

UNIVERSITA KARLOVA

3. lékařská fakulta

**FAMILIÁRNÍ ŽLOUTENKY A DĚDIČNÉ CHOLESTATICKÉ
SYNDROMY**

HABILITAČNÍ PRÁCE

MUDr. Eva Sticová, Ph.D.

**Ústav patologie 3. LF UK a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
Pracoviště klinické a transplantační patologie, Institut klinické a experimentální
medicíny
Institute of Liver Studies, King's College Hospital NHS Trust**

Praha 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému emeritnímu mentorovi a následně dlouholetému spolupracovníkovi prof. MUDr. et Mgr. Milanu Jirsovi, CSc. za inspiraci, podporu i cenné připomínky k odbornému textu. Zároveň děkuji prof. MUDr. Radoslavu Matějovi, Ph.D. za velkou trpělivost a za motivaci k napsání této práce. Velké díky patří rovněž doc. MUDr. Evě Honsové, Ph.D. za to, že mne uvedla do problematiky patologie jater. A v neposlední řadě bych ráda vyjádřila vděk všem svým současným i bývalým kolegům a spolupracovníkům za dlouholetou spolupráci, bez níž by tato práce nevznikla.

Obsah

1. Úvod.....	5
2. Fyziologie tvorby žluči	6
2.1 Transportéry bilirubinu a žlučových kyselin.....	12
2.1.1 Transportní proteiny na bazolaterální (sinusoidální) membráně hepatocytů.....	12
2.1.2 Transportní proteiny na apikální (kanalikulární) membráně hepatocytů.....	15
2.1.3 Transportní systémy cholangiocytů.....	17
2.1.4 Transportní systémy v enterocytech.....	18
2.2 Regulační mechanismy syntézy žlučových kyselin.....	19
3. Patofyziologie žloutenky a cholestázy	21
3.1 Klasifikace žloutenek	23
3.2 Klasifikace hereditární žloutenky a geneticky podmíněné cholestázy	25
4. Dědičné žloutenky a cholestatické poruchy	26
4.1 Dědičné hyperbilirubinémie	26
4.1.1 Hyperbilirubinémie převážně konjugovaného typu	26
4.1.2 Hyperbilirubinémie převážně nekonjugovaného typu.....	28
4.2 Hereditární cholestatická onemocnění	31
4.2.1 Progresivní familiální intrahepatální cholestáza.....	31
4.2.2 Benigní rekurentní intrahepatální cholestáza	37
4.2.3 Familiární hypercholanémie.....	39
4.2.4 ARC syndrom.....	39
4.2.5 Geneticky podmíněné cholestázy spojené s cholangiopatií malých žlučovodů	40
4.2.6 Primární poruchy syntézy žlučových kyselin.....	43
5. Hereditární predispozice u získaných cholestatických stavů	46
5.1 Cholelitiáza	46
5.2 Intrahepatální těhotenská cholestáza	47
5.3 Léky indukovaná cholestáza	48
5.4 Transientní neonatální cholestáza	51
5.5 Cholestáza a parenterální výživa.....	51
5.6 Biliární fibróza a cirhóza.....	52
5.7 Hepatobiliární transportní systémy a ztukovatění jater	52
5.8 Nádorová onemocnění u geneticky podmíněných cholestáz.....	53
6. Shrnutí	55
7. Cíle práce	56
8. Výsledky	57
8.1 Molekulárně genetická a morfologická analýza probandů s hereditárním typem žloutenky či cholestázy ..	57
8.1.1 Probandi s převážně konjugovaným typem hyperbilirubinémie	57
8.1.2 Probandi s dědičným typem cholestázy	59
8.2 Objasnění úlohy bazolaterálních transportérů OATP1B1 a OATP1B3 v patogeneze dědičné a získané žloutenky.....	64
9. Shrnutí výsledků	66
10. Seznam zkratk	69

11. Reference	72
12. Přehled publikační aktivity autora.....	84
12.1 Recenzované časopisy s IF	84
12.2 Recenzované časopisy bez IF	86
12.3 Publikace <i>in extenso</i>	86
12.4 Kapitoly v monografiích	87
13. Seznam příloh	88

1. Úvod

Cholestáza je definována jako porucha tvorby a sekrece žluči nebo selhání schopnosti organismu dodat do duodena dostatečné množství žluči odpovídajícího složení. Tento patologický stav vzniká jako následek funkční či strukturální poruchy jaterní buňky (hepatocytu) nebo žlučvodů a ve svém důsledku vede k hromadění žluči a jejích komponent v játrech a v séru a současně k poruše jejich sekrece do střeva (1).

Nejběžnějšími klinickými projevy cholestázy bývají žloutenka (*ikterus*), tj. žlutavé zbarvení sklér, kůže, sliznic a tělních tekutin, a dále svědění kůže (*pruritus*), které se může projevit i v časnějších fázích cholestatického onemocnění bez žloutenky. Na úrovni biochemické se cholestáza projevuje typicky zvýšením sérové aktivity enzymů alkalické fosfatázy (ALP) a γ -glutamyl transferázy (GGT), dále hypercholesterolémií, zvýšením hladiny solí žlučových kyselin a případně vzestupem bilirubinu v séru. Jako morfológickou cholestázu pak označujeme soubor strukturálních změn v postižené jaterní tkáni, a to jak na úrovni makroskopické, tak na úrovni světelně-mikroskopické a případně subcelulární, elektron-mikroskopické.

Cholestáza může být součástí projevů celé řady dědičných i získaných chorob jaterního parenchymu a žlučových cest. Kromě poruch s plně vyvinutým obrazem cholestázy existují i tzv. familiární nehemolytické žloutenky, projevující se jako izolované hyperbilirubinémie převážně nekonjugovaného či převážně konjugovaného typu, vzácně jako kombinace poruchy konjugace a transportu bilirubinu (2).

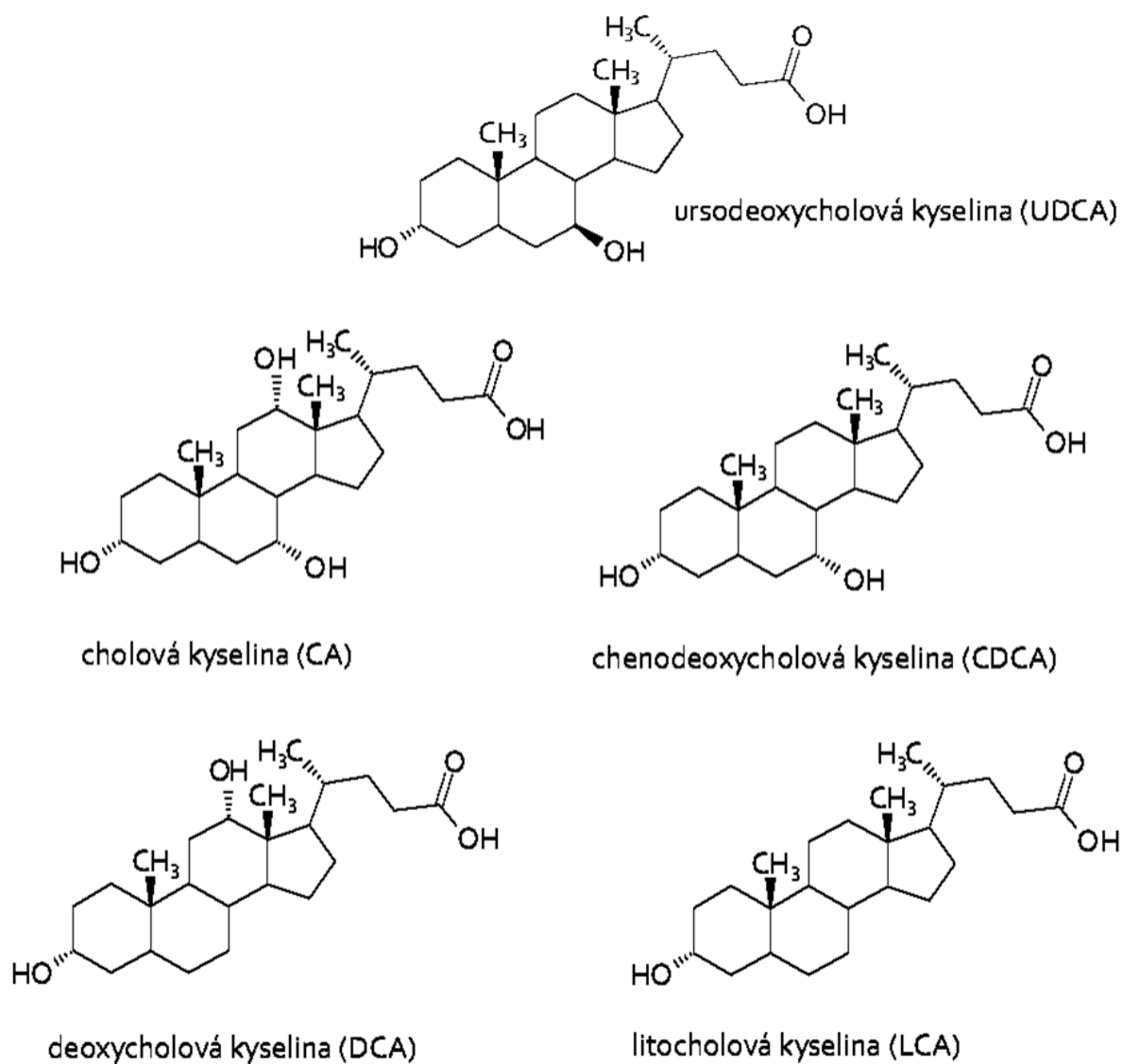
Předkládaná práce je zaměřena především na nejčastěji se vyskytující a klinicky nejzávažnější dědičné cholestázy a familiární nehemolytické žloutenky a dále na problematiku dědičných predispozic k některým získaným cholestatickým stavům a chorobám.

2. Fyziologie tvorby žluči

Žluč je potřebná pro trávení a vstřebávání tuků a vitamínů rozpustných v tucích a dále pro vylučování celé řady látek endogenní i exogenní povahy. Je produkována hepatocyty v játrech v množství cca 0,7-1,2 l/den (1). Izotonická jaterní žluč je následně upravována ve žlučových cestách a částečně i ve žlučníku, kam se vrací pod tlakem ve chvíli, kdy je uzavřen Oddiho svěrač. Ve žlučovodech je žluč obohacována o bikarbonátové ionty (HCO_3^-) a mukosubstance a zároveň zde dochází k aktivnímu odčerpávání aminokyselin a glukózy. Ve žlučníku dochází ke snížení obsahu sodíkových iontů (Na^+) a vody ve žluči, což vede k jejímu zahuštění a zároveň ke snížení pH výměnou Na^+ za kationt vodíku (H^+), který následně reaguje s HCO_3^- za vzniku oxidu uhličitého (CO_2) a vody. Takto upravená žluč odtéká žlučovými cestami do tenkého střeva, kde se účastní trávicích procesů (1).

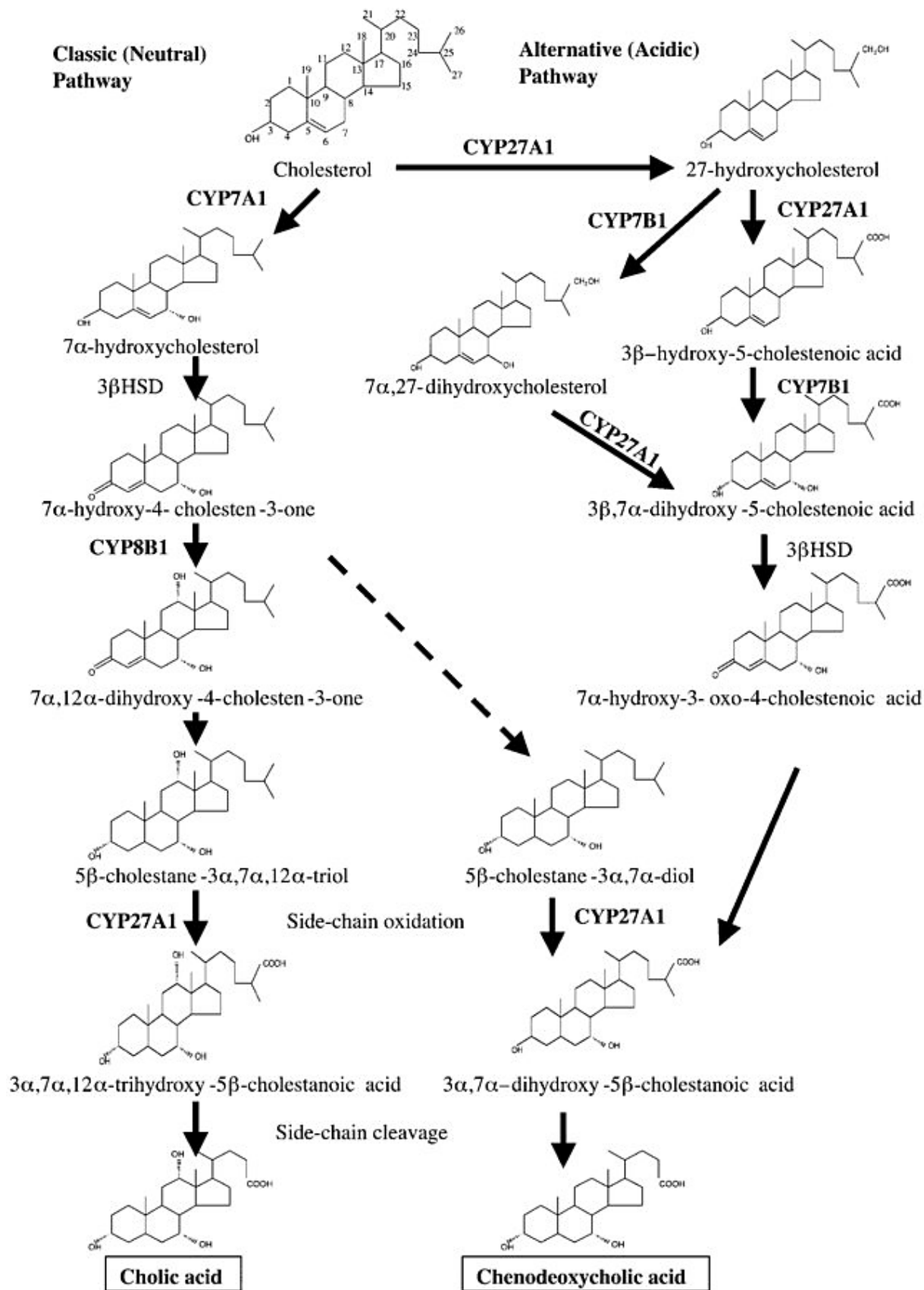
Největší část objemu žluči tvoří voda, která představuje cca 97 % celkového objemu jaterní žluči a cca 86 % objemu žlučnickové žluči. Hlavní organickou složku představují zejména žlučové kyseliny, fosfatidylcholin a neesterifikovaný cholesterol, dále pak žlučové pigmenty, především konjugovaný bilirubin, a konečně mastné kyseliny, peptidické hormony a hlen. Součástí žluči jsou i anorganické soli a celá řada cizorodých sloučenin, které prošly detoxifikací v játrech (1).

Žlučové kyseliny, jejichž celkové množství u zdravého dospělého člověka představuje cca 3-4 g, jsou amfipatické steroidní sloučeniny tvořené 24 uhlíkovými atomy, syntetizované v játrech z cholesterolu. Na celkovém poolu žlučových kyselin se u člověka z cca 80 % podílejí tzv. primární žlučové kyseliny (kyselina cholová a chenodeoxycholová) syntetizované v játrech, a dále z 20 % sekundární žlučové kyseliny (kyselina lithocholová a deoxycholová), vznikající z primárních žlučových kyselin v tlustém střevě dekonjugací a dehydroxylací v pozici 7 α působením střevních bakterií (obr. 1). Tzv. terciární žlučové kyseliny vznikají biotransformací sekundárních žlučových kyselin. Řadíme mezi ně např. kyselinu sulfolithocholovou, vznikající v játrech konjugací toxické kyseliny lithocholové se sulfátem, či kyselinu ursodeoxycholovou (UDCA), vyskytující se ve žluči ve stopovém množství a vznikající biotransformací ve střevním lumen (1,3,4). UDCA je ve srovnání s primárními žlučovými kyselinami daleko hydrofilnější a méně hepatotoxická a v současné době našla široké uplatnění v konzervativní léčbě cholestatických stavů, u nichž podporuje cholerézu a suprimuje syntézu žlučových kyselin *de novo*. Kromě toho se terapeuticky využívá i dalších účinků UDCA, mezi něž patří zejména imunomodulační, protizánětlivý a antiapoptotický efekt (3-5).



Obr.1: Chemická struktura primárních a sekundárních žlučových kyselin a kyseliny ursodeoxycholové. Převzato z: Jurica J, *Gastroent Hepatol* 2016, ref. (5).

Biosyntéza žlučových kyselin probíhá dvěma základními cestami, a to cestou *klasickou (neutrální)*, lokalizovanou v játrech a zodpovědnou za tvorbu 90 % celkového poolu žlučových kyselin, a dále cestou *alternativní* (obr. 2) (6-8).



Obr. 2: Schéma klasické a alternativní cesty syntézy žlučových kyselin. Převzato z: Chiang, *Endocr Rev* 2002, ref. (8).

Klasická cesta tvorby žlučových kyselin začíná modifikací sterolového jádra a vede k syntéze kyseliny cholové a chenodeoxycholové. Rychlost syntézy je determinována první chemickou reakcí, která je katalyzována mikrozomálním enzymem cholesterol-7 α -hydroxylázou (CYP7A1, gen *CYP7A1*). Vzniklý 7 α -hydroxycholesterol je poté přeměněn na 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-on (6-8).

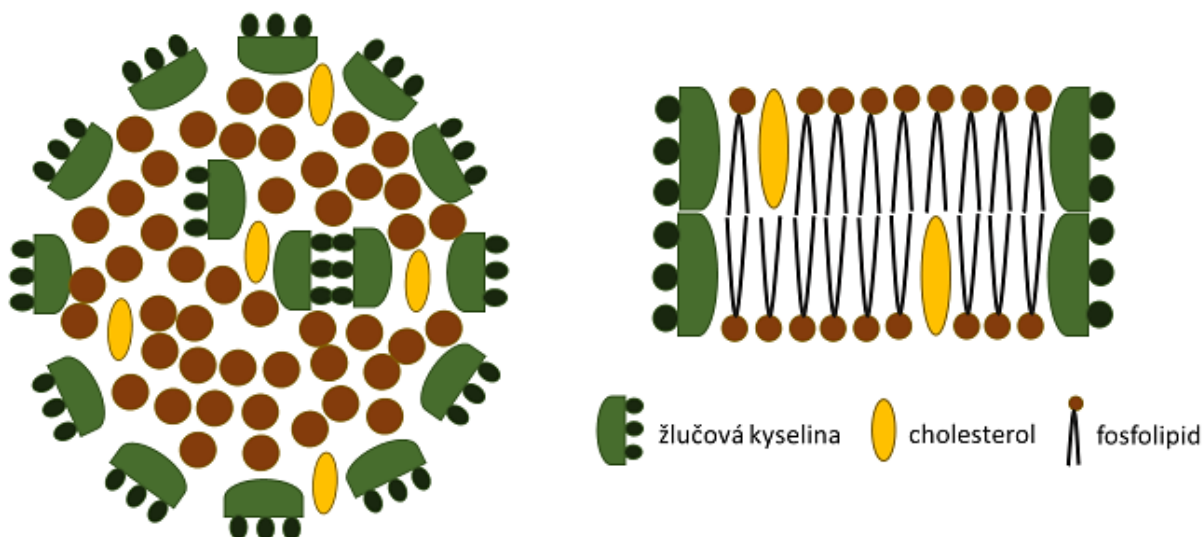
Při alternativní cestě syntézy žlučových kyselin dochází nejdříve k oxidaci vedlejších řetězců a teprve následně k modifikaci sterolového kruhu. Prvním enzymem v alternativní cestě syntézy žlučových kyselin je mitochondriální sterol-27-hydroxyláza (CYP27A1, gen *CYP27A1*) (6-8).

V dalším průběhu jsou primární žlučové kyseliny konjugovány s aminokyselinami taurinem či glycinem a vzniklé sodné či draselné soli jsou vyloučeny na kanalikulární membráně hepatocytu do žluči. Konjugace probíhá ve dvou stupních: v prvním stupni dochází k aktivaci žlučových kyselin na CoA-thioestery. Tato reakce je katalyzována enzymem BACS (bile acyl-CoA synthetase), rovněž známým jako BAACL (bile acyl-CoA ligase, gen *SLC27A5*). Ve druhém kroku jsou CoA-thioestery přeměněny na aminokyselinové konjugáty v reakci katalyzované enzymem BAAT (bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase, gen *BAAT*). Glycinové konjugáty žlučových kyselin jsou u člověka zastoupeny přibližně třikrát častěji než konjugáty s taurinem (1,7).

Soli žlučových kyselin jsou dobře rozpustné ve vodě, nicméně jejich molekuly mají i hydrofobní část, takže v zásaditém prostředí kanalikulární žluči dochází k jejich rychlé inkorporaci do tzv. smíšených micel obsahujících kromě žlučových solí rovněž fosfolipidy a cholesterol. Centrální část micely tvoří ve vodě nerozpustné lipidy, zatímco na periferii se nacházejí polárně uspořádané soli žlučových kyselin, které tak tvoří rozhraní mezi vodnou fází a nepolárními řetězci mastných kyselin fosfatidylcholinu (obr. 3).

Smíšené micely jsou nejen transportním vehikulem cholesterolu a rostlinných sterolů, ale vyvázáním žlučových kyselin rovněž plní protektivní funkci před poškozením buněčných membrán epiteliální výstelky žlučovodů (1).

Více než 95 % střevních žlučových kyselin je v distální části tenkého střeva reabsorbováno do portální krve a transportováno zpět do jater – tento cyklus je znám jako *enterohepatální cirkulace žlučových kyselin*. Udržení enterohepatální cirkulace má klíčový význam pro celou řadu fyziologických pochodů, zejména pro udržení toku žluči, vyloučení cholesterolu, fytoosterolů a toxických látek, intestinální reabsorpci lipofilních látek a nutrientů, zejména vitamínů rozpustných v tucích, a dále pro udržení střevní mikroflóry (1,3,6).

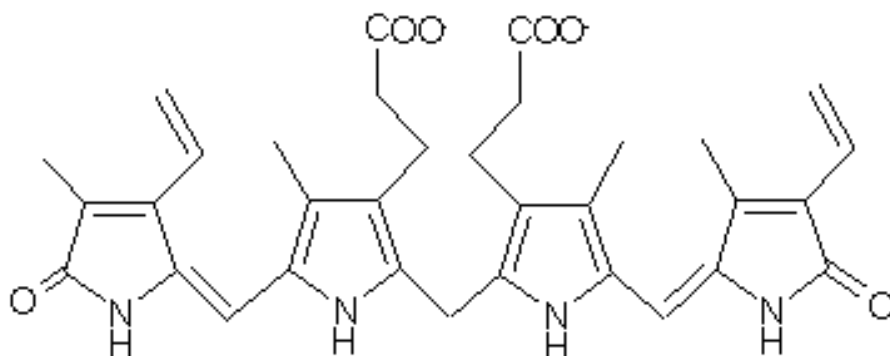


Obr. 3: Schéma smíšené micely. Povrch smíšené micely tvoří hydrofilní část molekuly solí žlučových kyselin; uvnitř smíšených micel se nachází hydrofobní část molekuly solí žlučových kyselin a rovněž ve vodě nerozpustné lipidy.

Malé množství nevstřebaných žlučových solí se dostává dále do tlustého střeva, kde působením bakteriální 7- α -dehydroxylázy dochází k jejich přeměně na sekundární kyseliny 7-deoxycholovou a lithocholovou. Minimum (cca 3-5 %) žlučových kyselin ztracených stolicí (0.2-0.6 g/den) je doplněno syntézou *de novo* v játrech (1,6,8).

V těle se žlučové kyseliny vyskytují především ve formě konjugované, což zabraňuje jejich nekontrolovatelné difúzi, a jejich přenos přes buněčné membrány vyžaduje aktivní transport závislý na energii (viz kapitola 2.1).

Dalšími sloučeninami vylučovanými žlučí jsou žlučová barviva, zejména bilirubin. Bilirubin je tetrapyrolová sloučenina představující konečný produkt degradace hemu, a to především hemoglobinu červených krvinek (cca 80 %) a jaterních cytochromů (obr. 4) (9,10). Produkce bilirubinu u dospělého člověka představuje cca 4.4 mg/kg tělesné hmotnosti za den, což odpovídá denní produkci bilirubinu v množství cca 250-350 mg. Fyziologicky dochází k rozpadu opotřebovaných erytrocytů zejména v mononukleárním fagocytárním systému sleziny, odkud se ve vodě nerozpustný nekonjugovaný bilirubin dostává především ve vazbě na albumin portálním řečištěm do jater, kde je na sinusoidálním pólu transportován do jaterních buněk. Lidský albumin představuje hlavní transportní bílkovinu pro nekonjugovaný bilirubin, pro který má na svém povrchu vysoce afinitní vazebné místo. Malá část (10 %) nekonjugovaného bilirubinu je v cirkulaci vázána na apolipoprotein D v molekule HDL-lipoproteinu a minimální frakce nekonjugovaného bilirubinu (<1 $\mu\text{mol/l}$) se v plazmě vyskytuje ve volné formě, bez vazby na transportní protein (10).



Obr. 4: Lineární tetrapyrrolová struktura bilirubinu.

V hepatocytech je nekonjugovaný bilirubin vázán na cytozolové proteiny Y (tzv. jaterní ligandin) a Z, což zabraňuje jeho zpětné difúzi do krve a umožňuje transport bilirubinu jaterní buňkou do endoplazmatického retikula (ER). V ER dochází ke konjugaci bilirubinu s kyselinou glukuronovou za vzniku bisglukosiduronátu (80 %) a v menší míře monoglukosiduronátů, a to v reakci katalyzované enzymem uridin-difosfát glukuronosyltransferázou 1A1 (UGT1A1, gen *UGT1*). V jaterní buňce je UGT1A1 lokalizována především v hladkém ER a v menší míře rovněž v Golgiho aparátu a v cisternách jaderné membrány hepatocytu (10-12).

Část konjugovaného bilirubinu je následně vyloučena do žluči, a to aktivním transportem zajištěným ATP-dependentním přenašečem MRP2/cMOAT (multidrug resistance-associated protein – viz kapitola 2.1.2). Kromě toho je poměrně významná frakce konjugovaného bilirubinu secernována zpět do sinusoidální krve, aby byla následně zpětně vycytována hepatocyty a definitivně vyloučena žlučí. Tento proces je zajištěn sinusoidálními transportéry MRP3 (multidrug resistance associated protein 3) a polypeptidy OATP1B1 (organic anion-transporting polypeptide 1B1) a OATP1B3 (organic anion-transporting polypeptide 1B3), exprimovanými zejména v centrální zóně jaterního lalůčku. Tato *MRP3-OATP1B1/3 smyčka* pravděpodobně představuje účinný mechanismus chránící periportální hepatocyty proti zvýšeným koncentracím různých xenobiotik a zároveň umožňující zvýšení celkové sekreční kapacity jater přesunem části nálože organických aniontů a aniontových konjugátů z periportální zóny do méně zatěžovaných hepatocytů v zóně 3 (perivenulární) jaterního lalůčku (13).

Jakmile se konjugovaný bilirubin dostane do terminálního ilea a tlustého střeva, molekula kyseliny glukuronové je odštěpena účinkem bakteriální β -glukuronidázy a dekonjugovaný pigment je následně redukován na bezbarvé sloučeniny zvané urobilinoidy, mezi něž patří zejména urobilinogen a sterkobilinogen. Většina urobilinoidů je oxidována na barevné urobiliny a vyloučena stolicí, ale malá frakce (20 %) je zpětně reabsorbována a opětovně

vyloučena játry. Zanedbatelné množství urobilinoidů přestupuje do systémové cirkulace a je vyloučeno močí (10).

2.1 Transportéry bilirubinu a žlučových kyselin

Rychlý rozvoj nových diagnostických metod a zejména nové objevy v oblasti molekulární genetiky v posledních desetiletích významně přispěly k pochopení mechanismů tvorby žluči a k odhalení procesů, které se podílejí na vzniku a rozvoji celé řady cholestatických poruch. Velký pokrok byl zaznamenán zejména v souvislosti s výzkumem procesů zodpovědných za transport bilirubinu a žlučových kyselin, stejně jako za regulaci syntézy a přenosu jednotlivých žlučových komponent.

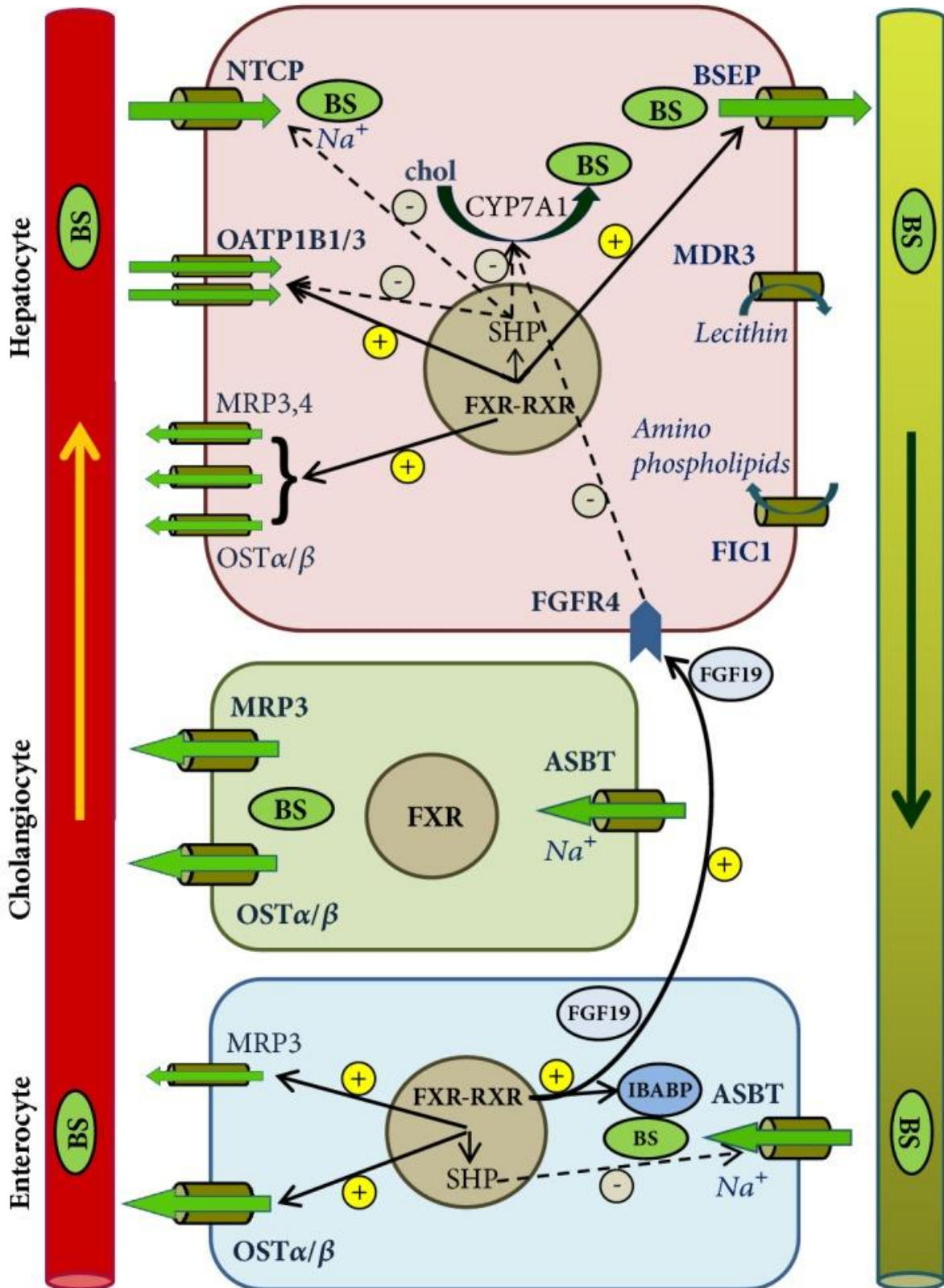
Transport bilirubinu a žlučových kyselin je zajištěn souborem přenašečových proteinů exprimovaných především v hepatocytech, biliárních epitelích a v epitelích intestinálního traktu (obr. 5).

2.1.1 Transportní proteiny na bazolaterální (sinusoidální) membráně hepatocytů

Přenašečové systémy na bazolaterální (sinusoidální) membráně hepatocytů se řadí do dvou velkých nadrodin transportérů, a to SLC (solute carrier superfamily) a ABC (ATP-binding cassette transporter superfamily). Obecně platí, že zatímco SLC přenašeče zprostředkovávají vychytávání substrátů buňkami, ABC transportéry jsou zodpovědné za vylučování exogenních i endogenních substrátů (1,14).

Za normálních okolností se konjugované žlučové kyseliny vracejí portální krví do jater, kde jsou vychytávány hepatocyty. Na⁺-dependentní taurocholát kotransportující peptid (NTCP, sodium/bile acid cotransporter) kódovaný genem *SLC10A1* (solute carrier family 10 member 1) představuje v hepatocytech hlavní vychytávací systém konjugovaných žlučových kyselin z portální krve zodpovědný za cca 80 % celkové transportní kapacity. NTCP je lokalizován na bazolaterální (sinusoidální) membráně hepatocytu a jeho pohon, koncentrační gradient Na⁺, je udržován Na⁺/K⁺-ATPázou (14,15).

Deficit NTCP způsobuje familiární hypercholanémii provázenou zvýšenou koncentrací žlučových kyselin v systémové cirkulaci, bez známek jejich akumulace v játrech (viz kapitola 4.2.3) (16). Kromě transportu žlučových kyselin funguje NTCP rovněž jako receptor nezbytný pro vstup viru hepatitidy B a D do hepatocytu (17,18).



Obr. 5: Hlavní hepatobiliární a intestinální transportéry žlučových kyselin a bilirubinu a jejich regulační mechanismy. Převzato z: Sticova, *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018 (publikace autora).

