

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Ing. Kateřina, Žížalová

Metabolické účinky žlučových lipidů

Metabolic effects of bile lipids

Typ závěrečné práce

Disertační

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: MUDr. Martin Leníček, Ph.D

Praha, 2023

Abstrakt

Žlučové kyseliny v lidském organismu působí jako významné detergenty. Stále více se ale ukazuje, že hrají i roli důležitých signálních molekul. Jedná se o poměrně heterogenní skupinu lišící se i svými metabolickými účinky. Jejich zastoupení v organismu je značně variabilní a silně ovlivněno složením mikrobiomu. Význam jednotlivých žlučových kyselin není dosud známý tak dobře, abychom ho mohli naplno využít v klinické praxi. Z toho důvodu se na většině pracovišť jeví jako dostačující stanovení žlučových kyselin pomocí enzymatické metody. Další a spolehlivější možností je stále více se rozšiřující použití kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS).

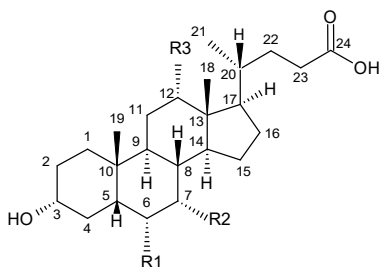
Cílem mé práce bylo otestovat spolehlivost enzymatické metody, zavést metodu ke stanovení žlučových kyselin včetně měření tak netypických jako jsou mikrobiální konjugáty nebo keto- a isoderiváty. Také otestovat přípravu vzorku na měření markeru biosyntézy žlučových kyselin 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-onu.

Těmito metodami jsme zjišťovali, jak se mění zastoupení žlučových kyselin u potkanů předávkovaných železem. U tohoto modelu geneticky podmíněných poruch metabolismu železa nebyl metabolismus žlučových kyselin do té doby znám. K popsání interakce mezi bakterií *Eggerthella lenta* a žlučovými kyselinami jsme zase využili stanovení atypických žlučových kyselin zejména jejich ketoderivátů. Nakonec nás zajímal potenciál žlučových kyselin v diagnostice. A jak jsme zjistili, kyselina taurochenodeoxycholová by se mohla sloužit jako spolehlivý marker klinicky významné portální hypertenze.

1. Úvod

1.1 Struktura žlučových kyselin

Žlučové kyseliny se skládají z jádra a postranního řetězce, jádro tvoří jeden cyklopentanový a tři cyklohexanové kruhy, postranní řetězec je pak tvořen alifatickým uhlíkem s karboxylovou skupinou (Obrázek 1). Jednotlivé žlučové kyseliny se mohou lišit jak délkou postranního řetězce, tak substituenty na něm i na jádře (Hofmann & Roda, 1984). Všechny žlučové kyseliny však obsahují hydroxylovou skupinu na C3 v pozici α , na rozdíl od cholesterolu, který ji má v pozici β . U lidí se



	kyselina	R1	R2	R3
AlloCA*	allocholová		7 α	12 α
CA	cholová		7 α	12 α
CDCA	chenodeoxycholová		7 α	
DCA	deoxycholová			12 α
HCA	hyocholová	6 α	7 α	
HDCA	hyodeoxycholová	6 α		
LCA	lithocholová			
MDCA	murideoxycholová	6 β		
UDCA	ursodeoxycholová		7 α	
α -MCA	α -muricholová	6 β	7 α	
β -MCA	β -muricholová	6 β	7 α	
ω -MCA	ω -muricholová	6 α	7 α	

Obrázek 1. Struktura žlučové kyseliny. Tabulka popisuje pozici hydroxylových skupin pro jednotlivé žlučové kyseliny. V pozicích, které jsou volné je na příslušný uhlík navázán vodík, pro přehlednost je však neuvádím. Dále v textu používám výše uvedené zkratky, v případě konjugace (viz dále) používám před zkratkou žlučové kyseliny G pro glycin a T pro taurin.

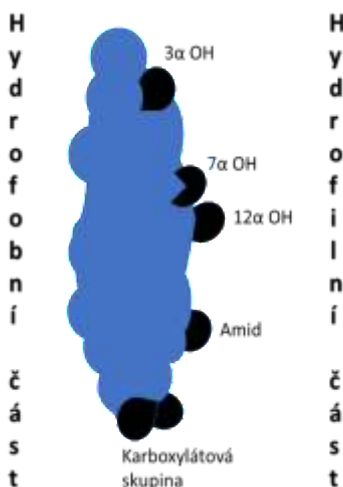
*Na obrázku je znázorněna konformace cis. Předpona allo se používá pro žlučové kyseliny v pozici trans.

postranní řetězec nemění, lidské žlučové kyseliny tvoří vždy 24 uhlíkatá kostra. Lišit se mohou tedy konjugací na postranním řetězci (viz dále) a počtem hydroxylových skupin (Hofmann et al., 2010). Majoritními lidskými žlučovými kyselinami jsou kyselina cholová (CA), kyselina chenodeoxycholová (CDCA), kyselina deoxycholová (DCA) a kyselina lithocholová (LCA). Strukturu těchto (i dalších žlučových kyselin použitých v naší práci) znázorňuje (Obrázek 1)

Pokud se podíváme na stereochemii molekuly, kruhy A a B mohou zaujímat jak pozici *cis*, tak *trans*, což je dáno postavením vodíku na C5. Většina v přírodě se vyskytujících žlučových kyselin zaujímá pozici *cis*. Pro žlučové kyseliny s kruhy A/B v pozici *trans* byla zavedena předpona *allo* (Fieser & Fieser, 1959; Hofmann & Hagey, 2014).

1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti žlučových kyselin

Žlučové kyseliny jsou planární amfipatické molekuly. Skládají se z hydrofobní (steroidní jádro) a hydrofilní (hydroxylové a karboxylové skupiny) části (Hofmann, 2009) (Obrázek 2). Obecně je rozpustnost přirozeně se vyskytujících C24 žlučových kyselin ve vodě velmi malá, pro základní lidské žlučové kyseliny se pohybuje od 0,05 $\mu\text{mol/l}$ (LCA) přes 28 $\mu\text{mol/l}$ (CDCA a DCA) po 273 $\mu\text{mol/l}$ (CA) (Roda & Fini, 1984).



Obrázek 2: Uspořádání molekuly kyseliny cholové. [Upraveno]

V roztoku se mohou žlučové kyseliny vyskytovat v protonované formě, zároveň jako slabé kyseliny v roztoku částečně disociují a tvoří soli zejména s kationty vápníku nebo sodíku (Hofmann & Mysels, 1992). Pokud koncentrace žlučových kyselin dosáhne tzv. kritické micelární koncentrace, anionty žlučových kyselin se samovolně spojují a tvoří agregáty obsahující od 4 do 40 molekul (Cabral, 1989). Hodnota kritické micelární koncentrace se odvíjí zejména od počtu hydroxylových skupin žlučových kyselin, ale i jejich pozice a orientace, dále se mění s přítomností dalších lipofilních látek a přítomností kationtů i jejich koncentrací (Hofmann & Mysels, 1992). Například v séru se žlučové kyseliny vyskytují pod svou micelární koncentrací, shlukují se pak s polárními lipidy a tvoří micely složené (Hofmann, 2009; Natalini et al., 2014; Tamesue & Juniper, 1967). Předpokládá se, že ve žluči se

žlučové kyseliny vyskytují ve všech formách, tedy ve formě monomerů, jednoduchých i složených micel (Hofmann & Hagey, 2014).

1.3 Biosyntéza žlučových kyselin

Na syntéze žlučových kyselin se podílí přes 17 enzymů, které jsou lokalizovány v cytosolu, endoplasmatickém retikulu, mitochondriích a peroxisomech. U lidí probíhá zejména dvěma drahami první nazýváme klasickou (též neutrální), druhou pak alternativní (kyselou) (Russell, 2003; Vaz & Ferdinandusse, 2017). Žlučové kyseliny vzniklé biosyntézou nazýváme jako primární. Klasickou cestou vzniká zejména kyselina cholová, na konci té alternativní je pak kyselina chenodeoxycholová. U obou těchto drah je výchozí molekulou cholesterol, dochází ke zkrácení postranního řetězce, oxidaci na karboxylovou kyselinu, změně pozice 3β hydroxylové skupiny na 3α a hydroxylace C7, případně C12 (Chiang, 1998; Vaz & Ferdinandusse, 2017).

