroxidázy. Hefestin je transmembránový protein v basolaterální membráně enterocytů vycytávajících železo, který oxiduje exportované Fe^{2+} na Fe^{3+} . Hepatocyty a makrofágy, které jsou také schopné poskytovat železo, tento protein neobsahují, vyvazují tedy rovnou Fe^{2+} . Pro oxidaci cirkulujících Fe^{2+} slouží plazmatický ceruloplazmin (Matouš et al. 2010; Muñoz et al. 2009; Horák et al. 2010).

5.2.2.1 Ferroportin

Ferroportin je transmembránový protein zabudovaný v membráně buněk, které exportují železo do krevního řečiště – enterocyty, hepatocyty, makrofágy. Slouží pro přenos železa pouze ve formě Fe^{2+} kationtů. Velikost transportu přes ferroportin usměrňuje enzym hepcidin, který reguluje množství přenašeče v membránách, viz dále (Muñoz et al. 2009).

5.2.2.2 Transferrin

Nejvýznamnější cirkulujícím transferrinovým proteinem je transferrin. Obsahuje vazebná místa pro 2 kationty Fe^{3+} (Muñoz et al. 2009).

Import železa z krve do buněk je realizován pomocí komplexu transferrinu a jeho transferrinového receptoru v tzv. transferrinovém cyklu. Existuje i transport nezávislý na transferrinu, kdy je železo přenášeno vázané na citrát nebo na malé organické chelátory. Dochází k němu většinou v podmínkách, při kterých je transferrin saturovaný, tedy při nadbytku železa jako např. u hereditární hemochromatózy (Lawen a Lane 2013).

Cyklus začíná tvorbou komplexu transferrinu s transferrinovým receptorem. Existují 2 typy transferrinových receptorů – TfR1, TfR2. Na rozdíl od TfR1 se TfR2 vyskytuje pouze u enterocytů, hepatocytů a erytroidních buněk a má převážně regulační funkci, transport přes membránu je u něj minoritní. (Goswami a Andrews 2006; Horák et al. 2010).

Po interakci receptoru se substrátem je vytvořen komplex, který je do nitra buňky vpraven receptorem zprostředkovanou endocytózou v podobě klathrinových váčků. Uvnitř vzniklého endozomu vytváří protonová pumpa kyselé prostředí, ve kterém se uvolňuje Fe^{3+} . Pro přechod přes endozomovou membránu musí být ionty železa redukovány pomocí feroreduktázy Steap3 (*Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-3*) (Lawen a Lane 2013). Redukované ionty pak prostupují pomocí DMT1 transportéru do cytoplazmy, kde mohou být skladovány zabudované ve ferritinu, nebo jsou využity na syntézu hemu. Cyklus končí splynutím endozomové membrány s cytoplazmatickou membránou a do krve se uvolňuje apotransferrin (transferrin bez Fe) (Matouš et al. c2010).

5.2.3 Zásoba a uchování železa

Železo je uloženo hlavně v hepatocytech a buňkách retikuloendoteliálního systému. V cytosolu buněk je vázáno na zásobní protein ferritin. Do 1 molekuly ferritinu může být zabudováno až 4500 atomů železa v podobě Fe^{3+} (Lawen a Lane 2013). Existují 2 hlavní podjednotky ferritinu – H-ferritin (*heavy*) a L-ferritin (*light*). Malé množství buněčného ferritinu se nachází v jádře, kde zřejmě chrání DNA před poškozením (Lawen a Lane 2013). Většina se však vyskytuje v cytosolu, kde slouží jako zásobárna železa, ze které se může uložené železo uvolnit a použít pro aktuální potřeby. Pokud je zásobní kapacita ferritinu vyčerpána, železo se ukládá do hemosiderinu. Vyšší koncentrace hemosiderinu je patrná při nadbytku železa na kůži ve formě tmavých pigmentových skvrn (Muñozet *al.*, 2009).

5.3 Regulace homeostázy železa

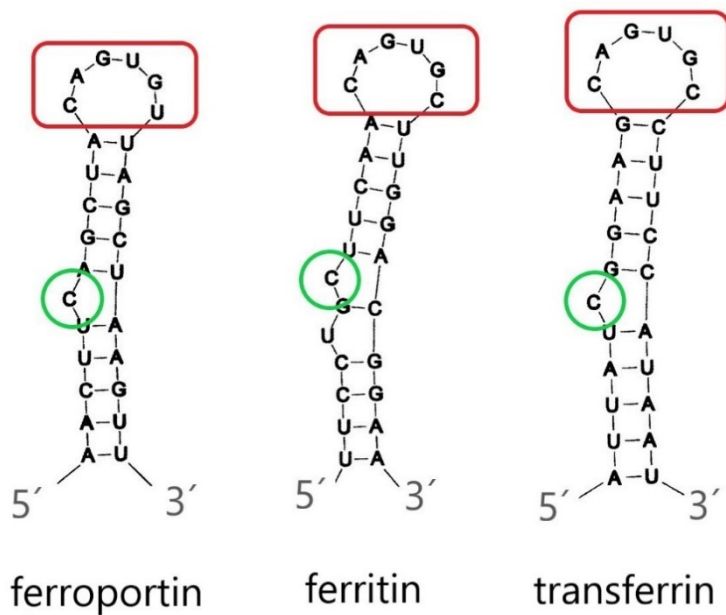
Hladina železa podléhá přísné regulaci, aby bylo zajištěno dostatečné množství pro fyziologickou potřebu a zároveň zamezeno toxickému působení. V organismu neexistuje žádná speciální cesta exkrece, k vylučování dochází primárně prostřednictvím deskvamace buněk nebo při krvácení. Proto je koncentrace železa usměrňována na úrovni absorpce a uvolňování z makrofágů a hepatocytů (Dev a Babitt 2017).

Homeostáza železa je kontrolována na dvou úrovních – uvnitř buněk a systémově. Obě se vzájemně ovlivňují. Hlavním prostředníkem jejich vzájemné komunikace je TfR1. Pokud se koncentrace železa v buňce zvýší, sníží se exprese TfR1 v plazmatické membráně. Dojde k menšímu vychytávání železa z krevního řečiště a zvýší se saturace transferrinu v plazmě. Saturace transferrinu podává signál ke snížení absorpce železa ze střeva a snížení dostupnosti z hepatocytů a makrofágů. Stejné regulační mechanismy se využívají i při úbytku železa v buňce nebo při narušení homeostázy v systémové cirkulaci (Horák et al. 2010).

5.3.1 Buněčná regulace homeostázy železa

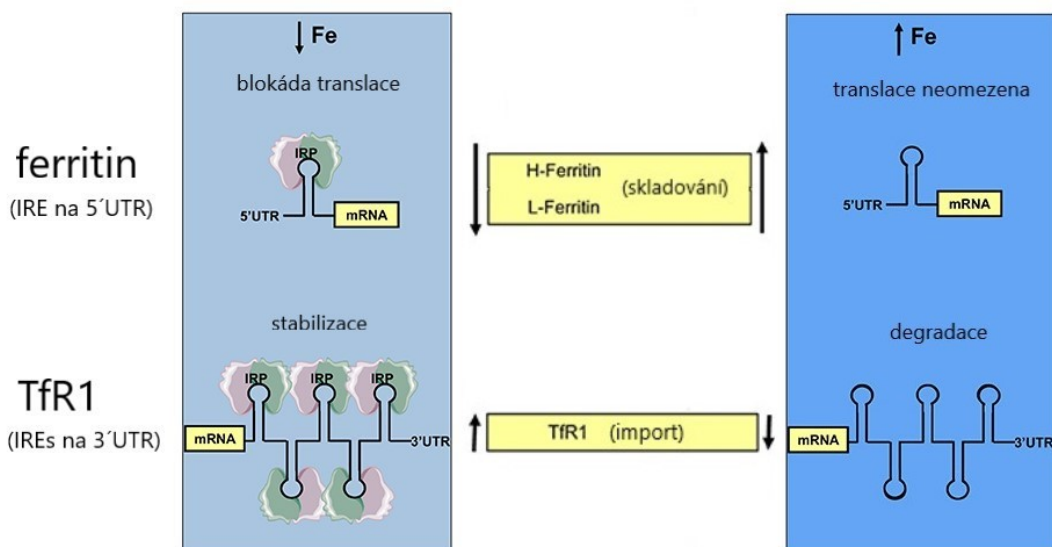
Buněčnou homeostázu udržuje IRP/IRE regulační systém. IRP (*Iron regulatory protein*) se při nízké koncentraci železa v buňce váže na sekvenci IRE (*Iron responsive element*) v mRNA, ovlivňuje její translaci a tím zajišťuje posttranskripční úpravy exprese proteinů, které jsou důležité pro vychytávání, transport, distribuci a skladování železa. Při nízké hladině železa IRP/IRE systém omezuje translaci mRNA ferritinu a transferrinu, zatímco translace mRNA ferroportinu a DMT1 probíhá ve vyšší míře (Horák et al. 2010).

IRE je označení pro sekvenci 28-30 nukleotidů, která se nachází v nepřekládané oblasti mRNA. Nukleotidy tvoří vlásenkovou strukturu (Obr. 8) Stopka obsahuje komplementární báze, které jsou spojeny vodíkovými můstky, a jeden nespárovaný cytosin. Nukleotidy v tomto úseku vlásenky se mohou značně lišit, čímž získávají jednotlivé IRE určitou variabilitu. Společným znakem všech IRE je sekvence šesti nespárovaných nukleotidů 5'-CAGUGX-3' (kde X=U/C/A), které formují smyčku, a zmíněný nespárovaný cytosin (Lawen a Lane 2013).



Obr. 8: Sekvence IRE v genech pro různé proteiny. Zeleně a červeně jsou vyznačeny části, které jsou stejné pro všechny IRE. Převzato a upraveno z (Piccinelli a Samuelsson 2007).