Nekonjugované žlučové kyseliny jsou na bazolaterální membráně hepatocytů přenášeny na ATP a Na⁺ nezávislými transportéry, a to OATP1B1 (organic anion-transporting polypeptide 1B1, rovněž OATP-C, OATP2, SLC21A6, nebo LST-1, gen *SLCO1B1*), a OATP1B3 (synonyma OATP8, SLC21A8, or LST3, gen *SLCO1B3*) (19-21). Jedná se o multispecifické přenašeče zodpovědné zejména za transport velkých hydrofobních organických aniontů, jako jsou nekonjugované (a v menší míře i konjugované) soli žlučových kyselin, bilirubin, steroidní hormony a celá řada léků a léčivých přípravků, např. srdeční glykosidy, statiny a různá chemoterapeutika (19-21). OATP1B1 a OATP1B3 představují vysoce homologní proteiny s podobnou organizací genu do 15 exonů a s blízkou sekundární strukturou s 12 predikovanými transmembránovými helixy a konci lokalizovanými intracelulárně (22,23). Zatímco OATP1B1 je exprimován panlobulárně, OATP1B3 je lokalizován zejména v centrolobulárních hepatocytech (22,23).

Organický transportér kationtů OCT1 z rodiny SLC22 (gen *SLC22A1*) je zodpovědný za přenos celé řady malých organických kationtů, včetně léčiv, cholinu či monoaminových neurotransmiterů, a to podle jejich elektrochemického gradientu, nezávisle na Na⁺ (24). Kromě sinusoidálního pólu jaterních buněk je OCT1 protein rovněž exprimován na luminální membráně plicních epitelů (25).

Na sinusoidálním pólu hepatocytů je rovněž lokalizováno několik na ABC transportérů se širokou substrátovou specificitou, zajišťujících zejména přenos organických aniontů, včetně solí žlučových kyselin (26).

MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1, gen *ABCC1*) byl prvním členem podrodiny transportérů ABCC/MRP identifikovaným v játrech. Exprese MRP1 je za normálních okolností velmi nízká, ale významně se zvyšuje po podání endotoxinu či po parciální hepatektomii (27-28). Mezi substráty MRP1 patří sloučeniny s glutathionem S, bilirubinglukuronidy, taurolithocholát 3-sulfát a oxidovaná forma glutathionu (29).

MRP3 (multidrug resistance-associated protein 3, gen *ABCC3*) je bazolaterální transportér solí žlučových kyselin, glukuronidu a anionických sloučenin, včetně glutathionu (30). V játrech je MRP3, obdobně jako OATP1B3, lokalizován především v centrální zóně lalůčku a spolu s OATP1B proteiny vytváří *MRP3-OATP1B1/3 smyčku* (viz výše) (13). Za fyziologických okolností je exprese MRP3 v játrech nízká, ale zvyšuje se v průběhu cholestázy a po opakovaném podání etinylestradiolu (31,32).

MRP4 (multidrug resistance-associated protein 4, gen *ABCC4*) je bazolaterální přenašeč konjugátů kyseliny cholové a glutathionu a rovněž funguje jako vysokoafinitní transportér

sulfatovaných žlučových kyselin, eikosanoidů, kyseliny močové a signálních molekul, jako jsou cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) (33). Podobně jako u MRP3 je exprese MRP4 v hepatocytech za fyziologických okolností nízká, ale může být indukována solemi žlučových kyselin v podmínkách cholestázy (34). Významná upregulace MRP4 byla u člověka popsána i u deficitu BSEP (35).

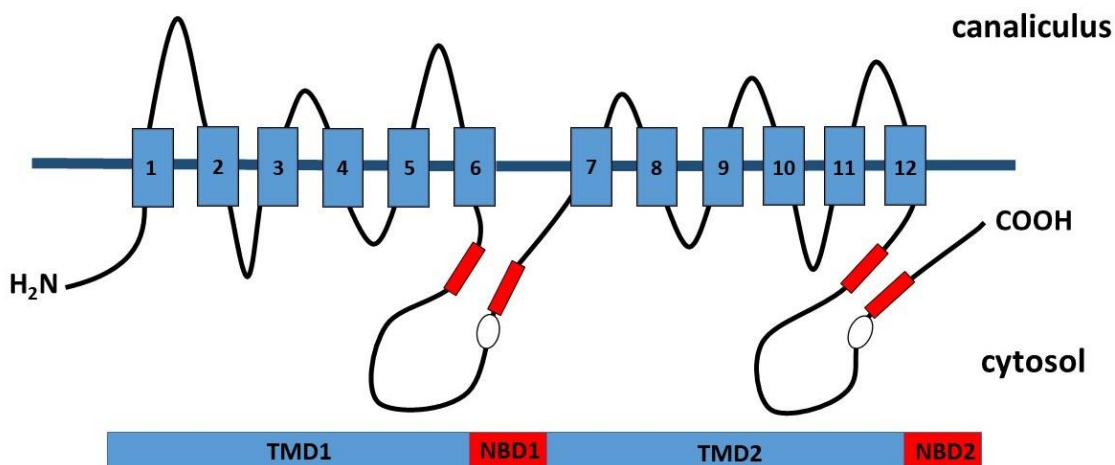
Heterodimerický transportér organických sloučenin OST α -OST β (organic solute transporters, geny *SLC51A* a *SLC51B*) byl původně popsán jako bazolaterální sekreční systém v enterocytech (viz kapitola 2.1.4), ale je rovněž lokalizován na sinusoidální membráně hepatocytů (36). Jaterní OST α -OST β je zvýšen u pacientů s primární biliární cholangitidou (37). Předpokládá se, že upregulace transportních proteinů MRP3, MRP4 a OST α -OST β během cholestázy může sloužit jako ochrana jaterních buněk proti škodlivému účinku hromadících se solí žlučových kyselin (37).

2.1.2 Transportní proteiny na apikální (kanalikulární) membráně hepatocytů

Většina kanalikulárních transportérů žlučových lipidů a pigmentů patří do velké nadrodiny tzv. ABC přenašečů (ATP-binding cassette transporters) využívajících pro transmembránový přenos energii získanou hydrolýzou ATP. ATP transportéry se skládají z několika domén: transmembránové (TMD) domény tvořené transmembránovými α -helixy zajišťují substrátovou specificitu. Jako NBD (nucleotide-binding domain) se označují domény vážící ATP a obsahující motivy známé jako Walker A a B a tzv. ABC signature. Funkční ABC pumpa typicky obsahuje dvě NBD a dvě TMD domény (obr. 6). (38,39).

V eukaryotních buňkách je transport zprostředkovaný ATP pumpou jednosměrný, obvykle z cytoplazmy do extracelulárního prostoru, případně do intracelulárního kompartmentu, jako jsou ER, mitochondrie či peroxisomy (38,39).

Exportní pumpa žlučových solí (BSEP, bile salt export pump) je považována za hlavní transportér monovalentních solí žlučových kyselin z hepatocytu do žluči. Gen *ABCB11* se nachází na dlouhém raménku druhého chromozomu (2q24) a jeho proteinový produkt je exprimován výhradně v játrech, a to na apikální (kanalikulární) membráně hepatocytů a v menší míře v subapikálních vezikulách (40). Funkční či strukturální poruchy této pumpy vedou k alteraci sekrece žlučových kyselin do žlučového kanálku a k jejich akumulaci v hepatocytech, což se zpravidla manifestuje jako klinicky významná cholestáza s nízkými hodnotami GGT (1,39). Regulace exprese BSEP je proto zcela zásadní pro udržení homeostázy žlučových kyselin. Klíčovou úlohu zde hraje jaderný transkripční faktor farnesoid X-aktivovaný receptor (FXR, viz kapitola 2.2).



Obr. 6 Schéma ABC transportéru s 12 předpokládanými transmembránovými segmenty. Malé červené rámečky představují motivy Walker A a B, bílé ovály tzv. ABC signature. TMD - transmembránová doména, NBD – nukleotid vážící doména.

P-Glykoprotein, rovněž označovaný jako MDR1 (multidrug resistance protein 1, gen *ABCB1*), je přenašeč zajišťující transport steroidních hormonů, hydrofobních peptidů, amfifilních kationických léčiv, žlučových solí a mnoha dalších endogenních i exogenních substrátů. Ve střevě zajišťuje pumpa MDR1 přesun substrátů z enterocytu do střevního lumen. Zvýšená exprese MDR1 má v nádorových buněčných liniích za následek jejich rezistenci vůči nízké polárním cytostatikům (39).

MDR3 (multidrug resistance protein 3) je homologní s proteinem MDR1 a funguje jako flopáza translokující fosfolipidy z vnitřního do vnějšího listu lipidové dvojvrstvy kanalikulární membrány (41,42). Gen *ABCB4*, který se nachází na sedmém chromozomu (7q21), zaujímá 74 kb a je tvořen 27 protein kódujícími exony (41). Patogenní mutace v *ABCB4* mají za následek poruchu tvorby smíšených micel a produkci hydrofilní žluči, která má nejen silné detergentní účinky na buněčné membrány, ale zároveň vykazuje i významný litogenní potenciál k tvorbě cholesterolových konkrementů (41,42).

MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2, rovněž cMOAT – canalicular multispecific anion transporter 1, či ABCC2 – ATP-binding cassette subfamily C member 2, gen *ABCC2*) se podílí na transportu konjugovaných endogenních i exogenních sloučenin, včetně konjugovaného bilirubinu, a dále přispívá k tvorbě žluči transportem redukováného glutathionu (GSH) (43,44). Za fyziologických okolností je MRP2 exprimován na kanalikulární membráně hepatocytů a v menší míře v ledvinách, duodenu, ileu, v mozku a v placentě (45). Deficit MRP2 je příčinou konjugované hyperbilirubinémie Dubin-Johnsonova typu (viz kapitola 4.1.1).

FIC1 (familial intrahepatic cholestasis type 1 transporter, gen *ATP8B1*) je P4 ATPáza (type 4 subfamily of P-type ATPases) exprimovaná v polarizovaných epiteliích, zejména v oblasti kanalikulární membrány hepatocytů, na apikální membráně enterocytů a acinárních buněk pankreatu a v menší míře i v mnoha dalších tkáních a orgánech (1,35). FIC1/ATP8B1 funguje jako flipáza aktivně translokující aminofosfolipidy, zejména fosfatidylserin a fosfatidylethanolamin, z vnějšího listu plazmatické membrány na vnitřní, čímž přispívá k udržení asymetrie a fluidity buněčných membrán (46). Funkční a strukturální poruchy ATP8B1/FIC1 mají vysoce variabilní klinickou manifestaci, která kromě různě vyjádřené poruchy sekrece žluči zahrnuje i celou řadu extrahepatálních příznaků (viz kapitola 4.2.1.1).

ABCG5 a ABCG8 (ATP-binding cassette proteins G5/G8) jsou členy podrodiny tzv. ABCG proteinů. Jedná se o poloviční transportéry, které společně formují heterodimerní kanalikulární pumpu zprostředkující aktivní, na ATP závislou exkreci cholesterolu a rostlinných sterolů do žluči. ABCG5 a ABCG8 jsou kódovány dvěma geny (*ABCG5* a *ABCG8*) na chromozomu 2, exprimovanými převážně v játrech, žlučníku a ve střevě (47). Mutace v *ABCG5* a 8 vedou k tzv. sitosterolémii (OMIM#210250), vzácnému onemocnění charakterizovanému až stonásobným vzestupem sérových rostlinných sterolů (48).

2.1.3 Transportní systémy cholangiocytů

Výstelku žlučových cest tvoří polarizované biliární epiteliie (cholangiocyty), které jsou rovněž významnými modifikátory složení žluči. Na apikální i bazolaterální membráně cholangiocytů se nachází několik transportních proteinů zajišťujících jednosměrný tok žlučových kyselin ze žluči do cirkulace. Soli žlučových kyselin absorbované biliárními epiteliemi se peribiliární cévní pletení dostávají zpět k hepatocytům, aby byly opětovně vyloučeny do žluči. Tento cyklický proces mezi cholangiocyty a hepatocyty se nazývá *cholehepatický shunt*, který nejen významně přispívá k celkové hepatobiliární transportní kapacitě pro přenos žlučových kyselin, ale rovněž stimuluje sekreci HCO_3^- , čímž umožňuje obnovení bikarbonátového štítu biliárních epitelií a představuje tak účinný adaptační a ochranný mechanismus, uplatňující se zejména při chronické obstrukci žlučových cest (1,49).

Žlučové kyseliny jsou aktivně transportovány do cholangiocytu cestou ASBT (apical sodium-dependent bile acid transporter, gen *SLC10A2*), který je exprimován na apikální membráně biliárních epitelií a je identický s přenašečem v terminálním ileu, epiteliích žlučníku a rovněž v proximálních tubulech ledviny (50). ASBT je tvořen 348 aminokyselinami a má omezenou substrátovou specificitu, která zahrnuje nekonjugované žlučové kyseliny a jejich glycinové a taurinové konjugáty. Kromě transportu žlučových kyselin je ASBT v biliárních

epiteliích zapojen rovněž do intracelulárních signálních procesů regulujících citlivost cholangiocytů na žlučové kyseliny (1,49,50).

Regulace ASBT probíhá na několika úrovních: akutní regulace se děje cestou na c-AMP závislé translokace transportéru do apikální membrány cholangiocytu, dále ubikvitinací a degradací proteazomem. Chronicky je ASBT řízen změnou genové exprese, která je ovlivňována koncentrací žlučových kyselin ve žluči a rovněž produkcí zánětlivých cytokinů (1,50).

Volné intracelulární žlučové kyseliny se v cholangiocytu vážou na cytosolové vazebné proteiny, které sekvestrací žlučových kyselin brání jejich cytotoxickému účinku a rovněž zajišťují jejich transcelulární transport od apikálního pólu k bazolaterální membráně biliárních epitelí, kde dochází k jejich vyloučení do krve (49).

Na exkreci žlučových kyselin do peribiliárního kapilárního plexu se podílí několik systémů, které zahrnují heterodimerický transportér OST α -OST β , MRP3, t-ASBT, variantu vzniklou alternativním štěpením ASBT za vzniku proteinu s kratším aminokyselinovým řetězcem s délkou 154 aminokyselin, a dále dosud blíže nespecifikovaný systém výměny aniontů (49).

2.1.4 Transportní systémy v enterocytech

Důležitým krokem v udržení homeostázy žlučových kyselin je jejich zpětné vstřebávání ve střevním lumen, které se děje pasivní absorpcí v tenkém a tlustém střevě a rovněž aktivním transportem v distálním ileu. Aktivní transport má význam především pro konjugované žlučové kyseliny, zatímco pasivní difúze přes kartáčkový lem intestinálních epitelí se uplatňuje zejména u nekonjugovaných žlučových kyselin a u některých glycinových konjugátů (1).

Enterocyty reabsorbují většinu žlučových solí prostřednictvím ASBT (viz kapitola 2.1.3), rovněž označovaného jako IBAT (ileal bile acid transporter či ileal sodium-dependent bile acid transporter), který je lokalizován v oblasti kartáčkového lemu enterocytů ilea. Stejně jako v cholangiocytech, i v tenkém střevě transportuje ASBT konjugované i nekonjugované soli žlučových kyselin, a to s vyšší afinitou pro chenodeoxycholovou a deoxycholovou kyselinu než pro taurocholáty (49-51).

Po vychytání enterocytem je intracelulární transport žlučových solí zprostředkován cytosolovým proteinem vázajícím žlučové kyseliny, známým rovněž jako fatty acid-binding protein 6 či jako gastrotropin (IBABP, FABP6, gen *FABP6*). IBABP váže jak mastné, tak žlučové kyseliny, a to s vyšší afinitou pro žlučové kyseliny, zejména taurinové konjugáty (51). Exprese *FABP6* je indukována žlučovými kyselinami působícími přes cytoplazmatický receptor FXR (51,52).

Exkrece žlučových kyselin do portální krve je ve střevních epitelích zajištěna zejména heterodimerickým transportérem organických solutů OST α -OST β , tvořeným membránovým proteinem OST α (gen *SLC51A*) s délkou řetězce 352 aminokyselin a proteinem OST β (gen *SLC51B*), tvořeným 182 aminokyselinami (36). OST α -OST β , který je považován za primární transportér žlučových solí do systémové cirkulace, je v intestinálním traktu lidí exprimován především v oblasti bazolaterální membrány enterocytů ilea a v menší míře i v proximálních částech tenkého střeva a v tlustém střevě, kde patrně zajišťuje transport glycinových konjugátů a nekonjugovaných žlučových kyselin, které se do intestinálních epitelů dostaly pasivní difúzí (1,36,51). Kromě žlučových kyselin patří mezi endogenní substráty OST α -OST β i malé molekuly, jako jsou např. prostaglandiny, neurosteroidy či steroidní sulfáty (51,52).

Kromě OST α -OST β se na bazolaterálním transportu žlučových solí v intestinálním traktu může malou měrou podílet i MRP3 (51,52).

2.2 Regulační mechanismy syntézy žlučových kyselin

Syntéza a enterohepatální cirkulace žlučových kyselin je řízena na mnoha úrovních. Klíčovým regulátorem je farnesoid X-aktivovaný receptor (FXR), jaderný transkripční faktor s vysokou afinitou k několika hlavním žlučovým kyselinám. Úroveň exprese genu *NR1H4* kódujícího FXR (tzv. nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4) je nejvyšší v intestinálním traktu, zejména v ileu, dále pak v játrech a v ledvinách (7,8,52,53).

FXR účinkuje jako aktivátor transkripce cílových genů, a to vazbou na tzv. inverted repeat DNA element (IR-1) v promotoru cílového genu, ke kterému se FXR připojuje jako heterodimer s RXR (retinoid X-receptorem). V játrech indukuje heterodimer FXR-RXR expresi *ABCB11*, *ABCC2*, *ABCB4* a *SLCO1B3*. Komplex FXR-RXR rovněž přímo indukuje expresi OST α -OST β , a to jak na bazolaterální membráně hepatocytů, tak v enterocytech ilea, a dále expresi IBABP (53-56).

FXR může rovněž nepřímo snižovat transkripci některých genů cestou SHP (tzv. small heterodimer partner, gen *NROB2*), atypického jaderného receptoru bez DNA vazebné domény (52). Tato zprostředkovaná downregulace se uplatňuje zejména u jaterního přenašeče NTCP a dále u ASBT v ileu. Expresi OATP1B1 během cholestázy může být rovněž suprimována mechanismy závislými na FXR (53,54,57).

Kromě regulace exprese transportních proteinů zapojených do enterohepatální cirkulace bilirubinu a žlučových kyselin se FXR rovněž podílí na regulaci tvorby žlučových kyselin, a to ovlivněním klíčových enzymů v klasické i alternativní cestě syntézy žlučových kyselin,

především *CYP7A1* and *CYP27A1*. Jsou známy dva základní, na FXR závislé mechanismy inhibice transkripce genu *CYP7A1*, a to inhibice cestou FXR/SHP a FXR/FGF19/FGFR4.

V játrech vzniká po navázání nízkomolekulárních ligandů kyseliny retinové a žlučových solí heterodimer FXR-RXR, který v jádře indukuje expresi SHP. Interakce SHP s LRH-1 (liver receptor homologue-1, synonymum NR5A2, gen *NR5A2*) a HNF4 α (hepatocyte nuclear factor-4 α , synonymum NR2A1, gen *HNF4A*) inhibuje transkripci *CYP7A1*. Gen *CYP27A1* postrádá vazebné místo pro LRH-1 a je schopen navázat pouze HNF4 α (52,54,56).

Druhý mechanismus souvisí s enterohepatální cirkulací žlučových kyselin. Ty v enterocytech terminálního ilea indukují prostřednictvím FXR-RXR intestinální hormon FGF19 (fibroblast growth factor 19, gen *FGF19*), který následně v játrech aktivuje FGF receptor 4 (FGFR4, gen *FGFR4*). Aktivovaný receptor snižuje syntézu žlučových solí inhibicí exprese *CYP7A1* (54,57).

Kromě regulačních mechanismů biosyntézy žlučových kyselin závislých přímo na FXR existuje i celá řada dalších mechanismů inhibice *CYP7A1* zprostředkovaných např. PXR (pregnane X receptor), receptorem vitamínu D (VDR), TNF α (tumour necrosis factor α), TGF β 1 (transforming growth factor β 1), receptorem pro epidermální růstový faktor (EGFR) a dalšími. Předpokládá se, že všechny tyto faktory aktivují signální dráhy chránící buněčné struktury proti toxickým účinkům solí žlučových kyselin během cholestázy (53,57).

V neposlední řadě má FXR rovněž schopnost přímo transaktivovat geny kódující enzymy metabolizující žlučové soli, jako jsou UGT2B4 (uridin 5'-difosfát-glukuronosyltransferáza 2B4, gen *UGT2B4*), a to vazbou na promotor *UGT2B4* v podobě monomeru, bez předchozí heterodimerizace s RXR (54).

3. Patofyziologie žloutenky a cholestázy

Fyziologická sérová koncentrace bilirubinu u zdravého dospělého člověka je menší než 17 $\mu\text{mol/l}$. Hodnoty převyšující 20 $\mu\text{mol/l}$ se označují jako hyperbilirubinémie. Žloutenka se projeví ve chvíli, kdy sérové koncentrace bilirubinu dosáhnou hodnot 30-50 $\mu\text{mol/l}$.

Ve většině případů je hyperbilirubinémie součástí komplexnější poruchy vedoucí k cholestáze, kdy dochází rovněž k retenci solí žlučových kyselin, fosfolipidů, volného cholesterolu a dalších komponent, které jsou za normálních okolností vylučovány do žluči. Na druhé straně, u některých typů cholestáz dominují příznaky z hromadění solí žlučových kyselin, a to zejména svědění kůže (*pruritus*) či projevy poruchy vstřebávání vitamínů rozpustných v tucích, a žloutenka nebývá vedoucím příznakem (1).

Přesný mechanismus poškození tkání a orgánů, zejména jater a žlučových cest, ke kterému dochází během cholestázy, není dosud plně objasněn. Za nejzávažnější klinické příznaky cholestázy jsou pravděpodobně zodpovědné hromadící se žlučové kyseliny a jejich soli, nicméně i ostatní substráty, např. bilirubin, mohou být potenciálně patogenní (58).

Odhalení patogenetických mechanismů cholestázy komplikují významné rozdíly mezi jednotlivými živočišnými druhy a rovněž rozdílný průběh procesů v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. Hepatocyty a cholangiocyty jsou za běžného stavu exponovány fyziologickým koncentracím žlučových kyselin. Původní studie *in vitro* předpokládaly přímý toxický účinek vysokých koncentrací žlučových kyselin na jaterní parenchym (58-60). Hydrofobní žlučové kyseliny mohou díky svým detergentním vlastnostem poškozovat lipidovou dvojvrstvu biologických membrán a alterovat strukturu a funkce membránově vázaných proteinů, včetně nejrůznějších přenašečů. Vysoké koncentrace žlučových kyselin navíc v experimentu indukují apoptózu a nekrózu hepatocytů, zejména cestou mitochondriální dysfunkce a tvorbou reaktivních forem kyslíku (58-60). Ve skutečnosti však během cholestázy dochází k akumulaci především netoxických žlučových kyselin a hladiny toxických žlučových kyselin patrně nedosahují úrovně nezbytné pro závažnější poškození buněčných struktur (59,60). Tyto nálezy podporují domněnku, že nikoliv vysoké koncentrace, ale únik žlučových kyselin ze žlučového stromu má v lidských játrech za následek buněčnou smrt, alespoň v případě obstrukční cholestázy (59,60).

Faktory uvolňované z nekrotických hepatocytů, tzv. DAMPs (damage-associated molecular patterns), mohou navíc indukovat sterilní zánětlivou odpověď s akumulací neutrofilních leukocytů a později i makrofágů. Žlučové kyseliny samy o sobě působí jako prozánětlivé molekuly a indukují expresi cytokinů a chemokinů v hepatocytech a makrofázích. Akumulace

zánětlivých elementů, zejména neutrofilních leukocytů obsahujících enzymy nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH) oxidázu a myeloperoxidázu, vede k produkci superoxidu a kyseliny chlorné s následným poškozením buněčných struktur oxidačním stresem (59,60).

Žlučový strom a cholangiocyty jsou za fyziologických okolností značně rezistentní vůči toxickému působení komponent žluči, v níž se žlučové kyseliny vyskytují ve formě smíšených micel (1,7,8). K základním obranným mechanismům patří udržování mezibuněčné integrity výstelky žlučových cest, zejména intaktních těsných spojení (*tight junctions*) mezi biliárními epitelii. Vlastní cholangiocyty jsou navíc chráněny před hydrofobními a toxickými žlučovými kyselinami udržováním alkalického pH na jejich apikální buněčné membráně, na čemž se podílejí zejména dva transportéry známé jako (CFTR)/Cl⁻ (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, gen *CFTR*) a (AE2)/HCO₃⁻ (anion exchange protein 2, gen *SLC4A2*) (1,59). Narušení těsných spojení a epitelové bariérové funkce, například vlivem imunitního inzultu či ischemickým poškozením, má za následek zvýšení citlivosti výstelky žlučových cest vůči působení toxických komponent žluči (59).

Bilirubin je rovněž považován za potenciálně toxický odpadní produkt metabolismu a pacienti s významnou nekonjugovanou hyperbilirubinémií jsou vystaveni riziku rozvoje tzv. bilirubinem-indukované neurologické dysfunkce (BIND) a jádrového ikteru, tzv. *kernicteru* (61,62). Přesný mechanismus bilirubinem indukovaného poškození mozku a vzniku bilirubinové encefalopatie není zcela objasněn. Předpokládá se inhibiční vliv nekonjugovaného bilirubinu na syntézu DNA a rozpojení oxidativní fosforylace a adenosintrifosfatázové aktivity v mitochondriích mozkových buněk (63,64). Úlohu může mít i bilirubinem zprostředkovaná inhibice různých enzymatických systémů, syntézy RNA a proteosyntézy v mozku i v játrech, spolu s alterací metabolismu sacharidů (65,66). Nekonjugovaný bilirubin může navíc spouštět apoptózu neuronů a glie mitochondriální cestou, což je efekt významný zejména u nezralých nervových buněk (67,68). Dysfunkce dýchacího řetězce a snížená antioxidační ochrana mladých neuronů mohou být významnými faktory ovlivňujícími citlivost předčasně narozených dětí na toxické účinky bilirubinu (68,69).

3.1 Klasifikace žloutenek

V závislosti na převažujícím typu žlučového pigmentu v plazmě se žloutenky klasifikují do tří základních kategorií, a to na převážně nekonjugované (nepřímé, premikrosomální), převážně konjugované (přímé, postmikrosomální) a smíšené (tabulka 1) (70).

Tabulka 1: Přehledná klasifikace žloutenek

Premikrozomální	Zvýšená produkce bilirubinu	hemolýza	
		porucha tvorby erytrocytů	
	Porucha vychytávání bilirubinu	městnavá hepatopatie	
		portosystémové zkraty	
		léky	
	Porucha konjugace bilirubinu	Crigler-Najjarův syndrom I a II	
		Gilbertův syndrom	
		novorozenci	
		estrogenní hormony	
	Postmikrozomální	Extrahepatální	hyperthyreóza
			žlučové kameny
			nádory
jizevnaté striktury			
pankreatitida			
Intrahepatální		parazitární onemocnění	
		primární biliární cholangitida	
		sepsy	
		léky a toxiny	
		infiltrativní procesy	
		sarkoidóza	
		těhotenství	
		cholestatická forma virové hepatitidy	
totální parenterální výživa			
Hereditární		Dubin-Johnsonův syndrom	
		Rotorův syndrom	

Na nekonjugované hyperbilirubinémii se podílejí tři hlavní patofyziologické mechanismy: nadprodukce bilirubinu, porucha vychytávání bilirubinu hepatocyty a porucha konjugace bilirubinu (70).

Příčiny převážně konjugované hyperbilirubinémie zahrnují celou řadu získaných i hereditárních onemocnění. Konjugovaná hyperbilirubinémie je častým nálezem u intra i extrahepatální cholestázy, nicméně existují i vzácné případy hereditárních žloutenek bez

cholestatických projevů. K postmikrozomálnímu typu hyperbilirubinémie může přispět rovněž porucha intestinálního metabolismu a transportu bilirubinu (2,70).

Následující kapitoly jsou zaměřeny především na geneticky podmíněné intrahepatální cholestázy a hereditární žloutenky.

3.2 Klasifikace hereditární žloutenky a geneticky podmíněné cholestázy

V současnosti existuje celá řada možných přístupů ke klasifikaci dědičné žloutenky a cholestatických stavů. Jedno z možných klasifikačních schémat uvádí tabulka 2.

Tabulka 2: Přehled nejvýznamnějších geneticky podmíněných intrahepatálních cholestáz a hereditárních žloutenek

Hlavní znak	Gen	Proteinový produkt	Onemocnění
Dědičné hyperbilirubinémie	<i>UGT1A1</i>	UGT1A1	Crigler-Najjarův a Gilbertův syndrom
	<i>ABCC2</i>	MRP2	Dubin-Johnsonův syndrom
	<i>SLCO1B1/SLCO1B3</i>	OATP1B1/3	Rotorův syndrom
	<i>UGT1A1/ABCC2</i>	UGT1A1/MRP2	Duální hereditární žloutenka
Hepatocelulární cholestáza	<i>ATP8B1</i>	ATP8B1/FIC1	PFIC1, BRIC1
	<i>ABCB11</i>	ABCB11/BSEP	PFIC2, BRIC2
	<i>TJP2</i>	TJP2/ZO2	PFIC4
	<i>NR1H4</i>	FXR	PFIC5
	<i>MYO5B</i>	MYO5B	Mikrovilózní inkluzní nemoc/PFIC6
	<i>USP53</i>	USP53	PFIC fenotyp
	<i>VPS33B</i>	VPS33B	Arthrogryposis-renal dysfunction-cholestasis (ARC) syndrome
	<i>VIPAS39</i>	VIPAS39/VIPAR	Arthrogryposis-renal dysfunction-cholestasis (ARC) syndrome
Hepatocelulární cholestáza s cholangiopatií	<i>ABCB4</i>	ABCB4/MDR3	PFIC3, ITC, GBD1/LPAC syndrom, biliární cirhóza, sklerozující cholangitida
Cholangiopatie	<i>CLDN1</i>	CLDN1	Neonatální sklerozující cholangitida s ichtyózou a alopecií
	<i>C1RH1A</i>	C1RH1A	North American Indian childhood cirrhosis
	<i>DCDC2</i>	DCDC 2	Neonatální sklerozující cholangitida
Hypercholanémie	<i>BAAT</i>	BAAT	Familiární hypercholanémie
	<i>TJP2</i>	TJP2	Familiární hypercholanémie
	<i>SLC27A5</i>	BACL	Familiární hypercholanémie
	<i>EPHX1</i>	EPHX	Familiární hypercholanémie

4. Dědičné žloutenky a cholestatické poruchy

4.1 Dědičné hyperbilirubinémie

Dědičné hyperbilirubinémie představují zvláštní skupinu hereditárních žloutenek bez typických cholestatických rysů. Podle typu bilirubinu převažujícího v séru rozlišujeme hyperbilirubinémie převážně konjugované, mezi něž patří vzácný Rotorův a Dubin-Johnsonův syndrom, a dále na hyperbilirubinémie převážně nekonjugovaného typu, kam se řadí v naší populaci poměrně frekventně se vyskytující Gilbertův syndrom a rovněž závažnější, ale nepoměrně vzácnější Crigler-Najjarův syndrom 1. a 2. typu.

4.1.1 Hyperbilirubinémie převážně konjugovaného typu

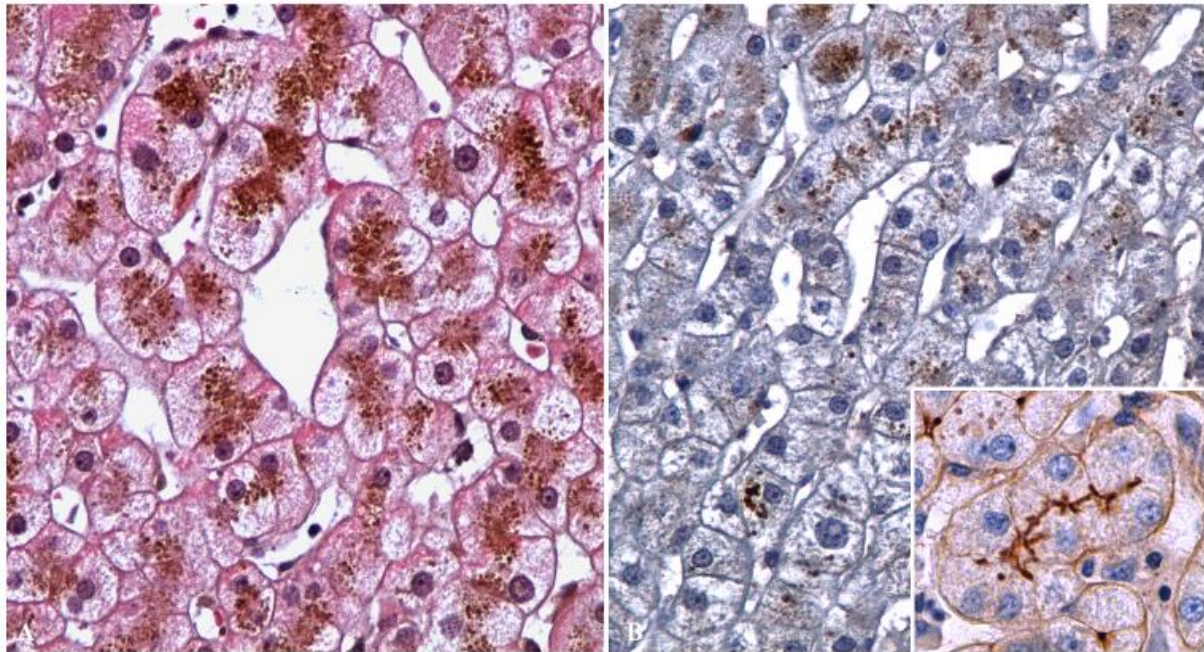
Dubin-Johnsonův syndrom (DJS, OMIM#237500) je představitelem dědičných žloutenek převážně konjugovaného typu, popsáným v roce 1954 hned dvěma kolektivy autorů, a to Dubinem a Johnsonem a dále Nelsonem a Sprinzem (71,72). Jedná se o autozomálně recesivně dědičnou poruchu, typicky se manifestující v době adolescence a v mladším dospělém věku kolísavou žloutenkou s převážně konjugovanou hyperbilirubinémií.