Každý den se v játrech přemění na žlučové kyseliny asi 500 mg cholesterolu (Russell, 2003). Kromě toho byly popsány dvě další dráhy, nazývají se Yamasakiho a 25-hydroxylační. Tyto dráhy sdílejí většinu reakcí i enzymů s drahami uvedenými výše, kombinují reakce těchto dvou drah či jejich pořadí (více (Duane et al., 1988; Setchell et al., 1988).

U všech výše uvedených drah není dodnes znám přesný počet meziproductů, všechny enzymy ani lokalizace všech reakcí (Sarenac & Mikov, 2018).

1.4 Biotransformace žlučových kyselin

K biotransformaci žlučových kyselin dochází jak endogenně v játrech, tak činností střevních bakterií. Endogenní modifikace zlepšují detergentní vlastnosti žlučových kyselin (konjugace) či usnadňují jejich vylučování z organismu (sulfatace, glukuronidace). Bakterie zase žlučové kyseliny modifikují s cílem snížit jejich toxicitu, slouží jim jako akceptor elektronů či zdroj aminokyselin (Hofmann & Hagey, 2014; Pedersen et al., 2022; Philipp, 2011).

1.4.1 Konjugace

Konjugací se v případě žlučových rozumí N-acyl amidace. Jedná se o II. fázi biotransformace, při které dochází ke vzniku kovalentní vazby mezi karboxylovou skupinou žlučové kyseliny a glycinem nebo taurinem (Hofmann & Hagey, 2014). Konjugace žlučových kyselin s těmito aminokyselinami snižuje jejich pKa. Nekojugované žlučové kyseliny jsou tak nejslabší kyselinou (pKa= 5), následují glykokonjugáty (pKa= 4) a nakonec taurokonjugáty (pKa= 2) (Fini & Roda, 1987). V lumen tenkého střeva se uvádí pH kolem 6,5. To znamená, že nekonjugované kyseliny nejhůře disociují a jsou tedy nejméně rozpustné ve vodě (Hofmann, 1963). Proces konjugace probíhá jak v hepatocytech, tak v cholangiocytech, nicméně konjugace v hepatocytech výrazně převažuje (Hylemon et al., 1990). Klíčovým enzymem je Bile acid-CoA:amino-acid N-acyltransferase (BAAT, EC: 2.3.1.65). Ta je lokalizována v peroxisomech i cytosolu, podle posledních prací ke konjugaci však dochází pouze v peroxisomech, a to jak těch nově vzniklých, tak těch přicházejících portální žílou (Styles et al., 2007), (Rembacz et al., 2010). Konjugace probíhá ve dvou základních krocích, v prvním dochází ke vzniku thioesteru, ve druhém je připojen taurin nebo glycin.

BAAT na žlučové kyseliny přenáší výhradně taurin nebo glycin, a tak jsou u vyšších obratlovců i přes variabilitu aminokyselin syntetizovány výhradně glyko nebo taurokonjugáty. *In vitro* experimenty ukazují, že BAAT upřednostňuje konjugaci s taurinem. Tomu odpovídá i fakt, že taurokonjugáty u většiny vyšších obratlovců dominují (Killenberg & Jordan, 1978). V živočišné říši existuje však několik výjimek, kde převažují glykokonjugáty, mezi ně patří i *homo sapiens*. U lidí se poměr glyko : tauro konjugátům standardně uvádí asi 3:1. Tento poměr je však značně závislý na dostupnosti taurinu, při jeho podávání se podíl taurokonjugátů dramaticky zvyšuje (Sjovall, 1959). Naopak vyšší poměr se pojí s vegetariánskou/veganskou stravou, což je dáno nedostatkem taurinu (Hardison, 1978; Trefflich et al., 2020).

1.4.2 Bakteriální transformace

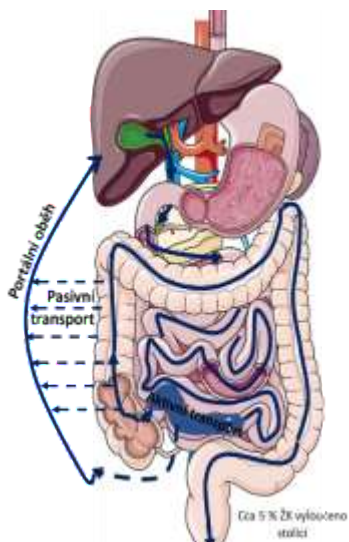
Při průchodu trávicím traktem podléhají žlučové kyseliny řadě chemických modifikací, jako je dekonjugace, dehydroxylace, oxidace, epimerace a rekonjugace. Ke všem těmto modifikacím dochází činností bakteriálních enzymů (Pedersen et al., 2022). Transformací žlučových kyselin se bakterie brání před jejich toxickým působením. Se zvyšující se koncentrací žlučových kyselin dochází u bakterií k solubilizaci membrán, disociaci integrálních membránových proteinů a unikání obsahu z buněk (Dunne et al., 2001; Kumar et al., 2006; Ridlon et al., 2016).

Pro bakterie žlučové kyseliny zároveň slouží jako akceptor elektronů vzniklých fermentací i zdroj aminokyselin (Philipp, 2011).

Nejdůležitějšími bakteriálními transformcemi jsou dekonjugace, dehydroxylace, epimerace a možná rekonjugace.

1.5 Enterohepatální oběh

Konjugované žlučové kyseliny jsou přenášeny přes kanalikulární membránu hepatocytu aktivně transportérem BSEP (Bile Salt Export Pump, TCDB: 3.A.1.201.2). Na této membráně se sice nacházejí i další transportéry schopné přenášet žlučové kyseliny (MRP2, MDR1 a BCRP), ale předpokládá se, že fyziologicky nehrají v transportu žlučových kyselin významnou roli. Dokážou však obstatat transport



Obrázek 3: Schéma enterohepatálního oběhu žlučových kyselin. Použitý obrázek (Servier Medical Art, Servier, licence Creative Commons Attribution 3.0), upraven z (Hylemon et al., 2009)

v případě BSEP deficiencie (Akita et al., 2001). Žlučové kyseliny se dostávají do žluče a jsou koncentrovány ve žlučníku. Kontrakcí žlučníku se pak dostávají do duodena. V celém tenkém střevě působí jako detergenty, podporují solubilizaci, trávení a vstřebávání lipidů a vitamínů rozpustných v tucích. Vysoké koncentrace žlučových kyselin nalézáme v duodenu, jejunu a proximálním ileu, právě zde totiž dochází k trávení a absorpci tuků (Ridlon et al., 2006). Až 90 % žlučových kyselin je vstřebáno v konjugované formě v distální části ilea (Hofmann, 1999). Dále je zapotřebí aktivního transportu, vstup žlučových kyselin do enterocytů je zprostředkovan transportním

proteinem ASBT (Apical sodium-dependent bile acid transporter, TCDB: 2.A.28.1.2) (Wong et al., 1994). Tento transportér přesouvá konjugované žlučové kyseliny z lumen tenkého střeva přes apikální membránu. Dále jsou žlučové kyseliny transportovány přes basolaterální membránu do portálního oběhu pomocí transportního proteinu OST α , OST β (Organic solute transporter α a β , TCDB: 2.A.82.1.1) (Dawson et al., 2009).

Portálním řečištěm jsou odváděny jak konjugované žlučové kyseliny, tak nekonjugované žlučové kyseliny vstřebané pasivním transportem z tlustého střeva. Všechny žlučové kyseliny jsou účinně vychytány hepatocyty. Předpokládá se, že většina žlučových kyselin je transportována prostřednictvím NTCP (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide, TCDB: 2.A.28.1.9). Na basolaterální membráně se vyskytuje celá řada dalších transportérů schopných přenášet žlučové kyseliny, patří sem například OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 nebo OATP1C1 (TCDB: 2.A.60.1.14, 2.A.60.1.5,

2.A.60.1.12, 2.A.60.1.15). Jejich význam v transportu žlučových kyselin však není zcela znám (Hofmann & Hagey, 2014). Fyziologicky jsou přednostně vychytávány konjugáty kyseliny cholové. Poločas jakékoliv plasmatické žlučové kyseliny je však menší než 5 minut (Dawson et al., 2009). Schéma enterohepálního oběhu znázorňuje Obrázek 3.

1.6 Metody stanovení žlučových kyselin

Za vůbec první popsané stanovení se považuje důkaz kyseliny cholové sacharózou v koncentrované kyselině sírové. Reakci popsal v roce 1844 Max von Pettenkoffer (Pettenkofer, 1844). Žlučové kyseliny zde dávají růžové zbarvení, a tak je na počátku dvacátého století vidět snaha tuto reakci využít a měřit je kolorimetricky. To však naráží na řadu interferencí v analyzovaných matricích, jako jsou krev a žluč (Aldrich, 1928). Žlučové kyseliny jsou poměrně heterogenní skupinou, a tak se velice záhy ukazuje, že právě separace z matrice bude minimálně stejně složitým úkolem jako jejich stanovení. To změnil až rozvoj chromatografických metod.