Vazba IRP na IRE probíhá při poklesu hladiny železa v buňce. Způsob ovlivnění translace mRNA závisí na umístění IRE (Obr. 9). Inhibice translace nastává v případě, kdy se IRP naváže na IRE v 5'-nepřekládané oblasti mRNA (např. pro H-ferritin, L-ferritin, ferroportin). IRE může ležet také v 3'-nepřekládané části mRNA (např. pro DMT1, TfR1), kde se vazbou IRP stabilizuje mRNA a umožňuje tak průběh translace. Opačný efekt na translaci má vysoká koncentrace železa. IRP se na IRE neváže a průběh translace mRNA ferritinu a ferroportinu není omezen, naopak mRNA DMT1 a transferrinu podléhá rychlejší degradaci (Lawen a Lane 2013).



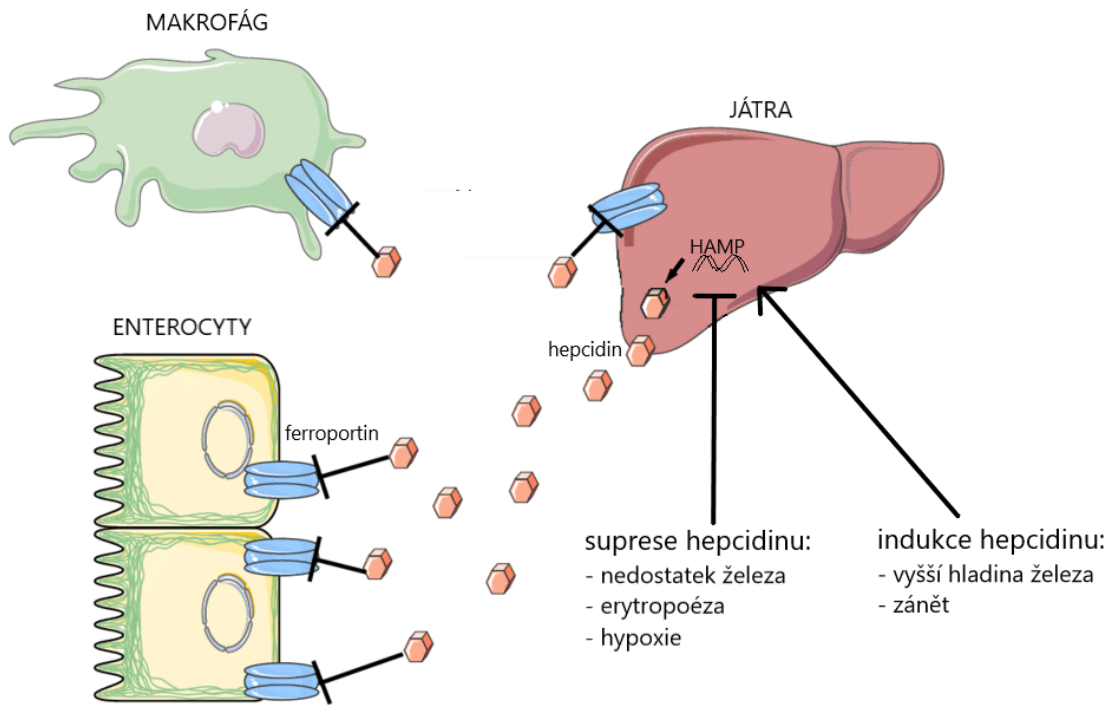
Obr. 9: Mechanismy ovlivňování mRNA prostřednictvím IRP/IRE regulačního systému v závislosti na umístění IRE. Převzato a upraveno z (Wilkinson a Pantopoulos 2014). IRE, *iron responsive element*; IRP, *iron regulatory protein*; 5'UTR, 5' nepřekládaná oblast mRNA (*5' untranslated region*); 3'UTR, 3' nepřekládaná oblast mRNA (*3' untranslated region*); TfR1, transferrinový receptor 1.

5.3.2 Systémová regulace homeostázy železa

Regulace na systémové úrovni je řízena hormonem hepcidinem (Obr. 10). Jedná se o peptidový hormon tvořený 25 aminokyselinami, který je produkován převážně v hepatocytech. Po vypravení do krve hepcidin redukuje hladinu železa prostřednictvím transmembránového přenašeče ferroportinu, který zajišťuje eflux železnatých iontů z buněk uvolňujících železo – enterocyty, makrofágy a hepatocyty. Hepcidin se váže na ferroportin, komplex je internalizován a odeslán do lysozomu, kde probíhá jeho degradace. Snížením množství ferroportinu na membránách zmíněných buněk snižuje absorpci železa ze střev a uvolňování z jater a makrofágů do krve (Nemeth a Ganz 2009; Reichert et al. 2017).

Hepcidin je kódován genem *HAMP*, jehož exprese je ovlivňována plazmatickou koncentrací železa, erytropoézou, hypoxií a zánětem. Při zvýšené koncentraci železa v organismu dochází k saturaci sérového transferrinu a saturovaný transferrin indukuje expresi hepcidinu. Zvýšení exprese může proběhnout i nezávisle na hladině železa, a to při infekci a zánětlivé reakci, kdy se vyplavují cytokiny IL-6, které také indukují produkci

hepcidinu. Erytropoéza a hypoxie mají opačný efekt. Při hypoxii je stimulována exprese hormonu erythropoetinu, který podporuje erytropoézu. Erytropoéza zvyšuje nároky na přísun železa, to se vyvazuje z transferrinu, jeho saturace klesá a nedochází k transkripci *HAMP* genu (Horák et al. 2010).



Obr. 10: Řízení homeostázy železa na systémové úrovni prostřednictvím hormonu hepcidinu, jeho mechanismus působení a podmínky, které mění genovou expresi *HAMP* genu. Převzato a upraveno z (Wilkinson a Pantopoulos 2014).

5.4 Nedostatek železa

Za fyziologických podmínek existuje rovnováha mezi absorpcí, transportem a ukládáním železa. Při narušení zmíněných procesů mohou vznikat stavy s nedostatkem železa. Příčinou nedostatku mohou být zvýšené nároky organismu (např. v období růstu a při stimulaci erythropoézy, v těhotenství nebo při zotavování se po krvácivém stavu), snížený příjem železa (např. při malnutrici, malabsorpci vlivem zánětlivých onemocnění střev, infekci *H. pylori*) nebo zvýšená ztráta krve (např. při krvácení do gastrointestinálního traktu, gynekologických krváceních) (Penka et al. 2001; Muñoz et al. 2009).

Mezi nespecifické projevy karence železa patří únava, bledost, slabost, iritabilita, námahová dušnost, palpitace, bolesti hlavy. Postižen může být neuromuskulární systém (svalová slabost, ztráta pozornosti, neuralgie, brnění), epitelální tkáň (lámavé nehty, atrofie linguálních papil, angulární stomatitida, dysfagie), imunitní systém (snížená buněčná imunita a fagocytární funkce vede k větší náchylnosti k infekcím). U dětí a plodu bývá zasažen růst a vývoj. U některých pacientů může být projevem pika – konzumace nezvyklých substancí (nejčastěji omítka, hlína, led) (Penka et al. 2001; Souček et al. 2011).

Deficit v těle lze rozdělit na absolutní a funkční. K absolutní deficienci dochází kvůli vyčerpání zásob železa. Při funkčním nedostatku zásoby železa v organismu existují, tělo však není schopno prvek uvolnit z buněk retikuloendoteliálního systému a tak zdroj efektivně využít pro svoje potřeby (Muñoz et al. 2009).

Absolutní nedostatek železa je spojován s rozvojem sideropenické anémie. Sideropenii (nedostatek železa) rozdělujeme do 3 stadií. Prelatentní stadium je charakteristické nižším množstvím zásobního železa, dodávka do kostní dřeně však zůstává nezměněna. Při latentním stadiu je zásobní železo zcela spotřebováno a do kostní dřeně je dodáváno nižší množství železa, nicméně hladina hemoglobinu zůstává fyziologická. Nejzávažnější stadium je označováno jako sideropenická anémie (anémie z nedostatku železa), při kterém klesá i hladina hemoglobinu v krvi pod fyziologickou hladinu (pod 12a/dL u žen a pod 13 g/dL u mužů) (Penka et al. 2001; Muñoz et al. 2009).

Anémie s funkčním nedostatkem železa se rozvíjí u pacientů s chronickým zánětlivým nebo nádorovým onemocněním, jde o tzv. anémie chronických onemocnění.

Patogeneze je komplexní, zahrnuje více mechanismů. Souvisí se zvýšením prozánětlivých cytokinů TNF, IL1, INF γ a hepcidinu, který brání uvolňování železa z monocytů, enterocytů a hepatocytů pro erytropoézu (Souček et al. 2011).

5.5 Železo a žlučové kyseliny

Existují hypotézy, že homeostáza žlučových kyselin může být ovlivněna hladinou železa v organismu. Podezření se opírají o poznatky, že nedostatek železa je doprovázen sníženou hladinou cholesterolu v séru (Kamei et al. 2010), naopak zvýšená sérová hladina cholesterolu byla pozorována při zvýšené koncentraci železa v organismu (Silva et al. 2015). Studie popisují, že jsou do mechanismu zapojeny změny exprese enzymu CYP7A1, který limituje rychlost přeměny cholesterolu na žlučové kyseliny. Dosud však nebyla provedena žádná studie, která by přímo popisovala vztah nedostatku železa a syntézy žlučových kyselin.

6 Cíl diplomové práce

Cílem diplomové práce bylo zjištění, zda má nedostatek železa vliv na syntézu a metabolismus žluče, a to především žlučových kyselin, a na změny exprese příslušných transportérů.

