

Doktorský studijní program

**Lékařská farmakologie**

**Farmakologická regulace homeostázy žlučových kyselin  
u experimentální nealkoholové steatohepatitidy**

Pharmacological regulation of bile acid homeostasis  
in experimental nonalcoholic steatohepatitis

**Ing. Hana Laštůvková**

Školitel: prof. MUDr. Stanislav Mičuda, PhD.

Hradec Králové, 2024

## **Prohlášení autora**

---

### **Prohlášení:**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

**Hradec Králové, 2024**

**Ing. Hana Laštůvková**

## Poděkování

---

Ráda bych touto cestou vyjádřila své upřímné poděkování všem, kteří mi pomáhali během mého studia, a tak přispěli k této práci. Můj největší dík patří prof. MUDr. Stanislavu Mičudovi, Ph.D., mému školiteli, za jeho vynikající vedení během mého doktorského studia. Děkuji mu za odborné a laskavé rady, za jeho nekonečnou trpělivost a podporu při řešení problémů.

Zvláštní poděkování patří MUDr. Jolaně Schreiberové, Ph.D. a Bc. Kristýně Trubačové za podnětnou spolupráci a každodenní podporu. Děkuji jim za jejich čas, který mi věnovali a přátelský přístup. Děkuji také doc. Ing. Miloši Hrochovi, Ph.D. a Bc. Janě Lemfeldové za praktickou pomoc v analytických metodách. Dagmar Ježkové děkuji za praktické vedení a pomoc při práci se zvířaty. Mé poděkování patří také všem mým kolegům z Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové za vědeckou podporu, odborné rady a vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí.

V neposlední řadě patří můj vřelý dík mé rodině a přátelům za jejich podporu a bezpodmínečnou lásku.

Tato disertační práce je koncipována jako komentovaný soubor tří publikovaných původních vědeckých prací na téma farmakologická regulace homeostázy žlučových kyselin u experimentální nealkoholové steatohepatitidy. Dizertační práce vznikla za finanční podpory následujících grantových projektů (v abecedním pořadí): Cooperatio LFHK, GA ČR 19-14497S, GA UK 346218, PERSONMED No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17\_048/0007441 a PROGRES Q40/5.

# Obsah

---

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	ŽLUČOVÉ KYSELINY .....	1
1.1.1	<i>Syntéza žlučových kyselin</i> .....	2
1.1.1.1	Klasická cesta tvorby žlučových kyselin.....	2
1.1.1.2	Alternativní cesta tvorby žlučových kyselin .....	2
1.1.2	<i>Enterohepatální cirkulace</i> .....	4
1.2	TRANSPORTNÍ SYSTÉMY ŽK V JÁTRECH A STŘEVĚ .....	6
1.2.1	<i>Kanalikulární transport v játrech</i> .....	6
1.2.1.1	MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2, gen <i>ABCC2</i> ) .....	6
1.2.1.2	BSEP (bile salt export pump, gen <i>ABCB11</i> ).....	7
1.2.2	<i>Bazolaterální import v játrech</i> .....	7
1.2.2.1	NTCP (Na <sup>+</sup> -taurocholate cotransporting polypeptide, gen <i>SLC10A1</i> ) .....	8
1.2.2.2	OATP (organic anion transporting polypeptides, gen <i>SLCO</i> ) .....	8
1.2.3	<i>Transport žlučových kyselin ve střevě</i> .....	9
1.2.3.1	ASBT (apical sodium–bile acid transporter, gen <i>SLC10A2</i> ) .....	9
1.2.3.2	IBABP (ileal bile acid-binding protein, gen <i>FABP6</i> ) .....	10
1.2.3.3	OST $\alpha/\beta$ (organic solute transporter $\alpha/\beta$ , gen: <i>SLC51A/B</i> ).....	10
1.3	CELKOVÝ OBSAH ŽK (POOL) A JEHO REGULACE .....	10
1.3.1	<i>FXR</i> .....	11
1.4	NASH .....	13
1.4.1	<i>Střevní mikrobiom</i> .....	15
1.5	STATINY .....	16
1.6	$\beta$ -BLOKÁTORY.....	18
1.6.1	<i>Karvedilol</i> .....	18
<b>2</b>	<b>CÍLE</b> .....	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>VÝSLEDKY A KOMENTÁŘE</b> .....	<b>21</b>
3.1	KARVEDILOL NARUŠUJE HOMEOSTÁZU ŽLUČOVÝCH KYSELIN U MYŠÍ: DŮSLEDKY U NEALKOHOLOVÉ STEATOHEPATITIDY .....	21
3.2	ATORVASTATIN MODULUJE HOMEOSTÁZU ŽLUČOVÝCH KYSELIN U MYŠÍ S DIETNĚ INDUKOVANOU NEALKOHOLOVOU STEATOHEPATITIDOU .....	23
3.3	LABETALOL A SOLUBILNÍ ENDOGLIN ZHORŠUJÍ RETENCI ŽLUČOVÝCH KYSELIN U MYŠÍ S CHOLESTÁZOU INDUKOVANOU ETHINYLESTRADIOLEM .....	25
<b>4</b>	<b>DISKUSE</b> .....	<b>27</b>
4.1	ŽLUČOVÉ KYSELINY A NASH.....	27
4.2	KARVEDILOL NARUŠUJE HOMEOSTÁZU ŽLUČOVÝCH KYSELIN U MYŠÍ: DŮSLEDKY U NEALKOHOLOVÉ STEATOHEPATITIDY .....	28
4.3	ATORVASTATIN MODULUJE HOMEOSTÁZU ŽLUČOVÝCH KYSELIN U MYŠÍ S NEALKOHOLOVOU STEATOHEPATITIDOU INDUKOVANOU DIETOU .....	31
4.4	LABETALOL A SOLUBILNÍ ENDOGLIN ZHORŠUJÍ RETENCI ŽLUČOVÝCH KYSELIN U MYŠÍ S CHOLESTÁZOU INDUKOVANOU ETHINYLESTRADIOLEM .....	33