1.6.1 Chromatografické metody

První, kdo použil chromatografii k analýze žlučových kyselin, byl Jan Sjovall, který separoval 9 nekonjugovaných žlučových kyselin kapalinovou rozdělovací chromatografií na reverzní fázi (Sjovall, 1953). V 60. letech začala být chromatografie na tenké vrstvě (TLC) široce dostupná díky komerční výrobě adsorbentů např. oxidu hlinitého nebo kyseliny ortokřemičité. V případě žlučových kyselin našla TLC široké uplatnění jako semikvantitativní metoda při separaci jednotlivých skupin konjugátů i jednotlivých žlučových kyselin (Hofmann, 1961; Hofmann & Hagey, 2014). Do dnešního dne byla samozřejmě popsána řada modifikací. Za zlatý standard se považuje separace na silikagelu s mobilní fází n-hexan/ethyl-acetát/methanol/kyselina octová v poměru 20:20:5:2 s detekcí kyselinou sírovou nebo fosfomolybdenovou (Pyka, 2008). TLC však později začaly vytlačovat jiné chromatografické metody s vyšší účinností a menší náročností na množství materiálu. I dnes má však tato metoda své místo zejména pro rychlou orientaci.

1.6.1.1 Kapalinová chromatografie

HPLC (high-performance liquid chromatography; vysokoúčinná kapalinová chromatografie) byla vyvinuta v 70. letech a velmi záhy byla použita k analýze žlučových kyselin. Nevýhodou byl tehdy používaný UV detektor, konjugované žlučové kyseliny lze detekovat při 205 nm (absorpční maximum amidové vazby). Nekonjugované a sulfatované žlučové kyseliny však takto detekovat nelze. Nevýhodou jsou i vysoké požadavky na množství vzorku (Linnet et al., 1984). Dnes se nejčastěji používá chromatografie na reverzní fázi (Griffiths & Sjøvall, 2010). Pro kompletní analýzu profilu žlučových kyselin je v současné době jedinou možnou metodou spojení kapalinové chromatografie s tandemových hmotnostním detektorem (Hofmann & Hagey, 2014). LC-MS/MS je pro analýzu žlučových kyselin relativně citlivá, nenáročná na množství materiálu i extrakci, což umožňuje měřit žlučové kyseliny v různých matricích jako je sérum, žluč i jaterní tkáň. V tomto uspořádání lze měřit konjugované, nekonjugované, sulfatované i glukuronidované žlučové kyseliny (Yang et al., 2017). Pro všechny tyto výhody, spolu se zvětšující se dostupností přístrojového vybavení, začíná LC-MS/MS vytlačovat ostatní metody analýzy žlučových kyselin.

1.6.2 Enzymatické stanovení

Tuto metodu popsal jako první Iwata (Iwata & Yamasaki, 1964), který využil 3 α -hydroxysteroiddehydrogenasy (EC 1.1.1.50) izolované z *Comamonas testosteroni* (dříve *Pseudomonas testosteroni*). Tento enzym oxiduje 3 α -hydroxyskupinu žlučových kyselin a je NAD⁺ dependentní, dochází tedy k redukci na NADH⁺. To je pak měřeno buď přímo v UV spektru nebo následující spřažené reakce, při kterých vzniká barevný produkt (Griffiths & Sjøvall, 2010; Hofmann & Hagey, 2014). Takovým měřením získáváme informaci nejen o celkové koncentraci žlučových kyselin s 3 α -hydroxyskupinou, ale i ostatních 3 α -hydroxysteroidů. Těch jsou v séru nicméně za fyziologických podmínek zanedbatelné koncentrace. Nevýhodou je, že se nedozvídáme o profilu žlučových kyselin, ale jen o jejich celkové sumě. Zároveň neměří ty, u kterých je 3 α hydroxylová skupina modifikovaná, například sulfatací nebo glukuronidací.

2. Cíle práce

K měření žlučových kyselin se jako v současné době nejpřesnější a nejspolehlivější jeví metoda LC-MS/MS, ta se pro výzkumné účely používá nejčastěji. Pro svou jednoduchost a rychlost má ale i své zastoupení enzymatická metoda stanovení celkových žlučových kyselin. Cílem mé práce bylo ověřit, nakolik je tato metoda spolehlivá pro jednotlivé žlučové kyseliny. Vzhledem k tomu o jak heterogenní skupinu se jedná, jsme předpokládali, že by se účinnost přeměny 3 α -HSD mohla pro jednotlivé žlučové kyseliny lišit. To by pak mohlo mít vliv na spolehlivost metody u vzorků s odlišným spektrem či u experimentů, kde změny ve spektru žlučových kyselin očekáváme. Výsledky jsme popsali v publikaci **Enzymatic methods may underestimate the total serum bile acid concentration**.

Kvůli pochybám o spolehlivosti enzymatické metody, jsem zavedla metodu stanovení žlučových kyselin na LC-MS/MS. Tuto metodu jsme využili k měření žlučových kyselin při přetížení železem. Akumulace železa provází celou řadu genetických onemocnění jako je hereditární hemochromatóza nebo β -talasémie. Vzniká ale i sekundárně například po opakovaných krevních transfúzích. U takového přetížení bylo popsáno, že se mění metabolismus cholesterolu, jaký vliv to má na metabolismus žlučových kyselin však dosud popsáno nebylo. My jsme to popsali v práci **Iron overload reduces synthesis and elimination of bile acids in rat liver**.

Střevní bakterie modifikují žlučové kyseliny mnoha cestami a vytváří tím i selekční tlak mezi sebou. Konkrétně bakterie *Eggerthella lenta* zmírňuje toxické účinky některých žlučových kyselin pro ostatní bakterie. Postihnout tyto změny pomocí LC-MS/MS jsme se pokusili v práci **Eggerthella lenta DSM 2243 alleviates bile acid stress response in Clostridium ramosum and Anaerostipes caccae by transformation of bile acids**. Naší hypotézou bylo, že *Eggerthella lenta* přeměňuje tyto žlučové kyseliny na jejich méně toxické varianty a jejich identifikace byla předmětem naší práce. Zároveň jsme chtěli ověřit, zda *E. lenta* disponuje enzymy schopnými vytvářet amidovou vazbu mezi žlučovými kyselinami a jinými aminokyselinami, než je taurin nebo glycin. Jak se zmiňují v kapitole "Další možnosti konjugace", v roce 2020 bylo popsáno, že střevní bakterie mohou tuto amidovou vazbu tvořit.

Pro metabolismus žlučových kyselin je samozřejmě klíčová i jejich biosyntéza. Jako marker její aktivity se používá jeden z meziproductů této dráhy, a to 7-alpha-hydroxy-4-cholesten-3-on (C4). Pro jeho měření na LC-MS/MS je potřeba jej nejprve izolovat ze séra. K tomu se používá řada metod, cílem naší práce bylo popsané metody porovnat. Tedy jak jsou dané metody schopny odstranit proteiny, fosfolipidy, s jakou účinností izolují samotný C4, ale i jejich časovou náročnost. To jsme popsali v práci **Comparison of simple extraction procedures in liquid chromatography-mass spectrometry based determination of serum 7alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one, a surrogate marker of bile acid synthesis.**

Posledním bodem mé disertační práce bylo využití žlučových kyselin jako klinického markeru. Konkrétně ověřit hypotézu, zda by sérové koncentrace žlučových kyselin nemohly odrážet hodnoty portálního tlaku u nemocných s cirhózou jater. Při portální hypertenzi dochází ke vzniku porto-systémových spojek. Proto nás zajímalo, zda poměr krve obcházející játra by mohl odpovídat výši portální hypertenze, s ohledem k vysokému first-pass efektu žlučových kyselin. O tom pojednává práce **Serum concentration of taurochenodeoxycholic acid predicts clinically significant portal hypertension.**