7 Metodika

7.1 Pokusná zvířata

In vivo studie byla prováděna na samcích potkanů kmene Wistar (Velaz, Praha, Česká republika). Jejich hmotnost se pohybovala v rozmezí 250 ± 20 g. Zvířata byla umístěna v Centrálním viváriu Lékařské fakulty v HK. Během experimentu měla zvířata volný přístup ke krmivu a vodě. Studie byla schválena etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a prováděna v souladu s pokyny uvedenými ve vyhlášce č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

Zvířata byla náhodně rozdělena do dvou skupin. V obou skupinách bylo použito šest zvířat.

- *Chow diet* – představovala kontrolní skupinu potkanů, kteří byli na standardní dietě (Cat. No. C1000, Altromin, Německo)
- *Iron depletion (ID)* – skupina s deplecí železa. Zvířata byla po dobu 21 dnů krmena dietou se sníženým obsahem železa (5,155mg/kg Fe, Cat. No. C1038, Altromin, Německo), jak už bylo popsáno u Kamei et al. (2010)

7.2 *In vivo* studie

Při *in vivo* studii byla zvířata pod celkovou anestézií navozenou i.p. podáním pentobarbitalu (50 mg/kg). Pro sběr žluči byla zavedena kanyla do ductus choledochus, odběr krve byl prováděn z a. carotis externa. Sběry žluči byly provedeny ve 30min intervalech (ve 30., 60., 90. a 120. minutě) do předem zvážených mikrozkušavek. Odběry krve proběhly v 15., 45., 75., 105. minutě. Do břišní dutiny byl aplikován fyziologický roztok pro nahrazení ztráty krve. Po 120 minutách byla zvířata usmrcena exsanguinací z břišní aorty. Z těl byla odebrána játra, která byla po zvážení uchována při -80°C pro další analýzu metodou PCR a Western blot.

7.3 qRT-PCR

Pro kvantitativní stanovení genové exprese (mRNA) genů (Tabulka 4) byla použita metoda qRT-PCR (*quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*)

s využitím přístroje 7500 HT Fast-Real-Time PCR System od Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA). Vzorky pro izolaci mRNA pocházely z potkaní jaterní tkáně (20-30 mg), mRNA byla izolována pomocí TRI reagentu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Pro změření čistoty mRNA byl použit poměr absorbance 260 nm a 280 nm, měření koncentrace mRNA bylo provedeno při absorbanci 260 nm na NanoDrop ND-1000 spektrofotometru (BioTech a.s., ČR). Přepis mRNA do cDNA byl realizován pomocí High Capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies, USA). Analýza exprese daného genu byla provedena v 10 ng cDNA, kde každý vzorek měl svůj duplikát. K amplifikaci byl využit TaqMan Fast Universal PCR Master Mix a Taq-Man Gene Expression Assay kits (Life Technologies, USA). Jako vnitřní kontrola výsledků byl použit referenční gen *Gapdh* (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza). qRT-PCR probíhala za podmínek: 95°C po dobu 20 s, 95°C po dobu 3 s ve 40 cyklech, 60°C po dobu 30 s. Výpočet relativní exprese byl proveden dle popsané metody u Hirsova et al. (2013).

Tabulka 4: Přehled genu použitých při analýze qRT-PCR

| Symbol genu | Transporter/Enzym | Life Technologies kat. číslo |
|--------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| <i>Slc10a1</i> | Ntcp | Rn00566894_ml |
| <i>Abcc3</i> | Mrp3 | Rn01452854_ml |
| <i>Abcc4</i> | Mrp4 | Rn01465702_ml |
| <i>Abcb11</i> | Bsep | Rn00582179_ml |
| <i>Abcc2</i> | Mrp2 | Rn00563231_ml |
| <i>Abcb1a</i> | Mdr1a | Rn00591394_ml |
| <i>Abcb1b</i> | Mdr1b | Rn00561753_ml |
| <i>Abcb4</i> | Mdr2 | Rn00562185_ml |
| <i>Cyp7a1</i> | | Rn00564065_ml |
| <i>Cyp8b1</i> | | Rn0144502_ml |
| <i>Cyp27a1</i> | | Rn00710298_ml |
| <i>Gapdh</i> | | 4352338E |

7.4 Western blot

Pro stanovení exprese transportérů a enzymů uvedených v Tabulce 5 byly použity vzorky jaterní tkáně o hmotnosti 200 mg. Vzorky byly vloženy do směsi 1 ml vychlazeného pufru (o koncentraci 25 mmol/l Tris-HCl s pH 7,6 a 0,1% (m/m) TRITON-X) s inhibitory proteáz (0,5 µg/ml leupeptinu, 50 µg/ml benzamidinu, 50 µg/ml aprotininu) a 10 µl/ml inhibitorů fosfatáz (Thermo Scientific Prague, Czech Republic)). Směs byla homogenizována v MagNALyseru (Roche Diagnostics GmbH, Německo) ve 2 cyklech po 20 s při otáčkách 6500 rpm. Následovala centrifugace homogenátu (10 000 g, při 4°C po dobu 10 min). Supernatanty byly dále znovu centrifugovány (100 000 g, při 4°C po dobu 60 min). Po sedimentaci byl odstraněn supernatant a získané pelety byly resuspendovány v 200 µl roztoku pufru 50 mmol/l HEPES s pH 7,4; 0,1 KCl, 3mmol/l MgCl₂, 1mmol/l EDTA, 10% glycerol, ve kterém se nacházely inhibitory proteáz (aprotinin, leptin, benzamid) a fosfatáz.

Tabulka 5: Přehled proteinů stanovovaných Western blot metodou

| Protein | Výrobce | Ředění primární protilátky | Ředění sekundární protilátky |
|---------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Cyp7a1 | ThermoFisher (PA5-15216) | 1:1000 | 1:2000 |
| Cyp8b1 | ThermoFisher (PA5-37088) | 1:1000 | 1:2000 |
| Cyp27a1 | ThermoFisher (PA5-27946) | 1:1000 | 1:2000 |
| Ntcp | Santa Cruz (sc98485) | 1:3000 | 1:6000 |
| Mrp3 | Alexis (ALX801-019-C250) | 1:1000 | 1:2000 |
| Mrp4 | Abcam (ab77184) | 1:2000 | 1:4000 |
| Mrp2 | Alexis (ALX801-037-C125) | 1:500 | 1:1000 |
| Bsep | Abcam (ab71793) | 1:1000 | 1:2000 |
| Mdr1 | Signet Laboratories (8710) | 1:1000 | 1:3000 |
| Mdr2 | Abcam (ab71792) | 1:2000 | 1:4000 |
| Gapdh | GE-HealthCare (NA9340) | 1:8000 | 1:10 000 |
| β-actin | Sigma (AC-74) | 1:2000 | 1:4000 |

Koncentrace proteinů jednotlivých vzorků byla stanovena metodou BCA (BCA Protein Assaykit, Pierce, Rockford, IL, USA). Poté byly všechny vzorky naředěny na koncentraci 25 µg proteinu/jamka a převedeny do aliquotů po 15 µl, které byly uchovány při -80°C pro další analýzu. Pro separaci proteinů byla použita metoda elektroforézy na polyakrylamidovém gelu SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) s využitím 5% polyakrylamidového gelu (pro proteiny o molekulové hmotnosti 100-250 kDa), 6,25% polyakrylamidového gelu (pro separaci proteinů o molekulové hmotnosti 50-100 kDa) a 10% polyakrylamidového gelu (pro proteiny o molekulové hmotnosti 25-50 kDa). Poté byly proteiny přeneseny z gelu na PVDF (polyvinylidenfluoridovou) membránu (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). K zablokování nespecifických vazebných míst na membránách byl použit 5% roztok odtučněného mléka v TBS-T (0,05% Tween 20 v TBS, TBS=Tris-buffered saline), ve kterém byly membrány promývané po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Následně byla provedena inkubace membrán s primárními protilátkami (jejich ředění je uvedeno v Tabulce 5) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Pro odstranění přebytečných primárních protilátek byly membrány promyty v TBS-T 3krát po dobu 7 minut. Poté byla provedena hodinová inkubace v roztoku se sekundární protilátkou v optimalizovaném ředění. Opět se membrány promyly v TBS-T 3krát po dobu 7 minut. Detekce byla provedena na přístroji Fusion Solo S (Vilber, France) pomocí detekčního chemiluminiscenčního činidla (West Femto, Thermofisher). Pro kvantifikaci byl použit software ImageLab (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Pro kontrolu a normalizaci exprese proteinů byly použity proteiny Gapdh a β-aktin.

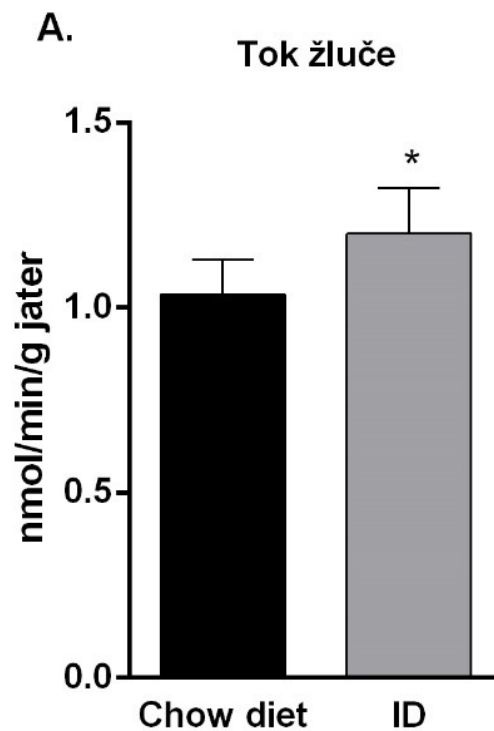
7.5 Statistická analýza dat

Data byla analyzována pro 6 zvířat v obou skupinách. Získané hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM (střední chyba průměru). Pro statistické vyhodnocení byl použit nepárový t-test v programu GraphPad Prism 6.0 (San Diego, Kalifornie). Za statisticky významnou byla považována hodnota $p < 0,05$.