<b>5</b>	<b>ZÁVĚRY .....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>50</b>

## Seznam použitých zkratek

---

ABC	ABC transportní protein vázající ATP (ATP-binding cassette)
ABCC	ABC transportní protein vázající ATP podrodina C
Acc	acetyl-CoA karboxylasa
ACO	acyl-CoA oxidasa
Akt	proteinkináza B
ALT	alaninaminotransferasa
ASBT (IBAT) ( <i>SLC10A2</i> )	apical sodium-dependent bile acid transporter = ileal bile acid transporter ( <i>gen</i> )
ATP	adenosintrifosfát
BAAT	bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferasa
BACS	bile acyl-CoA syntetasa
BAR501	6 $\beta$ -ethyl-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-ol
BRIC-2	benigni recidivující intrahepatální cholestáza typu 2
BSEP ( <i>ABCB11</i> )	bile salt export pump ( <i>gen</i> )
BSH	bile salt hydrolasa
CA (TCA)	kyselina cholová (taurocholová)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CDCA (TCDCA)	kyselina chenodeoxycholová (taurochenodeoxycholová)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CPT1	karnitin palmitoyltransferasa 1
CVD	kardiovaskulární onemocnění
CYP27A1	sterol-27-hydroxylasa
Cyp2a12	cytochrom P450 2a12
Cyp2c70	sterol-6 $\beta$ -hydroxylasa
CYP2C9	izoenzym 2C9 cytochromu P450
CYP2D6	izoenzym 2D6 cytochromu P450
CYP3A4	izoenzym 3A4 cytochromu P450
CYP7A1	cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylasa
CYP7B1	oxysterol-7 $\alpha$ -hydroxylasa
CYP8B1	sterol-12 $\alpha$ -hydroxylasa
DCA (TDCA)	kyselina deoxycholová (taurodeoxycholová)
DM2T	diabetes mellitus 2. typu

eNOS	endoteliální syntasa oxidu dusnatého
EPAC1	výměnný protein přímo aktivovaný cAMP 1
ERK	extracelulární signální redukována kináza
F4/80	marker monocytů a makrofágů (z angl. <i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i> )
Fasn	syntasa mastných kyselin
FGF15/19	fibroblastový růstový faktor 15/19
FGFR4	receptor fibroblastového růstového faktoru
FXR	farnesoidní X receptor
GPBAR-1 (TGR5)	receptor 1 pro žlučové kyseliny spřažený s G proteinem
GPR30	estrogenový receptor spřažený s G proteinem
GR	glukokortikoidní receptor
GSH	redukována glutathion
GSSG	glutathion disulfid (oxidována)
GTPáza	malý protein vázající guanosintrifosfát
HCA (THCA)	hyocholová kyselina (taurohyocholová)
HCC	hepatocelulární karcinom
HCO <sub>3</sub>	hydrogenuhličitan
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HepaRG	buněčná linie lidských jaterních buněk
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl koenzym A reduktasa
HNF4 $\alpha$	hepatocytární jaderný faktor 4 $\alpha$ (z angl. <i>hepatocyte nuclear factor 4<math>\alpha</math></i> )
HSCs	jaterní hvězdicové buňky
IBABP ( <i>FABP6</i> )	protein vázající žlučové kyseliny v ileu (z angl. <i>ileal bile acid binding protein</i> )
ICP	intrahepatální cholestáza v těhotenství
IL-1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
iNOS	indukovatelná syntasa oxidu dusnatého
INT-767	6 $\alpha$ -ethyl-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,23-trihydroxy-24-nor-5 $\beta$ -cholan-23-sulfate
ISA	vnitřní sympatomimetická aktivita
JNK	c-Jun N-kináza
KCs	Kupfferovy buňky
kDA	kilodalton