Molekulárně genetickým podkladem DJS je mutace v genu *ABCC2* na chromozomu 10q24, která má za následek deficit transportního proteinu MRP2/cMOAT na kanalikulární membráně hepatocytů (73,74).

Pro klinický obraz je charakteristický kolísavý ikterus sklér a někdy i kůže. Většina pacientů je kromě intermitentního subikteru či ikteru asymptomatická, až na občasnou únavu a mírné bolesti břicha v pravém horním kvadrantu (71,72). Hladina celkového bilirubinu se pohybuje kolem 100 $\mu\text{mol/l}$, přičemž více než 50 % připadá na přímý bilirubin (75). Ostatní laboratorní nálezy včetně odpadu celkových porfyrinů jsou normální, avšak izomer I koproporfyriu představuje u DJS až 80 % celkově vylučovaného koproporfyriu. Vylučování bromsulfoftaleinu a indocyaninové zeleni do žluči po intravenózním podání je zpomaleno a ve 45. minutě po podání dochází k opětovnému vzestupu jeho koncentrace. Obdobnou kinetiku jako bromsulfoftalein mají i radiofarmaka používaná k cholescintigrafii, což se projevuje opožděným zobrazením jater i plněním žlučníku (76).

Morfologickým korelátem DJS je v mikroskopickém obraze jaterní akumulace černohnědého pigmentu s tinkčnými vlastnostmi podobnými melaninu a lipofuscinu, s výraznou autofluorescencí (obr. 7A) (77). Množství pigmentu v jaterní tkáni je variabilní a přechodně může i vymizet, nejčastěji v souvislosti s jiným akutně probíhajícím jaterním onemocněním (78,79). Imunohistologicky lze ve většině případů prokázat absenci proteinu *ABCC2*/MRP2

v oblasti kanalikulární membrány hepatocytů (obr. 7B), výjimečně však může být mutovaný nefunkční protein normálně exprimován (80). Kromě tmavé až černé pigmentace jater není hromadění pigmentu provázeno jinými patologickými změnami jaterní tkáně a syndrom nemá za následek chronické poškození jaterní tkáně či progredující fibrózu (75). Mutace v *ABCC2* však mohou kromě transportu konjugovaného bilirubinu alterovat vylučování mnoha anionických substrátů, včetně celé řady běžně užívaných léčiv (81,82).



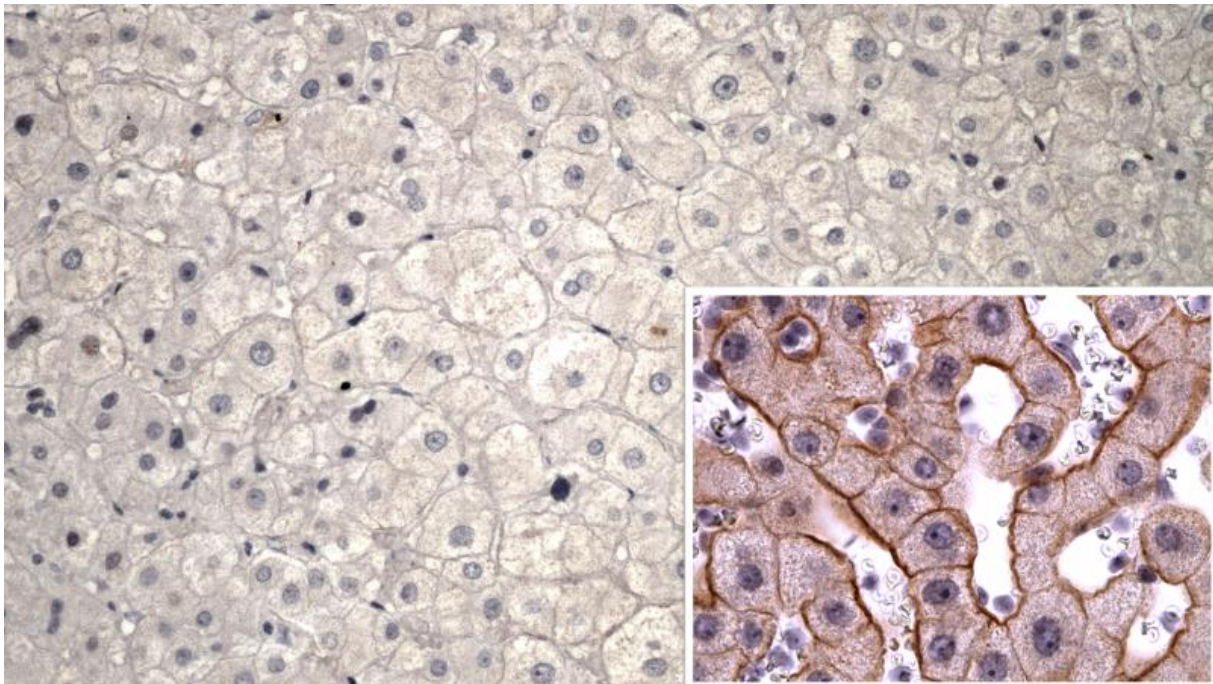
Obr. 7: Dubin-Johnsonův syndrom. (A) Akumulace hnědočerného pigmentu ve strukturálně normální jaterní tkáni. HE; původní zvětšení 600x. (B) Kompletní chybění kanalikulární exprese MRP2 ve tkáni probanda (vložený obrázek – kontrola). Imunohistochemie (primární myši monoklonální protilátka anti-MRP2, clone M2III-6, Kamiya); původní zvětšení 600x.

Rotorův syndrom (RS, OMIM#2374500) byl detailně popsán již v roce 1948 autory Rotorem, Manahanem a Florentinem jako familiární nehemolytická žloutenka s přímou van der Berghovou reakcí (83), nicméně molekulárně genetická podstata syndromu byla odhalena až v roce 2012 (13). Stejně jako předchozí jednotka, není RS spojen s rizikem poškození jaterních funkcí či progredující fibrózy.

RS je charakterizován mírnou, převážně konjugovanou hyperbilirubinémií se zvýšeným vylučováním koproporfyrinu močí, s převahou izomeru I. Vylučování aniontových barviv játry je pomalejší než u DJS a nedochází k opětovnému vzestupu jejich koncentrace. Při choleoscintigrafii se nezobrazí ani játra, ani žlučník (13,84,85).

Molekulárně genetickým podkladem RS je digenní porucha, konkrétně homozygotní mutace v genech *SLCO1B1* a *SLCO1B3*, vedoucí ke kompletnímu deficitu sinusoidálních transportérů OATP1B1 a OATP1B3 (obr. 8) (13).

Vzácně se vyskytující RS sám o sobě nevyžaduje žádná zvláštní terapeutická opatření, nicméně se předpokládá, že jedinci s patogenními mutacemi ve výše zmíněných genech mohou mít zvýšené riziko nežádoucích komplikací při užívání celé řady běžných léčiv, jako jsou statiny, metotrexát, některá antibiotika či chemoterapeutika (viz kapitola 5.3) (13,86).



Obr.8: Rotorův syndrom. Absence bazolaterálních transportních proteinů OATP1B1 a OATP1B3 v jaterní tkáni probanda s RS. Vložený obrázek – zdravá kontrola. Imunohistochemie (primární myší monoklonální protilátka MDQ anti-OATP2 antibody, ab15442, Abcam); původní zvětšení 400x.

4.1.2 Hyperbilirubinémie převážně nekonjugovaného typu

Konjugace bilirubinu v ER je katalyzována enzymem *UGT1A1*. Mutace v *UGT1A1* mohou mít za následek sníženou expresi a sníženou aktivitu až kompletní inaktivaci konjugačního enzymu (11,12,87). Exprese *UGT1A1* může být indukována fenobarbitalem, a to přes cytoplazmatický konstitutivní androstanový receptor CAR (constitutive active receptor), který se po podání fenobarbitalu jako heterodimer s RXR translokuje do jádra, kde se naváže na specifickou sekvenci v promotoru *UGT1A1*, tzv. gtBPREM (glucuronosyltransferase phenobarbital response enhancing motif) (88).

Mezi žloutenky převážně nekonjugovaného typu s různou úrovní reziduální aktivity konjugačního enzymu patří Crigler-Najjarův syndrom a dále syndrom Gilbertův.

Crigler-Najjarův syndrom (CNS) je vzácná autosomálně recesivní porucha konjugace bilirubinu vyvolaná mutacemi ve strukturálních oblastech genu *UGT1A1*. Podle koncentrace sérového bilirubinu se rozlišuje CNS I. a II. typu.

CNS I. typu (OMIM#218800), popsáný v roce 1952 Criglerem a Najjarem (89), představuje nejzávažnější poruchu ze spektra převážně nekonjugovaných hereditárních žloutenek, charakterizovanou kompletním chyběním aktivity konjugačního enzymu a těžkou žloutenkou, která se zpravidla objeví krátce po narození. Neléčená choroba je letální, postižení umírají zpravidla v prvních dvou letech věku na jádrový ikterus (90,91).

Příčinou jsou *nonsense* a některé *missense* mutace v exonech *UGT1A1* či v jejich intronickém okolí (91-93). Pro CNS I. typu jsou charakteristické hodnoty bilirubinu nad 350 $\mu\text{mol/l}$, které neklesají po podání fenobarbitalu. Ostatní laboratorní nálezy, chromoexkreční testy, stejně jako jaterní histologie bývají v mezích normy (90,91).

Léčba spočívá v celoživotní intermitentní fototerapii, při které dochází k vylučování ve vodě rozpustných fotoizomerů nekonjugovaného bilirubinu do žluči. Zvýšení účinnosti fototerapie je možno dosáhnout adjuvantní terapií, která spočívá v sekvestraci či v urychlení střevní degradace bilirubinu ve střevě. Účinnost fototerapie však s věkem postupně klesá, a ještě před nástupem puberty je obvykle nutno přistoupit k transplantaci jater (91,94).

V posledních letech byly u pacientů s CNS I. typu vyzkoušeny nové terapeutické modalitty, jako je transplantace hepatocytů či jaterních progenitorových buněk nebo genová terapie, nicméně i přes dílčí úspěchy těchto nových postupů zůstává metodou volby transplantace jater (91,94,95).

CNS II. typu (Ariasův syndrom, OMIM#606785) popsáný Irwinem Ariasem v roce 1962 (96), je považována za benigní formu CNS, charakterizovanou sníženou aktivitou konjugačního enzymu na 10-25 % normální hodnoty, se středně závažnou nehemolytickou žloutenkou. Bilirubinémie nepřesahuje hodnoty 350 $\mu\text{mol/l}$ a CNS II. typu je jen zcela výjimečně komplikován rozvojem jádrového ikteru. Stejně jako u CNS I. typu jsou ostatní laboratorní nálezy a jaterní morfologie normální (96). Na rozdíl od většiny případů CNS I. typu dochází u CNS II po podání fenobarbitalu k výrazné indukci transkripce genu *UGT1A1* se zvýšením reziduální aktivity konjugačního enzymu, s následným poklesem sérového bilirubinu až o třetinu (97). Ve žluči jedinců s CNS II bývají detekovatelné bilirubin glukuronidy (96-98).

CNS II. typu je podmíněn takovými mutacemi v genu *UGT1A1*, z nichž alespoň jedna nemá za následek kompletní inaktivaci či nulovou expresi kódovaného enzymu (97,99). Metodou volby v diagnostice CNS je mutační analýza *UGT1A1* (98-100).

Gilbertův syndrom (GS, OMIM#143500) je familiární nehemolytická žloutenka popsána již v roce 1901 Augustinem Gilbertem a Pierrem Lereboulletem (101). Jedná se o autosomálně

recesivně dědičnou metabolickou odchylku podmíněnou snížením rychlosti konjugace bilirubinu v játrech, přičemž hladiny nekonjugovaného bilirubinu v séru zpravidla nepřesahují 85 $\mu\text{mol/l}$ (101).

V evropské populaci je v převážné většině případů toto snížení podmíněno homozygotním stavem pro variantu A(TA₇)TAA TATA-boxu v promotoru genu *UGT1A1*. Normální sekvence TATA-boxu je A(TA₆)TAA. Inzerce TA má za následek snížení transkripce genu o 20 % proti normálním hodnotám, s následným snížením konjugační aktivity strukturálně normálního enzymu UGT1A1 až o 80 % v homozygotním stavu (102,103). U většiny nositelů GS je exprese UGT1A1 dále snížena přítomností druhé mutace T>G v pozici -3279 od začátku translace genu *UGT1A1* v gtPBREM. Tato mutace je příčinou zpomaleného poklesu bilirubinémie po podání fenobarbitalu (87,88).

Vedle uvedených mutací v promotoru genu *UGT1A1* mohou GS vyvolat i mutace ve strukturálních oblastech genu. Tyto mutace se vyskytují zejména v asijské populaci a mezi nejčastější patří heterozygotní mutace UGT1A1*6 (c.211G>A) v exonu 1 (p.G71R), UGT1A1*7 (p.Y486YD), UGT1A1*27 (p.P229PQ), a UGT1A1*62 (p.F83FL) (104,105).

Klinicky se GS projevuje jako intermitentní ikterus sklér, popřípadě mírná žloutenka, akcentující se stresem, fyzickou zátěží, hormonálními vlivy, podáním některých léků, případně hladověním, čehož se v minulosti využívalo i diagnosticky (tzv. test hladověním) (101,106,107). K (sub)ikteru se mohou přidružit i další, většinou nespecifické symptomy, jako je zvýšená únava, nechutenství či břišní dyskomfort. Fyzikální vyšetření je zcela v normě, stejně jako laboratorní nálezy, s výjimkou již zmíněné hyperbilirubinémie nekonjugovaného typu.

V bioptických vzorcích jater části nositelů GS bylo pozorováno hromadění lipofuscinu v hepatocytech, a to především v zóně 3 jaterního lalůčku (centrolobulárně) (108). Elektronmikroskopicky byla popsána u části případů GS hypertrofie ER v hepatocytech (109). Testy jaterní chromoexkrece, stejně jako jaterní biopsie nemají žádnou diagnostickou hodnotu, a proto tato vyšetření nejsou u jinak nekomplikovaných případů indikována.

GS dnes není považován za chorobnou jednotku, nýbrž za metabolickou odchylku, která nevyžaduje žádnou cílenou terapii ani zvláštní dietní či režimová opatření.

Je však známo, že mutace v *UGT1A1* mohou přispět k protrahované kojenecké hyperbilirubinémii (110). Proces konjugace je navíc důležitým metabolickým krokem při eliminaci celé řady endogenních i exogenních substrátů, a proto mohou být jedinci s GS náchylní k rozvoji toxických účinků léků, jako jsou např. indinavir, atazanavir nebo irinotecan, jejichž konjugaci katalyzuje právě UGT1A1 (111-113).

Duální hereditární žloutenka představuje vzácnou jednotku způsobenou současnou poruchou konjugace bilirubinu a jeho transportu, tedy kombinaci poruch typických pro GS a DJS (114). Klinické příznaky i laboratorní nález vč. cholescintigrafie odpovídá DJS provázenému intermitentní smíšenou, převážně nekonjugovanou hyperbilirubinemií, avšak současně s absencí pigmentu typického pro DJS. Molekulárně genetická vyšetření postižených jedinců prokázala mutace typické pro GS a současně patogenní mutace v *ABCC2*. Tento kombinovaný genetický defekt má za následek imunohistologicky prokazatelnou poruchu exprese MRP2 v jinak normálně strukturálně uspořádané jaterní tkáni (114,115).

4.2 Hereditární cholestatická onemocnění

Problematika dědičných cholestáz je nepoměrně složitější, než je tomu v případě hereditárních žloutenek. Kromě skupiny monogenně podmíněných cholestáz může porucha genů zodpovědných za syntézu a transport jednotlivých komponent žluči přispívat k častější či časnější manifestaci celé řady primárně získaných hepatobiliárních poruch, a to jak zánětlivých, tak neoplastických.

Rozdílné mutace v jediném genu mohou navíc vykazovat širokou fenotypickou variabilitu. Obecně platí, že mutace postihující strukturální oblasti genu mají za následek většinou závažnější formy onemocnění, zatímco mutace v regulačních oblastech genu se mohou navenek projevit jako mírnější fenotyp (116).

4.2.1 Progresivní familiální intrahepatální cholestáza

Progresivní familiální intrahepatální cholestáza (PFIC) je souhrnný název pro geneticky heterogenní skupinu autosomálně recesivně dědičných onemocnění podmíněných mutacemi v genech kódujících proteiny odpovědné za regulaci a transport žlučových kyselin a fosfolipidů a rovněž za udržení integrity buněčných spojení v hepatobiliárním systému. Klinicky se většina PFIC obvykle manifestuje v 1. roce života žloutenkou, těžkým pruritem, hepatosplenomegalií, steatoreou, anorexií a retardací růstu a psychického vývoje. Dále bývají přítomny známky deficitu vitaminů rozpustných v tucích, např. koagulopatie, osteopenie a neuromuskulární poruchy. Bez adekvátní léčby choroba zpravidla poměrně rychle progreduje a končí obvykle smrtí v důsledku jaterního selhání v první či vzácněji ve druhé dekádě (117-118).

Konzervativní léčba bývá obvykle bez trvalejšího efektu. Chirurgická léčba - ileální bypass či nověji parciální drenáž žluči cholecystostomií, jejímž cílem je snížit pool žlučových kyselin a zabránit tvorbě toxických hydrofobních sekundárních žlučových kyselin, může oddálit

potřebu transplantace jater, která je v současné době jedinou účinnou léčebnou metodou (118,119).

Do dnešního dne bylo na základě molekulárně genetické podstaty identifikováno pět forem PFIC, označovaných jako PFIC1-5. Jak již bylo dříve zmíněno, jedná se zpravidla o krajní, nejzávažnější fenotyp z možného spektra klinických projevů způsobených mutací v příslušném genu, s úplným chyběním či kompletní ztrátou funkce proteinového produktu (116).

4.2.1.1 Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 1

Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 1 (PFIC1, rovněž *ATP8B1* disease, OMIM#211600), původně Bylerova choroba, je způsobena patogenní mutací v genu *ATP8B1/FIC1*, lokalizovaném na dlouhém raménku chromozomu 18 (18q21-22), kódujícím ATPázu FIC1 (120). Jak již bylo uvedeno v předchozím textu, aktivní translokací fosfatidylserinu a fosfatidylethanolaminu z vnějšího listu plazmatické membrány na vnitřní se flipáza FIC1 podílí na udržení asymetrie rozložení fosfolipidů v buněčných membránách, čímž přispívá k udržení jejich integrity a rezistence vůči toxickým účinkům žlučových kyselin (46).

Kromě obecných příznaků PFIC se deficit *ATP8B1/FIC1* projevuje celou řadou mimojaterních poruch, mezi něž patří opožděný růst a vývoj, vodnaté průjmy, poruchy sluchu, nebo pankreatitida. Většina těchto symptomů přetrvává i po úspěšné transplantaci jater a intestinální příznaky se mohou po transplantaci dokonce zhoršit (121). Jaterní štěp u příjemců s PFIC1 může v potransplantačním období vyvinout významnou steatózu a případně známky steatohepatitidy s progresivní jaterní fibrózou (122). Jak průjem, tak steatóza štěpu se může zlepšit po biliární diverzi (123).

Na rozdíl od většiny ostatních jednotek ze skupiny PFIC, nebyl u deficitu FIC1 zaznamenán zvýšený výskyt primárních hepatobiliárních malignit (124).

K typickým laboratorním příznakům PFIC1 patří známky cholestázy s nízkou aktivitou GGT, zvýšení sérové koncentrace primárních žlučových kyselin a normální hladiny cholesterolu. ALT a AST zpočátku zůstávají v mezích normy, nicméně v průběhu choroby může dojít až k desetinásobnému zvýšení jejich aktivity (120).

Mikroskopické změny v jaterním parenchymu zahrnují zejména hepatokanikulární cholestázu akcentovanou v centru lobulů a progredující fibrózu až cirhotickou přestavbu jaterní tkáně. Portální žlučovody mohou být hypoplastické, což je zřejmě důsledek sníženého průtoku žluči. Obrovskobuněčná transformace hepatocytů není, na rozdíl od celé řady jiných cholestáz s manifestací v časném dětském věku, obvyklým znakem. Charakteristickým nálezem v elektronovém mikroskopu je přítomnost hrubě granulární žluči (tzv. Bylerovská žluč) (124).

Molekulárně genetické vyšetření typicky odhalí přítomnost patogenních mutací v obou alelách *ATP8B1* (125,126).

Mírnější a obvykle neprogresivní formou deficitu *ATP8B1* je benigní rekurentní intrahepatální cholestáza 1. typu (viz kapitola 4.2.2).

4.2.1.2 Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 2

Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 2 (PFIC2, *ABCB11* disease, OMIM #601847) je porucha způsobená mutací genu *ABCB11*, lokalizovaném na dlouhém raménku chromozomu 2 (2q24), který kóduje kanalikulární transportní protein BSEP (127).

Klinické i laboratorní příznaky PFIC2 jsou blízké manifestaci PFIC1, včetně typicky nezvýšené aktivity GGT, avšak extrahepatální příznaky se u PFIC2 prakticky nevyskytují. Kromě toho bývá PFIC2 častěji komplikován cholelitiázou a zvýšenou sérovou aktivitou aminotransferáz (124,127).

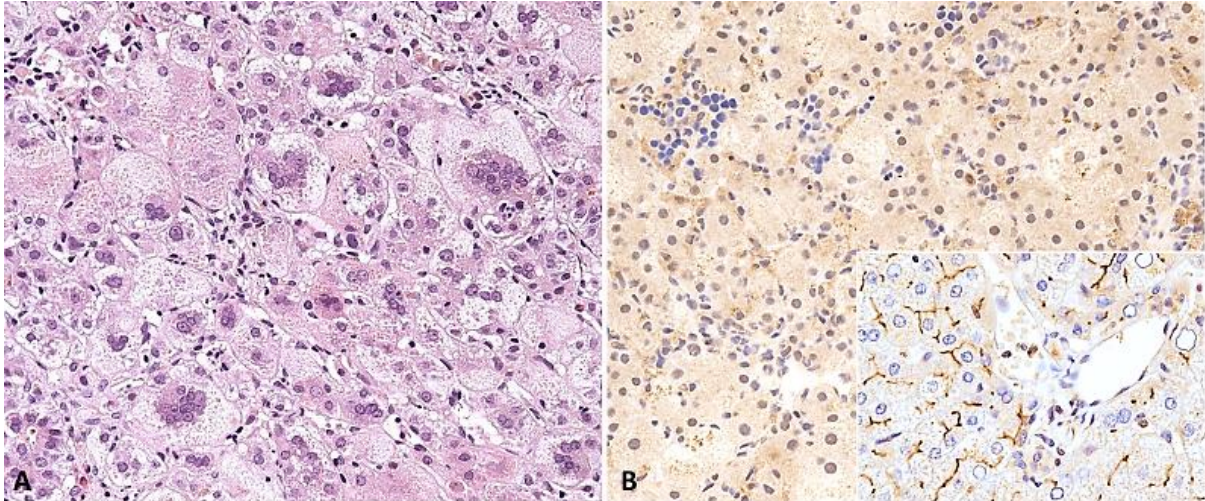
Závažnou komplikací PFIC2 je zvýšené riziko vzniku hepatobiliárních malignit, a to jak hepatocelulárních, tak cholangiocelulárních, proto je u pacientů se známým deficitem *ABCB11* doporučován v prvních letech života skrínig na přítomnost jaterních tumorů (128,129).

Podobně jako *ATP8B1* se i deficit BSEP může manifestovat v podobě mírnější a obvykle neprogresivní formy BRIC2, případně může predisponovat k rozvoji léky indukované cholestázy nebo cholestázy během těhotenství (viz kapitola 4.2).

Typickým mikroskopickým nálezem jsou u pacientů s PFIC2 známky obrovskobuněčné hepatitidy s hepatokanalikulární cholestázou a s ostrůvky extramedulární krve tvorby (obr. 9). V jaterní tkáni postižených jedinců bývá často přítomna i periportální duktulární proliferace. Interlobulární žlučovody jsou v důsledku sníženého toku žluči často spíše hypoplastické. K diagnostice onemocnění může významnou měrou přispět i imunohistochemie, která v typickém případě prokáže absenci BSEP v oblasti kanalikulární membrány hepatocytů. Žluč je u PFIC2 spíše amorfni či filamentózní (130).

Včas nerozpoznaný a neléčený deficit BSEP má obvykle za následek rychlý rozvoj a progresi fibrózy. Jedinou kurativní metodou zůstává u pacientů s PFIC2 i nadále transplantace jater (131). Na rozdíl od deficitu FIC1 nebývá u PFIC2 potransplantační období komplikováno rozvojem steatózy jaterního štěpu, nicméně až 8 % pacientů může vyvinout obraz připomínající fenotyp BSEP deficitu s nízkou aktivitou GGT při zvýšené hladině konjugovaného bilirubinu a žlučových kyselin. V séru se u pacientů s tzv. Autoimmune BSEP Disease (AIBD) zpravidla detekují polyklonální protilátky namířené proti první extracelulární klíče BSEP (132). Přesný mechanismus inhibičního účinku těchto protilátek není dosud zcela objasněn, ale předpokládá

se, že dochází k zesíťování proteinu BSEP v oblasti kanalikulární membrány hepatocytů, což narušuje jeho strukturu a funkci (132,133). Znamky cholestázy se u pacientů s AIBD lepší plazmaferézou a podáváním rituximabu, chimerické (myší/lidské) monoklonální protilátky proti antigenu CD20 na povrchu B buněk (134).



Obr. 9: Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 2. (A) Obrovskobuněčná transformace hepatocytů (HE, původní zvětšení 600x). (B) Absence exprese kanalikulárního proteinu BSEP v jaterní tkáni probanda (primární králičí polyklonální protilátka anti-ABCB11/BSEP, ab155421, Abcam, původní zvětšení 200x); vložený obrázek – zdravá kontrola (původní zvětšení 400x).

4.2.1.3 Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 3

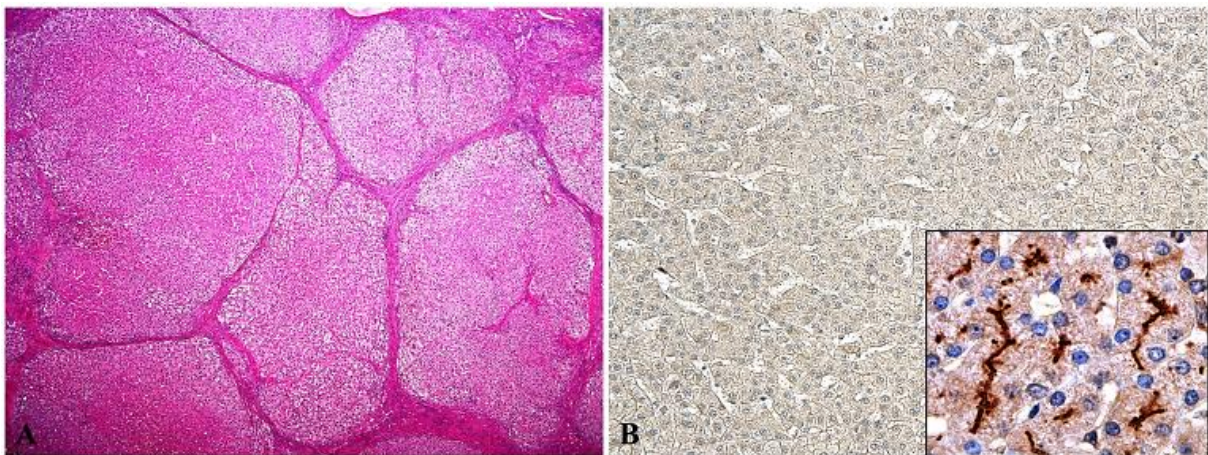
Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 3 (PFIC3, *ABCB4* disease, OMIM #602347) je způsobena mutací v obou alelách genu *ABCB4* kódujícího transportér MDR3, exprimovaný v oblasti kanalikulární membrány hepatocytů (135).

Mutace v *ABCB4* mohou predisponovat k celému spektru jaterních onemocnění, jako jsou syndrom cholelitiázy s nízkými fosfolipidy (LPAC, rovněž Gallbladder Disease type 1, GBD1, OMIM#600803), intrahepatální těhotenská cholestáza (ITC, OMIM#147480), léky indukované jaterní poškození, transientní neonatální cholestáza, kryptogenní biliární fibróza či cirhóza, případně fibrózní cholangiopatie s postižením malých žlučovodů (136-139). Kromě toho může defekt *ABCB4* představovat zvýšené riziko vzniku hepatocelulárního a cholangiocelulárního karcinomu (138,139).

Klinicky i laboratorně se PFIC3 podobá oběma předchozím jednotkám, ale extrahepatální symptomy nebývají přítomny a syndrom je typicky doprovázen normální či zvýšenou aktivitou GGT (135,136).

Charakteristickým mikroskopickým nálezem u pacientů s PFIC3 je obrovskobuněčná hepatitida s hepatokanalikulární cholestázou, dále zpravidla mírný, portálně vázaný zánětlivý infiltrát a známky jaterní fibrózy, případně až cirhotické přestavby (obr. 10A).

Poměrně často jsou u deficitu MDR3 popisovány změny na žlučovém stromu představované koncentrickou periduktální fibrózou kolem portálních žlučovodů, provázenou periportální duktulární proliferací. V lumen malých žlučovodů se mohou nacházet krystaly cholesterolu či drobné konkrementy (viz obr. 11, kapitola 4.2.5) (136,137). U časných forem onemocnění může k diagnóze přispět rovněž imunohistochemie prokazující sníženou či chybějící expresi proteinu MDR3 v oblasti apikální membrány hepatocytů (obr. 10B), nicméně často bývá exprimován nefunkční protein, což představuje významný limit pro využití imunohistochemických metod v diagnostice *ABCB4* deficitu. Elektronová mikroskopie prokazuje denzní amorfní žluč, vzácně s přítomností krystalů lipidů (137).



Obr. 10: Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 3. (A) Cirhotická přestavba jaterní tkáně s biliárními rysy (HE, původní zvětšení 40x). (B) Absence kanalikulární imunoexpresie MDR3 v hepatocytech (primární králičí polyklonální protilátka anti-MDR3/ABCB4, NBP2-30887PEP, Novus Biologicals, původní zvětšení 100x); vložený obrázek s expresí MDR3 ve zdravé jaterní tkáni (původní zvětšení 600x).

Zajímavým a dosud ne zcela objasněným nálezem je u některých pacientů s PFIC3 nápadně zvýšená akumulace mědi v jaterní tkáni se zvýšeným vylučováním mědi močí, tedy změny, které mohou vést k chybné diagnóze Wilsonovy choroby (140,141).

4.2.1.4 Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 4

Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 4 (PFIC4, deficit *TJP2*, OMIM #615878) je poměrně nedávno popsanou chorobnou jednotkou, způsobenou homozygotní či složenou heterozygotní mutací v genu *TJP2* (rovněž označovaném jako *ZO-2*), lokalizovaném na chromozomu 9 (142). Mutace v *TJP2* mají za následek deficit claudinu 1, integrálního

proteinu těsných spojení, a to zejména v oblasti kanalikulární membrány hepatocytů, což vede k rozvolnění mezibuněčných spojů s následným únikem žluči do mezibuněčného prostoru (142,143).

Pacienti s mutacemi v *TJP2* mohou vyvinout těžké progresivní cholestatické jaterní onemocnění již v časném dětství a mají rovněž významně zvýšené riziko vzniku hepatocelulárního karcinomu (144). Sérové hladiny GGT bývají u *TJP2* deficitu normální či pouze lehce zvýšené a exprese ostatních transportních proteinů je zachována. Kromě hepatobiliárních příznaků je u pacientů s PFIC4 popsána celá řada mimojaterních symptomů, a to zejména respiračních a neurologických (142).

Izolovaná homozygotní misense mutace v *TJP2* byla popsána u pacientů s benigní familiární hypercholanémií, která se manifestuje zvýšenou sérovou koncentrací solí žlučových kyselin, pruritem a známkami malabsorpce tuku (viz kapitola 4.2.3) (145).

4.2.1.5 Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 5

Progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 5 (PFIC5, deficit *NR1H4*, OMIM #617049), poprvé popsána v roce 2016, je cholestatické onemocnění způsobené mutací v *NR1H4* lokalizovaném na chromozomu 12 (12q23.1), kódujícím FXR, klíčový regulátor metabolismu žlučových kyselin (146).

Homozygotní ztráta funkce FXR má za následek těžkou neonatální cholestázu s časným rozvojem koagulopatie nezávislé na vitamínu K, s následnou rychlou progresí do jaterního selhání (146). Snížená až chybějící odpověď na podávání vitamínu K je zřejmě přímým důsledkem ztráty funkce FXR a může sloužit jako významný diferenciálně diagnostický znak cholestázy asociované s defektem *NR1H4*. Kromě normální či nižší aktivity GGT jsou pro PFIC5 typické zvýšené hladiny sérového α -fetoproteinu (146,147).

Při mikroskopickém vyšetření jaterní tkáně se často nachází obraz obrovskobuněčné hepatitidy s hepatokanalikulární cholestázou a s periportální cholangiolární proliferací. V pozdějších stádiích se rozvíjí progresivní fibróza až mikronodulární cirhotická přestavba jaterní tkáně. Imunohistochemické vyšetření prokáže absenci BSEP v oblasti kanalikulární membrány hepatocytů při zachovalé expresi ostatních transportních proteinů (148).

Vzhledem k tomu, že se FXR podílí na regulaci celé řady metabolických procesů, některé varianty deficitu *NR1H4* mohou predisponovat k rozvoji celé řady dalších onemocnění, například k poruše glukózové tolerance, vzniku cholelitiázy, k léky indukovanému poškození jaterní tkáně či k těhotenské cholestáze (viz kapitola 5) (148,149).