8 Výsledky

8.1 *In vivo* studie - Tok žluče

Během 120min *in vivo* kinetické studie se sbírala žluč ve 30min intervalech do předvážených mikrozkuvek. Tok žluče byl vztažen na hmotnost jater. Naměřené hodnoty poukazují na statisticky významně zvýšený tok žluče u skupiny potkanů s deplecí železa v porovnání s kontrolní skupinou (Obr. 11).

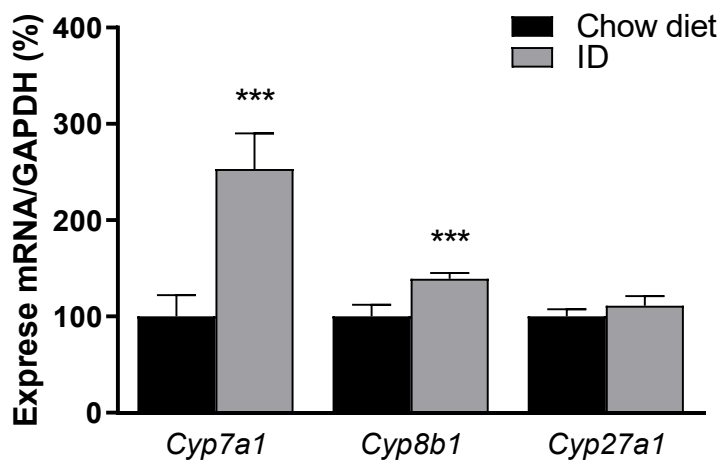


Obr. 11: Grafické znázornění toku žluče u kontrolní a ID skupiny. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM, ($n = 6$ pro každou skupinu). Signifikantní rozdíl oproti kontrole * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa.

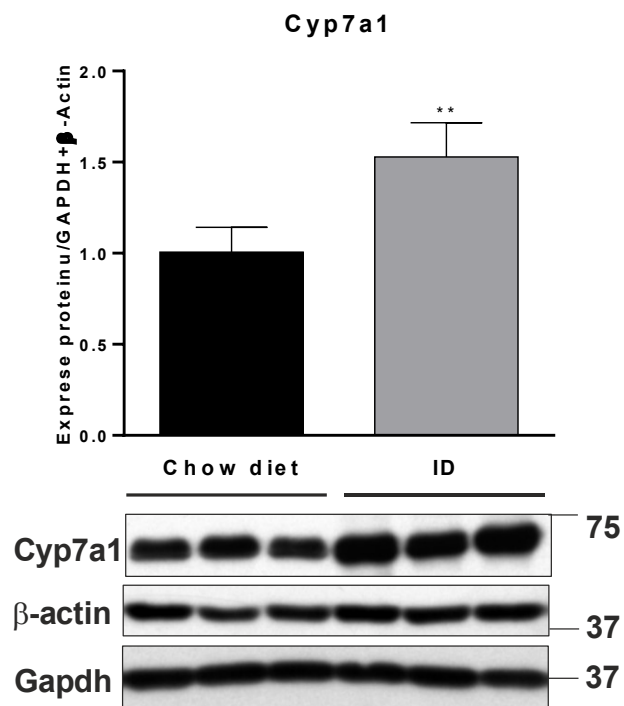
8.2 Analýza enzymů odpovědných za *de novo* syntézu žlučových kyselin

Provedli jsme analýzu vlivu nedostatku železa na syntézu žlučových kyselin za účelem zjistit, zda je za zvýšený tok žluče zodpovědná *de novo* syntéza žlučových kyselin. Metodou qRT-PCR jsme naměřili zvýšenou mRNA expresi *Cyp7a1* (enzym limitující přeměnu cholesterolu na žlučové kyseliny v klasické cestě syntézy) a mRNA *Cyp8b1* (enzym zodpovědný za poměr produkce CA/CDCA). Expres mRNA genu *Cyp27a1* (enzym alternativní cesty syntézy žlučových kyselin) nebyla u ID skupiny výrazně změněna (Obr. 12). Metodu Western blot jsme použili pro srovnání exprese zmíněných enzymů na úrovni proteinu. U všech analyzovaných enzymů (*Cyp7a1*, *Cyp8b1*, *Cyp27a1*) jsme zaznamenali signifikantní nárůst u zvířat s deplecí železa (Obr. 13, 14, 15).

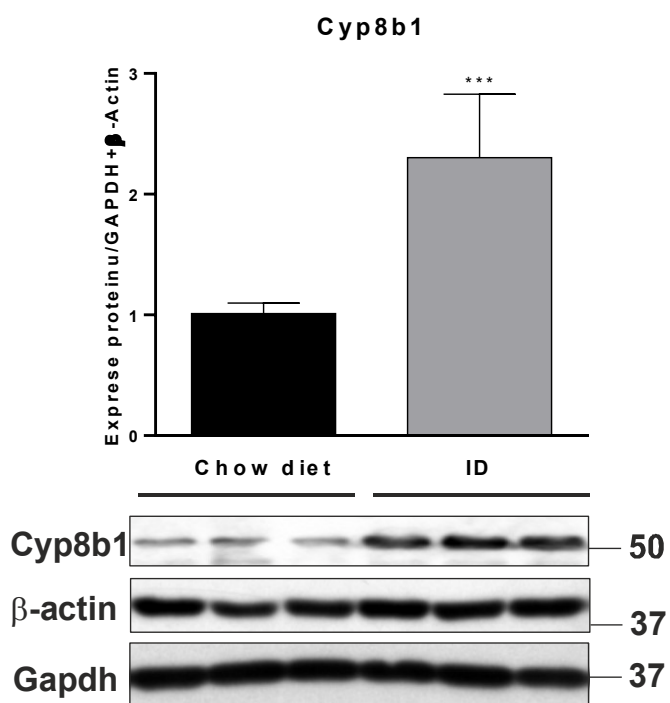
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM, (n = 6 pro každou skupinu). Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa. Reprezentativní obrázky Western blotu jsou zobrazeny pod příslušnými grafy s denzitometrickou analýzou dat vztaženou ke dvěma kontrolám (*Gapdh* a β -Actin), kde z každé skupiny jsou zastoupené vzorky ze tří zvířat.



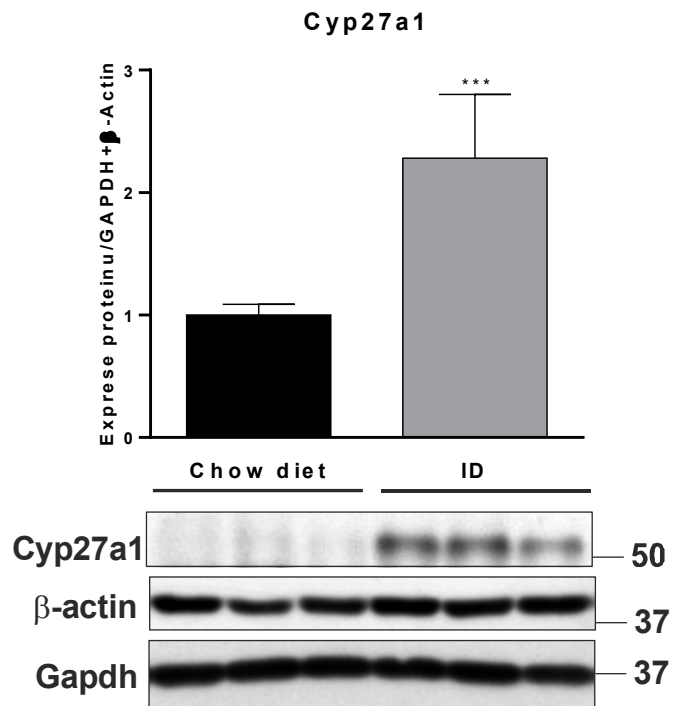
Obr. 12: Grafické znázornění exprese enzymů syntézy žlučových kyselin u kontrolní a ID skupiny s použitím metody qRT-PCR.



Obr. 13: Grafické znázornění exprese enzymu Cyp7a1 pro syntézu žlučových kyselin u kontrolní a ID skupiny s použitím metody Western blot.



Obr. 14: Grafické znázornění exprese enzymu Cyp8b1 pro syntézu žlučových kyselin u kontrolní a ID skupiny s použitím metody Western blot.

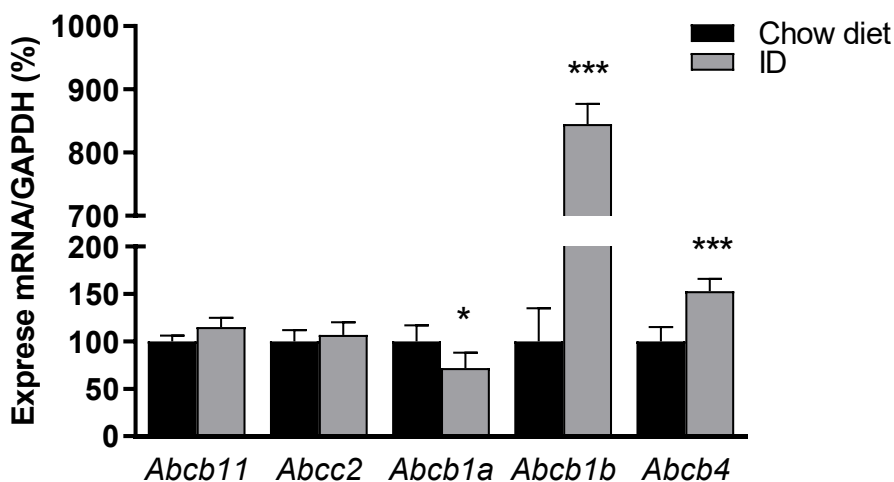


Obr. 15: Grafické znázornění exprese enzymu Cyp27a1 pro syntézu žlučových kyselin u kontrolní a ID skupiny s použitím metody Western blot.