3. Diskuse

Ke stanovení žlučových kyselin se používá řada metod, jednou z nich je enzymatická metoda. V literatuře, která tuto metodu používá, se často objevuje tvrzení, že enzymatická metoda stanovení pravděpodobně není stejně účinná pro všechny žlučové kyseliny. Tedy že enzym 3α -hydroxysteroiddehydrogenasa nereaguje s jednotlivými žlučovými kyselinami se stejnou rychlostí (Iwata & Yamasaki, 1964; Mashige et al., 1981). Této problematice jsme se věnovali v práci **Enzymatic methods may underestimate the total serum bile acid concentration** (Zizalova et al., 2020). V té jsme popsali, že účinnost tohoto enzymu se opravdu značně liší od nejlépe reagující kyseliny glykocholové po nejhůře reagující α -muricholovou, kterou enzym přemění jen pětinu za stejnou časovou jednotku oproti GCDCA. Naše zjištění jsou v souladu s dříve publikovanými daty pro hlavní lidské žlučové kyseliny CA > CDCA > DCA > LCA (Engert & Turner, 1973). Z našich dat dále vyplývá, že u jednotlivých žlučových kyselin se liší zejména rychlost reakce katalyzovaná 3α -hydroxysteroiddehydrogenasou. S prodloužením času reakce se rozdíl mezi GCA a α -MCA zmenšuje, nicméně nikdy se zcela nevyrovná. Enzymatická metoda stanovení žlučových je hojně využívanou metodou, jedná se o metodu rychlou, jednoduchou a nenáročnou na vybavení. Ve světle těchto odlišností je však jasné, že se musí lišit výsledky podle toho na jakou žlučovou kyselinu je kalibrujeme. Tím se zabývali ve své práci Danese a spolupracovníci (Danese et al., 2017). Zde měřili stejné vzorky třemi různými komerčními kity a LC-MS jako referenční metodou. Výsledky se ve všech třech případech signifikantně liší. Výrobci však složení kalibrátorů nedeklarují. Problematické mohou být rovněž vzorky, u kterých předpokládáme změny ve spektru žlučových kyselin. Na možné zkrácení výsledků v multicentrické klinické studii na pacientkách s intrahepatální cholestázou těhotných (Hague et al., 2021) poukazuje Leníček (Leníček, 2021). Ve studii porovnávali pacientky po podání UDCA nebo rifampicinu se zdravými kontrolami. V případě obou těchto terapií dochází ke dramatické změně spektra žlučových kyselin, a získáváme tak pravděpodobně podhodnocené výsledky. I přes své nedostatky je v klinické praxi enzymatická metoda stanovení žlučových kyselin většinou dostačující. Měli bychom si však být jejich

limitů vědomi. Zároveň se z těchto důvodů nezdá příliš vhodnou pro výzkumné účely.

Pro naše účely další účely se vhodnější zdála metoda LC-MS/MS. V případě této analýzy bylo nutné zvolit vhodnou preanalytickou přípravu. Kromě jiného jsme potřebovali otestovat extrakci 7- α -hydroxy-4-cholesten-3-onu (C4) ze séra. C4 je jedním z meziproduktů biosyntézy žlučových kyselin a používá se jako její marker (Freundenberg et al., 2013; Lyutakov et al., 2021). K porovnání jsme vybrali 4 metody popsané v literatuře a výsledky sepsali do práce **Comparison of simple extraction procedures in liquid chromatography–mass spectrometry based determination of serum 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one, a surrogate marker of bile acid synthesis (Lenicek et al., 2016)**. V publikaci jsme porovnávali schopnost deproteinace, odsolení, odstranění fosfolipidů, přesnost, opakovatelnost a časovou náročnost. Všechny 4 metody dosahují přijatelných výsledků ve všech těchto parametrech, variační koeficient pod 10 %, opakovatelnost mezi 88 a 97 %, nepřítomnost fosfolipidů a zbytkový protein maximálně 1 %. Metody se ale liší ve schopnosti odsolení a jsou různě časově náročné. Z hlediska odsolení dosahuje zdaleka nejlepších výsledků metoda s použitím směsi chloroform/methanol. Nejrychlejší je metoda využívající k vysrážení proteinů acetonitril. Právě tuto metodu jsme se rozhodli používat i pro extrakci C4 i žlučových kyselin při měření na LC-MS. To, že je na to tato metoda vhodná popisují ve své práci i Tagliacozzi a spolupracovníci (Tagliacozzi et al., 2003). Extrakce acetonitrem se často používá ve spojení s SPE (solid phase extraction) při analýze řady hydrofobních látek, například steroidů (Wang et al., 2019) nebo perfluorovaných sloučenin (Yeung et al., 2009). Zařazením SPE získáváme čistší vzorek, ale v komplexnějších analýzách můžeme o některé analyty přicházet. Zároveň tím samozřejmě prodlužujeme dobu analýzy (Gosetti et al., 2013). Dle našich zjištění získáváme extrakci acetonitrem dostatečně čistý vzorek pro LC-MS analýzu. A řada publikací, ve kterých SPE krok vynechávají, to potvrzuje (Janzen et al., 2011; Thomas et al., 2010; Yang et al., 2017).

Žlučové kyseliny byly dlouhá léta považovány za pouhé detergenty, až s rozvojem molekulárně genetických metod bylo objeveno, že ovlivňují celou řadu nukleárních receptorů. Tím významně ovlivňují metabolismus, a naopak řada látek má vliv na jejich expresi i vylučování (Vitek & Haluzik, 2016). My jsme se v publikaci **Iron**

overload reduces synthesis and elimination of bile acids in rat liver (Prasnicka et al., 2019) zabývali změnou v obratu žlučových kyselin u potkanů při nadměrném podávání železa. Jak jsme zjistili, u těchto potkanů dochází pravděpodobně k redukci biosyntézy žlučových kyselin. Předávkování železem vede v játrech k významnému snížení koncentrací téměř všech měřených žlučových kyselin s výjimkou GCA. V plasmě se však nemění spektrum ani koncentrace měřených žlučových kyselin. Naše data tedy ukazují, že předávkování železem vede u potkanů spíše k potlačení syntézy žlučových kyselin a zároveň ke zvýšení celkového cholesterolu v krevní plasmě. Tomu odpovídají i snížené exprese enzymů CYP7A1 i CYP8B1, klíčových enzymů biosyntézy žlučových kyselin. Blokáda této dráhy v organismu způsobuje vyšší koncentrace cholesterolu (Heubi et al., 2007). V plasmě těchto potkanů je cholesterol skutečně významně zvýšený. Spoluautoři nicméně změnili, že vysoké dávky železa mají vliv i na expresi celé řady transportérů asociovaných se žlučovými kyselinami. Jejich změny odpovídají změnám v expresi při cholestázách, nejbližší pak obstrukční cholestáze (s výjimkou BSEP, který se nemění) (Geier et al., 2007).

V takovém případě bychom však očekávali zvýšené koncentrace žlučových kyselin v játrech případně v séru (Arab et al., 2017), naše zjištění jsou však zcela opačná. Stejně tak jako při cholestázách dochází i zde k výraznému zvýšení exprese HMG-CoA reductasy (asi 2,5x), klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu (Chisholm et al., 1999; Kattermann & Creutzfeldt, 1970). Předávkování železem i cholestáza mají jednoho společného jmenovatele, a tím je oxidační stres (Copples et al., 2010; Philippe et al., 2007). To ostatně potvrzuje i naše práce, ve které jsme pozorovali zvýšené koncentrace glutationu i jeho oxidované formy u potkanů s vysokým příjmem železa. Hypercholesterolémie je v souvislosti s vysokými koncentracemi železa často zmiňována. Vztah těchto dvou molekul je však spíše nejasný. (Herbert, 1994; Sullivan, 1996). Často je diskutován v souvislosti s neurodegenerativními onemocněními, které jsou spojovány s hypercholesterolémií, oxidačním stresem i vyššími koncentracemi železa v mozku (Ong & Halliwell, 2004). Souhrnně lze říct, že vysoké dávky železa u potkanů způsobí blokádu syntézy žlučových kyselin, což vede k nárůstu koncentrací cholesterolu. Zda vysoké koncentrace cholesterolu způsobují další oxidační stres či

oxidační stres způsobený vysokými dávkami železa zvyšuje koncentrace cholesterolu je však otázkou dalšího výzkumu.