4.2.1.6 Další formy progresivní familiární intrahepatální cholestázy

Jako šestý typ PFIC je některými autory označována intrahepatální cholestáza asociovaná s mutacemi v genu *MYO5B*, lokalizovaném na chromozomu 18q21.1 (150). Proteinový produkt *MYO5B* (Myosin VB) je nezbytný pro správné fungování polarizovaných epitelí, včetně buněk jaterních. Mutace v *MYO5B* mohou narušit zejména expresi a funkci transportních proteinů BSEP a MDR3 v oblasti kanalikulární membrány hepatocytů (150,151).

Mutace v *MYO5B* jsou zodpovědné za tzv. mikrovilózní inkluzní onemocnění (OMIM#251850), kongenitální poruchu enterocytu manifestující se především úporným průjmem. Cholestáza se u těchto pacientů typicky projevuje po převedení pacienta na parenterální výživu (151,152). Sekvenování nové generace navíc odhalilo homozygotní a složené heterozygotní mutace v *MYO5B* u pediatrických pacientů s PFIC fenotypem s nízkou aktivitou GGT, avšak bez intestinálního onemocnění. Cholestáza se u těchto pacientů obvykle manifestuje kolem prvního roku věku. Do pátého roku žádný z pacientů neprogredoval do jaterního selhání vyžadujícího transplantační léčbu (150-152).

Celogenomové sekvenování probandů s intrahepatální cholestázou s nízkou aktivitou GGT, bez přítomnosti patogenních mutací ve výše popsáných genech zodpovědných za PFIC1-5 či *MYO5B*, recentně odhalilo bialelické patogenní mutace v genu *USP53*, kódujícím ubiquitinovou karboxy-terminální hydrolázu 53, protein s ne zcela objasněnou funkcí, avšak s prokázaným vztahem k TJP2. U všech popsáných pacientů nesoucích tyto mutace se žloutenka objevila před sedmým měsícem věku a spontánně odezněla do pátého roku věku. U jednoho z pacientů byly popsány extrahepatální příznaky v podobě poruchy sluchu (154,155).

V mikroskopickém obraze jaterní tkáně dominoval obraz neonatální obrovskobuněčné hepatitidy s hepatokanalikulární cholestázou a s perisinusoidální a periportální fibrózou, případně až s cirhotickou přestavbou. U části pacientů byly tyto změny provázeny i akutním a chronickým zánětem v portálních polích. Imunohistochemicky byla prokázána snížená exprese TJP2 a claudinu 1. V elektronmikroskopickém obraze dominovala zejména elongace těsných spojení mezi jednotlivými hepatocyty, zasahující od okraje kanalikulu hlouběji do mezibuněčného prostoru (154,155).

4.2.2 Benigní rekurentní intrahepatální cholestáza

Benigní rekurentní intrahepatální cholestáza (BRIC) je skupinou geneticky heterogenních chorob s autozomálně recesivním typem dědičnosti, charakterizovaných především

intermitentními epizodami cholestázy, většinou bez progresu do terminálního stádia jaterního onemocnění (116,118).

Jsou známy dvě geneticky definované formy tohoto onemocnění, a to BRIC1 (Summerskillův-Walshův-Tygstrupův syndrom, OMIM #243300), resp. BRIC2 (OMIM #605479), způsobené částečným deficitem *ATP8B1* (125), resp. *ABCB11* (121,156).

Onemocnění se typicky manifestuje v první a druhé dekádě života, nicméně doba prvních projevů může být významně variabilní, což platí i pro dobu trvání jednotlivých cholestatických epizod, které mohou přetrvávat několik dní až dokonce měsíců. Epizoda cholestázy může být u pacientů s BRIC iniciována například infekcí či hormonálními změnami v těhotenství. Obvyklé klinické příznaky zahrnují žloutenku, svědění kůže, slabost, nechutenství a často rovněž průjmy se známkami steatorey. Laboratorně dochází během cholestatické ataky k elevaci bilirubinu a žlučových kyselin v séru, typicky při normální aktivitě GGT, aminotransferáz a hladin cholesterolu (118,121,125).

Jaterní biopsie provedená v době ataky onemocnění většinou demonstruje morfologické známky akutní hepatokanalikulární bilirubinostázy provázené duktulární proliferací. V mezidobí je však morfologický nález v jaterní tkáni zcela v mezích normy. Expresi transportních proteinů bývá u BRIC většinou zachována a imunohistochemie má pro diagnostiku těchto poruch pouze omezený význam (125,156).

Diagnóza BRIC1 a 2 je založena na molekulárně genetickém průkazu mutace v obou alelách odpovídajícího genu. Zatímco mutace u PFIC jsou často lokalizované v konzervovaných oblastech odpovídajícího genu kódujících funkční domény proteinového produktu, mutace u BRIC mají jen omezený vliv na expresi a funkci příslušného transportéru (116,118).

BRIC byla původně popsána jako benigní neprogresivní porucha bez závažnějších strukturálních změn jaterní tkáně či trvalého poškození jaterních funkcí, nicméně v posledních letech bylo zaznamenáno několik případů začínajících jako benigní epizodická cholestáza, které postupně přešly do progresivní formy onemocnění provázené fibrózou a poruchou jaterních funkcí. BRIC a PFIC tak zřejmě reprezentují dva hraniční projevy fenotypu jednoho onemocnění (157).

Podávání kortikosteroidů, cholestyraminu či UDCA má u pacientů s BRIC v průběhu ataky jen velmi limitovaný význam. V praxi se osvědčilo zejména podání antibiotika rifampicinu, případně zavedení nasobiliární drenáže (118,158,159).

4.2.3 Familiární hypercholanémie

Familiární hypercholanémie (FHCA, OMIM #607748) je podobně jako PFIC souhrnné označení pro několik chorobných jednotek s obdobnou klinickou manifestací, lišících se svojí molekulárně genetickou podstatou. Mezi tyto jednotky se řadí zejména defekt *BAAT*, *TJP2*, *EPHX1* a *SLC27A5*. Jejich společným znakem je zejména tzv. anikterická cholestáza, charakterizovaná svědění kůže s projevy malabsorpce tuků a vitamínů rozpustných v tucích (145,160).

První typ FHCA je autosomálně recesivně dědičné onemocnění podmíněné mutací v genu *BAAT* (bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase) kódujícím protein BAAT, který katalyzuje konjugaci žlučových kyselin s aminokyselinami taurinem či glycinem (160). Klinické příznaky této poruchy mohou být variabilní a zahrnují známky malabsorpce tuků a vitamínů rozpustných v tucích, případně koagulopatii. V laboratorním nálezu dominuje zejména zvýšená sérová hladina primárních žlučových kyselin, způsobená patrně zpětnou difúzí nekonjugovaných žlučových kyselin ze žluči do plazmy přes basolaterální membránu hepatocytů (160).

Druhý typ FHCA je způsoben homozygotní mutací v genu *TJP2* kódujícím claudin 1 (viz kapitola 4.2.1.4). Jak již bylo dříve zmíněno, deficit *TJP2* v játrech zvyšuje permeabilitu mezibuněčných spojení pro žluč, což způsobuje únik žlučových kyselin do plazmy. Výsledkem je vysoká plazmatická koncentrace žlučových kyselin s pruritem na jedné straně a malabsorpcí tuků na druhé straně (145,161).

Další poruchou, která se může manifestovat pod obrazem FHCA, je mutace genu *SLC27A5* (Solute Carrier Family 27 Member 5), kódujícím proteinový produkt BACL, konvertující žlučové kyseliny na CoA-thioestery (viz kapitola 2). V plazmě postižených jedinců jsou detekovány především nekonjugované žlučové kyseliny. V mikroskopickém obraze jaterní tkáně byly popsány známky mírné neonatální obrovskobuněčné hepatitidy (162).

Mutace v promotoru genu *EPHX1* kódujícího epoxid hydrolázu byly prokázány u probanda s hypercholanémií, avšak bez průvodního ikteru či známek malabsorpce (163).

4.2.4 ARC syndrom

ARC syndrom (artrogrypóza, renální dysfunkce, cholestáza a trombocytopenie, OMIM #208085) je multisystémové autozomálně recesivní onemocnění s postižením zejména centrální nervové soustavy, kůže, jater a ledvin (164). Mezi klinické příznaky patří mnohočetné kloubní kontraktury provázené ichtyózou, žloutenkou a aminoacidurií Fanconiho typu s tubulointersticiální mineralizací. V laboratorním obraze dominuje konjugovaná hyperbilirubinémie s nízkou aktivitou GGT. V krevním obraze se nacházejí velké a funkčně

méněcenné destičky. Histologické vyšetření jaterní tkáně prokazuje zpravidla hepatokanalikulární cholestázu s příležitostnou syncyriální přeměnou části hepatocytů a s akumulací pigmentu podobného pigmentu u DJS (164). Exprese MRP2 je zachována, ale narušena je kanalikulární imunoexprese GGT s translokací enzymu do cytoplazmy a k bazolaterální membráně hepatocytů (165).

Choroba je způsobena mutacemi v genech *VPS33B* a *VIPAS39* (*VIPAR*) kódujících proteiny, které regulují intracelulární transport komponent plazmatické membrány, a to především k apikálnímu (kanalikulárnímu) pólu hepatocytu (166,167).

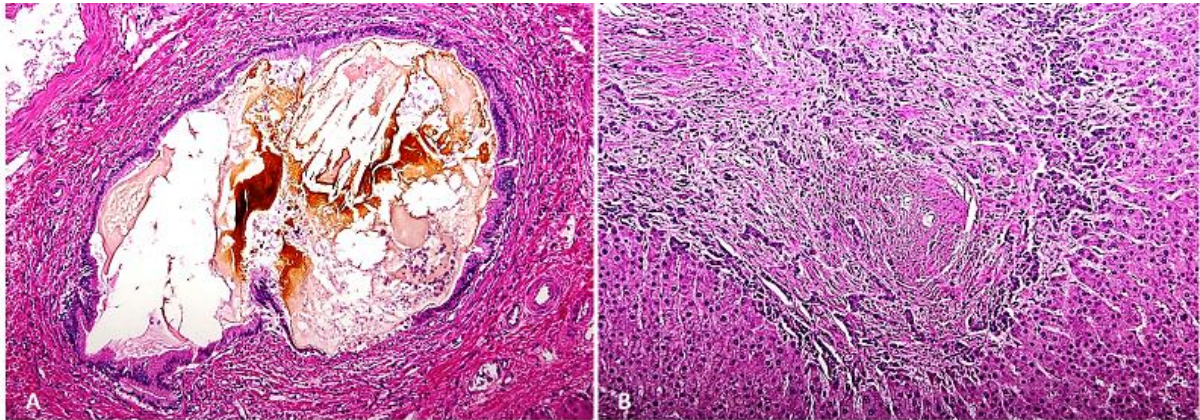
4.2.5 Geneticky podmíněné cholestázy spojené s cholangiopatií malých žlučovodů

U části geneticky podmíněných žloutenek byly kromě změn ve vlastním jaterním parenchymu rovněž popsány strukturální změny na malých žlučovodech. Jedná se zejména o výše zmíněný deficit *ABCB4*, který je v současné době považován spíše za cholangiopatii než za klasického představitele familiární intrahepatální cholestázy, a dále vzácnější jednotky, mezi něž patří některé případy neonatální sklerozující cholangitidy, cirhóza severoamerických indiánů či ILVASC syndrom. V širším pojetí lze do této kategorie zahrnout i chorobné jednotky primárně necholestatické, například deficit α 1-antitrypsinu či cystickou fibrózu, které mohou být rovněž příležitostně provázeny změnami žlučovodů a cholestázou s elevací GGT. Konečně je třeba zmínit geneticky podmíněné cholestázy s primárně biliární komponentou, jejichž typickým představitelem je Alagillův syndrom.

Jak již bylo zmíněno v předchozím textu, hlavním patogenetickým mechanismem u deficitu *ABCB4* není vlastní retence žlučových solí, ale přímé působení „toxické“ žluči s detergentními účinky na výstelku žlučových cest (41,60,117). V animálním experimentu vyvinuly *Abcb4* deficitní myši nehnisavou cholangitidu a obdobné změny byly popsány rovněž u některých lidských jedinců s patogenními mutacemi v *ABCB4* (168,169).

Morfologické spektrum biliárních lézí asociovaných s deficitem *ABCB4* je poměrně široké (136,137,139,169). U pacientů se syndromem GBD1/LPAC dochází k segmentální dilataci nitrojaterních žlučovodů s akumulací inspisované žluči, s tvorbou cholesterolových krystalů a konkrementů (obr. 11A) (137,170). U některých pacientů s mutacemi v *ABCB4* byly popsány fibroobliterativní změny malých žlučovodů připomínající primární sklerozující cholangitidu (PSC; obr. 11B) (137). U části pacientů s pokročilou biliární fibrózou či cirhózou na pozadí deficitu *ABCB4* byly rovněž popsány změny odpovídající syndromu mizejících žlučovodů (vanishing bile duct syndrome) s duktopenií (169,171).

Dosud nevyřešenou zůstává otázka, zdali porucha ABCB4/MDR3 hraje významnější roli u pacientů se skutečnou PSC.



Obr. 11: Biliární léze u deficitu MDR3/ABCB4. (A) Akumulace krystalů cholesterolu v lumen žlučovodu (HE, původní zvětšení 200x); (B) Jizevnatý zánik portálního žlučovodu provázený periportální duktulární proliferací (HE, původní zvětšení 100x)

Cirhóza severoamerických indiánů (NAIC, North American Indian childhood cirrhosis, OMIM#604901) je vzácné autosomálně recesivní cholestatické onemocnění s projevy v novorozeneckém věku (172). Onemocnění je na mikroskopické úrovni charakterizované především změnami odpovídajícími neonatální obrovskobuněčné hepatitidě s rozvojem fibrózy a následně cirhózy, způsobené mutací v genu *CIRH1A* na chromozomu 16q22, kódujícím nukleolární protein cirhin. Tato jednotka pravděpodobně představuje lidský model cholestázy indukované dysfunkcí mikrofilament (172,173).

ILVASC (ichthyóza, leukocytární vakuoly, alopecie a sklerozující cholangitida, OMIM #607626) se projevuje v prvních týdnech života jako cholestáza variabilní intenzity provázená zvýšenou aktivitou GGT, způsobená mutací v genu *CLDN1* kódujícím protein těsných spojení claudin 1 (174,175). U postižených jedinců jsou nápadné extrahepatální příznaky, zejména ichthyóza, jizvící alopecie a dále poruchy dentice (174). Předpokládá se, že defekt claudinu 1 má za následek ztrátu buněčné polaridy postihující rovněž hepatocyty a cholangiocyty, s následným mezibuněčným únikem žluči (viz kapitola 4.2.1.4) (176).

Mikroskopické vyšetření jaterní tkáně může být značně variabilní a zahrnuje obrazy připomínající Alagillův syndrom či biliární atrezii s progresí do biliární cirhózy. Cholangiogram typicky zobrazí průchodné extrahepatální žlučovody, které jsou však, stejně jako intrahepatální žlučový strom, tenké, s nepravidelnými konturami (174-176).

Jako neonatální sklerozující cholangitida (NSC, OMIM#605755) se označuje patrně geneticky heterogenní skupina onemocnění charakterizovaných těžkou formou cholangiopatie

s progresí do jaterního selhání vyžadujícího transplantaci. Onemocnění se obvykle manifestuje v prvních týdnech života žloutenkou, hepatosplenomegalií, světlými stolicemi, koagulopatií se známkami krvácení do zažívacího traktu a vysokými sérovými hladinami GGT. Perkutánní cholangiografie prokazuje nitrojaterní cholangiopatii (177,178).

Nedávno identifikovaným genem, jehož mutace může vyvolat obraz NSC je *DCDC2* (doublecortin domain containing 2) na chromozomu 6p22, kódující protein DCDC2 (doublecortin domain-containing protein 2), který je součástí mikrotubulárních struktur vázajících tubulin a usnadňujících jeho polymerizaci (177,178).

V histologickém obraze defektu *DCDC2* dominují známky cholangiopatie malých nitrojaterních žlučovodů s ložiskovou koncentrickou lamelární periduktální fibrózou a s destrukcí malých žlučovodů. Imunohistochemické vyšetření může potvrdit nepřítomnost proteinu DCDC2 a rovněž chybění proteinu primárních cilií ACALT (acetylovaný α -tubulin), a to zejména v septálních a perihilárních žlučovodech, s fokální nepravidelnou expresí v malých interlobulárních žlučovodech. Elektronová mikroskopie prokazuje nepřítomnost cholangiocelulárních primárních cilií (178). U části pacientů s deficitem *DCDC2* byly rovněž popsány prosté cysty jater, ale bez jednoznačné manifestace hepatorenální ciliopatie (178).

Deficit alfa-1 antitrypsinu (A1AT, OMIM#613490) je autozomálně recesivní onemocnění způsobené patogenními mutacemi v genu *SERPINA 1* na chromozomu 14 (179,180). Kromě emfyzému se onemocnění může manifestovat cholestatickou jaterní poruchou, která může progredovat až do terminálního stádia s cirhózou a jaterním selháním (181,182). Pacienti s chronickou hepatopatií na pozadí deficitu A1AT mají rovněž zvýšené riziko výskytu hepatocelulárního karcinomu (183).

V mikroskopickém obraze jaterní tkáně je u cca 10 % postižených dětských pacientů přítomna hypoplazie malých žlučovodů se známkami chronické cholestázy a stázy cholátů, provázené periportální akumulací mědi a metaloproteinu (181,182). Mikroskopickou diagnostiku deficitu A1AT může komplikovat skutečnost, že v časných stádiích jaterního onemocnění mohou být obtížně identifikovatelné PAS pozitivní eozinofilní globulární inkluze odpovídající depozitům abnormálního A1AT v ER periportálních hepatocytů (184).

Cystická fibróza (CF, mukoviscidóza, OMIM#219700) je multisystémové onemocnění způsobené homozygotní či složenou heterozygotní mutací v genu *CFTR* (cystic fibrosis conductance regulator gene) na chromozomu 7q31.2, projevující se chronickou plicní lézí, insuficiencí zevně sekrečních funkcí pankreatu a rovněž vysokou koncentrací Na^+ a Cl^- v potu postižených jedinců (185). K těmto příznakům se mohou vzácněji přidružit i různé závažné hepatobiliární komplikace s cholestázou obstrukčního typu, způsobené především obliterací

žlučových cest s litogenním potenciálem, s následným rozvojem fibrózy až cirhózy s biliárními rysy (186,187).

Alagillův syndrom je autosomálně dominantní multisystémová porucha provázená těžkou cholestázou při vrozené chybné diferenciaci intrahepatálních žlučových cest (188). Ve většině případů je syndrom podmíněn mutacemi v genu *JAG1* kódujícím mezibuněčný signální protein JAGGED 1 (Alagillův syndrom 1. typu, OMIM#118450) (188,189), podstatně vzácnější jsou mutace v genu *NOTCH2* podmiňující Alagillův syndrom 2. typu (OMIM#610205) (190).

Mezi obvyklé projevy syndromu patří redukce intrahepatálních žlučových cest s obstrukční cholestázou, v kombinaci s dalšími diagnostickými znaky, zejména abnormalitami skeletu (motýlovitý obratel), vrozenou srdeční vadou (obvykle periferní stenóza plicnice), postižením oka a charakteristickým vzhledem obličeje (188).

4.2.6. Primární poruchy syntézy žlučových kyselin

Syntéza žlučových kyselin z cholesterolu je komplexní víceúrovňový proces odehrávající se především v cytoplazmě buněk, v mitochondriích i v peroxisomech (1,6,7). Primárních i sekundárních poruch syntézy žlučových kyselin je známa celá řada a zde uváděný výčet (viz tabulka 3) není ani zdaleka vyčerpávající.

V mnoha případech se porucha syntézy žlučových kyselin projevuje jako intrahepatální cholestáza s konjugovanou hyperbilirubinémií a s nízkou aktivitou GGT, bez pruritu či nápadnějšího zvýšení hladiny žlučových kyselin v séru (191,192). V mikroskopickém obraze mohou dominovat známky obrovskobuněčné neonatální hepatitidy s fibroprodukcí. Při projevech v pozdějším věku se může porucha manifestovat pod obrazem malabsorpce, s morfologií nezánetlivé cholestázy bez dalších patognomonických rysů. Expres transportních proteinů bývá většinou zachována. U některých pacientů může docházet k narušení kanalikulárních těsných spojení. Žluč bývá zpravidla amorfni a denzní (191,192).

V diferenciální diagnostice je důležité zejména odlišení primární a sekundární poruchy syntézy žlučových kyselin, která může druhotně nastat v důsledku těžkého jaterního onemocnění. Nejčastěji se jedná o získaný defekt $\Delta(4)$ -3-oxysteroid 5 β -reduktázy (191).

Deficit 3 β -hydroxy- Δ 5-C27-steroid dehydrogenázy/izomerázy (OMIM#607765) je nejčastěji se vyskytující primární porucha syntézy žlučových kyselin, postihující druhý krok v procesu syntézy žlučových kyselin. Enzym kódovaný genem *HSB3D7* (3 β -hydroxy- Δ 5-C27-steroid oxidoreduktáza) na chromozomu 16p katalyzuje přeměnu 7 α -hydroxycholesterolu na 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-on (viz kapitola 2) (193).

Klinický i histologický nálezn je u tohoto syndromu značně variabilní a závisí ve značné míře na době manifestace prvních příznaků. V novorozeneckém věku dominuje cholestáza s nepřítomností primárních žlučových kyselin v séru a v moči, spolu se zvýšením sérových hladin 7 α -hydroxycholesterolu. V mikroskopickém obraze jsou popisovány známky neonatální obrovskobuněčné hepatitidy. V pozdějším věku se ke žloutence, typicky bez průvodního svědění kůže, mohou přidat příznaky malabsorpce, zejména steatorea, a dále hepatosplenomegalie. Enzymatický defekt byl rovněž popsán v dospělém věku, kdy se manifestoval jako cirhóza nejasné etiologie (194).

Tabulka 3: **Klinicky nejzávažnější poruchy syntézy žlučových kyselin**

Primární klinicko-patologický znak	Gen	Proteinový produkt	Chorobná jednotka
Obrovskobuněčná hepatitida	<i>AKR1D1</i>	AKR1D1	Deficit $\Delta(4)$ -3-oxysteroid 5 β -reduktázy
	<i>HSD3B7</i>	HSD3B7	deficit 3 β -hydroxy- Δ 5-C27-steroid oxidoreduktázy, dehydrogenázy či izomerázy
	<i>CYP7B1</i>	CYP7B1	deficit oxysterol 7 α -hydroxylázy
	<i>AMACR</i>	AMACR	deficit α -methylacyl-CoA racemázy
Dysmorfismus, neprospívání	<i>DHCR7</i>	DHCR7	Smith-Lemli-Opitzův syndrom
Průjem, katarakta, xantomy, mentální retardace	<i>CYP27A1</i>	CYP27A1	cerebrotendinózní xantomatóza
Akutní jaterní selhání	neznámý	neznámý	neonatální hemochromatóza, perinatální akutní selhání jater

Enzym Δ 4–3-oxysteroid-5 β -reduktáza, kódovaný genem *AKR1D1* (aldo-keto reductase Family 1 Member D1, syn. *SRD5B1*) na chromozomu 7q33, se vyskytuje pouze v játrech a uplatňuje se při saturaci sterolového kruhu během syntézy žlučových kyselin cholové a chenodeoxycholové (192,195). Deficit tohoto enzymu (OMIM#235555) způsobený homozygotní či složenou heterozygotní mutací *AKR1D1* se projevuje většinou časně po narození jako intrahepatální cholestáza, někdy provázená steatoreou a koagulopatií (195,196). K diagnóze přispívá kromě molekulárně genetického vyšetření *AKR1D1* rovněž rozbor moči, který prokáže nepřítomnost kyseliny cholové a chenodeoxycholové. Stejně jako u celé řady dalších primárních poruch syntézy žlučových kyselin, bývá i u tohoto deficitu nejčastějším morfologickým nálezem v jaterní tkáni neonatální hepatitida se syncyriální (obrovskobuněčnou) přeměnou hepatocytů, často se známkami extramedulární hematopoézy (195).

U pacientů s deficitem $\Delta 4-3$ -oxysteroid- 5β -reduktázy, u nichž nebyla prokázána mutace v korespondujícím genu, se předpokládá, že byl enzym sekundárně poškozen v průběhu jiného primárního jaterního onemocnění (191,197).

Oxysterol 7α -hydroxyláza je třetím enzymem v tzv. kyselé (alternativní) cestě tvorby žlučových kyselin vedoucí k tvorbě kyseliny chenodeoxycholové (192). Patogenní mutace v genu *CYP7B1* (cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1) s deficitem tohoto enzymu (OMIM#613812) může mít za následek rychle progredující jaterní poškození manifestující se časně po narození hepatosplenomegalií se žloutenkou a známkami malabsorpce (198,199). V séru pacientů bývá významně zvýšen 27-hydroxycholesterol. Na mikroskopické úrovni dominují zejména známky obrovskobuněčné hepatitidy s hepatokanalikulární a duktulární cholestázou a s periportální duktulární proliferací, často již ve stadiu pokročilé fibrózy či cirhotické přestavby (198).

Cerebrotendinózní xantomatóza (OMIM#213700) je vzácné autozomálně recesivní onemocnění způsobené deficitem enzymu sterol-27-hydroxylázy (*CYP27A1*, gen *CYP27A1*) na vnitřním listu mitochondriální membrány (200-202). Onemocnění se může manifestovat chronickým průjmem, kataraktou, tuberózními xantomy, zejména v oblasti Achillovy šlachy, a dále různým stupněm mentální retardace. Mezi neurologické příznaky projevující se zejména ve druhém a třetím decenniu patří ataxie a spasticita končetin, míšní paréza, periferní neuropatie a progredující demence. Postižení jedinci zpravidla umírají v důsledku neurologického poškození ve čtvrté až šesté dekádě (200).

V séru pacientů jsou nacházeny vysoké koncentrace cholestanolu, 5α -dihydroderivátu cholesterolu, který se spolu s cholesterolem hromadí ve tkáních. Ke správné diagnóze vede vyšetření moči s průkazem zvýšených hladin žlučového alkoholu po podání cholestyraminu (200-202). Mikroskopické vyšetření jaterní tkáně může u části postižených jedinců odhalit intracelulární depozita tvořená buď amorfním pigmentem či krystalickými inkluzemi, které pravděpodobně představují hromadící se nemetabolizovaný žlučový alkohol. Spolu s těmito nálezy byla v jaterní tkáni popsána pericelulární fibróza, steatóza a dále změny žlučových kanálků detekovatelné elektronmikroskopicky (dilatace kanálků, zmnožení mikrofilament a ztráta mikroklků) (202,203).

5. Hereditární predispozice u získaných cholestatických stavů

Významným přínosem výzkumu hepatobiliárních a intestinálních přenašečových systémů a jejich regulačních mechanismů bylo odhalení genetické predispozice k celé řadě primárně získaných chorob či chorobných stavů provázených cholestázou. Spouštěcím faktorem u těchto geneticky determinovaných jedinců může být podání určitého léku, dlouhodobá parenterální výživa, případně hormonální vlivy. Genetická predispozice může rovněž přispět k časnější manifestaci a rychlejší progresi získané choroby. Studie na velkém vzorku populace rovněž odhalily významnou souvislost mezi variantami některých genů kódujících transportéry žlučových kyselin a zvýšeným výskytem nádorových onemocnění jater a žlučových cest (204-206).

5.1 Cholelitiáza

Žlučové kameny (cholelitiáza) představují v současné době jedno z nejčastějších onemocnění žlučových cest, a to zejména u osob středního věku. Kromě exogenních rizikových faktorů je známa genetická predispozice k tvorbě žlučových kamenů, především cholesterolových. Nejvýznamnějšími kandidátními geny, jejichž variantní mutace zvyšují riziko vzniku a progresu cholelithiázy, jsou *ABCB4* a *ABCG5/8* (204,207,208).

Velká populační studie na Islandské populaci odhalila statisticky významnou souvislost mezi časně se manifestující cholelitiázou a dvěma variantami v *ABCB4*: p.G622E a p.L445GfsX22 (204). Jak již bylo zmíněno v předchozím textu, pacienti s mutacemi v *ABCB4* mohou kromě PFIC3 vyvinout mírnější fenotyp, projevující se mimo jiné jako tzv. gallbladder disease 1 (GBD1, OMIM #600803), rovněž známý jako syndrom cholelitiázy asociované s nízkými fosfolipidy (low phospholipid-associated cholelithiasis syndrome, LPAC) (137,170). GBD1 se obvykle projevuje jako symptomatická cholelitiáza s prvními příznaky před 40. rokem věku. Biliární obtíže často rekurují po cholecystektomii. Hepatokolitiáza a cholelitiáza se často vyskytuje i v rodinné anamnéze u příbuzných probanda prvního stupně (170). Při ultrazvukovém vyšetření je pro GBD1 typická přítomnost hepatokolitiázy či nitrojaterních hyperechogenních fokusů s jedním či více vřetenitými dilatacemi intrahepatálních žlučovodů (137,170). Mikroskopický a chemický rozbor žluči prokáže přítomnost agregátů cholesterolových krystalů či mikrolitiázy, spolu se sníženými hladinami žlučových fosfolipidů (170). Diagnóza GBD1 by měla být potvrzena molekulárně genetickým vyšetřením genu *ABCB4*.

Většina pacientů s GBD1 profituje z dlouhodobého užívání UDCA. Symptomatická litiáza s omezenou odpovědí na UDCA však vyžaduje invazivní metody řešení, a to jednak endoskopické (ERCP, biliární drenáž), tak chirurgické (cholecystektomie, resekce jater a v krajním případě i transplantace jater) (3,170).

Kromě mutací v *ABCB4* je znám rovněž vztah mezi cholelitiázou a transportérem cholesterolu *ABCG5/8*. Mutace v *ABCG8* (rs11887534) vede k záměně guaninu za cytosin na pozici 55 (c.55>C) s následnou substituční záměnou kyseliny asparagové za histidin (p.D19H). Vzniklý heterodimer má v kanalikulární membráně hepatocytů vyšší transportní potenciál pro přenos cholesterolu do žluči (207,208).

Recentní celogenomové asociační studie identifikovaly další genové lokusy asociované se žlučovými kameny, a to *HNF4A*, *FUT2*, *SERPINA1*, *JMJD1C*, *AC074212.3*, *ALC10A2*, *CYP7A1*, *SULT2A1*, *TM4SF4* a *TTC39B* (204-206).

Naproti tomu, data z populačních studií dokládají, že běžná varianta rs738409 (p.I148M) genu *PNPLA3* (patatin like phospholipase domain containing 3) predisponující k jaterní steatóze má inverzní vztah ke tvorbě žlučových kamenů (206,208).

5.2 Intrahepatální těhotenská cholestáza

Intrahepatální těhotenská cholestáza (ITC, OMIM #147480) se projevuje úporným svěděním kůže, zejména dlaní a plosek, spolu s elevací žlučových kyselin a sérové aktivity aminotransferáz, a to zejména ve třetím trimestru těhotenství. Po skončení těhotenství se jaterní funkce zpravidla rychle vrací k normálnímu stavu (209,210). Incidence ITC kolísá v závislosti na etniku a geografických vlivech a rovněž byly popsány sezónní variace s vyšším výskytem v zimních měsících. Známý je také častější výskyt ITC u mnohočetných těhotenství a po umělém oplodnění (209).

ITC může být spojena s vyšším rizikem metabolických abnormalit u těhotných žen, zejména dyslipidémie, poruchy glukózové tolerance, gestačního diabetu či preklampsie (210,211). ITC navíc představuje významné riziko pro plod. V souvislosti s ITC byl popsán předčasný porod, nitroděložní asfyxie či dokonce intrauterinní úmrtí plodu (210,211).

Přestože se biochemické parametry normalizují zpravidla do 8. týdne po ukončení těhotenství, je doporučována další kontrola postižených žen, a to vzhledem k vyššímu riziku recidivy ITC v průběhu následujícího těhotenství a k riziku rozvoje jaterní fibrózy či cirhózy, nealkoholické pankreatitidy a žlučových kamenů (209-211). Téměř třetina žen s ITC v anamnéze rovněž udává svědění kůže při užívání hormonální antikoncepce a ve druhé polovině menstruačního cyklu (210).

U postižených žen jsou často prokázány mutace v *ABCB4*, *ABCB11* a *ATP8B1*, a rovněž *NR1H4*, pravděpodobně mechanismem downregulace exprese BSEP (149,212-214).

Nejrůznější heterozygotní *missense* mutace *ABCB4* byly identifikovány až u 10 % žen s ITC, zpravidla provázené vyšší aktivitou GGT (212,214).

U postižených žen byl rovněž poměrně často identifikován polymorfismus c.1331T>C (p.V444A) v exonu 13 genu *ABCB11* (214). Koncentrace hormonů v průběhu třetího trimestru gravidity navíc dosahují hodnot, při kterých jsou samy schopny snižovat aktivitu kanalikulárního transportéru BSEP (214).

Heterozygotní mutace byly vzácně nalezeny i v genu *ATP8B1* a dále nově i v *NR1H4*. Čtyři heterozygotní varianty FXR byly identifikovány u části žen s ITC, a to c.-1G>T, p.M1V, p.W80R a p.M173T110. První z variant, c.-1G>T, se manifestuje typicky v případě, je-li současně přítomna mutace v *ABCB11* (V444A), případně v *ABCB4* (p.S320F) (213,214).

Nedávno byly popsány rovněž případy ITC u žen s mutacemi v *TJP2*, a to c.185C>T a c.1877C>G (214).

Terapeuticky se u ITC osvědčil cholestyramin, dexametason, rifampicin a zejména UDCA, která může zlepšit klinické projevy, zejména pruritus, a rovněž redukuje riziko předčasného porodu. Těhotným ženám s ITC se doporučuje užívat UDCA i v průběhu následujícího těhotenství (215-217).

5.3 Léky indukovaná cholestáza

Játra jsou jedním z klíčových orgánů pro transport a metabolickou degradaci xenobiotik. Zásadním momentem při vylučování lipofilních léků a jejich metabolitů játry je jejich exkrece do žluči zprostředkovaná celou řadou hepatobiliárních přenašečových systémů. Funkční i strukturální poškození těchto systémů způsobené buď genetickou poruchou či ovlivněním samotným xenobiotikem, případně jeho metabolity, se manifestuje bohatým klinickým obrazem zahrnujícím jak akutní, tak chronické stavy, které lze podle převažujících biochemických nálezů dělit na hepatocelulární, cholestatické a smíšeného typu (218).