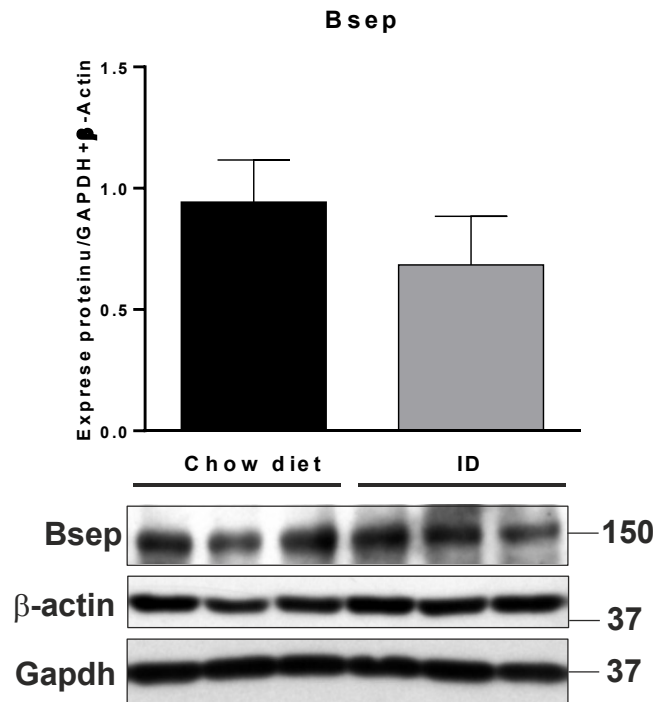
8.3 Analýza apikálních transportérů odpovědných za sekreci žluče

V dalším kroku jsme zjišťovali, zda vede zvýšený tok žluče (Obr. 11) a zvýšená syntéza žlučových kyselin (Obr. 13-15) ke změně exprese apikálních transportérů, jejichž hlavní funkcí je sekrece žluče do žlučového kanálku. Výsledky qRT-PCR prokázaly zvýšenou expresi mRNA *Abcb4* (Mdr2 transportující fosfolipidy) a *Abcb1b* (Mdr1 transportér pro přenos léčiv) (Obr. 16). Naopak sníženou expresi jsme zaznamenali u mRNA *Abcb1a* (kóduje také Mdr1) (Obr. 16). Nezměněná zůstala exprese mRNA *Abcb11* (Bsep transportér pro žlučové kyseliny) a *Abcc2* (Mrp2 transportér pro přenos organických aniontů a glutathionu) (Obr. 16). Z Western blot analýzy jsme zjistili, že nedostatek železa statisticky snížil pouze expresi Mdr2 transportéru (Obr. 20), ostatní transportéry (Bsep, Mrp2, Mdr1) byly beze změny (Obr. 17, 18, 19).

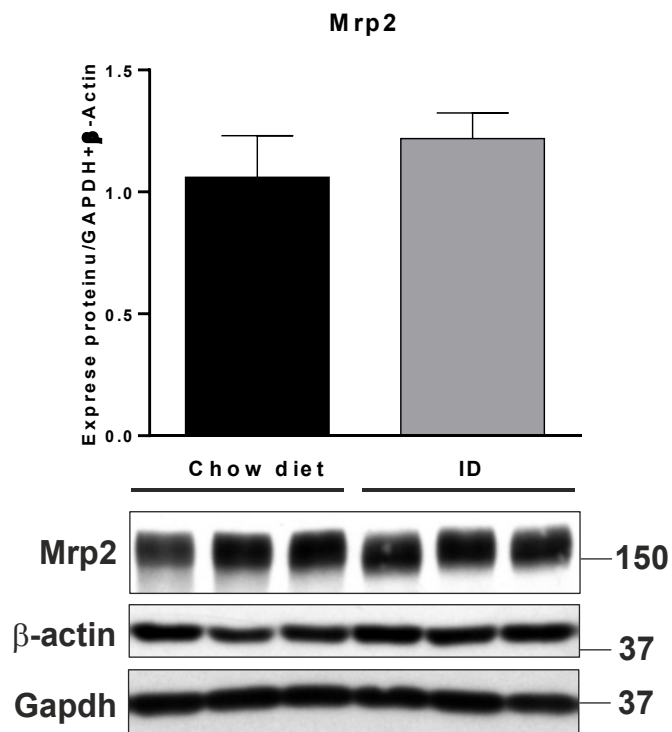
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM, (n = 6 pro každou skupinu). Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa. Reprezentativní obrázky Western blotu jsou zobrazeny pod příslušnými grafy s denzitometrickou analýzou dat vztáženou ke dvěma kontrolám (Gapdh a β -Actin), kde z každé skupiny jsou zastoupené vzorky ze tří zvířat.



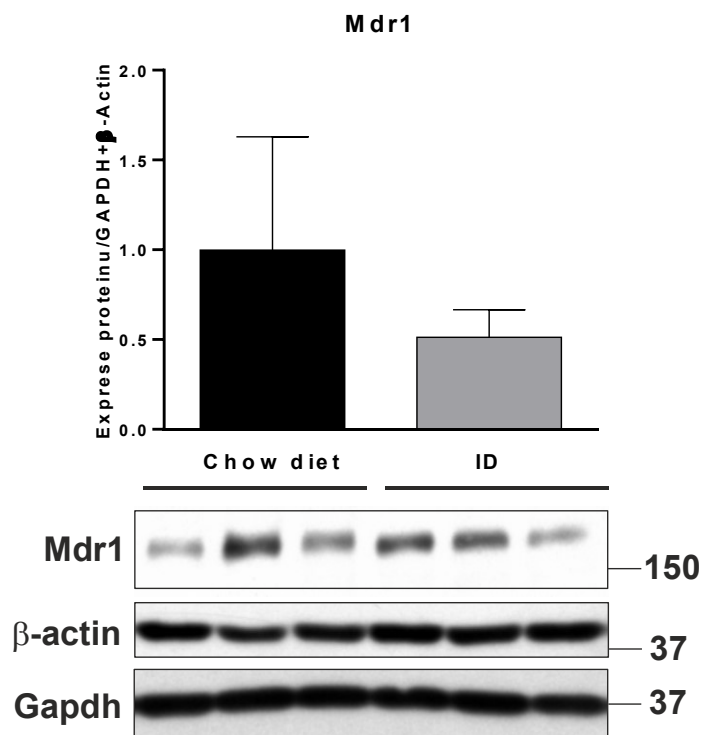
Obr. 16: Grafické znázornění exprese apikálních transportérů u kontrolní a ID skupiny s použitím metody qRT-PCR.



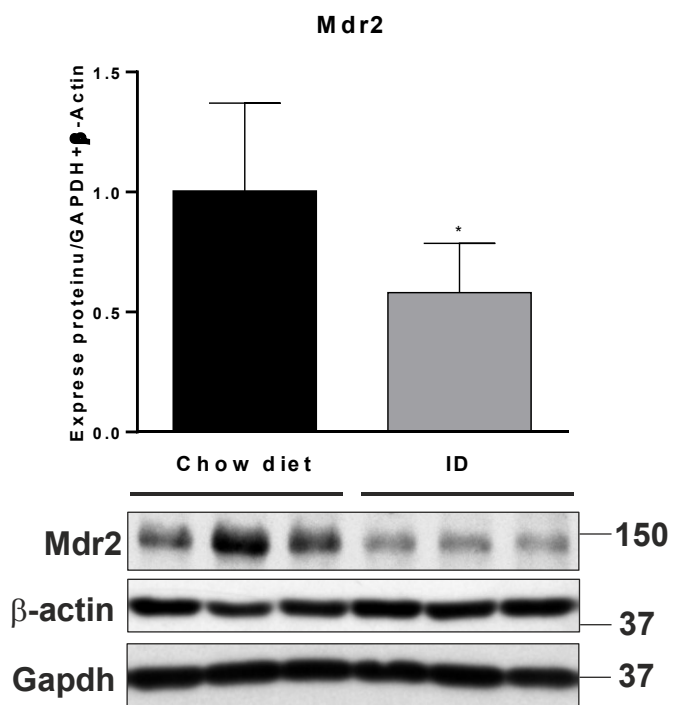
Obr. 17: Grafické znázornění exprese Bsep apikálního transportéru u kontrolní a ID skupiny s použitím metody Western blot.



Obr. 18: Grafické znázornění exprese Mrp2 apikálního transportéru u kontrolní a ID skupiny s použitím metody Western blot.



Obr. 19: Grafické znázornění exprese Mdr1 apikálního transportéru u kontrolní a ID skupiny s použitím metody Western blot.

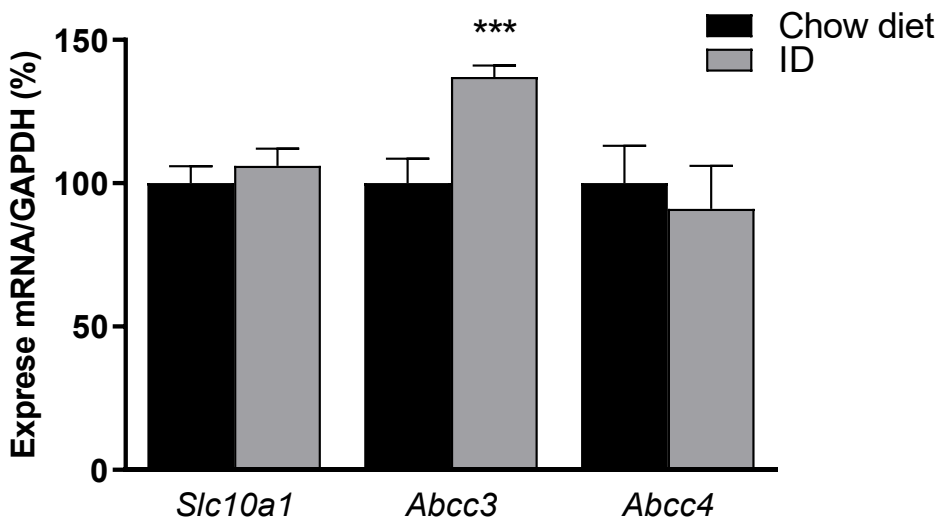


Obr. 20: Grafické znázornění exprese Mdr2 apikálního transportéru u kontrolní a ID skupiny s použitím metod Western blot.