Žlučové kyseliny výrazně ovlivňují střevní mikrobiom a naopak jsou jím významně ovlivňovány (Collins et al., 2022). Jeho součástí je i *Eggerthella lenta*, tato anaerobní grampozitivní bakterie se běžně vyskytuje v trávicím traktu člověka (Eggerth, 1935). Disponuje celou řadou enzymů modifikujících žlučové kyseliny (Hirano & Masuda, 1981). Jak bylo popsáno dříve, kokultivace s touto bakterií poskytuje výhodu i dalším bakteriím (Edenharder & Schneider, 1985). Jak naznačuje naše práce ***Eggerthella lenta* DSM 2243 alleviates bile acid stress response in *Clostridium ramosum* and *Anaerostipes caccae* by transformation of bile acids** (Pedersen et al., 2022), *E. lenta* by mohla ovlivňovat růst dalších bakterií cestou změn ve spektru žlučových kyselin. Jak bylo zjištěno, stres způsobený vysokými koncentracemi DCA inhibuje růst 4 bakterií, a sice *B. longum*, *B. producta*, *C. butyricum* and *C. ramosum*, nicméně kokultivace s *E. lenta* tento stres zmírňuje. Reakce bakterií na tento stres se dají částečně předvídat. Jak je uvedeno v kapitole o bakteriální transformaci, gramnegativní bakterie (jako je *E. coli*) disponují mechanismem, který je chrání proti detergentnímu působení žlučových kyselin (Ridlon et al., 2016). My se blíže zaměřili na 3 bakteriální druhy a sice *E. coli* (nízká stresová reakce), *A. caccae* (střední reakce) a *C. ramosum* (vysoká míra stresu). Spoluautoři určovali míru stresu pomocí zeta potenciálu, který měří změny v permeabilitě membrán (Ferreya Maillard et al., 2021).

Měření ukázalo u *C. ramosum* značně zvýšenou permeabilitu membrán v případě kultivace v médiu s DCA. Tento efekt však zcela mizí v případě kokultivace s *E. lenta*. Zajímalo nás, jakým mechanismem toho tato bakterie dosahuje. Jednou z možností by mohla být transformace žlučových kyselin na jiné, méně toxické. Měřeními ketoderivátů žlučových kyselin a isomerů žlučových kyselin jsme zjistili, že při kokultivaci *E. lenta* a *C. ramosum* je více než polovina DCA transformována na 7keto-LCA a DCA isomery. Ketoderiváty žlučových kyselin mají vyšší kritickou micelární koncentraci než jejich hydroxylované či dehydroxylované varianty (Sewell et al., 1980). Nižší schopnost tvořit micely by mohla mít za následek obtížnější prostup bakteriální stěnou, a tak vysvětlovat benefity kokultivace s *E. lenta* pro *C. ramosum*. Stejná vlastnost a s tím i související nižší toxicita byla popsána u isoDCA (Devlin & Fischbach, 2015).

Současně jsme testovali, kolik z výše zmíněných bakteriálních druhů je schopných konjugovat žlučové kyseliny, a vytvářet tak konjugáty nejen s taurinem nebo glycinem, ale také s dalšími aminokyselinami. Jak je uvedeno v kapitole "Další možnosti amidace", dlouho se myslelo, že v lidském těle vznikají jen konjugáty s glycinem a taurinem (Huijghebaert & Hofmann, 1986). Až s rozvojem citlivějších analytických metod (a jejich schopností měřit konjugáty žlučových kyseliny) se zjistilo, že činností střevního mikrobiomu vzniká celá řada konjugátů s dalšími aminokyselinami (Lucas et al., 2021). V naší práci jsme zjistili, že vytvářet amidovou vazbu mezi kyselinou cholovou a tyrosinem, phenylalaninem nebo leucinem dokáže všech 8 zkoumaných bakteriálních druhů (s výjimkou TyrCA u *C. ramosum* a *E. coli*). V případě DCA je situace obdobná, jen jsme nenašli měřitelné hodnoty u *E. coli*, *C. butyricum*, ani *L. plantarum*. V případě kokultivace všech 8 bakterií s *E. lenta* jsme pozorovali spíše pokles koncentrace těchto konjugátů, nikoliv však signifikantní. Koncentrace těchto konjugátů se pohybují v rozmezí od 5 do 200 nmol/L, pravděpodobně tedy nemají na snížení toxicity DCA výrazný vliv.

V klinické praxi se stanovení žlučových kyselin u pacientů příliš nepoužívá, v doporučeních české lékařské společnosti JEP figuruje pouze k diagnostice intrahepatální cholestázy těhotných (ČGPS, 2017). Nejinak je to i v doporučeních Evropské asociace pro studium jater (Archer et al., 2022). Přitom diagnostický potenciál žlučových kyselin se zdá mnohem větší. Jako endogenní molekuly s výrazným first-pass efektem jsou silně ovlivňovány stavem jater (Aldini et al., 1982), navíc jejich spektrum odráží stav střevního mikrobiomu (Ramirez-Perez et al., 2017). Byla publikována řada prací, které navrhují, jak je možné změřené koncentrace žlučových kyselin využít v diagnostice. Zvýšené koncentrace žlučových kyselin v cirkulaci jsou silně asociovány například s těžkým poškozením jater, rakovinou jater (Farhat et al., 2022) či cirhózou (Mannes et al., 1986). Ve studii, na které aktuálně spolupracuji, zase pozorujeme potenciál k odlišení NAFLD a NASH pomocí sérových koncentrací sulfatované GCDCA. V již publikované práci **Serum concentration of**

taurochenodeoxycholic acid predicts clinically significant portal hypertension (Zizalova et al., 2023) jsme chtěli ověřit hypotézu, zda by sérové koncentrace žlučových kyselin nemohly odrážet hodnoty portálního tlaku právě z důvodu first-pass efektu, který je při portální hypertenzi narušený vznikem portosystémových spojek (Moller &

Bendtsen, 2018). Použili jsme explorativní kohortu 21 pacientů, u kterých jsme měli k dispozici jak portální, tak periferní krev. V obou těchto vzorcích jsme změřili 23 žlučových kyselin na LC-MS/MS. Porovnáním portální a periferní krve jsme však zjistili, že v případech našich pacientů je vstřebávání žlučových kyselin vážně narušeno a koncentrace v portální a periferní krvi se téměř neliší (jen asi o 10 %). Za fyziologických podmínek by rozdíl mezi portální a periferní krvi by měl být mezi 70 % a 90 % (LaRusso et al., 1978; Marin et al., 2015). V případech cirhózy se však naše zjištění shodují s literaturou (Lindblad et al., 1977).

Na explorativní kohortě jsme zároveň zjistili, že s hodnotami portálních tlaků (HVPG) korelují sérové koncentrace 2 žlučových kyselin, a to GCDCA a TCDCA. Jako nejspolehlivější se ukázala jejich schopnost predikovat klinicky významnou portální hypertenzi. Za tu jsou považovány hodnoty vyšší než 10 mm Hg (Garcia-Tsao, 2016). Pozorovali jsme i dramatickou změnu v poměru CA a CDCA. Zatímco fyziologicky se tyto dvě žlučové kyseliny vyskytují v poměru 3:1 (Carey, 1958), u našich pacientů nalézáme poměr 1:3. Schopnost GCDCA a TCDCA predikovat klinicky významnou portální hypertenzi jsme následně ověřili na validační kohortě 214 pacientů. Na té jsme potvrdili, že obě tyto žlučové kyseliny jsou schopné odlišit portální tlak nad 10 mm Hg s vysokou specifitou a senzitivitou. V další fázi jsme ověřovali, zda by se prediktivní schopnost těchto žlučových kyselin nedala zlepšit přidáním některého z markerů portální hypertenze popsanych v literatuře. Konkrétně sérových koncentrací albuminu (Harjai et al., 1995), kyseliny hyaluronové (Kropf et al., 1991), bilirubinu (Park et al., 2009), poměru AST/ALT (Heart Protection Study Collaborative, 2002), kreatininu (Garcia-Pagan et al., 2020), osteopontinu (Bruha et al., 2016) a průměru sleziny (měřeného ultrasonograficky) (Gonzalez-Ojeda et al., 2014). Všechny tyto parametry, s výjimkou kreatininu, korelují s portálním tlakem i u naší validační kohorty. Na základě logistické regrese jsme zjistili, že nejvýznamnějšími prediktory (z výše uvedených) jsou sérové koncentrace TCDCA, AST/ALT a průměr sleziny. S pomocí těchto dat jsme se definovali vztah:

$\text{Průměr sleziny [mm]} / 42 + 2,3 \text{ AST/ALT} + 0,6 \text{ TCDCA} \geq 6.$

Hodnoty vyšší nebo rovno 6 predikují klinicky významnou portální hypertenzi s 95 % senzitivitou a 76 % specifitou (AUROC 0,93 ± 0,04). Teoreticky bychom tak s tímto modelem mohli z odebrané krve diagnostikovat klinicky významnou portální hypertenzi namísto

používané katetrizace jaterních žil (de Franchis & Baveno, 2015), což by odstranilo zdravotní rizika tohoto vyšetření a umožnilo intenzivnější sledování pacientů s možností lépe reagovat na případné změny zdravotního stavu.