Přehled některých klinicky významných hepatobiliárních transportérů bilirubinu a žlučových kyselin s jejich exogenními lékovými substráty uvádí tabulka 4.

Z bazolaterálních (sinusoidálních) vychytávacích systémů hrají významnou roli OATP transportéry s překrývající se substrátovou specificitou, a to zejména OATP1B1, OATP1B3 a OATP2B1 (86,218). Jednou z nejvýznamnějších skupin léků přenášených těmito transportéry jsou statiny, zejména inhibitory HMG-CoA reduktázy. Inhibice vychytávání statinů v důsledku mutace či funkční inhibice OATP jiným xenobiotikem, jako jsou například inhibitory tyrosin

kinázy či rifampicin, může vést ke zvýšení koncentrace léku v krvi s následnými závažnými nežádoucími účinky, mezi něž patří tzv. statinová myopatie (219,220). Kromě statinů se OATP transportéry podílejí na přenosu metotrexátu, některých antagonistů receptoru pro angiotensin II a antagonistů angiotensin konvertujícího enzymu (86,218).

Kromě OATP jsou na sinusoidální membráně hepatocytů zastoupeny i představitelé transportérů organických aniontů, např. OAT2 (gen *SLC22A7*), který se podílí na vychytávání celé řady xenobiotik, např. entecaviru či tolbutamidu, či OAT7 (gen *SLC22A9*), jehož exogenním substrátem je pravastatin (219,221).

Mezi transportéry organických kationtů (OCT) exprimované v játrech patří OCT1 (gen *SLC22A1*), podílející se na přenosu antidiabetika metforminu. Tento přenos může být narušen jinými antidiabetiky, a to především rosiglitazonem a repaglinidem (218,222).

Tabulka 4: Přehled některých klinicky významných hepatobiliárních transportérů a jejich lékových substrátů

Rodina	Protein	Gen	Lokalizace v hepatocytu	Lékový substrát
SLC	OATP1B1	<i>SLCO1B1</i>	sinusoidální	statiny, rifampicin, octreotid, inhibitory tyrosin kinázy
	OATP1B3	<i>SLCO1B3</i>	sinusoidální	
	OATP2B1	<i>SLCO2B1</i>	sinusoidální	
	OAT2	<i>SLC22A7</i>	sinusoidální	entecavir, tolbutamid
	OAT7	<i>SLC22A9</i>	sinusoidální	pravastatin
	OCT1	<i>SLC22A1</i>	sinusoidální	metformin, rosiglitazon, repaglinid
ABC	MRP3	<i>ABCC3</i>	sinusoidální	vinca alkaloidy, metotrexát, alkylační činidla, analogy nukleotidu a nukleosidu
	MRP4	<i>ABCC4</i>	sinusoidální	steroidní hormony, cyklické nukleotidy
	BSEP	<i>ABCB11</i>	kanalikulární	cyklosporin, bosentan, glibenclamid, rifampicin, troglitazon
	MRP2	<i>ABCC2</i>	kanalikulární	etopozid, ezetimib, metotrexát, acetaminofen-glukuronid, estrogeny
	BCRP	<i>ABCG2</i>	kanalikulární	irinotekan, topotecan, doxorubicin, sunitinib
	MDR1	<i>ABCB11</i>	kanalikulární	ritonavir (?), verapamil
	MDR3	<i>ABCB4</i>	kanalikulární	itraconazol, posaconazol, ketoconazol

Bazolaterální sekreční (efluxní) transportéry MRP3 a MRP4 zajišťují přenos mnoha endogenních organických aniontů i xenobiotik. Na rozdíl od jiných MRP transportérů, MRP3 nezajišťuje přenos glutathionu a jeho konjugátů, ale zejména sloučenin s glukuronidy (30,34,218). Kromě toho se MRP3 podílí i na transportu metotrexátu a v animálním

experimentu rovněž na přenosu sloučenin acetaminofenu a glukuronidů morfia z hepatocytů do krevního oběhu (218).

MRP4 se také podílí na transportu celé řady substrátů, mezi něž patří steroidní hormony či cyklické nukleotidy, z jater do sinusoidální krve (34,223).

Kanalikulární (apikální) sekreční systémy rovněž významně ovlivňují transport a metabolismus xenobiotik.

Léky a jejich metabolity mohou působit jako kompetitivní inhibitory funkce BSEP, jak je tomu například u cyklosporinu A, rifampicinu, rifamycinu, erytromycinu, glibenclamidu, bosentanu, troglitazon-sulfátu a u celé řady dalších přípravků (218,224,225). U pacientů s léky indukovanou cholestázou, podobně jako s ITC, byl popsán častější výskyt varianty V444A (218,226). Na dávce závislá inhibice BSEP má za následek sníženou sekreci solí žlučových kyselin a jejich následnou retenci v hepatocytech (218).

MRP2 je kanikulární transportér pro celou řadu endogenních i exogenních substrátů, mezi které patří metotrexát, acetaminofen-glukuronid, vinca alkaloidy, ezetimib či etopozid (81,82,218). Při transportu zprostředkovaném MRP2 hraje významnou roli GSH. Řada metabolitů je vylučována jako sloučeniny s GSH, případně je jejich přenos závislý či stimulovaný přítomností GSH v transportním místě (227).

Breast cancer resistance protein (BRCP, gen *ABCG2*) vykazuje širokou substrátovou specifitu, a kromě kanikulární membrány hepatocytů je exprimován v mnoha tkáních a orgánech, mimo jiné ve střevě a v ledvinách. BRCP je zodpovědný za eliminaci SN-38, metabolitu irinotekanu, topotecanu, inhibitoru tyrosinkinázy sunitinibu či doxorubicinu (218,228).

MDR1 čili P glykoprotein je patrně nejvýznamnější transportér xenobiotik exprimovaný prakticky ve všech orgánech s bariérovou funkcí, zejména ve střevních enterocytech a v endoteliích krevních cév formujících hematoencefalickou bariéru (229). MDR1 je zodpovědný za eliminaci celé řady léků s překrývající se substrátovou specificitou s ostatními transportéry, zejména MRP.

Celá řada substrátů přenášených MDR1 je rovněž substrátem pro cytochrom P450 (*CYP3A4*, cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4) (218,229).

Mutace v *ABCB4* mohou vést rovněž ke klinicky závažné léky indukované cholestáze. Na rozdíl od MDR1 nemá MDR3 patrně žádný lék jako přímý substrát, avšak antimykotika jako posaconazol, itraconazol, či ketokonazol, orální kontraceptiva a některé statiny mohou účinkovat jako inhibitory funkce MDR3 s následným snížením vylučování fosfolipidů do žluči,

což má za následek poruchu tvorby smíšených micel (230,231). To ve svém důsledku může vést k projevům cholestázy, případně k syndromu mizejících žlučovýchodů a k duktopenii (230).

Léky indukované poškození jater může být rovněž následkem mutací ve FXR, transkripčním aktivátoru MDR3 i BSEP (218,232,233).

5.4 Transientní neonatální cholestáza

Transientní neonatální cholestáza (TNC) je vzácná forma spontánně se upravující novorozenecké cholestázy, pravděpodobně související s nezralostí hepatobiliárních mechanismů zodpovědných za sekreci žluči, s perinatálním stresem a poruchami provázenými ischemií a hypoxií jaterní tkáně (234). Za významný rizikový faktor se rovněž považuje podávání parenterální výživy, zejména po dobu delší jednoho týdne, a chirurgický výkon v břišní dutině či hrudníku časně po narození (235). Až u 10 % případů TNC však není příčina zřejmá a předpokládá se genetický defekt v hepatobiliárních transportních systémech, mimo jiné mutace v genech *ATP8B1*, *ABCB11* a *ABCB4* (235,236).

V mikroskopickém obraze jaterní tkáně u postižených novorozenců zpravidla dominují známky obrovskobuněčné hepatitidy s ostrůvky extramedulární hemopoézy a s fibrózou mírného až středního stupně (234).

Terapie TNC je především podpůrná a spočívá v suplementaci vitamínů rozpustných v tucích. Laboratorní parametry cholestázy rovněž upravuje podávání UDCA (234).

5.5 Cholestáza a parenterální výživa

Jaterní choroba asociovaná s parenterální výživou (PNALD, parenteral nutrition-associated liver disease, rovněž uváděná jako IFALD, intestinal failure-associated liver disease) je charakterizována progredující cholestázou se vzestupem přímého bilirubinu v séru v souvislosti s protražovaným podáváním parenterální výživy (více než 2 týdny), byl-li vyloučen jiný důvod cholestatické poruchy (237,238). PNALD představuje závažný problém zejména u nezralých novorozenců v souvislosti se syndromem krátkého střeva, nicméně některé známky PNALD se mohou rovněž projevit až u 40 % dospělých pacientů dlouhodobě přijímajících výživu parenterální cestou (238).

Klinicky se PNALD manifestuje zejména pod obrazem steatózy a cholestázy, nezřídka s přítomností cholecystolitiázy či žlučového bláta (sludge). Jaterní fibróza s poškozením jaterních funkcí může progredovat až do terminálního stádia se selháním jater (237,238).

Etiologie PNALD je patrně multifaktoriální a hlavní rizikové faktory zahrnují zejména nezralost hepatobiliárních a intestinálních transportních systémů, systémové infekce, rozsáhlé resekce střev či dlouhodobou absenci klasické enterální výživy (238).

Nedávné studie ukázaly, že za rozvoj PNALD mohou být alespoň u části nezralých novorozenců zodpovědné mutace v *ABCB4*, a to zejména c.504 C>T a c.485 T>A v exonu 6, stejně jako mutace c.2793 v exonu 23, způsobující posun čtecího rámce (239,240).

5.6 Biliární fibróza a cirhóza

Řada studií poukazuje na možnou souvislost mezi mutacemi genů kódujících hepatobiliární transportéry a kryptogenní biliární fibrózou či cirhózou, zejména v dospělé populaci (136,204,241).

Populační studie GWAS, stejně jako výsledky několika elastografických studií odhalily modulační efekt běžně se vyskytující varianty *ABCB4* p.T175A na tuhost jater u celé řady chronických jaterních onemocnění (204,242).

Včasně profylaktické nasazení UDCA může alespoň u části těchto pacientů zpomalit progresi fibrózy a zabránit či oddálit možné závažné komplikace (136).

5.7 Hepatobiliární transportní systémy a ztukovatění jater

V posledních desetiletích se podařilo alespoň částečně objasnit široké biologické funkce žlučových kyselin v organismu. Ukazuje se, že žlučové kyseliny neslouží jen jako detergenty důležité pro trávení a vstřebávání celé řady životně důležitých složek potravy, ale plní rovněž významné funkce signální a hormonální, a to zejména v metabolismu sacharidů a tuků, kde se mohou podílet na kontrole jaterní lipogeneze *de novo*, transportu lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL) a na plazmatickém obratu triglyceridů (1). FXR aktivovaný žlučovými kyselinami se rovněž podílí na regulaci jaterní glukoneogeneze, syntézy glykogenu a citlivosti na inzulín (148).

Hepatobiliární transportéry determinující jaterní koncentrace a sekreci žlučových kyselin mohou sehrát významnou úlohu v patogeneze nealkoholického ztukovatění jater (NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease) (243,244). V animálním experimentu myši s deficitem FXR a s nízkou expresí BSEP spontánně vyvinuly jaterní steatózu s hypertriglyceridemií a s inzulínovou rezistencí (245).

Nedávné studie odhalily pozitivní efekt některých variant *ABCB11* na hladiny TAG a cholesterolu u lidí (206). V animálním pokusu byl rovněž prokázán příznivý efekt stimulace FXR a TGR5 na rozvoj inzulínové rezistence a jaterní steatózy (243). FXR agonista INT747

zlepšuje citlivost na inzulín a jaterní funkce u lidí, zatímco jiný FXR agonista (WAY-362450) zmírňuje jaterní zánět a zpomaluje rozvoj fibrózy v myším modelu ztukovatění jater (246,247). INT777, aktivátor TGR5, redukuje jaterní steatózu u myši indukovanou vysokým příjmem tuku (248). Výsledky těchto studií dokládají potenciál pro využití aktivátorů FXR a TGR5 v terapii NAFLD (244,246-8).

5.8 Nádorová onemocnění u geneticky podmíněných cholestáz

Žlučové kyseliny jsou zapojeny do komplexních procesů jaterní regenerace a spolu se zánětlivými stimuly mohou rovněž hrát významnou roli v procesu kancerogeneze (1). Případové studie i data z velkých populačních studií poukazují na zvýšené riziko vzniku primárních hepatobiliárních malignit asociovaných s mutacemi genů kódujících některé transportéry bilirubinu a žlučových kyselin, a to zejména hepatocelulárního karcinomu (HCC), cholangiocelulárního karcinomu (CCC) a karcinomu žlučníku, vzácněji karcinomu slinivky břišní a jiných nádorů zažívacího traktu (204,205). Jedná se o maligní nádorová onemocnění s typickou manifestací v dospělém věku. V dětské populaci se s těmito malignitami naopak setkáváme zřídka, a to zpravidla vždy na pozadí geneticky podmíněné poruchy.

Cca 15 % pacientů s deficitem BSEP může vyvinou HCC či CCC, a rovněž se udává zvýšené riziko výskytu adenokarcinomu pankreatu (128,129,249).

Populační studie odhalily souvislost mezi zvýšeným výskytem HCC, CCC a karcinomu žlučníku na pozadí deficitu *ABCB4*. Nejčastější varianty asociované s těmito malignitami byly p.Gly622Glu, p.Leu445GlyfsX22, p.Asn510Ser a c.711A>T (204,205).

Poměrně nedávno byly popsány případy výskytu HCC u pacientů s mutacemi v *TJP2*, v terénu pokročilého jaterního onemocnění (PFIC4) (144).

Karcinom žaludku a kolorektální karcinom byly rovněž popsány u pacientů s defektem *MYO5B* (250,251).

Přesný mechanismus karcinogeneze v terénu geneticky podmíněných cholestáz není plně objasněn, nicméně se alespoň v některých případech předpokládá mutagenní role zvýšených intracelulárních koncentrací žlučových kyselin. Nekroinflamatorní změny v jaterní tkáni indukované solemi žlučových kyselin u *Mdr2* deficitních myši měly za následek rozvoj dysplastických změn hepatocytů a v 16. měsíci věku vznik HCC prakticky u 100 % pokusných zvířat (168,252,253). Lze předpokládat, že analogicky i v humánní populaci predisponuje inaktivní MDR3 k hepatobiliárnímu poškození zprostředkovanému žlučovými kyselinami, spojenému se zánětem, cholestázou a následnou fibrózou. To má za následek zvýšenou proliferaci hepatocytů, včetně proliferace alterovaných buněk.

Zánět a prozánětlivé signální molekuly hrají významnou roli i při vzniku a progresi CCC. V terénu chronických zánětlivých změn jsou cholangiocyty exponovány zvýšeným koncentracím interleukinu 6, TNF α , cyklooxygenázy 2 a Wnt, což vede ke kumulaci mutací v protoonkogenech, tumor-supresorových genech a v tzv. *mismatch repair* genech zodpovědných za opravu chyb v DNA, vznikajících při její replikaci. Hromadění solí žlučových kyselin v průběhu cholestázy navíc vede v biliárních epiteliích k aktivaci ERK1/2 (extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2) a dráhy Akt/NF- κ B, podporující buněčnou proliferaci a migraci (254).

Nedávná studie mapující získané genetické alterace v lidských a myších HCC vyrůstajících na pozadí deficitu BSEP prokázala, že expozice hepatocytů zvýšeným koncentracím žlučových kyselin a zánětlivých působků vede k masivní amplifikaci genů postihující zejména signální kaskádu MAPK (mitogen-activated protein kinase), regulující široké spektrum biologických dějů, včetně buněčné proliferace, diferenciaci či apoptózy (255).

U části dětských pacientů s HCC vyrůstajícím v terénu deficitu *ABCB11* byly zjištěny současně se vyskytující somatické mutace v *CTNNB1* kódujícím β -catenin a v *NFE2L2* (nuclear factor erythroid-2-related-factor-2), které rovněž hrají významnou úlohu v hepatocelulární karcinogenezi (256-8).

Centrálním regulátorem metabolismu žlučových kyselin je FXR. Snížená exprese FXR byla zaznamenána v lidských HCC a rovněž u kolorektálního karcinomu a CCC (259-261). U posledně jmenovaného byly zaznamenány nápadně zvýšené hladiny TGR5, který může být zprostředkovatelem rezistence nádorových buněk k apoptóze (262).

Překážkou v terapii HCC bývá rezistence nádorových buněk k chemoterapii, na což mohou mít rovněž významný vliv přenašečové systémy hepatocytů. Exprese hepatobiliárních transportérů navíc determinuje i radiologickou detekci HCC, protože selektivní zobrazení hepatocytů kontrastními látkami při magnetické rezonanci koreluje s expresními vzory OATP a MRP2 (263,264). Tyto poznatky podtrhují diagnostický a terapeutický význam hepatobiliárních transportérů u nádorových onemocnění jater.

6. Shrnutí

Mutace v genech kódujících systémy ovlivňující metabolismus a transport bilirubinu a žlučových kyselin mohou mít za následek rozvoj či vznik predispozice k celé řadě fenotypicky heterogenních cholestatických onemocnění či stavů. Navíc, jak ukazují současné celogenomové studie, některé běžné varianty těchto genů mohou představovat modulátory jaterní fibrózy, a to jak u primárně cholestatických, tak u necholestatických jaterních poruch, a determinovat tak progresi chronických jaterních onemocnění (204,242). Současně tyto studie poukazují na možnou souvislost mezi alterací řady transportních proteinů a některými hepatobiliárními malignitami (204-206).

Včasná a správná diagnostika genetického defektu způsobujícího či predisponujícího ke vzniku cholestatické jaterní léze umožňuje nasazení účinných preventivních a léčebných režimů zabraňujících vzniku či rozvoji chorobného stavu a možných závažných komplikací. Je rovněž zásadní z hlediska prevence nadbytečných invazivních výkonů, které jsou neefektivní z pohledu ovlivnění progresu základního onemocnění a současně znamenají i nemalou zátěž pro pacienta i celý zdravotnický systém.

V neposlední řadě má molekulárně genetická analýza hepatobiliárních transportních systémů a jejich regulačních mechanismů zásadní význam pro prenatální diagnostiku dědičných cholestáz a je účinným nástrojem genetického poradenství v rodinách probandů, kde se významnou měrou podílí na odhalení přenašečů a presymptomatických jedinců.

7. Cíle práce

Předkládaná práce je věnována problematice poruch tvorby a sekrece žluči, a to zejména se zaměřením na genetické defekty vedoucí k narušení funkce či úplné absenci hepatobiliárních transportních proteinů účastnících se přenosu žlučových lipidů a pigmentů.

Práce sleduje dva hlavní cíle:

1. Molekulárně genetická a morfologická analýza probandů s hereditárním typem žloutenky či cholestázy
2. Objasnění úlohy bazolaterálních transportérů OATP1B1 a OATP1B3 v patogeneze dědičné a získané žloutenky

8. Výsledky

8.1 Molekulárně genetická a morfologická analýza probandů s hereditárním typem žloutenky či cholestázy

Ve své práci se zaměřuji především na pacienty s převážně konjugovaným typem žloutenky, u nichž předchozí laboratorní a zobrazovací vyšetření nevysvětlila uspokojivě příčinu obtíží a u nichž se předpokládá primárně genetický defekt.

Součástí vyšetřovacích postupů je kromě mutační analýzy kandidátních genů i histologický rozbor jaterní tkáně pacienta, včetně imunohistochemického vyšetření zaměřeného na hepatobiliární transportní systémy. Pro tyto účely byl na našem pracovišti zaveden do diagnostické praxe, kromě standardních histochemických a imunohistochemických barvicích metod, panel primárních protilátek cílených na hepatobiliární transportní systémy jater a žlučových cest (tabulka 5).

Tabulka 5. **Přehled primárních protilátek používaných pro diagnostiku dědičné žloutenky**

Protein	Název protilátky	Katalog. číslo	Výrobce
MRP2	anti-MRP2 mouse monoclonal antibody	M2III-6	Kamiya, Seattle, WA
MDR3	anti-MDR3/ABCB4 rabbit polyclonal antibody	NBP2-30887PEP	Novus Biologicals, Colorado
OATP1B1	MDQ mouse monoclonal anti-OATP2 antibody	ab15442	Abcam, Cambridge, UK
OATP1B3	MDQ mouse monoclonal anti-OATP2 antibody	ab15442	Abcam, Cambridge, UK
BSEP	anti-ABCB11/BSEP rabbit polyclonal antibody	ab155421	Abcam, Cambridge, UK
TJP2	ZO-2 rabbit polyclonal antibody	38-910	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA

8.1.1 Probandi s převážně konjugovaným typem hyperbilirubinémie

Příčinu převážně konjugované hyperbilirubinémie se podařilo alespoň částečně objasnit u 15 probandů, a to se zaměřením na kandidátní geny *SLCO1B1*, *SLCO1B3* a *ABCC2*.

8.1.1.1 Probandi se žloutenkou Rotorova typu

Ve spolupráci se skupinou prof. Ing. Stanislava Kmocha, CSc. z Ústavu dědičných metabolických poruch 1. LF UK a VFN v Praze jsme provedli molekulárně genetické vyšetření 13 probandů s převážně konjugovaným typem hyperbilirubinémie Rotorova typu, se

zaměřením na kandidátní lokus na chromozomu 12 (12p12) s dvojicí genů *SLCO1B1* a *SLCO1B3*, kódujících transportní proteiny OATP1B1 a OATP1B3.

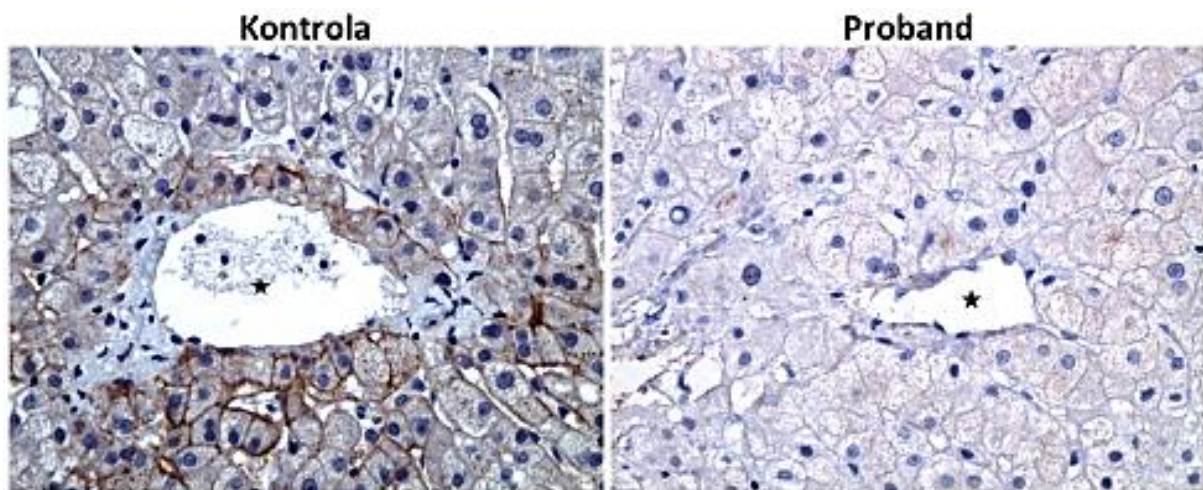
U všech testovaných jedinců byly zjištěny simultánní bialelické inaktivující mutace v kandidátních genech, se třemi hlavními haplotypy R1-3:

R1: bialelická nonsense mutace v *SLCO1B1* c.1738C→T (p.R580X) a bialelická delece v rozsahu 7.2 kb v exonu 12 genu *SLCO1B3* (3 probandi)

R2: bialelická delece *SLCO1B3* v rozsahu 405 kb a bialelická mutace místa sestřihu *SLCO1B1* (c.481+1G→T) (devět probandů)

R3: nonsense mutace v *SLCO1B1* c.757C→T (p.R253X) a bialelická mutace místa sestřihu c.1747+1G→A v *SLCO1B3* (jeden proband)

Následné mikroskopické a imunohistochemické vyšetření jaterní tkáně provedené u 7 probandů prokázalo u všech testovaných jedinců nepřítomnost korespondujících proteinových produktů OATP1B1 a OATP1B3 na sinusoidální membráně hepatocytů v jinak strukturálně normální jaterní tkáni (obr. 12).



Obr. 12: Imunohistochemické vyšetření jaterní tkáně probanda s RS (haplotyp R2). Úplná absence imunoexpresy sinusoidálních transportérů OATP1B1 a OATP1B3 ve strukturálně normální jaterní tkáni. Terminální venula označena hvězdičkou. Primární myší monoklonální protilátka MDQ anti-OATP2 antibody, ab15442, Abcam; původní zvětšení 400x.

8.1.1.2 Probandi s hereditární hyperbilirubinémií s alterací *ABCC2*

U dalších 2 probandů s dosud nevyjasněným konjugovaným typem hyperbilirubinémie bylo provedeno molekulárně genetické vyšetření genu *ABCC2*. Výsledky mutační analýzy shrnuje tabulka 6.

Tabulka 6: Výsledky mutační analýzy ABCC2 u probandů s konjugovaným typem žloutenky

Proband	Zjištěná alterace DNA	Dopad na protein	Patogenita
1	Heterozygotní c.2360_2366delCCCTGTC CD132433	p.Pro787Leufs*7	patogenní
	Heterozygotní c.3258+1G>A CS132432, rs762243203	abnormální sestřih	patogenní
2	Heterozygotní c.1249G>A CM067967, rs2273697	p.Val417Ile	benigní (častá mutace s frekvencí 0,20 u Evropanů)
	Heterozygotní c.1446C>G rs113646094	beze změny	benigní (synonymní mutace s frekvencí 1-2 % u Evropanů)
	Heterozygotní c.2213C>G	p.Ala738Gly	pravděpodobně patogenní
	Heterozygotní c.2310C>G rs763861644	p.Ser770Arg	pravděpodobně patogenní

Pozn.: Označení variant dle databáze RefSNP začíná písmeny „rs“; číslování mutací podle Human Gene Mutation Database (HGMD) začíná písmenem „C“, druhé velké písmeno označuje typ mutace.

Mikroskopické vyšetření jaterní tkáně bylo provedeno u obou probandů:

U probanda 1 byla ve strukturálně normálním jaterním parenchymu zjištěna akumulace hnědočerného pigmentu negativního v reakcích na průkaz hemosiderinu (Perlsova reakce) a redukujícího amoniakální roztok stříbra. Provedené imunohistochemické vyšetření následně odhalilo kompletní absenci ABCC2/MRP2 v oblasti kanalikulární membrány hepatocytů a potvrdilo diagnózu vzácného DJS (obr. 7).

U probanda 2 byla kromě vyšetření genu *ABCC2* rovněž provedena mutační analýza promotoru *UGT1A1*, která odhalila alelu c.-3279G spolu s variantou variantu A(TA)₇TAA v TATA boxu promotoru *UGT1A1* v homozygotním stavu, tedy změny asociované s GS. Morfologický rozbor jaterní tkáně provedený doc. MUDr. Tomášem Jiráskem, Ph.D. vyloučil přítomnost typického DJS pigmentu, ale v souladu s výsledky mutační analýzy prokázal absenci proteinu MRP2 v hepatocytech. Hyperbilirubinémie u tohoto probanda byla prvním popsaným případem tzv. duální hereditární žloutenky, způsobené simultánními patogenními mutacemi v genech *ABCC2* a *UGT1A1* (114).

8.1.2 Probandi s dědičným typem cholestázy

Druhou testovanou skupinou byli pacienti s plně vyvinutým syndromem cholestázy, u nichž se na základě výsledků předchozích zobrazovacích a laboratorních vyšetření předpokládal primárně genetický defekt.

V následujícím přehledu demonstrují výsledky molekulárně genetické analýzy genů *ATP8B1*, *ABCB11* a *ABCB4*. Námi nově popsané patogenní mutace asociované s odpovídajícím fenotypem jsou v tabulkách zvýrazněny tučným písmem.

8.1.2.1 Probandi s deficitem *ATP8B1*

Celkem u 10 probandů byly zjištěny patogenní mutace v *ATP8B1*, manifestující se pod obrazem PFIC typu 1 (3 pacienti) a BRIC1 (7 pacientů) (viz tabulka č. 7).

Tabulka 7: Výsledky mutační analýzy *ATP8B1*

Proband	Mutace 1	Mutace 2	Fenotyp
1	c.2097+2T>C CS982199, rs387906381	c.2677G>C (p.Asp893His) CM117163	PFIC1
2	c.1428T>A (p.Tyr476*)	delece exonů 2 a 3	PFIC1
3	c.191G>T (p.Trp64Leu)	c.191G>T (p.Trp64Leu)	PFIC1
4	c.1982T>C (p.Ile661Thr) CM980761, rs121909100	c.3122_3126del5ins20 CX046078	BRIC1
5	c.208G>A (p.Asp70Asn) CM043812, rs34719006	-	BRIC1
6	c.134A>C (p.Asn45Thr) CM051009, rs146599962	c.1805G>A (p.Arg602Gln) CM117172, rs758353144	BRIC1
7	c.134A>C (p.Asn45Thr) CM051009, rs146599962	-	BRIC1
8	c.1982T>C (p.Ile661Thr) CM980761, rs121909100	-	BRIC1
9	c.238delA (p.Met80*)	c.1352T>C (p.Ile451Thr)	BRIC1
10	c.854G>T (p.Ser285Ile), rs754073606	-	BRIC1

Pozn.: Označení variant dle databáze RefSNP začíná písmeny „rs“; číslování mutací podle Human Gene Mutation Database (HGMD) začíná písmenem „C“, druhé velké písmeno označuje typ mutace.

Od žádného z pacientů s geneticky prokázaným deficitem *ATP8B1* nebyl na našem pracovišti k dispozici vzorek jaterní tkáně k morfologické analýze.

8.1.2.2 Probandi s deficitem *ABCB11*

Mutační analýza genu *ABCB11* odhalila patogenní mutace celkem u 29 vyšetřovaných pacientů, manifestující se pod obrazem PFC12 (16 pacientů), BRIC2 (8 pacientů), ITC (2 pacientky) a 1 pacientka s cholestázou indukovanou kontracepcí. U jedné pacientky (probandka č. 15) došlo ke změně původního fenotypu odpovídajícího BRIC2 v progresivní formu onemocnění. Jedna pacientka vyvinula současně projevy ITC a léky indukované cholestázy (tabulka č. 8).

U probandky 28 s ITC byla současně prokázána heterozygotní mutace c.134A>C (p.Asn45Thr) rs146599962 v *ATP8B1*.

Tabulka 8: Výsledky mutační analýzy *ABCB11*

Proband	Mutace 1	Mutace 2	Fenotyp
1	c.937C>A (p.Arg313Ser) CM081501, rs375087680	c.1445A>G (p.Asp482Gly) CM980247, rs72549402	PFIC2
2	c.851T>C (p.Val284Ala) CM092759, rs200739891	c.1468A>G (p.Asn490Asp) CM081507, rs553076953	PFIC2
3	c.1445A>G (p.Asp482Gly) CM980247, rs72549402	c.3458G>T (p.Arg1153Leu) CM117166	PFIC2
4	c.90_93delGAAA (p.Lys30Asnfs*31) CD097190	c.249_250insT (p.Gly84Trpfs*9), CI097187	PFIC2
5	c.1445A>G (p.Asp482Gly) CM980247, rs72549402	c.1757C>T (p.Thr586Ile) CM092747, rs1321213158	PFIC2
6	c.1409G>A (p.Arg470Gln) CM081494, rs1463057954	c.1677_1679delinsAAA (p.Met559_Ser560delinsIleAsn) CX117168	PFIC2
7	g.13171G>A	c.2343+1G>T CS075057, rs774411820	PFIC2
8	c.3148C>T (p.Arg1050Cys) CM042275, rs72549398	c.1381A>G (p.Lys461Glu) CM980246, rs1274558905	PFIC2
9	c.179G>A (p.Trp60*) CM117164	c.179G>A (p.Trp60*) CM117164	PFIC2
10	c.673A>C (p.Thr225Pro) CM117165	c.677C>T (p.Ser226Leu) CM103531, rs1382100120	PFIC2
11	c.732delT (p.Ile245Leufs*17) CD117167	c.1445A>G (p.Asp482Gly) CM980247, rs72549402	PFIC2
12	c.3148C>T (p.Arg1050Cys) CM042275, rs72549398	c.3904G>T (p.Glu1302*) CM081484, rs72549398	PFIC2
13	c.611+1G>A CS067803, rs769134865	c.1685G>A (p.Gly562Asp) CM081503	PFIC2
14	c.732delT (p.Ile245Leufs*17) CD117167	c.779G>A (p.Gly260Asp) CM1723778	PFIC2
15	c.2495G>A (p.Arg832His) CM107193, rs376255350	c.2629G>A (p.Gly877Arg) CM103695, rs745557569	BRIC/PFIC2
16	c.1202C>G (p.Pro401Arg)	c.3457C>T (p.Arg1153Cys) CM980251, rs72549395	PFIC2
17	c.612-6_617delinsCAC	c.2842C>T (p.Arg948Cys) CM081493, rs1559183717	PFIC2
18	c.2316T>A (p.Tyr772*) CM117169, rs1371940395	c.3589CT>GG (p.Leu1197Gly) CX092751	BRIC2
19	c.667C>T (p.Arg223Cys) CM117170, rs199841445	-	BRIC2
20	c.23G>C (p.Arg8Pro) CM117171	c.3214-3C>G CS118460	BRIC2
21	c.1445A>G (p.Asp482Gly) CM980247, rs72549402	-	BRIC2
22	c.2093G>A (p.Arg698His) CM129435, rs138642043	-	BRIC2
23	c.403G>A (p.Glu135Lys) CM092737, rs752992432	c.1757C>T (p. Thr586Ile) CM092747, rs1321213158	BRIC2
24	c.1924G>T (p.Glu642*)	-	BRIC2
25	c.650T>G (p.Met217Arg) CM1213495, rs776085479	c.1724G>A (p.Arg575Gln) rs200667815	BRIC2
26	c.74C>A (p.Ser25*) CM067622	-	poléková
27	c.3628A>C (p.Thr1210Pro) CM081476	-	ITC

28	c.908G>A (p.Arg303Lys) CM081486, rs767002817	-	ITC
29	c.2944G>A (p.Gly982Arg) CM980249, rs72549399	-	ITC, poléková

Pozn.: Označení variant dle databáze RefSNP začíná písmeny „rs“; číslování mutací podle Human Gene Mutation Database (HGMD) začíná písmenem „C“, druhé velké písmeno označuje typ mutace.