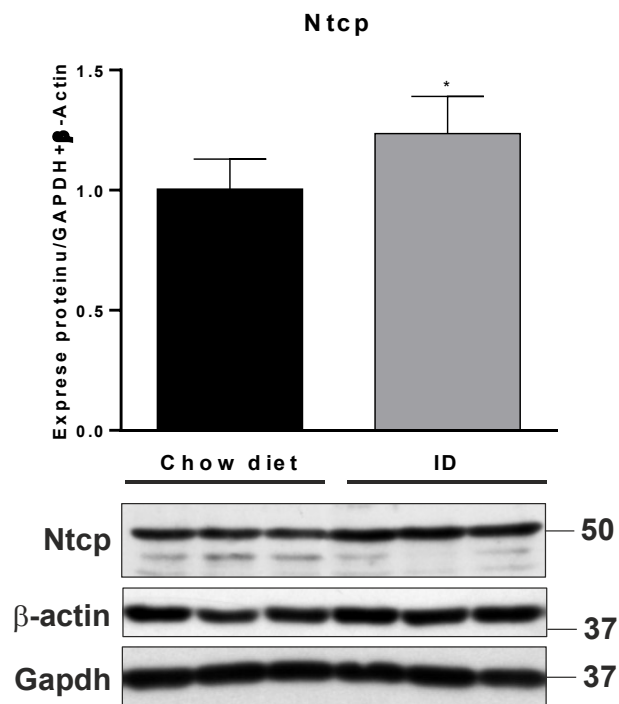
8.4 Analýza basolaterálních transportérů odpovědných za sekreci žluče

Sledovali jsme účinky deplece železa také na vybrané basolaterální transportéry pro vychytávání a eflux žlučových kyselin z/do plazmy. Zajímalo nás, zda pozorované změny mohou přispět ke zvýšenému toku žluče, a to prostřednictvím vychytání žlučových kyselin do hepatocytů. Zvýšenou expresi na úrovni mRNA měl *Abcc3* (Mrp3 efluxní transportér). Transportéry *Slc10a1* (Ntcp transportér pro vychytávání žlučových kyselin) a *Abcc4* (Mrp4 efluxní transportér) nebyly u potkanů s deplecí železa změněny (Obr. 21). Jejich následnou analýzou Western blotem pro expresi na úrovni proteinu jsme detekovali up-regulaci Ntcp (Obr. 22), ale efluxní transportéry Mrp3 a Mrp4 (Obr. 23, 24) byly beze změny.

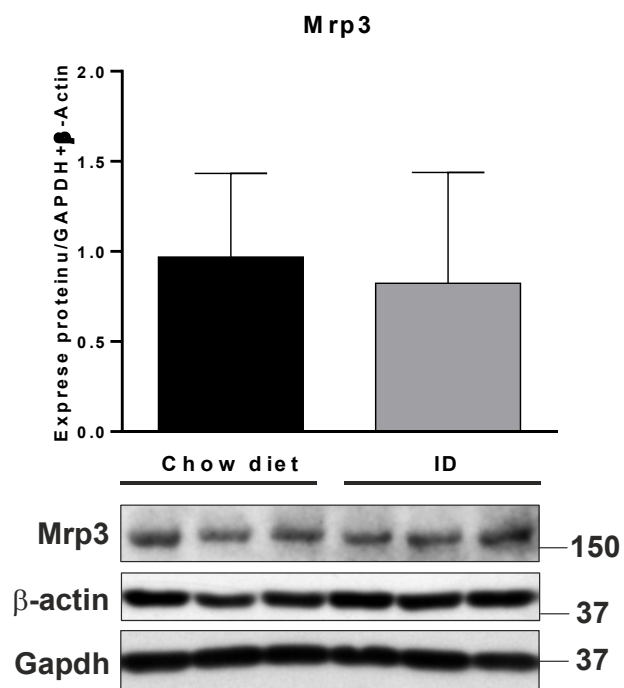
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM, (n = 6 pro každou skupinu). Signifikantní rozdíl oproti kontrole *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; Chow diet, kontrolní skupina; ID, skupina s deplecí železa. Reprezentativní obrázky Western blotu jsou zobrazeny pod příslušnými grafy s denzitometrickou analýzou dat vztaženou ke dvěma kontrolám (Gapdh a β -Actin), kde z každé skupiny jsou zastoupené vzorky ze tří zvířat.



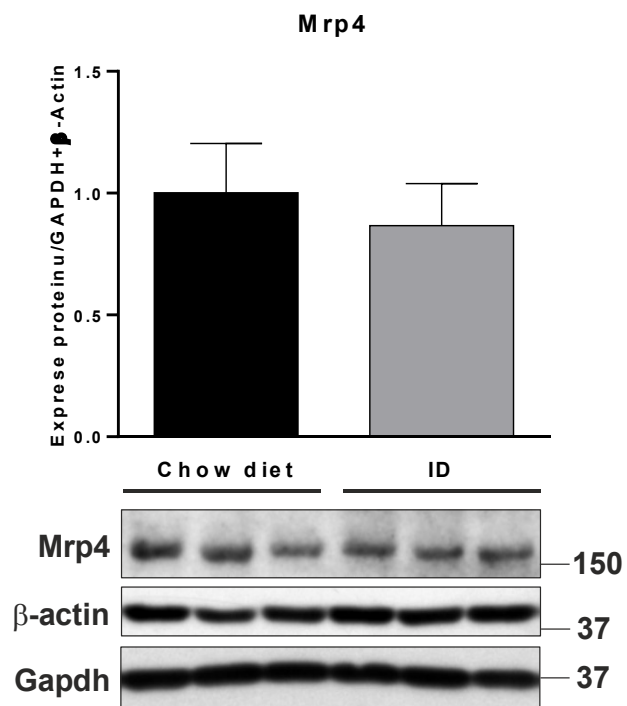
Obr. 21: Grafické znázornění exprese basolaterálních transportérů u kontrolní a ID skupiny s použitím metody qRT-PCR.



Obr. 22: Grafické znázornění exprese Ntcp basolaterálního transportéru u kontrolní a ID skupiny s použitím metody Western blot.



Obr. 23: Grafické znázornění exprese Mrp3 basolaterálního transportéru u kontrolní a ID skupiny s použitím metody Western blot.



Obr. 24: Grafické znázornění exprese Mrp4 basolaterálního transportéru u kontrolní a ID skupiny s použitím metod Western blot.

9 Diskuze

Nedostatkem železa trpí velké množství populace (Anderson a Frazer 2017). Některé studie popisují, že nedostatek železa vede ke snížení sérové koncentrace cholesterolu, jejíž příčinou je up-regulace Cyp7a1 - enzymu, který řídí rychlost klasické cesty syntézy žlučových kyselin z cholesterolu (Kamei et al. 2010). Objevení spojitosti mezi nedostatkem železa a klíčovým enzymem syntézy žlučových kyselin nám přinesl podnět ke zkoumání, zda a jakým způsobem ovlivňuje nedostatek železa produkci žluče a transportní systémy v hepatocytech důležitých pro tvorbu žluče.

Provedením *in vivo* studie na potkanech s deplecí železa jsme zjistili, že nedostatek železa zvyšuje tok žluče. Prasnicka et al. (2017) ve své práci také uvádí zvýšenou biliární sekreci žlučových kyselin, čímž se potvrzuje choleretický účinek u ID zvířat.

Žlučové kyseliny, respektive jejich sekrece, jsou hlavní hnací silou pro osmotický proces tvorby žluče (Trauner a Boyer 2003). Ke zjištění, zda ID způsobuje zvýšenou sekreci žlučových kyselin do žluče, jsme analyzovali změny exprese apikálních a dalších transportních proteinů a jejich genů pomocí metody qRT-PCR a Western blot. Transport žlučových kyselin do žlučových cest probíhá především skrz apikální transportér Bsep (zodpovědný za sekreci žluče závislé na žlučových kyselinách), v menší míře skrz Mrp2 (hlavně pro glutathion, který se podílí na sekreci žluče nezávislé na žlučových kyselinách) a Mdr1 (Klaassen a Aleksunes 2010). Prasnicka et al. (2017) naměřila zvýšené hodnoty individuálních žlučových kyselin ve žluči i jejich sekreci. Proto bychom mohli předpokládat up-regulaci zmíněných transportérů. Expres transportérů však u ID zvířat nebyla změněna.

U apikálního přenašeče fosfolipidů Mdr2 (*Abcc4*) jsme objevili nesoulad mezi expresí mRNA a expresí proteinu, kdy mRNA byla u ID zvířat exprimovaná ve větší míře, zatímco protein byl down-regulován. Příčina tohoto rozporu není zcela známá. Avšak podobná data byla pozorována i v jiné studii (Kamei et al., 2010). Prasnicka et al. (2017) také naměřila zvýšenou biliární sekreci fosfolipidů do žluče, přestože protein nebyl up-regulován. Příčinou mohla být zvýšená sekrece žlučových kyselin, které způsobují extrakci fosfolipidů z kanalikulární membrány hepatocytů do žluče (OudeElferink a Paulusma 2007).