LBD	ligand binding domain
LCA	kyselina lithocholová
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
LKB1/AMPK	AMP aktivovaná protein kináza
LRH1	homolog jaterního receptoru 1
LSECs	endotelové buňky jaterních sinusoid
MCA ( $\alpha/\beta$ MCA) (TMCA)	kyselina ( $\alpha/\beta$ ) muricholová (tauromuricholová)
MEK	mitogen-activated protein kinase
MK	mastné kyseliny
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
MRP2 ( <i>ABCC2</i> )	multidrug resistance-associated protein 2 ( <i>gen</i> )
MRP3/4	multidrug resistance-associated protein 3, 4
Mrp4 ( <i>Abcc4</i> )	multidrug resistance-associated protein 4 ( <i>gen</i> )
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
NAFLD	nealkoholové ztukovatění jater
NASH	nealkoholová steatohepatitida
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
NgBR	Nogo-B receptor
NLRP3	receptor NLR (z angl. <i>nucleotide-binding leucine-rich repeat</i> ) obsahující pyrinovou doménu 3
NRF2	nukleární transkripční faktor 2 (z angl. <i>nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i> )
NTCP ( <i>SLC10A1</i> )	Na <sup>+</sup> -taurocholate cotransporting polypeptide ( <i>gen</i> )
OATP ( <i>SLCO</i> )	polypeptidy transportující organické anionty (izoformy 1B1, 1B3, 1A2 a 2B1) ( <i>gen</i> )
OST $\alpha/\beta$ ( <i>SLC51A/B</i> )	organic solute transporter $\alpha/\beta$ ( <i>gen</i> )
PFIC-2	progresivní familiární intrahepatální cholestáza typu 2
PKA	proteinkináza A
PON1	paraoxonasa1
PPAR $\alpha$	receptor $\alpha$ aktivovaný peroxisomovým proliferátorem
PXR	pregnanový X receptor
qRT-PCR (qPCR)	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RAC1	GTPáza patřící do Rho/Rac rodiny



RXR	retinoidní X receptor
S1PR2	sfingosin-1-fosfát receptor 2
Scd1	stearoyl-CoA desaturasa 1
sEng	solubilní endoglin
SHP	malý heterodimerní partner (z angl. <i>small heterodimer partner</i> )
$t_{1/2}$	biologický poločas eliminace
Tgf- $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$ ( <i>transforming growth factor</i> )
TJ	těsný spoj
TNF- $\alpha$	faktor nádorové nekrózy $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor</i> )
UDCA (TUDCA)	kyselina ursodeoxycholová (tauroursodeoxycholová)
VDR	receptor vitamínu D
WB	western blot
ŽK (BA)	žlučové kyseliny (bile acids)
$\beta$ -Klo	$\beta$ -klotho protein

Zkratky uvedených transportních proteinů a biotransformačních enzymů jsou napsány velkými písmeny vyskytují-li se u člověka, malými písmeny vyskytují-li se u myši, kurzívou jsou označeny geny.

## Souhrn

---

Žlučové kyseliny (ŽK) jsou základními metabolity cholesterolu, které se kontinuálně tvoří v játrech, podstupují enterohepatální cirkulaci a mají řadu endo- i exokrinních funkcí v homeostáze živin, především tuků. Při poruše obratu ŽK dochází často k jejich retenci s projevy toxicity zejména v játrech. Tuto retenci lze pozorovat i v rámci nealkoholového ztukovatění jater, nejčastějšího jaterního onemocnění, pokud se rozvine jeho závažnější forma, nealkoholová steatohepatitida (NASH). NASH je spojena s postupným zhoršováním jaterního postižení a hrozí přechod do cirhózy a hepatocelulárního karcinomu. Vznik a rozvoj NASH je podporován kumulujícími se ŽK, proto je důležité hledat léčbu, která dokáže příznivě ovlivnit jak patologii NASH, tak i homeostázu ŽK. Současně je vhodné zamezit podávání léčiv, které by v dané situaci mohly zhoršit retenci ŽK v organismu. V naší studii jsme proto analyzovali schopnost navodit změny homeostázy ŽK u karvedilolu a atorvastatinu, léčiv používaných v klinické praxi v rámci terapie kardiovaskulárních komplikací provázejících metabolický syndrom a NASH. Současně byl analyzován potenciální cholestatický vliv labetalolu, léčiva s identickým mechanismem účinku jako karvedilol.