Intenzivnější výzkum v oblasti žlučových kyselin probíhá až od 50. let 20.století. Od té doby bylo zjištěno, že žlučové kyseliny v organismu neplní jen svou detergentní funkci, ale výrazným způsobem ovlivňují střevní mikrobiom a cestou transkripčních faktorů i řadu metabolických pochodů. Zároveň dnes víme, že se jedná o poměrně heterogenní skupinu, značně se liší svými vlastnostmi a tím i působením v organismu (Hofmann & Hagey, 2014). Výzkum v této oblasti však není zdaleka u konce, a ani to, co už víme, jsme ještě nedokázali v klinické praxi naplno využít. Snad by se to mohlo povést s rozvojem citlivých analytických metod a jejich zavedení do rutinní praxe.

Citace

- Akita, H., Suzuki, H., Ito, K., Kinoshita, S., Sato, N., Takikawa, H., & Sugiyama, Y. (2001). Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta*, 1511(1), 7-16. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00355-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00355-2)
- Aldini, R., Roda, A., Labate, A. M., Cappelleri, G., Roda, E., & Barbara, L. (1982). Hepatic bile acid uptake: effect of conjugation, hydroxyl and keto groups, and albumin binding. *J Lipid Res*, 23(8), 1167-1173. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7175373>
- Aldrich, M. B., Mary Sue. (1928). STUDIES IN THE METABOLISM OF THE BILE. *The Journal of Biological Chemistry*, 77, 519-537.
- Arab, J. P., Cabrera, D., & Arrese, M. (2017). Bile Acids in Cholestasis and its Treatment. *Ann Hepatol*, 16(Suppl. 1: s3-105.), s53-s57. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5497>
- Archer, A. J., Belfield, K. J., Orr, J. G., Gordon, F. H., & Abeysekera, K. W. (2022). EASL clinical practice guidelines: non-invasive liver tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *Frontline Gastroenterol*, 13(5), 436-439. <https://doi.org/10.1136/flgastro-2021-102064>
- Bruha, R., Jachymova, M., Petrtýl, J., Dvorak, K., Lenicek, M., Urbanek, P., Svestka, T., & Vitek, L. (2016). Osteopontin: A non-invasive parameter of portal hypertension and prognostic marker of cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 22(12), 3441-3450. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i12.3441>
- Cabral, D. J. S., D.M. (1989). Physical chemistry of bile. In F. Schultz, Rauner (Ed.), *In Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System* (pp. 621-662). American Physiological Society.
- Carey, J. B., Jr. (1958). The serum trihydroxy-dihydroxy bile acid ratio in liver and biliary tract disease. *J Clin Invest*, 37(11), 1494-1503. <https://doi.org/10.1172/JCI103741>
- Collins, S. L., Stine, J. G., Bisanz, J. E., Okafor, C. D., & Patterson, A. D. (2022). Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease. *Nat Rev Microbiol*. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00805-x>
- Copple, B. L., Jaeschke, H., & Klaassen, C. D. (2010). Oxidative stress and the pathogenesis of cholestasis. *Semin Liver Dis*, 30(2), 195-204. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1253228>
- ČGPS, Č. g. a. p. s. (2017). Intrahepatální cholestáza v těhotenství. Doporučený postup. *Česká gynekologie 2*.
- Danese, E., Salvagno, G. L., Negrini, D., Brocco, G., Montagnana, M., & Lippi, G. (2017). Analytical evaluation of three enzymatic assays for measuring total bile acids in plasma using a fully-automated clinical chemistry platform. *PLoS One*, 12(6), e0179200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179200>
- Dawson, P. A., Lan, T., & Rao, A. (2009). Bile acid transporters. *J Lipid Res*, 50(12), 2340-2357. <https://doi.org/10.1194/jlr.R900012-JLR200>
- de Franchis, R., & Baveno, V. I. F. (2015). Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J Hepatol*, 63(3), 743-752. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.05.022>

- Devlin, A. S., & Fischbach, M. A. (2015). A biosynthetic pathway for a prominent class of microbiota-derived bile acids. *Nat Chem Biol*, 11(9), 685-690. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1864>
- Duane, W. C., Pooler, P. A., & Hamilton, J. N. (1988). Bile acid synthesis in man. In vivo activity of the 25-hydroxylation pathway. *J Clin Invest*, 82(1), 82-85. <https://doi.org/10.1172/JCI113605>
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., & Collins, J. K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr*, 73(2 Suppl), 386S-392S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.386s>
- Edenharder, R., & Schneider, J. (1985). 12 beta-dehydrogenation of bile acids by *Clostridium paraputrificum*, *C. tertium*, and *C. difficile* and epimerization at carbon-12 of deoxycholic acid by cocultivation with 12 alpha-dehydrogenating *Eubacterium lentum*. *Appl Environ Microbiol*, 49(4), 964-968. <https://doi.org/10.1128/aem.49.4.964-968.1985>
- Eggerth, A. H. (1935). The Gram-positive Non-spore-bearing Anaerobic Bacilli of Human Feces. *J Bacteriol*, 30(3), 277-299. <https://doi.org/10.1128/jb.30.3.277-299.1935>
- Engert, R., & Turner, M. D. (1973). Problems in the measurement of bile acids with 3-hydroxysteroid dehydrogenase. *Anal Biochem*, 51(2), 399-407. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90493-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90493-4)
- Farhat, Z., Freedman, N. D., Sampson, J. N., Falk, R. T., Koshiol, J., Weinstein, S. J., Albanes, D., Sinha, R., & Loftfield, E. (2022). A prospective investigation of serum bile acids with risk of liver cancer, fatal liver disease, and biliary tract cancer. *Hepatol Commun*, 6(9), 2391-2399. <https://doi.org/10.1002/hep4.2003>
- Fieser, L. F., & Fieser, M. A. (1959). *Steroids* (New ed.).
- Fini, A., & Roda, A. (1987). Chemical properties of bile acids. IV. Acidity constants of glycine-conjugated bile acids. *J Lipid Res*, 28(7), 755-759. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3625035>
- Freundenberg, F., Gothe, F., Beigel, F., Rust, C., & Koletzko, S. (2013). Serum 7-alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one as a marker for bile acid loss in children. *J Pediatr*, 163(5), 1367-1371 e1361. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.06.083>
- Garcia-Pagan, J. C., Saffo, S., Mandorfer, M., & Garcia-Tsao, G. (2020). Where does TIPS fit in the management of patients with cirrhosis? *JHEP Rep*, 2(4), 100122. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100122>
- Garcia-Tsao, G. (2016). Beta blockers in cirrhosis: The window re-opens. *J Hepatol*, 64(3), 532-534. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.12.012>
- Geier, A., Wagner, M., Dietrich, C. G., & Trauner, M. (2007). Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta*, 1773(3), 283-308. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.014>
- Gonzalez-Ojeda, A., Cervantes-Guevara, G., Chavez-Sanchez, M., Davalos-Cobian, C., Ornelas-Cazares, S., Macias-Amezcuca, M. D., Chavez-Tostado, M., Ramirez-Campos, K. M., Ramirez-Arce Adel, R., & Fuentes-Orozco, C. (2014). Platelet count/spleen diameter ratio to predict esophageal varices in Mexican patients with hepatic cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 20(8), 2079-2084. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i8.2079>