Syntéza žlučových kyselin byla u ID potkanů zvýšena, neboť jsme zaznamenali zvýšenou expresi důležitých enzymů pro tvorbu žlučových kyselin a vyšší biliární sekreci žlučových kyselin. Obdobně jako Kamei et al. (2010) jsme naměřili up-regulaci enzymu Cyp7a1 (cholesterol-7 α -hydroxyláza), který je stěžejním enzymem v klasické cestě syntézy a limituje rychlost, jakou dochází k produkci primárních žlučových kyselin – k cholové (CA) a k chenodeoxycholové (CDCA) (Chiang 2013b). Ještě markantnější zvýšení exprese jsme zpozorovali u důležitého enzymu alternativní cesty syntézy Cyp27a1 (sterol-27-hydroxyláza), která vede k produkci CDCA (Li a Chiang 2014). CDCA je u potkanů hydroxylována na α/β MCA (Li a Chiang 2014). U potkanů vede tedy up-regulace Cyp7a1 a Cyp27a1 k vyšší produkci α/β MCA, což koresponduje se zvýšenou sekrecí α/β MCA do žluče, kterou naměřila Prasnicka et al. (2017).

Větší míru exprese jsme zjistili také u enzymu Cyp8b1 (sterol-12 α -hydroxyláza), který hydroxyluje CDCA na CA a je tedy zodpovědný za poměr CA/CDCA (Chiang 2013b). Jeho up-regulace vysvětluje zvýšenou koncentraci CA u ID, jak je avizováno u Prasnicka et al. (2017). Nedostatek železa tedy zvyšuje nejen syntézu žlučových kyselin, ale mění i kvantitativní složení žlučových kyselin ve žluči. Složení žlučových kyselin je však u lidí rozdílné, jelikož nedochází k přeměně CDCA na MCA (Chiang 2013b). Výsledky složení žlučových kyselin ve žluči u ID se tedy nedají plně extrapolovat na lidský organismus. Bylo by dobré provést analýzu i na lidské tkáni.

Naměřili jsme up-regulaci basolaterálního transportéru Ntcp, který slouží pro vychytávání žlučových kyselin z krve do hepatocytu (Klaassen a Aleksunes 2010). Zvýšený tok žluče by mohl způsobovat návrat většího množství žlučových kyselin enterohepatálním oběhem do jater a také by mohl nepřímo přispět ke zvýšenému toku žluče. Tento mechanismus by mohl vysvětlovat zvýšenou up-regulaci Ntcp transportéru.

Expese efluxních basolaterálních proteinů Mrp3 a Mrp4 nebyla pozměněna oproti kontrolám. Tyto transportéry mají význam především při cholestatických podmínkách, kdy zprostředkovávají především eflux žlučových kyselin z hepatocytů do krve (Köck a Brouwer 2012). Jejich nezměněná exprese poukazuje na to, že v játrech nevznikala cholestáza, ke které by mohla vést vyšší produkce žlučových kyselin. Vyšší syntéza žlučových kyselin je dostatečně kompenzována zvýšenou biliární sekrecí (Prasnicka et al. 2017).

10 Závěr

Diplomová práce se zabývá vlivem nedostatku železa na tvorbu žluče, metabolismus žlučových kyselin a expresi transportérů, které jsou zapojeny do procesu tvorby žluče.

K nalezení změn exprese genů a proteinů zmíněných struktur mezi kontrolní skupinou potkanů na normální dietě a skupinou, které byla podávána strava se sníženým obsahem železa, byly využity metody qRT-PCR a Western blot.

In vivo studie prokázala, že nedostatek železa zvyšuje tok žluče a sekreci žlučových kyselin do žluče. Tyto účinky deplece železa jsou zřejmě podmíněny up-regulací enzymů Cyp7a1, Cyp27a1 a Cyp8b1, které se významně podílí na syntéze žlučových kyselin, jež jsou ve žluči zastoupeny nejvíce.

Ze získaných dat můžeme konstatovat, že nedostatek železa mění sekreci žluče a to především žlučových kyselin. Tento efekt pak může vyústit ve změnu kinetiky léčiv u pacientů s poruchou metabolismu železa, jako je např. anémie.

11 Literatura

ADAMS, David H. a Bertus EKSTEEN, 2006. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* [online]. **6**(3), 244–251. ISSN 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri1784

ANDERSON, Gregory J a David M FRAZER, 2017. Current understanding of iron homeostasis. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. **106**(Suppl 6), 1559S-1566S. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.3945/ajcn.117.155804

BALLATORI, Nazzareno, Na LI, Fang FANG, James L. BOYER, Whitney V. CHRISTIAN a Christine L. HAMMOND, 2009. OST alpha-OST beta: a key membrane transporter of bile acids and conjugated steroids. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. **14**, 2829–2844. ISSN 1093-4715.

BOYER, James L., 2013. Bile Formation and Secretion. *Comprehensive Physiology* [online]. **3**(3), 1035–1078. ISSN 2040-4603. Dostupné z: doi:10.1002/cphy.c120027

BRODANOVÁ, Marie, Jiří BENEŠ, Vratislav DUFEK, Jiří CHMEL, Zdeněk MAREČEK a Jan ŠVÁB, 1998. *Onemocnění žlučníku a žlučových cest*. Vyd. 1. Praha: Grada, s. 13-16. ISBN 80-7169-562-9.

CASSAT, James E. a Eric P. SKAAR, 2013. Iron in Infection and Immunity. *Cell host & microbe* [online]. **13**(5), 509–519. ISSN 1931-3128. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2013.04.010

ČIHÁK, Radomír a Miloš GRIM, 2002. *Anatomie*. 2., upr.dopl. vyd. Praha: Grada, s. 127-145. ISBN 80-247-0143-X.

DAWSON, Paul A., Tian LAN a Anuradha RAO, 2009. Bile acid transporters. *Journal of Lipid Research* [online]. **50**(12), 2340–2357. ISSN 0022-2275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.R900012-JLR200

DE VREE, J. Marleen L., Emmanuel JACQUEMIN, Ekkehard STURM, Danièle CRESTEIL, Piter J. BOSMA, Jan ATEN, Jean-François DELEUZE, Marc DESROCHERS, Martin BURDELSKI, Olivier BERNARD, Ronald P. J. Oude ELFERINK a Michelle HADCHOUËL, 1998. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**(1), 282–287. ISSN 0027-8424.

DEV, Som a Jodie L. BABITT, 2017. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodialysis International. International Symposium on Home Hemodialysis* [online]. **21 Suppl 1**, S6–S20. ISSN 1542-4758. Dostupné z: doi:10.1111/hdi.12542

DIKKERS, Arne a Uwe JF TIETGE, 2010. Biliary cholesterol secretion: More than a simple ABC. *World Journal of Gastroenterology: WJG* [online]. **16(47)**, 5936–5945. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v16.i47.5936

FONTANA, Josef, Patrik MAĎA, Peter IVÁK, Martina ŠAJDÍKOVÁ, Petra LAVRÍKOVÁ, Lucie NOVÁKOVÁ, Martin PAVELKA a Jan TRNKA, 2014. *Funkce buněk lidského těla. Játra a biotransformace xenobiotik*. 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze, s.627. Dostupné z <http://fbllt.cz/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>

GOSWAMI, Tapasree a Nancy C. ANDREWS, 2006. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **281(39)**, 28494–28498. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C600197200

HAGENBUCH, Bruno a Peter J. MEIER, 2004. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Archiv* [online]. **447(5)**, 653–665. ISSN 1432-2013. Dostupné z: doi:10.1007/s00424-003-1168-y

HIRSOVA, Petra, Gabriela KARLASOVA, Eva DOLEZELOVA, Jolana CERMANOVA, Marie ZAGOROVA, Zuzana KADOVA, Milos HROCH, Ludek SISPERA, Pavel TOMSIK, Martin LENICEK, Libor VITEK, Petr PAVEK, Otto KUCERA, Zuzana CERVINKOVA a Stanislav MICUDA, 2013. Cholestatic effect of epigallocatechin gallate in rats is mediated via decreased expression of Mrp2. *Toxicology* [online]. **303**, 9–15. ISSN 1879-3185. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2012.10.018

HOLČÁKOVÁ, Jitka, Marta NEKULOVÁ, Paulina ORZOL a Bořivoj VOJTĚŠEK, 2014. Mechanizmy lékové rezistence a nádorové kmenové buňky. *Klinická onkologie* [online]. **27(Supplementum 1)**, 34–41. Dostupné z: doi:DOI: 10.14735/amko20141S34.

HORÁK, Jiří, Markéta DOSTALÍKOVÁ, Miluše HENDRICOVÁ, Ladislav CHROBÁK, Jan KOVÁŘ, Pavel KRAML, Karolina KRÁTKÁ, Jitka NEUBAUEROVÁ, Ivana PŮTOVÁ, Jaroslav STRÁNSKÝ a Jan STRĚTESKÝ, 2010. *Hemochromatóza*. 1. vyd. Praha: Grada, s. 9-39. ISBN 978-80-247-3287-9.

HŮLEK, Petr a Petr URBÁNEK, 2018. *Hepatologie*. 3. vydání. Praha: Grada Publishing, s. 17-36. ISBN 978-80-271-0394-2.