Morfologické hodnocení jaterní tkáně bylo provedeno celkem u 12 pacientů (tabulka 9).

Tabulka 9: **Histologické nálezy v jaterní tkáni pacientů s deficitem ABCB11/BSEP**

Proband	Pohlaví	Věk (roky)	Typ odběru	Fenotyp	Stadium fibrózy	Obrovskobuněčná hepatitida	Imunoexprese BSEP
1	muž	1	explantát jater	PFIC2	cirhóza	fokální	chybí
3	žena	4	explantát jater	PFIC2	cirhóza	přítomna	chybí
5	žena	8	explantát jater	PFIC2	cirhóza	přítomna	zachována
6	muž	1	punkce	PFIC2	septální	přítomna	chybí
7	muž	1	punkce	PFIC2	septální	přítomna	chybí
8	muž	6	punkce	PFIC2	periportální	chybí	neudána
9	žena	1	punkce	PFIC2	septální	přítomna	chybí
10	žena	1	punkce	PFIC2	septální	fokální	chybí
11	muž	4	explantát jater	PFIC2	cirhóza	přítomna	chybí
12	žena	2	punkce	PFIC2	periportální	chybí	zachována
15	žena	55	explantát jater	BRIC2/PFIC2	cirhóza	chybí	zachována
28	žena	28	punkce	ITC	neudána	neudána	zachována

Histologické vyšetření jaterní tkáně prokázalo u všech 12 pacientů známky cholestázy s periportální duktulární proliferací, u 8 pacientů provázené obrovskobuněčnou (syncyaliální) transformací hepatocytů. U 5 pacientů bylo zjištěno onemocnění v pokročilém stadiu, s vyvinutou cirhotickou přestavbou jaterní tkáně.

Imunohistochemické vyšetření jaterního parenchymu prokázalo kompletní absenci kanalikulární exprese BSEP u 7 pacientů. U 4 pacientů byl protein imunohistochemicky detekován a fenotyp choroby lze vysvětlit expresí funkčně alterovaného či nefunkčního transportního proteinu. U jednoho pacienta (proband 8) nebylo imunohistochemické vyšetření provedeno.

U dvou pacientů (proband 1 a 15) byla nemoc v pokročilém stadiu komplikována rozvojem hepatocelulárního karcinomu, u probanda 1 se dvěma nádorovými ložisky, bez známek generalizace.

U pěti pacientů (proband 1, 3, 5, 11 a 15) s pokročilým stadiem PFIC2 byla provedena úspěšná transplantace jater. Ani jeden z transplantovaných pacientů do současnosti nevyvinul protilátky proti transportéru ABCB11/BSEP a známky AIBD.

8.1.2.3 Probandi s deficitem *ABCB4*

Molekulárně genetické vyšetření prokázalo přítomnost mutací v *ABCB4* u 16 pacientů s poměrně pestrými klinickými projevy: u 10 pacientů se postižení manifestovalo pod obrazem plně vyvinutého syndromu PFIC3, u dvou pacientek jako ITC, u dvou pacientů jako LPAC a dva pacienti vyvinuli obraz léky indukované cholestázy (tabulka 10).

Tabulka 10: Výsledky mutační analýzy *ABCB4*

Proband	Mutace 1	Mutace 2	Fenotyp
1	c.344+2_3insTT	c.2064+3A>T	PFIC3
2	c.344+2_3insTT	c.2064+3A>T	PFIC3
3	c.1285G>A (p.Gly429Arg), rs374007494	c.1742G>T (p.Gly581Val)	PFIC3
		c.1954A>G (p.Arg652Gly) CM072814, rs2230028	
4	c.2783+1G>T	Chr7:g.(86998525)_(87236463)delN237939	PFIC3
5	c.2783+1G>T	Chr7:g.(86998525)_(87236463)delN237939	PFIC3
6	c.1326_1327delACinsGT (p.Ile442_Gln443delinsMet*)	c.1326_1327delACinsGT (p.Ile442_Gln443delinsMet*)	PFIC3
7	c.139C>T (p.Arg47*) CM082466, rs376926391	c.1954A>G (p.Arg652Gly) CM072814, rs2230028	PFIC3
8	c.833+1G>T	c.1798T>A (p.Ile600Phe)	PFIC3
9	c.2545C>T (p.Ser849Pro)	c.2545C>T (p.Ser849Pro)	PFIC3
10	c.475C>T (p.Arg159*) CM075939, rs377160065	c.959C>T (p.Ser320Phe) CM013506, rs72552778	PFIC3
11	c.1954A>G (p.Arg652Gly) CM072814, rs2230028	c.1358T>G (p.Ile453Ser)	poléková
12	c.1954A>G (p.Arg652Gly) CM072814, rs2230028	-	poléková
13	c.1954A>G (p.Arg652Gly) CM072814, rs2230028	-	LPAC
14	c.1436C>T (p.Pro479Leu) CM105793, rs748657435	c.1954A>G (p.Arg652Gly) CM072814, rs2230028	ITC
15	c.1436C>T (p.Pro479Leu) CM105793, rs748657435	c.1954A>G (p.Arg652Gly) CM072814, rs2230028	LPAC
16	c.1769G>A (p.Arg590Gln) CM075942, rs45575636	-	ITC

Pozn.: Označení variant dle databáze RefSNP začíná písmeny „rs“; číslování mutací podle Human Gene Mutation Database (HGMD) začíná písmenem „C“, druhé velké písmeno označuje typ mutace.

Histologické vyšetření jaterního parenchymu bylo provedeno u 9 pacientů s klinicky manifestní PFIC3, z toho u 4 v jaterní biopsii a u 5 pacientů byl k dispozici explantát jater (tabulka 11).

U všech pacientů byly na světelně mikroskopické úrovni zaznamenány známky cholestatické jaterní léze, z toho u 8 pacientů v pokročilém stádiu onemocnění.

Ve vzorcích 4 pacientů byly popsány známky chronické cholangiopatie s periduktální fibrózou a u 3 pacientů současně s přítomností intraduktálních krystalů cholesterolu.

Imunohistochemické vyšetření prokázalo úplnou absenci MDR3 na kanalikulární membráně hepatocytů u 7 pacientů. U 2 pacientů byla imunoexprese proteinu MDR3 hodnocena jako snížená v porovnání se zdravou kontrolou.

Tabulka 11: Histologické nálezy v jaterní tkáni pacientů s deficitem ABCB4/MDR3

Proband	Pohlaví	Věk (roky)	Typ odběru	Fenotyp	Stadium fibrózy	Imunoexprese MDR3
1	žena	2	punkce	PFIC3	septální	chybí
2	žena	1	punkce	PFIC3	cirhóza	chybí
3	muž	4	punkce	PFIC3	cirhóza	chybí
4	muž	12	explantát jater	PFIC3	cirhóza	chybí
5	muž	16	explantát jater	PFIC3	cirhóza	chybí
7	žena	2	punkce	PFIC3	cirhóza	chybí
8	muž	12	explantát jater	PFIC3	cirhóza	chybí
9	žena	6	explantát jater	PFIC3	cirhóza	snížená
10	žena	17	explantát jater	PFIC3	cirhóza	snížená

U probanda č. 8 byl zjištěn vysoký obsah mědi v sušině jaterní tkáně, dosahující hodnot až 1867 μ g/g.

U žádného z pacientů s deficitem *ABCB4* nebyl v našem souboru zaznamenán výskyt primární hepatobiliární malignity.

8.2 Objasnění úlohy bazolaterálních transportérů OATP1B1 a OATP1B3 v patogeneze dědičné a získané žloutenky

Humánní studie odhalily, že příčinou hyperbilirubinémie Rotorova typu je kompletní absence jaterních sinusoidálních transportérů OATP1B1 a OATP1B3, způsobená simultánními

patogenními mutacemi v kódujících genech *SLCO1B1* a *SLCO1B3* (viz kapitoly 4.1.1 a 8.1.1.1) (13).

Animální experimenty souběžně vedené skupinou A. Schinkela v The Netherlands Cancer Institute v Amsterdamu ukázaly, že za fyziologických podmínek je významná frakce konjugovaného bilirubinu vylučována zpět do krevního oběhu prostřednictvím sinusoidálního transportéru MRP3, aby byla v centrální zóně jaterního lalůčku zpětně vychytána proteiny OATP1B1 a OATP1B3 a následně vyloučena do žluče (tzv. *MRP3-OATP1B1/3 smyčka*, viz kapitola 2).

Obdobné molekulární mechanismy jako u RS se mohou uplatňovat i v patofyziologii ikteru u získaných onemocnění jater a žlučových cest.

V další práci jsme se proto zaměřili na úlohu sinusoidálních transportérů OATP1B1 a OATP1B3 v patogeneze žloutenky provázející získaná chronická jaterní onemocnění, a to za pomoci korelace sérových hladin bilirubinu s imunohistochemickou expresí těchto transportérů v jaterní tkáni pacientů s chronickou parenchymovou lézí (n=21) a s primárním postižením žlučového stromu (n=31). U všech pacientů zahrnutých do studie byla předchozí genotypizací promotoru *UGT1A1* a *SLCO1B1* (rs4149056) vyloučena geneticky podmíněná predispozice ke zvýšeným sérovým hladinám bilirubinu.

Výsledky naší studie ukazují, že sinusoidální exprese proteinů OATP1B1/3 je snížena v konečných stádiích u obou skupin pacientů, a to významněji ve skupině primárních biliárních poruch než v případě chronických parenchymových lézí ($1,9 \pm 1,1$ vs. $2,7 \pm 0,6$; $p=0,009$). Statisticky významná inverzní korelace mezi jaterní imunoexpresí OATP1B1/3 a hladinami konjugovaného, nekonjugovaného i celkového bilirubinu byla zaznamenána pouze ve skupině primárně biliárních lézí. U chronických parenchymových jaterních poruch nebyly mezi výše uvedenými parametry zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly.

Vysvětlením tohoto fenoménu může být jednak celkově snížené množství buněk (hepatocytů) exprimujících OATP1B1/3 v důsledku redukce objemu funkčního jaterního parenchymu u chronických přestavbových procesů jater a rovněž snížená denzita obou transportérů na sinusoidální membráně jednotlivých hepatocytů. Downregulace bazolaterálních transportních systémů může představovat jeden z adaptivních procesů chránících hepatocyty proti toxickému působení komponent žluči hromadících se během chronické cholestázy.

9. Shrnutí výsledků

1. Do diagnostické praxe jsme úspěšně zavedli panel primárních protilátek namířených proti hepatobiliárním transportérům v jaterní tkáni a rozšířili tak spektrum nástrojů používaných v morfologické diagnostice cholestatických jaterních lézí.

2. Podíleli jsme se na vysvětlení příčiny dědičně podmíněné žloutenky či cholestázy u celkem 70 testovaných probandů.

- a. U 13 probandů byly nalezeny simultánní patogenní mutace v genech *SLCO1B1* a *SLCO1B3* asociované se žloutenkou Rotorova typu;
- b. U jednoho probanda byl diagnostikován DJS, způsobený dvěma dosud nepopsanými patogenními mutacemi. Tento případ byl zároveň publikován jako nejstarší molekulárně geneticky a morfologicky verifikovaný DJS na světě;
- c. U jednoho probanda byly zjištěny simultánní mutace v genech *ABCC2* a *UGT1A1*, které mohou být asociovány s tzv. duální hereditární žloutenkou (114);
- d. U 10 pacientů byly zjištěny patogenní mutace v *ATP8B1*, klinicky se manifestující pod obrazem PFIC1 (3 pacienti) či BRIC1 (7 pacientů);
- e. U 29 pacientů byly zjištěny patogenní mutace asociované s projevy deficitu *ABCB11*, s fenotypem odpovídajícím PFIC2 (16 pacientů), BRIC2 (8 pacientů), ITC (2 pacientky) a kontraceptivy indukované cholestáze (2 pacientky, z toho u jedné současně s projevy ITC). U jedné pacientky došlo k přechodu původně benigní formy onemocnění s epizodickou cholestázou do obrazu PFIC2 s cirhotickou přestavbou jaterní tkáně, komplikovanou v dospělém věku rozvojem hepatocelulárního karcinomu – případ byl publikován jako kazuistické sdělení;
- f. U 16 pacientů byly zjištěny patogenní mutace v *ABCB4* manifestující se pod fenotypicky variabilním obrazem: PFIC3 (10 pacientů), ITC (2 pacientky), poléková cholestáza (2 pacienti) a LPAC (2 pacienti). Jeden z pacientů s projevy PFIC3 byl zároveň publikován jako případ s dosud nejvyšší prokázanou akumulací mědi v jaterní tkáni asociovanou s defektem *ABCB4*.

3. Naše práce přinesla nové poznatky o úloze transportních proteinů OATP1B1 a OATP1B3 v metabolické dráze degradace hemu a v jaterní detoxikaci. Podíleli jsme se na odhalení dosud neznámého jaterního cyklu konjugovaného bilirubinu a celé řady dalších substrátů pro MRP3, OATP1B1 a OATP1B3.

4. Prokázali jsme, že současná inaktivující mutace *SLCO1B1* a *SLCO1B3* s kompletní absencí transportních proteinů OATP1B1 a OATP1B3 je molekulární podstatou žloutenky Rotorova typu.

5. Ověřili jsme, že snížená exprese transportních proteinů OATP1B1 a OATP1B3 může přispívat k rozvoji ikteru v pokročilých stádiích získaných jaterních onemocnění, a to zejména s obstrukčním typem cholestázy.

Publikačním výstupem jsou následující původní práce a kazuistická sdělení (příloha č. 1-5):

V recenzovaných časopisech s IF:

1. van de Steeg E, Stránecký V, Hartmannová H, Nosková L, Hřebíček M, Wagenaar E, van Esch A, de Waart DR, Oude Elferink RP, Kenworthy KE, Sticová E, al-Edreesi M, Knisely AS, Kmoch S, Jirsa M, Schinkel AH. Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *J Clin Invest.* 2012; 122(2):519-28. **IF 12.812/2012**
2. Sticova E, Elleder M, Hulkova H, Luksan O, Sauer M, Wunschova-Moudra I, Novotny J, Jirsa M. Dubin-Johnson syndrome coinciding with colon cancer and atherosclerosis. *World J Gastroenterol.* 2013; 19(6):946-50. **IF 2.433/2013**
3. Sticova E, Lodererova A, van de Steeg E, Frankova S, Kollar M, Lanska V, Kotalova R, Dedic T, Schinkel AH, Jirsa M. Down-regulation of OATP1B proteins correlates with hyperbilirubinemia in advanced cholestasis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(5):5252-62. **IF 1.581/2015**
4. Sticova E, Neroldova M, Kotalova R, Subhanova I, Jirsa M. ABCB4 disease mimicking morbus Wilson: A potential diagnostic pitfall. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2020 Mar;164(1):121-125. **IF 1.000/2019**

V časopisech bez IF:

5. Husová L, Sticová E, Žampachová V, Neřoldová M, Jirsa M. Progressive familial intrahepatic cholestasis in adulthood: 60 years' follow-up. *Klin. Biochem. Metab.*, 28 (49), 2020, No. 1, p. 11–14.

Přehledové články v recenzovaných časopisech s IF (viz příloha č 6-8):

6. Sticova E, Jirsa M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. *World J Gastroenterol.* 2013; 19(38):6398-6407. **IF 2.433/2013**
7. Sticova E, Jirsa M, Pawłowska J. New Insights in Genetic Cholestasis: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018. **IF 1.714/2018**
8. Sticova E, Jirsa M. ABCB4 disease: Many faces of one gene deficiency. *Ann Hepatol.* 2020 Mar-Apr;19(2):126-133. **IF 2.125/2019**

Přehledové články v časopisech bez IF:

9. Jirsa M, Sticová E. Vrozené hyperbilirubinémie a molekulární mechanizmy žloutenky. *Vnitřní lékařství*. 2013; 59(7):566-571
10. Jirsa M, Sticová E. Dědičné hyperbilirubinémie a genetické cholestatické syndromy. *Postgraduální gastroenterologie & hepatologie*. 2018, roč. 4, č. 3, s. 106-109.

Kapitoly v monografiích:

1. Sticová E, Jirsa M.: Dědičné metabolické choroby jater. In: Brdička R, Didden W. Genetika v klinické praxi IV., Galén, 1. vyd., ©2016, s. 97-126. ISBN 978-80-7492-277-0.
2. Jirsa M, Sticová E.: Dědičné choroby jater: příčiny, mechanismy a léčba. In: Špičák J. a kol. Novinky v gastroenterologii a hepatologii II., Grada Publishing, a.s., 1. vyd., ©2017, s. 249-274. ISBN 978-80-271-9761-3.

10. Seznam zkratek

A1AT	alfa-1 antitrypsin
ABC	ATP-binding cassette transporter superfamily
ABCB11	ATP-binding cassette protein třídy B, typ 11
ABCB4	ATP-binding cassette protein třídy B, typ 4
ABCC2	ATP-binding cassette protein třídy C, typ 2
ABCG5/8	ATP-binding cassette proteins G5/G8
(AE2)/HCO ₃ ⁻	anion exchange protein 2
AGS	Alagilleův syndrom
AIBD	autoimmune BSEP disease
AKR1D1	aldo-keto reductase family 1 member D1
ARC	syndrom arthrogryposa - renální dysfunkce – cholestáza
ASBT	apical sodium-dependent bile acid transporter
ATP8B1	ATPáza I. třídy, typ 8B, člen 1
BAAT	bile acid coenzyme A – amino acid N-acetyltransferase
BACS	bile acyl-CoA synthetase
BACL	bile acyl-CoA ligase
BIND	bilirubinem-indukovaná neurologická dysfunkce
BRCP	breast cancer resistance protein
BRIC	benigní rekurentní intrahepatální cholestáza
BSEP	bile salt export pump
CAR	constitutive active receptor
CCC	cholangiocelulární karcinom
CFTR/Cl ⁻	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CIRH1A	cirhin 1A
CLDN1	claudin 1
cMOAT	canalicular multispecific anion transporter 1
CNS	Crigler-Najjarův syndrom
CYP7A1	cholesterol-7 α hydroxyláza
CYP27A1	sterol-27 hydroxyláza
CYP7B1	cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DCD2	doublecortin domain containing 2
DJS	Dubin-Johnsonův syndrom
EPHX1	epoxid hydroláza
ER	endoplazmatické retikulum
ERK1/2	extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2
FGF19	fibroblast growth factor 19
FGFR4	FGF receptor 4
FHCA	familiární hypercholanémie
FIC1	familial intrahepatic cholestasis 1 protein
FITC	fluorescein isothiocyanát
FXR	farnesoid X-activated receptor
GBD1	gallbladder disease 1
GGT	gammaglutamyl transferasa
GS	Gilbertův syndrom
gtPBREM	glucuronosyltransferase phenobarbital response enhancing motif
HCC	hepatocelulární karcinom
HGMD	Human Gene Mutation Database

HNF4 α	hepatocyte nuclear factor-4 α
HSB3D7	3-beta-hydroxy-delta-5-C27-steroid oxidoreductase
ITC	intrahepatální těhotenská cholestáza
IBABP	fatty acid-binding protein 6
IBAT	ileal bile acid transporter/ileal sodium-dependent bile acid transporter
IFALD	intestinal failure-associated liver disease
ITC	idiopatická těhotenská cholestáza
ILVASC	ichthyosa - leukocytární vakuolizace - sklerózující cholangitida
IR-1	inverted repeat 1 DNA element
JAG1	Jagged-1
LPAC	low phospholipid associated cholelithiasis
LpX	lipoprotein X
LRH1	liver receptor homologue-1
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDR1	multidrug resistance protein 1
Mdr2	myší multidrug resistance protein 2
MDR3	multidrug resistance protein 3
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2
MRP4	multidrug resistance-associated protein 4
MYO5B	myosin VB
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
NAIC	North American Indian childhood cirrhosis
NBD	nukleotid vázající doména
NFE2L2	nuclear factor erythroid-2-related-factor-2)
NSC	neonatální sklerozující cholangitida
NTCP	sodium/taurocholate cotransporting polypeptide
OATP	organic anion-transporting polypeptide
OATP1B1	organic anion-transporting polypeptide 1B1
OATP1B3	organic anion-transporting polypeptide 1B3
OMIM	elektronická databáze Online Mendelian Inheritance in Man™
OST α -OST β	organic solute transporters
PBC	primární biliární cholangitida
PFIC	progresivní familiární intrahepatální cholestáza
PNALD	parenteral nutrition-associated liver disease
PSC	primární sklerozující cholangitida
PXR	pregnane X receptor
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RS	Rotorův syndrom
RXR	retinoid X receptor
SHP	small heterodimer partner
SLC	solute carrier superfamily
SLC10A1	solute carrier family 10 member 1
SLC27A5	solute carrier family 27 member 5
SNP	single nucleotide polymorphism
TGF β 1	transforming growth factor β 1
TJP2	tight junction protein 2
TMD	transmembránová doména
TNC	transientní neonatální cholestáza
TNF α	tumour necrosis factor α

UDCA	ursodeoxycholová kyselina
UGT1A1	uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1
UGT2B4	uridin 5'-didifosfát-glukuronosyltransferáza 2B4
VPS33B	homolog of yeast vacuolar protein sorting 33B

11. Reference

1. Boyer JL. Bile formation and secretion. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(3):1035–1078.
2. Van Mil SWC., Houwen RHJ, Klomp LWJ. Genetics of familial intrahepatic cholestasis syndromes. *Journal of Medical Genetics*. 2005;42(6):449–463.
3. Beuers U, Trauner M, Jansen P, Poupon R. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: From UDCA to FXR, PXR and beyond. *Journal of Hepatology*. 2015;62(1):S25–S37.
4. Roma MG, Toledo FD, Boaglio AC, Basiglio CL, Crocenzi FA, Sánchez Pozzi EJ. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin Sci (Lond)*. 2011;121(12):523–544.
5. Jurica J. Ursodeoxycholová kyselina. *Gastroent Hepatol* 2016; 70(5): 457–462.
6. Javitt NB. Bile acid synthesis from cholesterol: regulatory and auxiliary pathways. *The FASEB Journal*. 1994;8(15):1308–1311.
7. Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research*. 2009;50(10):1955–1966.
8. Chiang JY. Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev*. 2002;23(4):443–463.
9. Stadel G. Über die Farbstoffe der Galle. *Anaalen d Chemie u Pharmacie*. 1864; 132: 323–354
10. Berk PD, Howe RB, Bloomer JR, Berlin NI. Studies on bilirubin kinetics in normal adults. *J Clin Invest*. 1979; 48:2176–90.
11. Burchell B. Identification and purification of multiple forms of UDP-glucuronosyltransferase. *Rev Biochem Toxicol*. 1981; 3:1.
12. Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RP, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PL. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem*. 1994;269(27):17960–4.
13. van de Steeg E, Stránecký V, Hartmannová H, Nosková L, Hřebíček M, Wagenaar E, van Esch A, de Waart DR, Oude Elferink RP, Kenworthy KE, Sticová E, al-Edreesi M, Knisely AS, Kmoch S, Jirsa M, Schinkel AH. Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *J Clin Invest*. 2012; 122(2):519–28. (pozn.: rovněž uvedeno mezi publikacemi autorů)
14. Hagenbuch B, Meier PJ. Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Seminars in Liver Disease*. 1996;16(2):129–136.
15. Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lübbert H, Meier PJ. Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(23):10629–10633.
16. Vaz FM, Paulusma CC, Huidekoper H, de Ru M, Lim C, Koster J, Ho-Mok K, Bootsma AH, Groen AK, Schaap FG, Oude Elferink R, Waterham HR, Wanders RJ. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) deficiency: conjugated hypercholanemia without a clear clinical phenotype. *Hepatology*. 2015;61(1):260–267.
17. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife*. 2012;1:e00049.
18. Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, Stindt J, König C, Nassal M, Kubitz R, Sültmann H, Urban S. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology*. 2014;146(4):1070–1083.
19. Hagenbuch B., Meier P. J. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: Phylogenetic classification as OATP/SLCO super-family, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2004;447(5):653–665.
20. Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol*. 2012;165(5):1260–87.
21. Hagenbuch B., Stieger B. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013;34(2–3):396–412.
22. König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D. Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J Biol Chem*. 2000a; 275(30):23161–8.
23. König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000b; 278(1):G156–64.
24. Nies AT, Koepsell H, Damme K, Schwab M. Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;(201):105–67.
25. Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W, Koepsell H. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33(1):79–88.

26. Hooiveld G. J. E. J., Van Montfoort J. E., Meijer D. K. F., Müller M. Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;12(4):525–543.
27. Vos TA, Hooiveld GJ, Koning H, Childs S, Meijer DK, Moshage H, Jansen PL, Müller M. Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology*. 1998;28(6):1637-44.
28. Vos TA, Ros JE, Havinga R, Moshage H, Kuipers F, Jansen PL, Müller M. Regulation of hepatic transport systems involved in bile secretion during liver regeneration in rats. *Hepatology*. 1999;29(6):1833-9.
29. König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1461(2):377-94. Review.
30. König J, Rost D, Cui Y, Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology*. 1999;29(4):1156–1163.
31. Donner M. Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology*. 2001;34(2):351–359.
32. Ruiz ML, Rigalli JP, Arias A, Villanueva S, Banchio C, Vore M, Mottino AD, Catania VA. Induction of hepatic multidrug resistance-associated protein 3 by ethynylestradiol is independent of cholestasis and mediated by estrogen receptor. *Drug Metabolism and Disposition*. 2013;41(2):275–280.
33. Russel FG M., Koenderink JB, Masereeuw R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008;29(4):200–207.
34. Ritter CA, Jedlitschky G, Meyer Zu Schwabedissen H, Grube M, Köck K, Kroemer HK. Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5) *Drug Metabolism Reviews*. 2005;37(1):253–278.
35. Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, Thomas Kühlkamp, Dietrich Keppler, Dieter Häussinger, Ralf Kubitz. Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology*. 2005;41(5):1160–1172.
36. Ballatori N, Fang F, Christian WV, Li N, Hammond CL. Ost α -Ost β is required for bile acid and conjugated steroid disposition in the intestine, kidney, and liver. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008;295(1):G179–G186.
37. Boyer JL, Trauner M, Mennone A, Soroka CJ, Cai SY, Moustafa T, Zollner G, Lee JY, Ballatori N. Upregulation of a basolateral FXR-dependent bile acid efflux transporter OST α -OST β in cholestasis in humans and rodents. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006;290(6):G1124–G1130.
38. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*. 1990;346(6282):362-5.
39. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. 2001;11(7):1156-66. Review.
40. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ.. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(16):10046–10050.
41. van der Blik AM, Baas F, Ten Houte de Lange T, Kooiman PM, van der Velde-Koerts T, Borst P. The human mdr3 gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO Journal*. 1987;6(11):3325–3331.
42. Smith A. J., Timmermans-Hereijgers J. L., Roelofsen B. The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma membrane of fibroblasts from transgenic mice. *FEBS Letters*. 1994;354(3):263–266.
43. Keppler D, Leier I, Jedlitschky G. Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Biol Chem*. 1997;378(8):787-91. Review.
44. Nishida T, Gatmaitan Z, Roy-Chowdhry J, Arias IM. Two distinct mechanisms for bilirubin glucuronide transport by rat bile canalicular membrane vesicles. Demonstration of defective ATP-dependent transport in rats (TR-) with inherited conjugated hyperbilirubinemia. *J Clin Invest*. 1992;90(5):2130-5.
45. Macias RI, Marin JJ, Serrano MA. Excretion of biliary compounds during intrauterine life. *World J Gastroenterol*. 2009 Feb 21; 15(7):817-28.
46. Groen A, Romero MR, Kunne C, Hoosdally SJ, Dixon PH, Wooding C, Williamson C, Seppen J, Van den Oever K, Mok KS, Paulusma CC, Linton KJ, Oude Elferink RP. Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1927–1937.

47. Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, Hobbs HH. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest.* 2002;110(5):659-69.
48. Patel SB, Salen G, Hidaka H, Kwiterovich PO, Stalenhoef AF, Miettinen TA, Grundy SM, Lee MH, Rubenstein JS, Polymeropoulos MH, Brownstein MJ. Mapping a gene involved in regulating dietary cholesterol absorption. The sitosterolemia locus is found at chromosome 2p21. *J Clin Invest.* 1998;102(5):1041-4.
49. Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, LeSage G. Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol.* 2006;12(22):3553-3563.
50. Xiao L, Pan G. An important intestinal transporter that regulates the enterohepatic circulation of bile acids and cholesterol homeostasis: The apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2/ASBT). *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2017;41(5):509-515.
51. Shneider BL. Intestinal bile acid transport: Biology, physiology, and pathophysiology. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 2001;32(4):407-417.
52. Halilbasic E., Claudel T., Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *Journal of Hepatology.* 2013;58(1):155-168.
53. Claudel T, Zollner G, Wagner M, Trauner M. Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2011;1812(8):867-878.
54. Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA. The role of FXR in disorders of bile acid homeostasis. *Physiology Journal.* 2008;23(5):286-295.
55. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Molecular Cell.* 2000;6(3):517-526.
56. Plass JR, Mol O, Heegsma J, Geuken M, Faber KN, Jansen PL, Müller M. Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology.* 2002;35(3):589-596.
57. Wagner M, Zollner G, Trauner M. Nuclear receptor regulation of the adaptive response of bile acid transporters in cholestasis. *Seminars in Liver Disease.* 2010;30(2):160-177.
58. Zollner G, Trauner M. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis.* 2008;12(1):1-vii.
59. Fickert P, Wagner M. Biliary bile acids in hepatobiliary injury - what is the link? *J Hepatol.* 2017;67(3):619-631.
60. Woolbright BL, Jaeschke H. Novel insight into mechanisms of cholestatic liver injury. *World J Gastroenterol.* 2012;18(36):4985-4993.
61. Shapiro SM. Definition of the clinical spectrum of kernicterus and bilirubin-induced neurologic dysfunction (BIND). *J Perinatol.* 2005;25(1):54-9. Review.
62. Shapiro SM. Chronic bilirubin encephalopathy: diagnosis and outcome. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15(3):157-63. Review.
63. Schiff D, Chan G, Poznansky MJ: Bilirubin toxicity in neural cell lines N115 and NBR10A. *Pediatr Res.* 1985; 19(9):908-11.
64. Mustafa MG, Cowger ML, Kind TE: Effects of bilirubin on mitochondrial reactions. *J Biol Chem.* 1969; 244(23): 6403-14.
65. Greenfield S, Nandi Majumdar AP: Bilirubin encephalopathy. Effect on protein synthesis in the brain of the Gunn rat. *J Neurol Sci.* 1974; 22(1):83-9.
66. Katoh R, Kashiwamata S, Niwa F: Studies on cellular toxicity of bilirubin. Effect on the carbohydrate metabolism in the young rat brain. *Brain Res.* 1975; 83(1):81-92.
67. Falcão AS, Silva RF, Pancadas S, Fernandes A, Brito MA, Brites D. Apoptosis and impairment of neurite network by short exposure of immature rat cortical neurons to unconjugated bilirubin increase with cell differentiation and are additionally enhanced by an inflammatory stimulus. *J Neurosci Res.* 2007a;85(6):1229-39.
68. Brites D. Bilirubin injury to neurons and glial cells: new players, novel targets, and newer insights. *Semin Perinatol.* 2011;35(3):114-20. Review.
69. Vaz AR, Delgado-Esteban M, Brito MA, Bolaños JP, Brites D, Almeida A. Bilirubin selectively inhibits cytochrome c oxidase activity and induces apoptosis in immature cortical neurons: assessment of the protective effects of glycochenodeoxycholic acid. *J Neurochem.* 2010;112(1):56-65.
70. Vitek L. Poruchy metabolismu bilirubinu. In: Bilirubin a interní choroby: Význam pro kliniku a praxi. 1. ed., Grada Publishing, 2009, pp. 29-36.
71. Dubin IN, Johnson FB. Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. *Medicine (Baltimore).* 1954;33:155-197.