- Gosetti, F., Mazzucco, E., Gennaro, M. C., & Marengo, E. (2013). Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited steroids in human biological matrices. A review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 927, 22-36. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.003>
- Griffiths, W. J., & Sjovall, J. (2010). Bile acids: analysis in biological fluids and tissues. *J Lipid Res*, 51(1), 23-41. <https://doi.org/10.1194/jlr.R001941-JLR200>
- Hague, W. M., Callaway, L., Chambers, J., Chappell, L., Coat, S., de Haan-Jebbink, J., Dekker, M., Dixon, P., Dodd, J., Fuller, M., Gordijn, S., Graham, D., Heikinheimo, O., Hennessy, A., Kaaja, R., Khong, T. Y., Lampio, L., Louise, J., Makris, A., . . . Williamson, C. (2021). A multi-centre, open label, randomised, parallel-group, superiority Trial to compare the efficacy of URsodeoxycholic acid with RIFampicin in the management of women with severe early onset Intrahepatic Cholestasis of pregnancy: the TURRIFIC randomised trial. *BMC Pregnancy Childbirth*, 21(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s12884-020-03481-y>
- Hardison, W. G. (1978). Hepatic taurine concentration and dietary taurine as regulators of bile acid conjugation with taurine. *Gastroenterology*, 75(1), 71-75. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/401099>
- Harjai, K. J., Kamble, M. S., Ashar, V. J., Anklesaria, P. S., Ratnam, K. L., & Abraham, P. (1995). Portal venous pressure and the serum-ascites albumin concentration gradient. *Cleve Clin J Med*, 62(1), 62-67. <https://doi.org/10.3949/ccjm.62.1.62>
- Heart Protection Study Collaborative, G. (2002). MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 360(9326), 7-22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09327-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09327-3)
- Herbert, V. (1994). Iron worsens high-cholesterol-related coronary artery disease. *Am J Clin Nutr*, 60(2), 299-300. <https://doi.org/10.1093/ajcn/60.2.299>
- Heubi, J. E., Setchell, K. D., & Bove, K. E. (2007). Inborn errors of bile acid metabolism. *Semin Liver Dis*, 27(3), 282-294. <https://doi.org/10.1055/s-2007-985073>
- Hirano, S., & Masuda, N. (1981). Transformation of bile acids by *Eubacterium lentum*. *Appl Environ Microbiol*, 42(5), 912-915. <https://doi.org/10.1128/aem.42.5.912-915.1981>
- Hofmann, A. F. (1961). Thin-layer adsorption chromatography of free and conjugated bile acids on silicic acid. *Journal of Lipid Research*, 3(1), 127-128.
- Hofmann, A. F. (1963). The Function of Bile Salts in Fat Absorption. The Solvent Properties of Dilute Micellar Solutions of Conjugated Bile Salts. *Biochem J*, 89, 57-68. <https://doi.org/10.1042/bj0890057>
- Hofmann, A. F. (1999). The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med*, 159(22), 2647-2658. <https://doi.org/10.1001/archinte.159.22.2647>
- Hofmann, A. F. (2009). Bile acids: trying to understand their chemistry and biology with the hope of helping patients. *Hepatology*, 49(5), 1403-1418. <https://doi.org/10.1002/hep.22789>
- Hofmann, A. F., & Hagey, L. R. (2014). Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades. *J Lipid Res*, 55(8), 1553-1595. <https://doi.org/10.1194/jlr.R049437>
- Hofmann, A. F., Hagey, L. R., & Krasowski, M. D. (2010). Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *J Lipid Res*, 51(2), 226-246. <https://doi.org/10.1194/jlr.R000042>

- Hofmann, A. F., & Mysels, K. J. (1992). Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH, and Ca²⁺ ions. *J Lipid Res*, 33(5), 617-626. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1619357>
- Hofmann, A. F., & Roda, A. (1984). Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J Lipid Res*, 25(13), 1477-1489. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6397555>
- Huijghebaert, S. M., & Hofmann, A. F. (1986). Pancreatic carboxypeptidase hydrolysis of bile acid-amino conjugates: selective resistance of glycine and taurine amides. *Gastroenterology*, 90(2), 306-315. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(86\)90925-x](https://doi.org/10.1016/0016-5085(86)90925-x)
- Hylemon, P. B., Bohdan, P. M., Sirica, A. E., Heuman, D. M., & Vlahcevic, Z. R. (1990). Cholesterol and bile acid metabolism in cultures of primary rat bile ductular epithelial cells. *Hepatology*, 11(6), 982-988. <https://doi.org/10.1002/hep.1840110612>
- Hylemon, P. B., Zhou, H., Pandak, W. M., Ren, S., Gil, G., & Dent, P. (2009). Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res*, 50(8), 1509-1520. <https://doi.org/10.1194/jlr.R900007-JLR200>
- Chiang, J. Y. (1998). Regulation of bile acid synthesis. *Front Biosci*, 3, d176-193. <https://doi.org/10.2741/a273>
- Chisholm, J. W., Nation, P., Dolphin, P. J., & Agellon, L. B. (1999). High plasma cholesterol in drug-induced cholestasis is associated with enhanced hepatic cholesterol synthesis. *Am J Physiol*, 276(5), G1165-1173. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.5.G1165>
- Iwata, T., & Yamasaki, K. (1964). Enzymatic Determination and Thin-Layer Chromatography of Bile Acids in Blood. *J Biochem*, 56, 424-431. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a128013>
- Janzen, N., Sander, S., Terhardt, M., Steuerwald, U., Peter, M., Das, A. M., & Sander, J. (2011). Rapid steroid hormone quantification for congenital adrenal hyperplasia (CAH) in dried blood spots using UPLC liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroids*, 76(13), 1437-1442. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.07.013>
- Kattermann, R., & Creutzfeldt, W. (1970). The effect of experimental cholestasis on the negative feedback regulation of cholesterol synthesis in rat liver. *Scand J Gastroenterol*, 5(5), 337-342. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5455818>
- Killenber, P. G., & Jordan, J. T. (1978). Purification and characterization of bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase from rat liver. *J Biol Chem*, 253(4), 1005-1010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/624713>
- Kropf, J., Gressner, A. M., & Tittor, W. (1991). Logistic-regression model for assessing portal hypertension by measuring hyaluronic acid (hyaluronan) and laminin in serum. *Clin Chem*, 37(1), 30-35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1988206>
- Kumar, R. S., Brannigan, J. A., Prabhune, A. A., Pundle, A. V., Dodson, G. G., Dodson, E. J., & Suresh, C. G. (2006). Structural and functional analysis of a conjugated bile salt hydrolase from *Bifidobacterium longum* reveals an evolutionary relationship with penicillin V acylase. *J Biol Chem*, 281(43), 32516-32525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604172200>
- LaRusso, N. F., Hoffman, N. E., Korman, M. G., Hofmann, A. F., & Cowen, A. E. (1978). Determinants of fasting and postprandial serum bile acid levels in healthy man. *Am J Dig Dis*, 23(5), 385-391. <https://doi.org/10.1007/BF01072919>

- Lenicek, M. (2021). Mathematical recalibration of total bile acids: comparing the incomparable? *Clin Chem Lab Med*, 59(12), 1889-1890. <https://doi.org/10.1515/cclm-2021-0793>
- Lenicek, M., Vecka, M., Zizalova, K., & Vitek, L. (2016). Comparison of simple extraction procedures in liquid chromatography-mass spectrometry based determination of serum 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one, a surrogate marker of bile acid synthesis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1033-1034, 317-320. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.08.046>
- Lindblad, L., Lundholm, K., & Schersten, T. (1977). Bile acid concentrations in systemic and portal serum in presumably normal man and in cholestatic and cirrhotic conditions. *Scand J Gastroenterol*, 12(4), 395-400. <https://doi.org/10.3109/00365527709181679>
- Linnet, K., Andersen, J. R., & Hesselheldt, P. (1984). Concentrations of glycine- and taurine-conjugated bile acids in portal and systemic venous serum in man. *Scand J Gastroenterol*, 19(4), 575-578. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6463582>
- Lucas, L. N., Barrett, K., Kerby, R. L., Zhang, Q., Cattaneo, L. E., Stevenson, D., Rey, F. E., & Amador-Noguez, D. (2021). Dominant Bacterial Phyla from the Human Gut Show Widespread Ability To Transform and Conjugate Bile Acids. *mSystems*, e0080521. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00805-21>
- Lytakov, I., Lozanov, V., Sugareva, P., Valkov, H., & Penchev, P. (2021). Serum 7- α -hydroxy-4-cholesten-3-one and fibroblast growth factor-19 as biomarkers diagnosing bile acid malabsorption in microscopic colitis and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 33(3), 380-387. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001925>
- Mannes, G. A., Thieme, C., Stellaard, F., Wang, T., Sauerbruch, T., & Paumgartner, G. (1986). Prognostic significance of serum bile acids in cirrhosis. *Hepatology*, 6(1), 50-53. <https://doi.org/10.1002/hep.1840060110>
- Marin, J. J., Macias, R. I., Briz, O., Banales, J. M., & Monte, M. J. (2015). Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *Curr Drug Metab*, 17(1), 4-29. <https://doi.org/10.2174/1389200216666151103115454>
- Mashige, F., Tanaka, N., Maki, A., Kamei, S., & Yamanaka, M. (1981). Direct spectrophotometry of total bile acids in serum. *Clin Chem*, 27(8), 1352-1356. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6895053>
- Moller, S., & Bendtsen, F. (2018). The pathophysiology of arterial vasodilatation and hyperdynamic circulation in cirrhosis. *Liver Int*, 38(4), 570-580. <https://doi.org/10.1111/liv.13589>
- Natalini, B., Sardella, R., Gioiello, A., Ianni, F., Di Michele, A., & Marinozzi, M. (2014). Determination of bile salt critical micellization concentration on the road to drug discovery. *J Pharm Biomed Anal*, 87, 62-81. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.06.029>
- Ong, W. Y., & Halliwell, B. (2004). Iron, atherosclerosis, and neurodegeneration: a key role for cholesterol in promoting iron-dependent oxidative damage? *Ann N Y Acad Sci*, 1012, 51-64. <https://doi.org/10.1196/annals.1306.005>
- Park, S. H., Park, T. E., Kim, Y. M., Kim, S. J., Baik, G. H., Kim, J. B., & Kim, D. J. (2009). Non-invasive model predicting clinically-significant portal hypertension in patients with advanced fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*, 24(7), 1289-1293. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.05904.x>