HUNDT, Melanie, Hajira BASIT a Savio JOHN, 2019. Physiology, Bile Secretion. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2019-06-26]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470209/>

CHIANG, John Y. L., 2002. Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocrine Reviews* [online]. **23**(4), 443–463. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/er.2000-0035

CHIANG, John Y. L., 2009. Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research* [online]. **50**(10), 1955–1966. ISSN 0022-2275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.R900010-JLR200

CHIANG, John Y. L., 2013a. Bile Acid Metabolism and Signaling. *Compr Physiology* [online]. **2013**(3(3)), 1191–1212. Dostupné z: doi:10.1002/cphy.c120023

CHIANG, John Y. L., 2013b. Bile Acid Metabolism and Signaling. *Comprehensive Physiology* [online]. **3**(3), 1191–1212. ISSN 2040-4603. Dostupné z: doi:10.1002/cphy.c120023

CHIANG, John Y. L., 2017. Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver research* [online]. **1**(1), 3–9. ISSN 2096-2878. Dostupné z: doi:10.1016/j.livres.2017.05.001

CHOW, Edwin C. Y., Lilia MAGOMEDOVA, Holly P. QUACH, Rucha PATEL, Matthew R. DURK, Jianghong FAN, Han-Joo MAENG, Kamdi IRONDI, Sayeepriyadarshini ANAKK, David D. MOORE, Carolyn L. CUMMINS a K. Sandy PANG, 2014. Vitamin D receptor activation down-regulates the small heterodimer partner and increases CYP7A1 to lower cholesterol. *Gastroenterology* [online]. **146**(4), 1048–1059. ISSN 1528-0012. Dostupné z: doi:10.1053/j.gastro.2013.12.027

JUŘICA, J., G. DOVRTĚLOVÁ, K. NOSKOVÁ a O. ZENDULKA, 2016. Bile acids, nuclear receptors and cytochrome P450. *Physiological Research*. **65**(Supplementum 4), S427–S440. ISSN 1802-9973.

KALLIOKOSKI, A a M NIEMI, 2009. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *British Journal of Pharmacology* [online]. **158**(3), 693–705. ISSN 0007-1188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00430.x

- KAMEI, Asuka, Yuki WATANABE, Tomoko ISHIJIMA, Mariko UEHARA, Soichi ARAI, Hisanori KATO, Yuji NAKAI a Keiko ABE, 2010. Dietary iron-deficient anemia induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study. *Physiological Genomics* [online]. **42**(2), 149–156. ISSN 1094-8341. Dostupné z: doi:10.1152/physiolgenomics.00150.2009
- KLAASSEN, Curtis D. a Lauren M. ALEKSUNES, 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacological Reviews* [online]. **62**(1), 1–96. ISSN 1521-0081. Dostupné z: doi:10.1124/pr.109.002014
- KÖCK, K. a K. L. R. BROUWER, 2012. A perspective on efflux transport proteins in the liver. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* [online]. **92**(5), 599–612. ISSN 1532-6535. Dostupné z: doi:10.1038/clpt.2012.79
- KOSTERS, A. a S. J. KARPEN, 2008. Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* [online]. **38**(7–8), 1043–1071. ISSN 1366-5928. Dostupné z: doi:10.1080/00498250802040584
- LAWEN, Alfons a Darius J. R. LANE, 2013. Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. **18**(18), 2473–2507. ISSN 1557-7716. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2011.4271
- LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN, 2004. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, s. 134-177. ISBN 80-246-0849-9.
- LI, Tiangang a Udayan APTE, 2015. Bile Acid Metabolism and Signaling in Cholestasis, Inflammation, and Cancer. In: *Advances in Pharmacology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 263–302 [vid. 2019-07-23]. ISBN 978-0-12-803119-3. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apha.2015.04.003
- LI, Tiangang a John CHIANG, 2009. *Regulation of Bile Acid and Cholesterol Metabolism by PPARs* [online]. Dostupné z: doi:10.1155/2009/501739
- LI, Tiangang a John Y. L. CHIANG, 2014. Bile Acid Signaling in Metabolic Disease and Drug Therapy. *Pharmacological Reviews* [online]. **66**(4), 948–983. ISSN 0031-6997. Dostupné z: doi:10.1124/pr.113.008201

MARIN, Jose J. G., Rocio I. R. MACIAS, Oscar BRIZ, Jesus M. BANALES a Maria J. MONTE, 2015. Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *Current Drug Metabolism*. **17**(1), 4–29. ISSN 1875-5453.

MATOUŠ, Bohuslav, Eva BUBNOVÁ, Alena BUDEŠÍNSKÁ, Radim ČERNÝ, Antonín KAZDA, Zdeněk KLEIBL, Jaromír KOTYZA, Jaromír KŘEMEN, Jan KVASNIČKA, VÁCLAV PELOUCH, Stanislav ŠÍPEK a Tomáš ZIMA, c2010. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vyd. Praha: Galén, s. 242-255. ISBN 978-80-7262-702-8.

MAUAD, T. H., C. M. VAN NIEUWKERK, K. P. DINGEMANS, J. J. SMIT, A. H. SCHINKEL, R. G. NOTENBOOM, M. A. VAN DEN BERGH WEERMAN, R. P. VERKUISEN, A. K. GROEN a R. P. OUDE ELFERINK, 1994. Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *The American Journal of Pathology*. **145**(5), 1237–1245. ISSN 0002-9440.

MONTE, Maria J, Jose JG MARIN, Alvaro ANTELO a Jose VAZQUEZ-TATO, 2009. Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World Journal of Gastroenterology WJG* [online]. **15**(7), 804–816. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.15.804

MUÑOZ, Manuel, Isabel VILLAR a José Antonio GARCÍA-ERCE, 2009. An update on iron physiology. *World Journal of Gastroenterology*. **15**(37), 4617–4626. ISSN 2219-2840.

MURRAY, Robert K., Daryl K. GRANNER, Peter A. MAYES a Victor W. RODWELL, 2002. *Harperova biochemie*. v ČR 4. vyd., v H + H třetí. Jinočany: H & H, s.745-745. ISBN 80-7319-003-6.

NEMETH, Elizabeta a Tomas GANZ, 2009. The Role of Hepcidin in Iron Metabolism. *Acta Haematologica* [online]. **122**(2–3), 78–86. ISSN 0001-5792. Dostupné z: doi:10.1159/000243791

OUDE ELFERINK, Ronald P. J. a Coen C. PAULUSMA, 2007. Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* [online]. **453**(5), 601–610. ISSN 0031-6768. Dostupné z: doi:10.1007/s00424-006-0062-9

PELLICORO, A. a K. N. FABER, 2007. Review article: The function and regulation of proteins involved in bile salt biosynthesis and transport. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* [online]. **26 Suppl 2**, 149–160. ISSN 1365-2036. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03522.x

PENKA, Miroslav, Alena BULIKOVÁ, Miloslava MATÝŠKOVÁ a Jiřina ZAVŘELOVÁ, 2001. *Hematologie I*. 1. vyd. Praha: Grada, s. 15-25 ISBN 80-247-0023-9.

PEREZ, Maria J. a Oscar BRIZ, 2019. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World journal of gastroenterology* [online]. **2019(15(14))**, 1677–89. Dostupné z: doi:doi:10.3748/wjg.15.1677

PICCINELLI, Paul a Tore SAMUELSSON, 2007. Evolution of the iron-responsive element. *RNA* [online]. **13(7)**, 952–966. ISSN 1355-8382. Dostupné z: doi:10.1261/rna.464807

PRASNICKA, Alena, Jolana CERMANOVA, Milos HROCH, Eva DOLEZELOVA, Lucie ROZKYDALOVA, Tomas SMUTNY, Alejandro CARAZO, Jaroslav CHLADEK, Martin LENICEK, Petr NACHTIGAL, Libor VITEK, Petr PAVEK a Stanislav MICUDA, 2017. Iron depletion induces hepatic secretion of biliary lipids and glutathione in rats. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. **1862(12)**, 1469–1480. ISSN 1388-1981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2017.09.003

REICHERT, Cadiele Oliana, Joel DA CUNHA, Débora LEVY, Luciana Morganti Ferreira MASELLI, Sérgio Paulo BYDLOWSKI a Celso SPADA, 2017. Hepcidin: Homeostasis and Diseases Related to Iron Metabolism. *Acta Haematologica* [online]. **137(4)**, 220–236. ISSN 1421-9662. Dostupné z: doi:10.1159/000471838

SCHAAP, Frank G., Michael TRAUNER a Peter L. M. JANSEN, 2014. Bile acid receptors as targets for drug development. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* [online]. **11(1)**, 55–67. ISSN 1759-5053. Dostupné z: doi:10.1038/nrgastro.2013.151

SCHMIDT, Daniel R., Sam R. HOLMSTROM, Klementina FON TACER, Angie L. BOOKOUT, Steven A. KLIEWER a David J. MANGELSDORF, 2010. Regulation of bile acid synthesis by fat-soluble vitamins A and D. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **285(19)**, 14486–14494. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.116004

SILVA, Maísa, Joyce Ferreira DA COSTA GUERRA, Ana Flávia Santos SAMPAIO, Wanderson Geraldo DE LIMA, Marcelo Eustáquio SILVA a Maria Lucia PEDROSA, 2015. Iron dextran increases hepatic oxidative stress and alters expression of genes related to lipid metabolism contributing to hyperlipidaemia in murine model. *BioMed Research International* [online]. **2015**, 272617. ISSN 2314-6141. Dostupné z: doi:10.1155/2015/272617

SOUČEK, Miroslav, Jindřich ŠPINAR a Jiří VORLÍČEK, 2011. *Vnitřní lékařství*. Vyd. 1. Praha: Grada, s. 740-748. ISBN 978-80-247-2110-1.

ŠVÍGLEROVÁ, Jitka a Jana SLAVÍKOVÁ, 2008. *Fyziologie gastrointestinálního traktu*. 1. vyd. Praha: Karolinum, s. 51-64. ISBN 978-80-246-1526-4.

TRAUNER, Michael a James L. BOYER, 2003. Bile Salt Transporters: Molecular Characterization, Function, and Regulation. *Physiological Reviews* [online]. **83**(2), 633–671. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00027.2002

WILKINSON, Nicole a Kostas PANTOPOULOS, 2014. The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **5** [vid. 2019-04-13]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2014.00176

ZHOU, Huiping a Phillip B. HYLEMON, 2014. Bile Acids are Nutrient Signaling Hormones. *Steroids* [online]. **2014**, 62–68. Dostupné z: doi:10.1016/j.steroids.2014.04.016