72. Sprinz H, Nelson RS. Persistent non-hemolytic hyperbilirubinemia associated with lipochrome-like pigment in liver cells: report of four cases. *Ann Intern Med.* 1954;41:952-962.
73. Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, Oude Elferink RP. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 1997;25:1539-1542.
74. Toh S, Wada M, Uchiumi T, Inokuchi A, Makino Y, Horie Y, Adachi Y, Sakisaka S, Kuwano M. Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am J Hum Genet.* 1999;64:739-746.
75. Shani M, Seligsohn U, Gilon E, Sheba C, Adam A. Dubin-Johnson syndrome in Israel. I. Clinical, laboratory, and genetic aspects of 101 cases. *Q J Med.* 1970;39:549-567.
76. Erlinger S, Dhumeaux D, Desjeux JF, Benhamou JP. Hepatic handling of unconjugated dyes in the Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology.* 1973;64:106-110.
77. Swartz HM, Chen K, Roth JA. Further evidence that the pigment in the Dubin-Johnson syndrome is not melanin. *Pigment Cell Res.* 1987;1:69-75.
78. Hunter FM, Sparks RD, Flinner RL. Hepatitis with resulting mobilization of hepatic pigment in a patient with dubin-johnson syndrome. *Gastroenterology.* 1964;47:631-635.
79. Watanabe S, Nishioka M, Kodama T, Ando K, Numa Y, Fukumoto Y, Okita K, Takemoto T, Mizuta M. Clinicopathological studies of the Dubin-Johnson syndrome complicated with chronic hepatitis. *Gastroenterol Jpn.* 1982;17:576-584.
80. Keitel V, Nies AT, Brom M, Hummel-Eisenbeiss J, Spring H, Keppler D. A common Dubin-Johnson syndrome mutation impairs protein maturation and transport activity of MRP2 (ABCC2). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(1):G165-G174.
81. Pedersen JM, Matsson P, Bergström CA, Norinder U, Hoogstraate J, Artursson P. Prediction and identification of drug interactions with the human ATP-binding cassette transporter multidrug-resistance associated protein 2 (MRP2; ABCC2). *J Med Chem.* 2008;51:3275-3287.
82. Hulot JS, Villard E, Maguy A, Morel V, Mir L, Tostivint I, William-Faltaos D, Fernandez C, Hatem S, Deray G. A mutation in the drug transporter gene ABCC2 associated with impaired methotrexate elimination. *Pharmacogenet Genomics.* 2005;15:277-285.
83. Rotor B, Manahan L, Florentin A. Familial non-hemolytic jaundice with direct van den Bergh reaction. *Acta medica Philippina.* 1948;5:37-49.
84. Wolkoff AW, Wolpert E, Pascasio FN, Arias IM. Rotor's syndrome. A distinct inheritable pathophysiologic entity. *Am J Med.* 1976;60:173-179.
85. Wolpert E, Pascasio FM, Wolkoff AW, Arias IM. Abnormal sulfobromophthalein metabolism in Rotor's syndrome and obligate heterozygotes. *N Engl J Med.* 1977;296:1099-1101.
86. Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol.* 2009;158:693-705.
87. Sugatani J, Yamakawa K, Yoshinari K, Machida T, Takagi H, Mori M, Kakizaki S, Sueyoshi T, Negishi M, Miwa M. Identification of a defect in the UGT1A1 gene promoter and its association with hyperbilirubinemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292:492-497.
88. Sugatani J, Kojima H, Ueda A, Kakizaki S, Yoshinari K, Gong QH, Owens IS, Negishi M, Sueyoshi T. The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CA-R. *Hepatology.* 2001;33:1232-1238.
89. Crigler JF, Najjar VA. Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics.* 1952;10:169-180.
90. Jansen PL. Diagnosis and management of Crigler-Najjar syndrome. *Eur J Pediatr.* 1999;158 Suppl 2:S89-S94.
91. Strauss KA, Ahlfors CE, Soltys K, Mazareigos GV, Young M, Bowser LE, Fox MD, Squires JE, McKiernan P, Brigatti KW, Puffenberger EG, Carson VJ, Vreman HJ. Crigler-Najjar Syndrome Type 1: Pathophysiology, Natural History, and Therapeutic Frontier. *Hepatology.* 2020;71(6):1923-1939.
92. Ritter JK, Yeatman MT, Ferreira P, Owens IS. Identification of a genetic alteration in the code for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in the UGT1 gene complex of a Crigler-Najjar type I patient. *J Clin Invest.* 1992;90:150-155.
93. Servedio V, d'Apolito M, Maiorano N, Minuti B, Torricelli F, Ronchi F, Zancan L, Perrotta S, Vajro P, Boschetto L, Iolascon A. Spectrum of UGT1A1 mutations in Crigler-Najjar (CN) syndrome patients: identification of twelve novel alleles and genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat.* 2005;25(3):325.
94. Al-Shurafa HA, Bassas AF, Broering DC, Rogiers XG, Wali SH, Burdelski MM. Management of Crigler-Najjar Syndrome type I. *Saudi Med J.* 2001;22(6):486-489.
95. Ebrahimi A, Rahim F. Crigler-Najjar Syndrome: Current Perspectives and the Application of Clinical Genetics. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2018;18(3):201-211.

96. Arias IM. Chronic unconjugated hyperbilirubinemia without overt signs of hemolysis in adolescents and adults. *J Clin Invest.* 1962;41:2233-2245.
97. Seppen J, Bosma PJ, Goldhoorn BG, Bakker CT, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PL, Oude Elferink RP. Discrimination between Crigler-Najjar type I and II by expression of mutant bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase. *J Clin Invest.* 1994;94:2385-2391.
98. Gollan JL, Huang SN, Billing B, Sherlock S. Prolonged survival in three brothers with severe type 2 Crigler-Najjar syndrome. Ultrastructural and metabolic studies. *Gastroenterology.* 1975;68:1543-1555.
99. Hunter JO, Thompson RP, Dunn PM, Williams R. Inheritance of type 2 Crigler-Najjar hyperbilirubinaemia. *Gut.* 1973;14:46-49.
100. Ranjan P, Kohli S, Saxena R, Thakur S. Mutation Analysis in Crigler-Najjar Syndrome Type II-Case Report and Literature Review. *J Clin Exp Hepatol.* 2011;1(3):204-206.
101. Gilbert A, Lereboullet P. La cholemie simple familiale. *Semaine Medicale.* 1901;21:241-243.
102. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, Lindhout D, Tytgat GN, Jansen PL, Oude Elferink RP. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med.* 1995;333:1171-1175.
103. Burchell B, Hume R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999;14:960-966.
104. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:8170-8174.
105. Ki CS, Lee KA, Lee SY, Kim HJ, Cho SS, Park JH, Cho S, Sohn KM, Kim JW. Haplotype structure of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene and its relationship to serum total bilirubin concentration in a male Korean population. *Clin Chem.* 2003;49:2078-2081.
106. Nixon JC, Monahan GJ. Gilbert's disease and the bilirubin tolerance test. *Canad. Med. Assoc. J.* 1967; 96: 370-373.
107. Thomsen HF, Hardt F, Juhl E. Diagnosis of Gilbert's syndrome. Reliability of the caloric restriction and phenobarbital stimulation tests. *Scand J Gastroenterol.* 1981;16:699-703.
108. Barth RF, Grimley PM, Berk PD, Bloomer JR, Howe RB. Excess lipofuscin accumulation in constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's syndrome). Light and electron microscopic observations. *Arch Pathol.* 1971;91:41-47.
109. Dawson J, Seymour CA, Peters TJ. Gilbert's syndrome: analytical subcellular fractionation of liver biopsy specimens. Enzyme activities, organelle pathology and evidence for subpopulations of the syndrome. *Clin Sci (Lond).* 1979;57:491-497.
110. Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Sawa H, Shimada M. Prolonged unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast milk and mutations of the bilirubin uridine diphosphate- glucuronosyltransferase gene. *Pediatrics.* 2000;106:E59.
111. Maruo Y, Iwai M, Mori A, Sato H, Takeuchi Y. Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase and drug metabolism. *Curr Drug Metab.* 2005;6:91-99.
112. Rotger M, Taffe P, Bleiber G, Gunthard HF, Furrer H, Vernazza P, Drechsler H, Bernasconi E, Rickenbach M, Telenti A. Gilbert syndrome and the development of antiretroviral therapy-associated hyperbilirubinemia. *J Infect Dis.* 2005;192:1381-1386.
113. Iyer L, Das S, Janisch L, Wen M, Ramirez J, Karrison T, Fleming GF, Vokes EE, Schilsky RL, Ratain MJ. UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J.* 2002;2:43-47.
114. Cebecauerova D, Jirasek T, Budisova L, Mandys V, Volf V, Novotna Z, Subhanova I, Hrebicek M, Elleder M, Jirsa M. Dual hereditary jaundice: simultaneous occurrence of mutations causing Gilbert's and Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology.* 2005;129:315-320.
115. Slachtova L, Seda O, Behunova J, Mistrik M, Martasek P. Genetic and biochemical study of dual hereditary jaundice: Dubin-Johnson and Gilbert's syndromes. Haplotyping and founder effect of deletion in ABCC2. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(10):1515.
116. Carlton V. E. H., Pawlikowska L., Bull L. N. Molecular basis of intrahepatic cholestasis. *Annals of Medicine.* 2004;36(8):606-617.
117. Bull LN, Thompson RJ. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Clin Liver Dis.* 2018;22(4):657-669.
118. Vitale G, Gitto S, Vukotic R, Raimondi F, Andreone P. Familial intrahepatic cholestasis: New and wide perspectives. *Dig Liver Dis.* 2019;51(7):922-933.
119. van der Woerd WL, Houwen RH, van de Graaf SF. Current and future therapies for inherited cholestatic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2017; 23(5): 763-775.
120. Clayton RJ, Iber FL, Ruebner BH, McKusick VA. Byler Disease: Fatal Familial Intrahepatic Cholestasis in an Amish Kindred. *Am J Dis Child.* 1969;117(1):112-124.

121. Van Mil S. W. C., Klomp L. W. J., Bull L. N., Houwen R. H. J. FIC1 disease: A spectrum of intrahepatic cholestatic disorders. *Seminars in Liver Disease*. 2001;21(4):535–544.
122. Miyahawa-Hayashino A., Egawa H., Yorifuji T., et al. Allograft steatohepatitis in progressive familial intrahepatic cholestasis type 1 after living donor liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2009;15(6):610–618.
123. Nicastro E, Stephenne X, Smets F, Fusaro F, de Magnée C, Reding R, Sokal EM. Recovery of graft steatosis and protein-losing enteropathy after biliary diversion in a PFIC 1 liver transplanted child. *Pediatric Transplantation*. 2012;16(5):E177–E182.
124. Davit-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, et al. ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology*. 2010;51(5):1645-1655.
125. Bull L, van Eijk MJ, Pawlikowska L, DeYoung JA, Juijn JA, Liao M, Klomp LW, Lomri N, Berger R, Scharschmidt BF, Knisely AS, Houwen RH, Freimer NB. A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nature Genetics*. 1998;18(3):219–224.
126. Klomp LW, Vargas JC, van Mil SW, Pawlikowska L, Strautnieks SS, van Eijk MJ, Juijn JA, Pabón-Peña C, Smith LB, DeYoung JA, Byrne JA, Gombert J, van der Brugge G, Berger R, Jankowska I, Pawlowska J, Villa E, Knisely AS, Thompson RJ, Freimer NB, Houwen RH, Bull LN. Characterization of mutations in ATP8B1 associated with hereditary cholestasis. *Hepatology*. 2004;40(1):27–38.
127. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nature Genetics*. 1998;20(3):233–238.
128. Knisely AS, Strautnieks SS, Meier Y, Stieger B, Byrne JA, Portmann BC, Bull LN, Pawlikowska L, Bilezikçi B, Ozçay F, László A, Tiszlavicz L, Moore L, Raftos J, Arnell H, Fischler B, Németh A, Papadogiannakis N, Cielecka-Kuszyk J, Jankowska I, Pawłowska J, Melín-Aldana H, Emerick KM, Whittington PF, Mieli-Vergani G, Thompson RJ. Hepatocellular carcinoma in ten children under five years of age with bile salt export pump deficiency. *Hepatology*. 2006;44(2):478–486.
129. Scheimann AO, Strautnieks SS, Knisely AS, Byrne JA, Thompson RJ, Finegold MJ. Mutations in Bile Salt Export Pump (ABCB11) in Two Children with Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis and Cholangiocarcinoma. *Journal of Pediatrics*. 2007;150(5):556–559.
130. Evason K, Bove KE, Finegold MJ, Knisely AS, Rhee S, Rosenthal P, Miethke AG, Karpen SJ, Ferrell LD, Kim GE. Morphologic findings in progressive familial intrahepatic cholestasis 2 (PFIC2): Correlation with genetic and immunohistochemical studies. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2011;35(5):687–696.
131. Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2012;36(supplement 1):S26–S35.
132. Jara P, Hierro L, Martínez-Fernández P, Alvarez-Doorno R, Yáñez F, Diaz MC, Camarena C, De la Vega A, Frauca E, Muñoz-Bartolo G, López-Santamaría M, Larrauri J, Alvarez L. Recurrence of bile salt export pump deficiency after liver transplantation. *The New England Journal of Medicine*. 2009;361(14):1359–1367.
133. Stindt J, Kluge S, Dröge C, Keitel V, Stross C, Baumann U, Brinkert F, Dhawan A, Engelmann G, Ganschow R, Gerner P, Grabhorn E, Knisely AS, Noli KA, Pukite I, Shepherd RW, Ueno T, Schmitt L, Wiek C, Hanenberg H, Häussinger D, Kubitz R. Bile salt export pump-reactive antibodies form a polyclonal, multi-inhibitory response in antibody-induced bile salt export pump deficiency. *Hepatology*. 2016;63(2):524–537.
134. Kubitz R, Dröge C, Kluge S, Stindt J, Stross C, Häussinger D, Flechtenmacher C, Wenning D, Teufel U, Schmitt CP, Engelmann G. High affinity anti-BSEP antibodies after liver transplantation for PFIC-2 - Successful treatment with immunoadsorption and B-cell depletion. *Pediatr Transplant*. 2016;20(7):987-993.
135. de Vree JML, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, Deleuze JF, Desrochers M, Burdelski M, Bernard O, Oude Elferink RPJ, Hadchouel M. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(1):282–287.
136. Jacquemin E, De Vree JM, Cresteil D, Sokal EM, Sturm E, Dumont M, Scheffer GL, Paul M, Burdelski M, Bosma PJ, Bernard O, Hadchouel M, Elferink RP. The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology*. 2001;120(6):1448–1458.
137. Wendum D, Barbu V, Rosmorduc O, Arrivé L., Fléjou JF, Poupon R. Aspects of liver pathology in adult patients with MDR3/ABCB4 gene mutations. *Virchows Archiv*. 2012;460(3):291–298.
138. Schatz SB, Jüngst C, Keitel-Anselmo V, Kubitz R, Becker C, Gerner P, Pfister ED, Goldschmidt I, Junge N, Wenning D, Gehring S, Arens S, Bretschneider D, Grothues D, Engelmann G, Lammert F, Baumann U.

- Phenotypic spectrum and diagnostic pitfalls of ABCB4 deficiency depending on age of onset. *Hepatol Commun.* 2018;2(5):504-514.
139. Reichert MC, Lammert F. ABCB4 Gene Aberrations in Human Liver Disease: An Evolving Spectrum. *Semin Liver Dis.* 2018;38(4):299-307.
 140. Shneider BL. ABCB4 Disease Presenting with Cirrhosis and Copper Overload-Potential Confusion with Wilson Disease. *J Clin Exp Hepatol.* 2011;1(2):115-117.
 141. Boga S, Jain D, Schilsky ML. Presentation of progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 mimicking wilson disease: molecular genetic diagnosis and response to treatment. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition.* 2015;18(3):p. 202.
 142. Sambrotta M, Strautnieks S, Papouli E, Rushton P, Clark BE, Parry DA, Logan CV, Newbury LJ, Kamath BM, Ling S, Grammatikopoulos T, Wagner BE, Magee JC, Sokol RJ, Mieli-Vergani G; University of Washington Center for Mendelian Genomics, Smith JD, Johnson CA, McClean P, Simpson MA, Knisely AS, Bull LN, Thompson RJ. Mutations in TJP2 cause progressive cholestatic liver disease. *Nature Genetics.* 2014;46(4):326-328.
 143. Sambrotta M, Thompson RJ. Mutations in TJP2, encoding zona occludens 2, and liver disease. *Tissue Barriers.* 2015;3(3)
 144. Zhou S, Hertel PM, Finegold MJ, Wang L, Kerkar N, Wang J, Wong LJ, Plon SE, Sambrotta M, Foskett P, Niu Z, Thompson RJ, Knisely AS. Hepatocellular carcinoma associated with tight-junction protein 2 deficiency. *Hepatology.* 2015;62(6):1914-1916.
 145. Carlton VE, Harris BZ, Puffenberger EG, Batta AK, Knisely AS, Robinson DL, Strauss KA, Shneider BL, Lim WA, Salen G, Morton DH, Bull LN. Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nature Genetics.* 2003;34(1):91-96.
 146. Gomez-Ospina N, Potter CJ, Xiao R, Manickam K, Kim MS, Kim KH, Shneider BL, Picarsic JL, Jacobson TA, Zhang J, He W, Liu P, Knisely AS, Finegold MJ, Muzny DM, Boerwinkle E, Lupski JR, Plon SE, Gibbs RA, Eng CM, Yang Y, Washington GC, Porteus MH, Berquist WE, Kambham N, Singh RJ, Xia F, Enns GM, Moore DD. Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nature Communications.* 2016;7.
 147. Cariello M, Piccinin E, Garcia-Irigoyen O, Sabbà C, Moschetta A. Nuclear receptor FXR, bile acids and liver damage: Introducing the progressive familial intrahepatic cholestasis with FXR mutations. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(4 Pt B):1308-1318.
 148. Koutsounas I, Theocharis S, Delladetsima I, Patsouris E, Giaginis C. Farnesoid x receptor in human metabolism and disease: the interplay between gene polymorphisms, clinical phenotypes and disease susceptibility. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 2015;11(4):523-532.
 149. van Mil SWC, Milona A, Dixon PH, Mullenbach R, Geenes VL, Chambers J, Shevchuk V, Moore GE, Lammert F, Glantz AG, Mattsson LA, Whittaker J, Parker MG, White R, Williamson C. Functional Variants of the Central Bile Acid Sensor FXR Identified in Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Gastroenterology.* 2007;133(2):507-516.
 150. Gonzales E, Taylor SA, Davit-Spraul A, Thébaut A, Thomassin N, Guettier C, Whittington PF, Jacquemin E. MYO5B mutations cause cholestasis with normal serum gamma-glutamyl transferase activity in children without microvillous inclusion disease. *Hepatology.* 2017;65(1):164-173.
 151. Cockar I, Foskett P, Strautnieks S, Clinch Y, Fustok J, Rahman O, Sutton H, Mtegha M, Fessatou S, Kontaki E, Papaevangelou V, Deheragoda M, Thompson RJ, Grammatikopoulos T. Mutations in Myosin 5B (MYO5B) in Children with Early Onset Cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2020;10.1097/MPG.0000000000002740.
 152. Overeem AW, Li Q, Qiu YL, Cartón-García F, Leng C, Klappe K, Dronkers J, Hsiao NH, Wang JS, Arango D, van Ijzendoorn SCD. A Molecular Mechanism Underlying Genotype-Specific Intrahepatic Cholestasis Resulting From MYO5B Mutations. *Hepatology.* 2019;10.1002/hep.31002.
 153. Girard M, Lacaille F, Verkare V, Mategot R, Feldmann G, Grodet A, Sauvat F, Irtan S, Davit-Spraul A, Jacquemin E, Ruemmele F, Rainteau D, Goulet O, Colomb V, Chardot C, Henrion-Caude A, Debray D. MYO5B and bile salt export pump contribute to cholestatic liver disorder in microvillous inclusion disease. *Hepatology.* 2014;60(1):301-310.
 154. Maddirevula S, Alhebbi H, Alqahtani A, Algoufi T, Alsaif HS, Ibrahim N, Abdulwahab F, Barr M, Alzaidan H, Almehaideb A, AlSasi O, Alhashem A, Hussaini HA, Wali S, Alkuraya FS. Identification of novel loci for pediatric cholestatic liver disease defined by KIF12, PPM1F, USP53, LSR, and WDR83OS pathogenic variants. *Genet Med.* 2019;21(5):1164-1172.
 155. Zhang J, Yang Y, Gong JY, Li LT, Li JQ, Zhang MH, Lu Y, Xie XB, Hong YR, Yu Z, Knisely AS, Wang JS. Low-GGT intrahepatic cholestasis associated with biallelic USP53 variants: Clinical, histological and ultrastructural characterization. *Liver Int.* 2020;40(5):1142-1150.

156. van Mil SWC, van der Woerd WL, van der Brugge G, Sturm E, Jansen PL, Bull LN, van den Berg IE, Berger R, Houwen RH, Klomp LW. Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11. *Gastroenterology*. 2004;127(2):379–384.
157. Van Ooteghem NAM., Klomp LWJ, Van Berge-Henegouwen GP, Houwen RHJ. Benign recurrent intrahepatic cholestasis progressing to progressive familial intrahepatic cholestasis: Low GGT cholestasis is a clinical continuum. *Journal of Hepatology*. 2002;36(3):439–443.
158. Balsells F, Wyllie R, Steffen R, Kay M. Benign recurrent intrahepatic cholestasis: Improvement of pruritus and shortening of the symptomatic phase with rifampin therapy: A case report. *Clinical Pediatrics*. 1997;36(8):483–485.
159. Stapelbroek JM, van Erpecum KJ, Klomp LW, Venneman NG, Schwartz TP, van Berge Henegouwen GP, Devlin J, van Nieuwkerk CM, Knisely AS, Houwen RH. Nasobiliary drainage induces long-lasting remission in benign recurrent intrahepatic cholestasis. *Hepatology*. 2006;43(1):51–53.
160. Hadžić N, Bull LN, Clayton PT, Knisely AS. Diagnosis in bile acid-CoA: amino acid N-acyltransferase deficiency. *World J Gastroenterol*. 2012;18(25):3322–3326.
161. Roehlen N, Roca Suarez AA, El Saghire H, Saviano A, Schuster C, Lupberger J, Baumert TF. Tight Junction Proteins and the Biology of Hepatobiliary Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):825. Published 2020.
162. Chong CP, Mills PB, McClean P, Gissen P, Bruce C, Stahlshmidt J, Knisely AS, Clayton PT. Bile acid-CoA ligase deficiency—a new inborn error of bile acid metabolism. *J Inherit Metab Dis*. 2012;35(3):521–530.
163. Zhu QS, Xing W, Qian B, von Dippe P, Shneider BL, Fox VL, Levy D. Inhibition of human m-epoxide hydrolase gene expression in a case of hypercholanemia. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1638(3):208–216.
164. Gissen P, Tee L, Johnson CA, Genin E, Caliebe A, Chitayat D, Clericuzio C, Denecke J, Di Rocco M, Fischler B, FitzPatrick D, García-Cazorla A, Guyot D, Jacquemont S, Koletzko S, Leheup B, Mandel H, Sanseverino MT, Houwen RH, McKiernan PJ, Kelly DA, Maher ER. Clinical and molecular genetic features of ARC syndrome. *Hum Genet*. 2006;120(3):396–409.
165. Di Rocco M, Callea F, Pollice B, Faraci M, Campiani F, Borrone C. Arthrogyrosis, renal dysfunction and cholestasis syndrome: report of five patients from three Italian families. *Eur J Pediatr*. 1995;154(10):835–839.
166. Gissen P, Johnson CA, Morgan NV, Stapelbroek JM, Forsheve T, Cooper WN, McKiernan PJ, Klomp LW, Morris AA, Wraith JE, McClean P, Lynch SA, Thompson RJ, Lo B, Quarrell OW, Di Rocco M, Trembath RC, Mandel H, Wali S, Karet FE, Knisely AS, Houwen RH, Kelly DA, Maher ER. Mutations in VPS33B, encoding a regulator of SNARE-dependent membrane fusion, cause arthrogyrosis-renal dysfunction-cholestasis (ARC) syndrome. *Nat Genet*. 2004;36(4):400–404.
167. Cullinane AR, Straatman-Iwanowska A, Zaucker A, Wakabayashi Y, Bruce CK, Luo G, Rahman F, Gürakan F, Utine E, Ozkan TB, Denecke J, Vukovic J, Di Rocco M, Mandel H, Cangul H, Matthews RP, Thomas SG, Rappoport JZ, Arias IM, Wolburg H, Knisely AS, Kelly DA, Müller F, Maher ER, Gissen P. Mutations in VIPAR cause an arthrogyrosis, renal dysfunction and cholestasis syndrome phenotype with defects in epithelial polarization [published correction appears in *Nat Genet*. 2011 Mar;43(3):277]. *Nat Genet*. 2010;42(4):303–312.
168. Mauad TH, van Nieuwkerk CM, Dingemans KP, Smit JJ, Schinkel AH, Notenboom RG, van den Bergh Weerman MA, Verkruijsen RP, Groen AK, Oude Elferink RP, et al. Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol*. 1994;145(5):1237–1245.
169. Gotthardt D, Runz H, Keitel V, Fischer C, Flechtenmacher C, Wirtenberger M, Weiss KH, Imparato S, Braun A, Hemminki K, Stremmel W, Rüschemdorf F, Stiehl A, Kubitz R, Burwinkel B, Schirmacher P, Knisely AS, Zschocke J, Sauer P. A mutation in the canalicular phospholipid transporter gene, ABCB4, is associated with cholestasis, ductopenia, and cirrhosis in adults. *Hepatology*. 2008;48(4):1157–1166.
170. Rosmorduc O., Poupon R. Low phospholipid associated cholelithiasis: association with mutation in the *MDR3/ABCB4* gene. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2007;2, article 29
171. Vij M, Valampampil J, Shanmugum N, Reddy SM, Rajindrajith S, Rela M. Paucity of Interlobular Bile Ducts in Multidrug-Resistant P-Glycoprotein 3 (MDR3) Deficiency. *Int J Surg Pathol*. 2019;27(3):343–347.
172. Drouin E, Russo P, Tuchweber B, Mitchell G, Rasquin-Weber A. North American Indian cirrhosis in children: a review of 30 cases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;31(4):395–404.
173. Chagnon P, Michaud J, Mitchell G, Mercier J, Marion JF, Drouin E, Rasquin-Weber A, Hudson TJ, Richter A. A missense mutation (R565W) in cirhin (FLJ14728) in North American Indian childhood cirrhosis. *Am J Hum Genet*. 2002;71(6):1443–1449.
174. Baala L, Hadj-Rabia S, Hamel-Teillac D, Hadchouel M, Prost C, Leal SM, Jacquemin E, Sefiani A, De Prost Y, Courtois G, Munnich A, Lyonnet S, Vabres P. Homozygosity mapping of a locus for a novel syndromic ichthyosis to chromosome 3q27–q28. *J Invest Dermatol*. 2002;119(1):70–76.

175. Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, Lyonnet S, De Prost Y, Munnich A, Hadchouel M, Smahi A. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease [published correction appears in *Gastroenterology*. 2005 Feb;128(2):524]. *Gastroenterology*. 2004;127(5):1386-1390.
176. Grosse B, Cassio D, Yousef N, Bernardo C, Jacquemin E, Gonzales E. Claudin-1 involved in neonatal ichthyosis sclerosing cholangitis syndrome regulates hepatic paracellular permeability. *Hepatology*. 2012;55(4):1249-1259.
177. Girard M, Bizet AA, Lachaux A, Gonzales E, Filhol E, Collardeau-Frachon S, Jeanpierre C, Henry C, Fabre M, Viremouneix L, Galmiche L, Debray D, Bole-Feysot C, Nitschke P, Pariente D, Guettier C, Lyonnet S, Heidet L, Bertholet A, Jacquemin E, Henrion-Caude A, Saunier S. DCDC2 Mutations Cause Neonatal Sclerosing Cholangitis. *Hum Mutat*. 2016;37(10):1025-1029.
178. Grammatikopoulos T, Sambrotta M, Strautnieks S, Foskett P, Knisely AS, Wagner B, Deheragoda M, Starling C, Mieli-Vergani G, Smith J; University of Washington Center for Mendelian Genomics, Bull L, Thompson RJ. Mutations in DCDC2 (doublecortin domain containing protein 2) in neonatal sclerosing cholangitis. *J Hepatol*. 2016;65(6):1179-1187.
179. Perlmutter DH. Alpha-1-antitrypsin deficiency: diagnosis and treatment. *Clin Liver Dis*. 2004;8(4):839-ix.
180. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. 2005;365(9478):2225-2236.
181. Perlmutter DH, Brodsky JL, Balistreri WF, Trapnell BC. Molecular pathogenesis of alpha-1-antitrypsin deficiency-associated liver disease: a meeting review. *Hepatology*. 2007;45(5):1313-1323.
182. Patel D, Teckman JH. Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Liver Disease. *Clin Liver Dis*. 2018;22(4):643-655.
183. Antoury C, Lopez R, Zein N, Stoller JK, Alkhouri N. Alpha-1 antitrypsin deficiency and the risk of hepatocellular carcinoma in end-stage liver disease. *World J Hepatol*. 2015;7(10):1427-1432.
184. Comba A, Demirbaş F, Çaltepe G, Eren E, Kalayci AG. Retrospective analysis of children with α -1 antitrypsin deficiency. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2018;30(7):774-778.
185. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA [published correction appears in *Science* 1989 Sep 29;245(4925):1437]. *Science*. 1989;245(4922):1066-1073.
186. Boëlle PY, Debray D, Guillot L, Corvol H; French CF Modifier Gene Study Investigators. SERPINA1 Z allele is associated with cystic fibrosis liver disease. *Genet Med*. 2019;21(9):2151-2155.
187. Sakiani S, Kleiner DE, Heller T, Koh C. Hepatic Manifestations of Cystic Fibrosis. *Clin Liver Dis*. 2019;23(2):263-277.
188. Mitchell E, Gilbert M, Loomes KM. Alagille Syndrome. *Clin Liver Dis*. 2018;22(4):625-641.
189. Spinner NB, Colliton RP, Crosnier C, Krantz ID, Hadchouel M, Meunier-Rotival M. Jagged1 mutations in alagille syndrome. *Hum Mutat*. 2001;17(1):18-33.
190. McDaniel R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, et al. NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet*. 2006;79(1):169-173.
191. Haas D, Gan-Schreier H, Langhans CD, et al. Differential diagnosis in patients with suspected bile acid synthesis defects. *World J Gastroenterol*. 2012;18(10):1067-1076.
192. Heubi JE, Setchell KDR, Bove KE. Inborn Errors of Bile Acid Metabolism. *Clin Liver Dis*. 2018;22(4):671-687.
193. Schwarz M, Wright AC, Davis DL, Nazer H, Björkhem I, Russell DW. The bile acid synthetic gene 3beta-hydroxy-Delta(5)-C(27)-steroid oxidoreductase is mutated in progressive intrahepatic cholestasis. *J Clin Invest*. 2000;106(9):1175-1184.
194. Cheng JB, Jacquemin E, Gerhardt M, Nazer H, Cresteil D, Heubi JE, Setchell KD, Russell DW. Molecular genetics of 3beta-hydroxy-Delta5-C27-steroid oxidoreductase deficiency in 16 patients with loss of bile acid synthesis and liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(4):1833-1841.
195. Setchell KD, Suchy FJ, Welsh MB, Zimmer-Nechemias L, Heubi J, Balistreri WF. Delta 4-3-oxosteroid 5 beta-reductase deficiency described in identical twins with neonatal hepatitis. A new inborn error in bile acid synthesis. *J Clin Invest*. 1988;82(6):2148-2157.
196. Lemonde HA, Custard EJ, Bouquet J, et al. Mutations in SRD5B1 (AKR1D1), the gene encoding delta(4)-3-oxosteroid 5beta-reductase, in hepatitis and liver failure in infancy. *Gut*. 2003;52(10):1494-1499.
197. Sumazaki R, Nakamura N, Shoda J, Kurosawa T, Tohma M. Gene analysis in delta 4-3-oxosteroid 5 beta-reductase deficiency. *Lancet*. 1997;349(9048):329.
198. Setchell KD, Schwarz M, O'Connell NC, et al. Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7alpha-hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. *J Clin Invest*. 1998;102(9):1690-1703.
199. Dai D, Mills PB, Footitt E, Gissen P, McClean P, Stahlschmidt J, Coupry I, Lavie J, Mochel F, Goizet C, Mizuochi T, Kimura A, Nittono H, Schwarz K, Crick PJ, Wang Y, Griffiths WJ, Clayton PT. Liver disease

- in infancy caused by oxysterol 7 α -hydroxylase deficiency: successful treatment with chenodeoxycholic acid. *J Inherit Metab Dis*. 2014;37(5):851-861.
200. Menkes JH, Schimschock JR, Swanson PD. Cerebrotendinous xanthomatosis. The storage of cholestanol within the nervous system. *Arch Neurol*. 1968;19(1):47-53.
 201. Cali JJ, Hsieh CL, Francke U, Russell DW. Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis. *J Biol Chem*. 1991;266(12):7779-7783.
 202. Clayton PT, Verrips A, Sijm AM, Mann A, Mieli-Vergani G, Wevers R. Mutations in the sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A) cause hepatitis of infancy as well as cerebrotendinous xanthomatosis. *J Inherit Metab Dis*. 2002;25(6):501-513.
 203. Gong JY, Setchell KDR, Zhao J, Zhang W, Wolfe B, Lu Y, Lackner K, Knisely AS, Wang NL, Hao CZ, Zhang MH, Wang JS. Severe Neonatal Cholestasis in Cerebrotendinous Xanthomatosis: Genetics, Immunostaining, Mass Spectrometry. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;65(5):561-568.
 204. Gudbjartsson DF, Helgason H, Gudjonsson SA, et al. Large-scale whole-genome sequencing of the Icelandic population. *Nat Genet*. 2015;47(5):435-444.
 205. Mhatre S, Wang Z, Nagrani R, Badwe R, Chiplunkar S, Mittal B, Yadav S, Zhang H, Chung CC, Patil P, Chanock S, Dikshit R, Chatterjee N, Rajaraman P. Common genetic variation and risk of gallbladder cancer in India: a case-control genome-wide association study. *Lancet Oncol*. 2017;18(4):535-544. doi:10.1016/S1470-2045(17)30167-5
 206. Diogo D, Tian C, Franklin CS, et al. Phenome-wide association studies across large population cohorts support drug target validation. *Nat Commun*. 2018;9(1):4285.
 207. Rebholz C, Krawczyk M, Lammert F. Genetics of gallstone disease. *Eur J Clin Invest*. 2018;48(7):e12935.
 208. Weber SN, Bopp C, Krawczyk M, Lammert F. Genetics of gallstone disease revisited: updated inventory of human lithogenic genes. *Curr Opin Gastroenterol*. 2019;35(2):82-87.
 209. Lammert F., Marschall H.-U., Glantz A., Matern S. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: molecular pathogenesis, diagnosis and management. *Journal of Hepatology*. 2000;33(6):1012-1021.
 210. Dixon P. H., Williamson C. The pathophysiology of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2016;40(2):141-153.
 211. Martineau MG, Raker C, Dixon PH, Chambers J, Machirori M, King NM, Hooks ML, Manoharan R, Chen K, Powrie R, Williamson C. The metabolic profile of intrahepatic cholestasis of pregnancy is associated with impaired glucose tolerance, dyslipidemia, and increased fetal growth. *Diabetes Care*. 2015;38(2):243-248.
 212. Floreani A., Carderi I, Paternoster D, Soardo G, Azzaroli F, Esposito W, Variola A, Tommasi AM, Marchesoni D, Braghin C, Mazzella G. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Three novel MDR3 gene mutations. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2006;23(11):1649-1653.
 213. Painter JN, Savander M, Ropponen A, Nupponen N, Riikonen S, Ylikorkala O, Lehesjoki AE, Aittomäki K. Sequence variation in the ATP8B1 gene and intrahepatic cholestasis of pregnancy. *European Journal of Human Genetics*. 2005;13(4):435-439.
 214. Dixon PH, Sambrotta M, Chambers J, Taylor-Harris P, Syngelaki A, Nicolaidis K, Knisely AS, Thompson RJ, Williamson C. An expanded role for heterozygous mutations of ABCB4, ABCB11, ATP8B1, ABCC2 and TJP2 in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Sci Rep*. 2017;7(1):11823.
 215. Glantz A, Marschall HU, Lammert F, Mattsson LÅ. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: A randomized controlled trial comparing dexamethasone and ursodeoxycholic acid. *Hepatology*. 2005;42(6):1399-1405.
 216. Binder T., Salaj P., Zima T., Vitek L. Randomized prospective comparative study of ursodeoxycholic acid and S-adenosyl-L-methionine in the treatment of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Journal of Perinatal Medicine*. 2006;34(5):383-391.
 217. Zapata R., Sandoval L, Palma J, Hernández I, Ribalta J, Reyes H, Sedano M, Tohá D, Silva JJ. Ursodeoxycholic acid in the treatment of intrahepatic cholestasis of pregnancy. A 12-year experience. *Liver International*. 2005;25(3):548-554.
 218. Jetter A, Kullak-Ublick GA. Drugs and hepatic transporters: A review. *Pharmacol Res*. 2020;154:104234.
 219. SEARCH Collaborative Group, Link E, Parish S, et al. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *N Engl J Med*. 2008;359(8):789-799.
 220. Ghatak A, Faheem O, Thompson PD. The genetics of statin-induced myopathy. *Atherosclerosis*. 2010;210(2):337-343.
 221. Khamdang S, Takeda M, Shimoda M, Noshiro R, Narikawa S, Huang XL, Enomoto A, Piyachaturawat P, Endou H. Interactions of human and rat-organic anion transporters with pravastatin and cimetidine. *J Pharmacol Sci*. 2004;94(2):197-202.
 222. Mofo Mato EP, Guewo-Fokeng M, Essop MF, Owira PMO. Genetic polymorphisms of organic cation transporter 1 (OCT1) and responses to metformin therapy in individuals with type 2 diabetes: A systematic review. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(27):e11349.