- Pedersen, K. J., Haange, S. B., Zizalova, K., Viehof, A., Clavel, T., Lenicek, M., Engelmann, B., Wick, L. Y., Schaap, F. G., Jehmlich, N., Rolle-Kampczyk, U., & von Bergen, M. (2022). Eggerthella lenta DSM 2243 Alleviates Bile Acid Stress Response in Clostridium ramosum and Anaerostipes caccae by Transformation of Bile Acids. *Microorganisms*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102025>
- Pettenkofer, M. J. V. (1844). Notiz ü eine bneue Rection auf galle und Zucker. *Liebig's Annual der chemie und Pharmacie*52, 90-96.
- Philipp, B. (2011). Bacterial degradation of bile salts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89(4), 903-915. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2998-0>
- Philippe, M. A., Ruddell, R. G., & Ramm, G. A. (2007). Role of iron in hepatic fibrosis: one piece in the puzzle. *World J Gastroenterol*, 13(35), 4746-4754. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i35.4746>
- Prasnicka, A., Lastuvkova, H., Alaei Faradonbeh, F., Cermanova, J., Hroch, M., Mokry, J., Dolezelova, E., Pavek, P., Zizalova, K., Vitek, L., Nachtigal, P., & Micuda, S. (2019). Iron overload reduces synthesis and elimination of bile acids in rat liver. *Sci Rep*, 9(1), 9780. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46150-7>
- Pyka, A. (2008). TLC of selected bile acids: Detection and separation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31(9), 1373-1385. <https://doi.org/10.1080/10826070802020028>
- Ramirez-Perez, O., Cruz-Ramon, V., Chinchilla-Lopez, P., & Mendez-Sanchez, N. (2017). The Role of the Gut Microbiota in Bile Acid Metabolism. *Ann Hepatol*, 16 Suppl 1, S21-S26. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5672>
- Rembacz, K. P., Woudenberg, J., Hoekstra, M., Jonkers, E. Z., van den Heuvel, F. A., Buist-Homan, M., Woudenberg-Vrenken, T. E., Rohacova, J., Marin, M. L., Miranda, M. A., Moshage, H., Stellaard, F., & Faber, K. N. (2010). Unconjugated bile salts shuttle through hepatocyte peroxisomes for taurine conjugation. *Hepatology*, 52(6), 2167-2176. <https://doi.org/10.1002/hep.23954>
- Ridlon, J. M., Harris, S. C., Bhowmik, S., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2016). Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes*, 7(1), 22-39. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1127483>
- Ridlon, J. M., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*, 47(2), 241-259. <https://doi.org/10.1194/jlr.R500013-JLR200>
- Roda, A., & Fini, A. (1984). Effect of nuclear hydroxy substituents on aqueous solubility and acidic strength of bile acids. *Hepatology*, 4(5 Suppl), 725-765. <https://doi.org/10.1002/hep.1840040813>
- Russell, D. W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*, 72, 137-174. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712>
- Sarenac, T. M., & Mikov, M. (2018). Bile Acid Synthesis: From Nature to the Chemical Modification and Synthesis and Their Applications as Drugs and Nutrients. *Front Pharmacol*, 9, 939. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00939>
- Setchell, K. D., Dumaswala, R., Colombo, C., & Ronchi, M. (1988). Hepatic bile acid metabolism during early development revealed from the analysis of human fetal gallbladder bile. *J Biol Chem*, 263(32), 16637-16644. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3182806>

- Sewell, R. B., Hoffman, N. E., Smallwood, R. A., & Cockbain, S. (1980). Bile acid structure and bile formation: a comparison of hydroxy and keto bile acids. *Am J Physiol*, *238*(1), G10-17. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1980.238.1.G10>
- Sjovall, J. (1953). On the separation of bile acids by partition chromatography. *Acta Physiol Scand*, *29*(2-3), 232-240. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1953.tb01020.x>
- Sjovall, J. (1959). Dietary glycine and taurine on bile acid conjugation in man; bile acids and steroids 75. *Proc Soc Exp Biol Med*, *100*(4), 676-678. <https://doi.org/10.3181/00379727-100-24741>
- Styles, N. A., Falany, J. L., Barnes, S., & Falany, C. N. (2007). Quantification and regulation of the subcellular distribution of bile acid coenzyme A:amino acid N-acyltransferase activity in rat liver. *J Lipid Res*, *48*(6), 1305-1315. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600472-JLR200>
- Sullivan, J. L. (1996). Iron versus cholesterol--response to dissent by Weintraub et al. *J Clin Epidemiol*, *49*(12), 1359-1362. [https://doi.org/10.1016/s0895-4356\(96\)00293-4](https://doi.org/10.1016/s0895-4356(96)00293-4)
- Tagliacozzi, D., Mozzi, A. F., Casetta, B., Bertucci, P., Bernardini, S., Di Ilio, C., Urbani, A., & Federici, G. (2003). Quantitative analysis of bile acids in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: a simple and rapid one-step method. *Clin Chem Lab Med*, *41*(12), 1633-1641. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2003.247>
- Tamesue, N., & Juniper, K., Jr. (1967). Concentrations of bile salts at the critical micellar concentration of human gall bladder bile. *Gastroenterology*, *52*(3), 473-479. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6019966>
- Thomas, A., Guddat, S., Kohler, M., Krug, O., Schanzer, W., Petrou, M., & Thevis, M. (2010). Comprehensive plasma-screening for known and unknown substances in doping controls. *Rapid Commun Mass Spectrom*, *24*(8), 1124-1132. <https://doi.org/10.1002/rcm.4492>
- Trefflich, I., Jabakhanji, A., Menzel, J., Blaut, M., Michalsen, A., Lampen, A., Abraham, K., & Weikert, C. (2020). Is a vegan or a vegetarian diet associated with the microbiota composition in the gut? Results of a new cross-sectional study and systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, *60*(17), 2990-3004. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1676697>
- Vaz, F. M., & Ferdinandusse, S. (2017). Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Mol Aspects Med*, *56*, 10-24. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.03.003>
- Vitek, L., & Haluzik, M. (2016). The role of bile acids in metabolic regulation. *J Endocrinol*, *228*(3), R85-96. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0469>
- Wang, Y., Peng, D., Zhu, Y., Xie, S., Pan, Y., Chen, D., Tao, Y., & Yuan, Z. (2019). Establishment of pressurized liquid extraction followed by HPLC-MS/MS method for the screening of adrenergic drugs, steroids, sedatives, colorants and antioxidants in swine feed. *J Sep Sci*, *42*(10), 1915-1929. <https://doi.org/10.1002/jssc.201801001>
- Wong, M. H., Oelkers, P., Craddock, A. L., & Dawson, P. A. (1994). Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem*, *269*(2), 1340-1347. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8288599>
- Yang, T., Shu, T., Liu, G., Mei, H., Zhu, X., Huang, X., Zhang, L., & Jiang, Z. (2017). Quantitative profiling of 19 bile acids in rat plasma, liver, bile and different intestinal section contents to investigate bile acid homeostasis and the application of temporal

- variation of endogenous bile acids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 172, 69-78.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.05.015>
- Yeung, L. W., Taniyasu, S., Kannan, K., Xu, D. Z., Guruge, K. S., Lam, P. K., & Yamashita, N. (2009). An analytical method for the determination of perfluorinated compounds in whole blood using acetonitrile and solid phase extraction methods. *J Chromatogr A*, 1216(25), 4950-4956. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.070>
- Zizalova, K., Novakova, B., Vecka, M., Petrtyl, J., Lanska, V., Pelinkova, K., Smid, V., Bruha, R., Vitek, L., & Lenicek, M. (2023). Serum concentration of taurochenodeoxycholic acid predicts clinically significant portal hypertension. *Liver Int*, 43(4), 888-895.
<https://doi.org/10.1111/liv.15481>
- Zizalova, K., Vecka, M., Vitek, L., & Lenicek, M. (2020). Enzymatic methods may underestimate the total serum bile acid concentration. *PLoS One*, 15(7), e0236372.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236372>