223. Borst P, de Wolf C, van de Wetering K. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch*. 2007;453(5):661-673.
224. Woodhead JL, Yang K, Siler SQ, Watkins PB, Brouwer KL, Barton HA, Howell BA. Exploring BSEP inhibition-mediated toxicity with a mechanistic model of drug-induced liver injury. *Front Pharmacol*. 2014;5:240.
225. Kenna JG. Current Concepts in Drug-Induced Bile Salt Export Pump (BSEP) Interference. *Curr Protoc Toxicol*. 2014;61:23.7.1-23.7.15.
226. Ali I, Khalid S, Stieger B, Brouwer KLR. Effect of a Common Genetic Variant (p.V444A) in the Bile Salt Export Pump on the Inhibition of Bile Acid Transport by Cholestatic Medications. *Mol Pharm*. 2019;16(3):1406-1411.
227. Dietrich CG, Ottenhoff R, de Waart DR, Oude Elferink RP. Role of MRP2 and GSH in intrahepatic cycling of toxins. *Toxicology*. 2001;167(1):73-81.
228. Safar Z, Kis E, Erdo F, Zolnerciks JK, Krajcsi P. ABCG2/BCRP: variants, transporter interaction profile of substrates and inhibitors. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019;15(4):313-328.
229. Urquhart BL, Kim RB. Blood-brain barrier transporters and response to CNS-active drugs. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009;65(11):1063-1070.
230. Mahdi ZM, Synal-Hermans U, Yoker A, Locher KP, Stieger B. Role of Multidrug Resistance Protein 3 in Antifungal-Induced Cholestasis. *Mol Pharmacol*. 2016;90(1):23-34.
231. He K, Cai L, Shi Q, Liu H, Woolf TF. Inhibition of MDR3 Activity in Human Hepatocytes by Drugs Associated with Liver Injury. *Chem Res Toxicol*. 2015;28(10):1987-1990.
232. Lu W, Cheng F, Jiang J, Zhang C, Deng X, Xu Z, Zou S, Shen X, Tang Y, Huang J. FXR antagonism of NSAIDs contributes to drug-induced liver injury identified by systems pharmacology approach. *Sci Rep*. 2015;5:8114.
233. Ballet F. FXR: Big fish or small fry for drug-induced liver injury? *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2016;40(1):6-8.
234. Jacquemin E, Lykavieris P, Chaoui N, Hadchouel M, Bernard O. Transient neonatal cholestasis: origin and outcome. *J Pediatr*. 1998;133(4):563-567.
235. Champion V, Carbajal R, Lozar J, Girard I, Mitanchez D. Risk factors for developing transient neonatal cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;55(5):592-598.
236. Liu LY, Wang XH, Lu Y, Zhu QR, Wang JS. Association of variants of ABCB11 with transient neonatal cholestasis. *Pediatr Int*. 2013;55(2):138-144.
237. Beath SV, Kelly DA. Total Parenteral Nutrition-Induced Cholestasis: Prevention and Management. *Clin Liver Dis*. 2016;20(1):159-176.
238. Mitra A, Ahn J. Liver Disease in Patients on Total Parenteral Nutrition. *Clin Liver Dis*. 2017;21(4):687-695.
239. Yang XF, Liu GS, Yi B. Correlation between mutation of MDR3 gene exon 6 and parenteral nutrition-associated cholestasis of preterm infants. *Exp Ther Med*. 2014;8(5):1655-1659.
240. Yang XF, Liu GS, Li MX. Analysis of mutations of MDR3 exons 9 and 23 in infants with parenteral nutrition-associated cholestasis. *Exp Ther Med*. 2015;10(6):2361-2365.
241. Aamann L, Ørntoft N, Vogel I, Grønbaek H, Becher N, Vilstrup H, Ott P, Lildballe DL. Unexplained cholestasis in adults and adolescents: diagnostic benefit of genetic examination. *Scand J Gastroenterol*. 2018;53(3):305-311.
242. Krawczyk M, Rau M, Grünhage F, Schattenberg JM, Bantel H, Pathil A, Demir M, Kluwe J, Boettler T, Geier A, Lammert F; NAFLD Clinical Study Group (NAFLD CSG). The ABCB4 p.T175A variant as potential modulator of hepatic fibrosis in patients with chronic liver diseases: Looking beyond the cholestatic realm. *Hepatology*. 2017;66(2):666-667.
243. Yuan L, Bambha K. Bile acid receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*. 2015;7(28):2811-2818.
244. Kim SG, Kim BK, Kim K, Fang S. Bile Acid Nuclear Receptor Farnesoid X Receptor: Therapeutic Target for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2016;31(4):500-504.
245. Vilà L, Roglans N, Alegret M, Camins A, Pallàs M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC. Hypertriglyceridemia and hepatic steatosis in senescence-accelerated mouse associate to changes in lipid-related gene expression. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007;62(11):1219-1227.
246. Arab JP, Karpen SJ, Dawson PA, Arrese M, Trauner M. Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: Molecular insights and therapeutic perspectives. *Hepatology*. 2017;65(1):350-362.
247. Zhang S, Wang J, Liu Q, Harnish DC. Farnesoid X receptor agonist WAY-362450 attenuates liver inflammation and fibrosis in murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2009;51(2):380-388.
248. Iracheta-Vellve A, Calenda CD, Petrasek J, Ambade A, Kodys K, Adorini L, Szabo G. FXR and TGR5 Agonists Ameliorate Liver Injury, Steatosis, and Inflammation After Binge or Prolonged Alcohol Feeding in Mice. *Hepatol Commun*. 2018;2(11):1379-1391.

249. Bass LM, Patil D, Rao MS, Green RM, Whittington PF. Pancreatic adenocarcinoma in type 2 progressive familial intrahepatic cholestasis. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:30.
250. Dong W, Chen X, Chen P, Yue D, Zhu L, Fan Q. Inactivation of MYO5B promotes invasion and motility in gastric cancer cells. *Dig Dis Sci.* 2012;57(5):1247-1252.
251. Letellier E, Schmitz M, Ginolhac A, Rodriguez F, Ullmann P, Qureshi-Baig K, Frاسquilho S, Antunes L, Haan S. Loss of Myosin Vb in colorectal cancer is a strong prognostic factor for disease recurrence. *Br J Cancer.* 2017;117(11):1689-1701.
252. Katzenellenbogen M, Pappo O, Barash H, Klopstock N, Mizrahi L, Olam D, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Mitchell LA, Kohen R, Domany E, Galun E, Goldenberg D. Multiple adaptive mechanisms to chronic liver disease revealed at early stages of liver carcinogenesis in the Mdr2-knockout mice. *Cancer Res.* 2006;66(8):4001-4010.
253. Katzenellenbogen M, Mizrahi L, Pappo O, Klopstock N, Olam D, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Domany E, Galun E, Goldenberg D. Molecular mechanisms of liver carcinogenesis in the mdr2-knockout mice. *Mol Cancer Res.* 2007;5(11):1159-1170.
254. Labib PL, Goodchild G, Pereira SP. Molecular Pathogenesis of Cholangiocarcinoma. *BMC Cancer.* 2019;19(1):185. Published 2019.
255. Iannelli F, Collino A, Sinha S, Radaelli E, Nicoli P, D'Antiga L, Sonzogni A, Faivre J, Buendia MA, Sturm E, Thompson RJ, Knisely AS, Natoli G, Ghisletti S, Ciccarelli FD. Massive gene amplification drives paediatric hepatocellular carcinoma caused by bile salt export pump deficiency [published correction appears in Nat Commun. 2015;6:7456]. *Nat Commun.* 2014;5:3850.
256. Vilarinho S, Erson-Omay EZ, Harmanci AS, Morotti R, Carrion-Grant G, Baranoski J, Knisely AS, Ekong U, Emre S, Yasuno K, Bilguvar K, Günel M. Paediatric hepatocellular carcinoma due to somatic CTNNB1 and NFE2L2 mutations in the setting of inherited bi-allelic ABCB11 mutations. *J Hepatol.* 2014;61(5):1178-1183.
257. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8847-8851.
258. Cuzziol CI, Castanhole-Nunes MMU, Pavarino ÉC, Goloni-Bertollo EM. MicroRNAs as regulators of VEGFA and NFE2L2 in cancer]. *Gene.* 2020;759:144994.
259. Su H, Ma C, Liu J, Li N, Gao M, Huang A, Wang X, Huang W, Huang X. Downregulation of nuclear receptor FXR is associated with multiple malignant clinicopathological characteristics in human hepatocellular carcinoma [published correction appears in Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2020 Jun 1;318(6):G1054]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(11):G1245-G1253.
260. Ding L, Yang L, Wang Z, Huang W. Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5(2):135-144.
261. Di Matteo S, Nevi L, Costantini D, Overi D, Carpino G, Safarikia S, Giulitti F, Napoletano C, Manzi E, De Rose AM, Melandro F, Bragazzi M, Berloco PB, Giuliante F, Grazi G, Giorgi A, Cardinale V, Adorini L, Gaudio E, Alvaro D. The FXR agonist obeticholic acid inhibits the cancerogenic potential of human cholangiocarcinoma. *PLoS One.* 2019;14(1):e0210077.
262. Reich M, Deutschmann K, Sommerfeld A, Klindt C, Kluge S, Kubitz R, Ullmer C, Knoefel WT, Herebian D, Mayatepek E, Häussinger D, Keitel V. TGR5 is essential for bile acid-dependent cholangiocyte proliferation in vivo and in vitro. *Gut.* 2016;65(3):487-501.
263. Tsuboyama T, Onishi H, Kim T, Akita H, Hori M, Tatsumi M, Nakamoto A, Nagano H, Matsuura N, Wakasa K, Tomoda K. Hepatocellular carcinoma: hepatocyte-selective enhancement at gadoteric acid-enhanced MR imaging--correlation with expression of sinusoidal and canalicular transporters and bile accumulation. *Radiology.* 2010;255(3):824-833.
264. Kitao A, Zen Y, Matsui O, Gabata T, Kobayashi S, Koda W, Kozaka K, Yoneda N, Yamashita T, Kaneko S, Nakanuma Y. Hepatocellular carcinoma: signal intensity at gadoteric acid-enhanced MR Imaging--correlation with molecular transporters and histopathologic features. *Radiology.* 2010;256(3):817-826.

12. Přehled publikační aktivity autora

12.1 Recenzované časopisy s IF

1. Muchova L, Vanova K, Zelenka J, Lenicek M, Petr T, Vejrazka M, Sticova E, Vreman HJ, Wong RJ, Vitek L. Bile acids decrease intracellular bilirubin levels in the cholestatic liver: implications for bile acid-mediated oxidative stress. *J Cell Mol Med.* 2011;15(5):1156-65.
2. van de Steeg E, Stránecký V, Hartmannová H, Nosková L, Hřebíček M, Wagenaar E, van Esch A, de Waart DR, Oude Elferink RP, Kenworthy KE, Sticová E, al-Edreesi M, Knisely AS, Kmoch S, Jirsa M, Schinkel AH. Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *J Clin Invest.* 2012;122(2):519-28.
3. Gkalpakiotis S, Arenberger P, Sticova E, Sefrnova P, Arenbergerova M. Long-term combination therapy of ustekinumab and dapsons in a patient with psoriasis and dermatitis herpetiformis Duhring. *J Dermatol.* 2012; 39(12):1074-5.
4. Wohl P, Hucl T, Drastich P, Kamenar D, Spicak J, Honsova E, Sticova E, Lodererova A, Matous J, Hill M, Wohl P, Kucera M. Epithelial markers of colorectal carcinogenesis in ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(14):2234-41.
5. Sticova E, Elleder M, Hulkova H, Luksan O, Sauer M, Wunschova-Moudra I, Novotny J, Jirsa M. Dubin-Johnson syndrome coinciding with colon cancer and atherosclerosis. *World J Gastroenterol.* 2013; 19(6):946-50.
6. Sticova E, Jirsa M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. *World J Gastroenterol.* 2013;19(38):6398-6407.
7. Gkalpakiotis S, Arenberger P, Gkalpakioti P, Hugo J, Sticova E, Tesinsky P, Arenbergerová M. A case of acute generalized pustular psoriasis of von Zumbusch treated with adalimumab. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014; 29(10): 2063-4.
8. Arenbergerova M, Alexandrova P, Gkalpakiotis S, Gkalpakiotis D, Svanda J, Sticova E, Kujal P, Srp A, Arenberger P. Pancreatic panniculitis with multiple osteolytic lesions. *Hautarzt.* 2015;66(2):114-6.
9. Cahova M, Palenickova E, Dankova H, Sticova E, Burian M, Drahotka Z, Cervinkova Z, Kucera O, Gladkova C, Stopka P, Krizova J, Papackova Z, Oliyarnyk O, Kazdova L. Metformin prevents ischemia reperfusion-induced oxidative stress in the fatty liver by attenuation of reactive oxygen species formation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;309(2):G100-11.
10. Peregrin JH, Janoušek R, Kautznerová D, Oliverius M, Sticová E, Přádny M, Michálek J. A comparison of portal vein embolization with PHEMA [poly(2-hydroxyethyl methacrylate)] and a histoacryl/lipiodol mixture in patients scheduled for extended right hepatectomy. *Physiol Res.* 2015;64(6):841-848.
11. Sticova E, Lodererova A, van de Steeg E, Frankova S, Kollar M, Lanska V, Kotalova R, Dedic T, Schinkel AH, Jirsa M. Down-regulation of OATP1B proteins correlates with hyperbilirubinemia in advanced cholestasis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(5):5252-62.
12. Kasoju N, Kubies D, Fábryová E, Kříž J, Kumorek MM, Sticová E, Rypáček F. In vivo vascularization of anisotropic channeled porous polylactide-based capsules for islet transplantation: the effects of scaffold architecture and implantation site. *Physiol Res.* 2015;64 Suppl 1:S75-84.
13. Kriz J, Fabryova E, Sticova E, Papackova Z, Koblas T, Cahova M, Saudek F. Formation of Cholangiogenic Cysts Following Intrahepatic Islet Transplantation in Streptozotocin Diabetic Rats. *Transplantation Proceedings.* 2015;47(9):2763-7.
14. Hejlova I, Honsova E, Sticova E, Lanska V, Hucl T, Spicak J, Jirsa M, Trunecka P. Prevalence and Risk Factors of Steatosis After Liver Transplantation and Patient Outcomes. *Liver Transpl.* 2016;22(5):644-55.
15. Gálisová A, Fábryová E, Jiráček D, Sticová E, Lodererová A, Herynek V, Kříž J, Hájek M. Multimodal Imaging Reveals Improvement of Blood Supply to an Artificial Cell Transplant Site Induced by bioluminescent Mesenchymal Stem Cells. *Mol Imaging Biol.* 2017;19(1):15-23.
16. Arenbergerova M, Mrazova I, Horazdovsky J, Sticova E, Fialova A, Arenberger P. Toxic epidermal necrolysis induced by vemurafenib after nivolumab failure. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31(5):e253-e254.
17. Lyskova P, Kubanek M, Hubka V, Sticova E, Voska L, Kautznerova D, Kolarik M, Hamal P, Vasakova M. Successful Posaconazole Therapy of Disseminated Alternariosis due to Alternaria infectoria in a Heart Transplant Recipient. *Mycopathologia.* 2017;182(3-4):297-303.

18. Arenbergerova M, Arenberger P, Gkalpakiotis S, Dahmen RA, Sticova E, Fialova A. Scalp melanoma after antihair loss mesotherapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32(5):e187-e188.
19. Zajicek R, Sticova E, Königova R. A histological analysis of artificial skin in an extensively burned child, 14 years after application: a case report. *J Wound Care*. 2018;27(1):14-18.
20. Papackova Z, Heczko M, Dankova H, Sticova E, Lodererova A, Bartonova L, Poruba M, Cahova M. Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191353.
21. Gálisová A, Fábryová E, Sticová E, Kosinová L, Jiráková M, Herynek V, Berková Z, Kříž J, Hájek M, Jiráček D. The Optimal Timing for Pancreatic Islet Transplantation into Subcutaneous Scaffolds Assessed by Multimodal Imaging. *Contrast Media Mol Imaging*. 2017;2017:5418495.
22. Musalkova D, Sticova E, Reboun M, Sokolova J, Krijt J, Honzikova J, Gurka J, Neroldova M, Honzik T, Zeman J, Jirsa M, Dvorakova L, Hrebicek M. Variable X-chromosome inactivation and enlargement of pericentral glutamine synthetase zones in the liver of heterozygous females with OTC deficiency. *Virchows Arch*. 2018;472(6):1029-1039.
23. Sticova E, Jirsa M, Pawłowska J. New Insights in Genetic Cholestasis: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018;2018:2313675.
24. Gálisová A, Herynek V, Swider E, Sticová E, Pátiková A, Kosinová L, Kříž J, Hájek M, Srinivas M, Jiráček D. A Trimodal Imaging Platform for Tracking Viable Transplanted Pancreatic Islets In Vivo: F-19 MR, Fluorescence, and Bioluminescence Imaging. *Mol Imaging Biol*. 2019;21(3):454-464.
25. Šilhavý J, Mlejnek P, Šimáková M, Vaněčková I, Behuliak M, Kuda O, Sticová E, Jirsa M, Pravenec M. Acute toxic effects of telmisartan in spontaneously hypertensive rats fed a high fructose diet. *Physiol Res*. 2018;67(6):851-856.
26. Bajer L, Slavcev A, Macinga P, Sticova E, Brezina J, Roder M, Janousek R, Trunecka P, Spicak J, Drastich P. Risk of recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation is associated with de novo inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2018;24(43):4939-4949.
27. Guirat N, Abdelhedi F, Tfifha M, Charfi A, Sticova E, Jirsa M. Dubin-Johnson syndrome in Tunisia: Spectrum of a rare disease. *Presse Med*. 2019;48(1 Pt 1):81-82.
28. Sticová E, Květoň M, Dubská M, Kubátová A. Acral peeling skin syndrome: An underdiagnosed skin disorder. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2019;85(3):316-318.
29. Jirsova Z, Heczko M, Dankova H, Malinska H, Videnska P, Vespalcova H, Micenkova L, Bartonova L, Sticova E, Lodererova A, Prefertusová L, Sekerkova A, Hradecky J, Cahova M. The Effect of Butyrate-Supplemented Parenteral Nutrition on Intestinal Defence Mechanisms and the Parenteral Nutrition-Induced Shift in the Gut Microbiota in the Rat Model. *Biomed Res Int*.; 2019:7084734.
30. Chmelova K, Frankova S, Jirsa M, Neroldova M, Sticova E, Merta D, Senkerikova R, Trunecka P, Spicak J, Sperl J. IL28B rs12979860 T allele protects against CMV disease in liver transplant recipients in the post-prophylaxis and late period. *Transpl Infect Dis*. 2019;21(4):e13124.
31. Donati M, Kastnerova L, Martinek P, Grossmann P, Sticova E, Hadravský L, Torday T, Adamacik L, Kyclova J, Michal M, Kazakov DV. Spitz tumors with ROS1 fusions: a clinicopathological study of 6 cases, including FISH for chromosomal copy number alterations and mutation analysis using next generation sequencing. *Am J Dermatopathol*. 2020;42(2):92-102.
32. Míková I, Neřoldová M, Hubáček JA, Dlouhá D, Jirsa M, Honsová E, Sticová E, Lánská V, Špičák J, Trunečka P. Donor PNLPLA3 and TM6SF2 variant alleles confer additive risks for graft steatosis after liver transplantation. *Transplantation*. 2020;104(3):526-534.
33. Hrudka J, Bezvodová A, Arenbergerová M, Sticová E, Bandke D. Sebaceous carcinoma in situ in extraocular skin: Case report and discussion of the new entity. *Hautarzt*. 2020;71(1):57-62.
34. Arenbergerova M, Arenberger P, Gkalpakiotis S, Sticova E, Hulkova H, Trhlikova O, Sikora J. Palladium causes bizarre skin hyperpigmentation in long-term dihydrocodeinone 'Braun' abusers. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34(1):188-191.
35. Erhartova D, Cahova M, Dankova H, Heczko M, Mikova I, Sticova E, Spicak J, Seda O, Trunecka P. Serum miR-33a is associated with steatosis and inflammation in patients with non-alcoholic fatty liver disease after liver transplantation. *PLoS One*. 2019;14(11):e0224820.
36. Sticova E, Neroldova M, Kotalova R, Subhanova I, Jirsa M. ABCB4 disease mimicking morbus Wilson: A potential diagnostic pitfall. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2020;164(1):121-125.

37. Kasoju N, Pátíková A, Wawrzynska E, Vojtišková A, Sedlačík T, Kumorek M, Pop-Georgievski O, Sticová E, Kříž J, Kubies D. Bioengineering a pre-vascularized pouch for subsequent islet transplantation using VEGF-loaded polylactide capsules. *Biomater Sci.* 2020;8(2):631-647.
38. Sticova E, Jirsa M. ABCB4 disease: Many faces of one gene deficiency. *Ann Hepatol.* 2020;19(2):126-133.
39. Novotny R, Chlupac J, Kristek J, Pit'ha J, Chmel R, Sticova E, Janousek L, Fronek J. Uterus transplant graft's arterial atherosclerotic remodeling veracity. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(1):e18612.
40. Gkalpakiotis S, Arenberger P, Sticova E, Karlova I, Arenbergerova M. Unusual Periungual Nodulocystic Lesions Leading to the Diagnosis of Extranodal Marginal Zone Lymphoma. *Indian J Dermatol.* 2020;65(1):83-84.
41. Kastnerova L, P, Grossmann P, Steiner P, Vanecek T, Kyclova J, Ferak I, Zalud R, Slehobr O, Svajdler P, Sulc M, Bradamante M, Banik M, Hadravsky L, Sticova E, Hajkova V, Ptakova N, Michal M, Kazakov DV. A Clinicopathological Study of 29 Spitzoid Melanocytic Lesions With ALK Fusions, Including Novel Fusion Variants, Accompanied by Fluorescence In Situ Hybridization Analysis for Chromosomal Copy Number Changes, and Both TERT Promoter and Next-Generation Sequencing Mutation Analysis. *Am J Dermatopathol.* 2020;42(8):578-592.
42. Kollar M, Krajciová J, Prefertusova L, Sticova E, Maluskova J, Vackova Z, Martinek J. Probe-based confocal laser endomicroscopy versus biopsies in the diagnostics of oesophageal and gastric lesions: A prospective, pathologist-blinded study. *United European Gastroenterol J.* 2020;8(4):436-443.
43. Gálisová A, Jiráková M, Rabyk M, Sticová E, Hájek M, Hrubý M, Jiráček D. Glycogen as an advantageous polymer carrier in cancer theranostics: Straightforward in vivo evidence. *Sci Rep.* 2020;10(1):10411.
44. Kolouchova K, Jirak D, Groborz O, et al. Implant-forming polymeric ¹⁹F MRI-tracer with tunable dissolution [published online ahead of print, 2020 Jul 27]. *J Control Release.* 2020; S0168-3659(20)30410-7.

12.2 Recenzované časopisy bez IF

1. Honsová E, Sticová E, Sperl J. Cutaneous sarcoidosis during pegylated interferon alpha and ribavirin treatment of chronic hepatitis C--a case report. *Cesk Patol.* 2007;43(1):27-30.
2. Cahova M, Dankova H, Palenickova E, Papackova Z, Komers R, Zdychova J, Sticova E, Kazdova L. The increased activity of liver lysosomal lipase in nonalcoholic Fatty liver disease contributes to the development of hepatic insulin resistance. *Biochem Res Int.* 2012; 135723.
3. Kinkor Z, Sticová E, Sach J, Rychtera J, Skálová A. Sarcomatoid (metaplastic) spindle cell carcinoma arising in a phylloid tumor with massive squamous metaplasia - a case report and review of the literature. *Cesk Patol.* 2012; 48(3):156-60.
4. Jirsa M, Sticová E. Vrožené hyperbilirubinémie a molekulární mechanizmy žloutenky. *Vnitřní lékařství.* 2013; 59(7):566-571.
5. Zajíček R, Sticová E, Šuca H, Brož L. Kožní náhrada Integra® v klinické praxi. *Rozhl Chir.* 2013;92(5):283-7.
6. Sticová E, Honsová E. Diagnosis of rejection in a transplanted liver. *Cesk Patol.* 2015;51(4):166-168.

12.3 Publikace in extenso

1. Dvořák T, Schraml J, Hynek V, Hálek M, Sapkota K, Kunec F, Broul M, Sticová E. Oboustranná granulomatózní orchiepididymitis jako komplikace BCG léčby povrchového karcinomu močového měchýře. *Urologie pro praxi.* 2007; 8(4):180-181.
2. Hejlová I, Šperl J, Fraňková S, Kamenář D, Sticová E, Špičák J. Akutní toxická hepatitida po bylinném přípravku. *Praktický lékař.* 2008;88(2):108-110.
3. Hrnčíř E, Filipovská O, Sticová E. Generalizovaný pustulózní exantém doprovázený febriliemi. *Referátový výběr z dermatovenerologie.* 2008; 50(1):82-84.
4. Smetana J, Sticová E, Jílek D, Cihlár F. Adenokarcinom žaludku a zánětlivý fibroidní polyp (Vaňkův tumor) u pacientky s primárním Sjögrenovým syndromem - popis případu. *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie.* 2009; 63(3):100-104.
5. Broul M, Schraml J, Sticová E, Derner M. Adrenokortikální karcinom. *Urologie pro praxi.* 2010;11(4):200-203.

6. Broul M, Schraml J, Bočan M, Hlavička M, Derner M, Sticová E. Resekce tumorů ledvin pomocí systému da Vinci S HD. Naše první zkušenosti. *Endoskopie*. 2011;20(3-4): 86-88.
7. Hlavička M, Schraml J, Broul M, Macová P, Sticová E, Derner M, Lysý M. Germinální tumor varlete u nespolupracujícího pacienta. *Česká urologie*. 2012;16 (3): 188-192.
8. Gkalpakiotis S, Šefrnová P, Arenberger P, Sticová E, Arenbergerová M. Hyperkeratotický pruh na dolní končetině. *Československá dermatologie*. 2012;87(4):149-151.
9. Arenbergerová M, Šefrnová P, Pojezná E, Sticová E, Arenberger P. Úspěšná léčba pacientky s metastazujícím melanomem ipilimumabem. *Československá dermatologie*. 2012;87(5):190-193.
10. Šperl J, Sticová E. Porfýrie. *Referátový výběr z dermatovenerologie*. 2013, roč. 55, Speciál I, s. 65-76.
11. Bajer L, Kamenář D, Sticová E, Wohl P, Špičák J, Drastich P. Idiopatický střevní zánět u pacientů s primární sklerozující cholangitidou – samostatný fenotyp IBD. *Gastroenterologie a hepatologie*. 2014;68(1):24-35.
12. Dubská Z, Kodetová Z, Gkalpakiotis S, Sticová E, Křemenová S, Arenberger P. Klinický případ: Bilaterální ulcerace bérců. *Československá dermatologie*. 2014;89(5):236-239.
13. Hugo J, Arenberger P, Sticová E, Gkalpakiotis S. Nodulární projevy ve kštici. *Československá dermatologie*. 2015;90(1):34-36.
14. Kollar M, Maluskova J, Sticova E, Honsova E, Fronek J, Oliverius M, Špičák J, Trunecka, J, Martinek J. First experiences of confocal laser endomicroscopy (pCLE - Cellvizio) in the diagnosis of gastrointestinal lesions. *Gastroenterologie a hepatologie*. 2015;69(3):218.
15. Kotalová R, Sticová E, Jirsa M. Progresivní familiární intrahepatální cholestáza 2. typu – soubor dětských pacientů sledovaných na Pediatrické klinice 2. LF UK a FN v Motole, Praha. *Gastroenterologie a hepatologie*. 2015;69(6):547-553.
16. Hejlová I, Komrsková J, Sticová E, Trunečka P, Špičák J, Franeková J. Makro-AST jako příčina izolované chronicky zvýšené aktivity AST – popis dvou případů. *Gastroenterologie a hepatologie*. 2016;70(2):138-140.
17. Hejlová I, Dezortová M, Šedivý P, Drobný M, Hájek M, Cahová M, Daňková H, Sticová E, Lánská V, Trunečka P. Metabolický profil pacientů po transplantaci jater ve vztahu k rozvoji NAFLD – výsledky pilotní studie. *Gastroenterologie a hepatologie*. 2016;70(4):325-330.
18. Šperl J, Fraňková S, Sticová E, Bartoňová L, Drastichová M, Štirand P. Přímě působící antivirotika v léčbě HCV asociovaných maligních lymfomů. *Gastroenterologie a hepatologie*. 2017;71(2):138-144.
19. Suchánková D, Arenbergerová M, Sticová E, Arenberger P. Difúzní plošný normolipemický xantom – popis případu. *Československá dermatologie*. 2018;93(4):137-140.
20. Erhartová D, Sticová E, Kautznerová D, Špičák J, Trunečka P. Na co nezapomínat při diferenciální diagnostice ložiskových procesů jater – kazuistika. *Postgraduální gastroenterologie & hepatologie*. 2018;4(2):94-97.
21. Jirsa M, Sticová E. Dědičné hyperbilirubinémie a genetické cholestatické syndromy. *Postgraduální gastroenterologie & hepatologie*. 2018;4(3):106-109.
22. Sticová E. Cholestáza z pohledu patologa. *Postgraduální gastroenterologie & hepatologie*. 2018;4(3): 115-119.
23. Husová L, Sticová E, Žampachová V, Neřoldová M, Jirsa M. Progressive familial intrahepatic cholestasis in adulthood: 60 years' follow-up. *Klin. Biochem. Metab.*, 28 (49), 2020, No. 1, p. 11–14.

12.4 Kapitoly v monografiích

1. Sticová E, Jirsa M.: Dědičné metabolické choroby jater. In: Brdička R, Didden W. Genetika v klinické praxi IV., Galén, 1. vyd., ©2016, s. 97-126. ISBN 978-80-7492-277-0.
2. Jirsa M, Sticová E.: Dědičné choroby jater: příčiny, mechanismy a léčba. In: Špičák J. a kol. Novinky v gastroenterologii a hepatologii II., Grada Publishing, a.s., 1. vyd., ©2017, s. 249-274. ISBN 978-80-271-9761-3.

13. Seznam příloh

1. van de Steeg E, Stránecký V, Hartmannová H, Nosková L, Hřebíček M, Wagenaar E, van Esch A, de Waart DR, Oude Elferink RP, Kenworthy KE, Sticová E, al-Edreesi M, Knisely AS, Kmoch S, Jirsa M, Schinkel AH. **Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver.** *J Clin Invest.* 2012;122(2):519-28.
2. Sticova E, Elleder M, Hulkova H, Luksan O, Sauer M, Wunschova-Moudra I, Novotny J, Jirsa M. **Dubin-Johnson syndrome coinciding with colon cancer and atherosclerosis.** *World J Gastroenterol.* 2013;19(6):946-50.
3. Sticova E, Lodererova A, van de Steeg E, Frankova S, Kollar M, Lanska V, Kotalova R, Dedic T, Schinkel AH, Jirsa M. **Down-regulation of OATP1B proteins correlates with hyperbilirubinemia in advanced cholestasis.** *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(5):5252-62.
4. Sticova E, Neroldova M, Kotalova R, Subhanova I, Jirsa M. **ABCB4 disease mimicking morbus Wilson: A potential diagnostic pitfall.** *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2020;164(1):121-125.
5. Husová L, Sticová E, Žampachová V, Neřoldová M, Jirsa M. **Progressive familial intrahepatic cholestasis in adulthood: 60 years' follow-up.** *Klin. Biochem. Metab.,* 28 (49), 2020, No. 1, p. 11–14.
6. Sticova E, Jirsa M. **New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications.** *World J Gastroenterol.* 2013;19(38):6398-6407.
7. Sticova E, Jirsa M, Pawłowska J. **New Insights in Genetic Cholestasis: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications.** *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018.
8. Sticova E, Jirsa M. **ABCB4 disease: Many faces of one gene deficiency.** *Ann Hepatol.* 2020;19(2):126-133.