Karvedilol je kombinovaný antagonist  $\alpha_1$  a  $\beta$ -adrenoreceptorů, který může v ojedinělých případech vyvolat příznaky cholestázy. Nicméně u nemocných s cirhózou a portální hypertenzí představuje lék volby snižující incidenci cévních komplikací. Za použití myšího modelu NASH vyvolané dietou, se současným porovnáním účinku u zdravých zvířat, se nám podařilo prokázat, že karvedilol je schopen u zdravých myší vyvolat příznaky cholestázy se zvýšenými plazmatickými hladinami ŽK. Tato kumulace byla způsobena redukcí Ntcp transportéru pro vstup žlučových kyselin do jater prostřednictvím blokády dráhy  $\beta$ -adrenoreceptor-cAMP-Epac1 zajišťující intracelulární přesun a inserci Ntcp do membrány. U NASH naopak karvedilol vykazoval pozitivní vliv na jaterní kumulaci tuků a snížil intenzitu zánětu a fibrózy. V důsledku těchto pozitivních účinků následně karvedilol nezhoršoval kumulaci ŽK, která byla patrná u neléčených myší s NASH. Karvedilol navíc u myší s NASH měnil profil jednotlivých ŽK ve prospěch hydrofilních zástupců. Tato studie tak objasnila významné pozitivní účinky karvedilolu u NASH, a tím podporuje možnost použití této látky v klinické praxi. Navíc se nám podařilo identifikovat mechanismus, kterým může karvedilol vést ke zvýšení plazmatických koncentrací ŽK u jedinců bez jaterní patologie.

Myší model NASH byl použit i ve druhé studii pro analýzu účinku atorvastatinu, jednoho z hlavních statinů používaných v klinické praxi. Významné bylo, že atorvastatin

dokonce redukoval plazmatické koncentrace ŽK u kontrolní skupiny. Toto snížení bylo důsledkem represe jaterních enzymů syntetizujících ŽK jako Cyp8b1, Cyp27a1 a Cyp2c70, a Asbt transportéru v ileu zajišťujícího reabsorpci ŽK ze střevního obsahu, což vedlo ke zvýšení fekální exkrece ŽK. U myši s NASH byl vliv atorvastatinu na ŽK minoritní. Zajímavé však bylo zvýšení proporce deoxycholové kyseliny po podání atorvastatinu v plazmě, žluči i ve stolici prostřednictvím snížení enzymů pro syntézu ŽK alternativní cestou. Diagnostický význam stanovení deoxycholové kyseliny během terapie statiny musí být dále zkoumán. Nicméně atorvastatin u myši s NASH významně snížil jaterní depozici tuků a stupeň zánětu vlivem na NF- $\kappa$ B prozánětlivou signalizaci. Vysvětlení zapojených mechanismů v naší studii podporuje bezpečné používání statinů u nemocných s NASH, které se začíná recentně doporučovat i odbornými hepatologickými společnostmi.

Ve třetí studii jsme dále analyzovali vliv kombinované blokády  $\alpha_1$  a  $\beta$ -adrenergních receptorů prostřednictvím labetalolu u experimentální cholestázy navozené estrogenem, která je modelem intrahepatální cholestázy během těhotenství. K takovéto situaci může v klinické praxi dojít, pokud je těhotná žena s preeklampsií léčená labetalolem a současně má i intrahepatální cholestázu s vysokými hladinami ŽK, které představují hlavní riziko poškození plodu. Analýza ŽK v naší studii skutečně potvrdila zvýšení jejich plazmatických hladin ve skupině se současným podáním estrogenu a labetalolu v důsledku indukce Mrp4 transportéru pro export ŽK z hepatocytů do krevního řečiště. Navíc byl labetalol schopen zvýšit plazmatické hladiny ŽK i na myším transgenním modelu preeklampsie s vysokou hladinou solubilního endoglinu a estrogenem navozenou cholestázou. Současně jsme zjistili, že samotná estrogení cholestáza vede ke zvyšování hladin solubilního endoglinu v plazmě a tím podporuje rozvoj preeklampsie. Tato studie tak přinesla důležité zjištění, že labetalol nemusí být vhodným léčivem u žen s preeklampsií a predispozicí k cholestáze, protože může významně zhoršit kumulaci ŽK v plazmě. Navíc se nám podařilo potvrdit, že zvyšování plazmatických hladin solubilního endoglinu může být pojítkem mezi zvýšeným současným výskytem cholestázy a preeklampsie v těhotenství.

## Summary

---

Bile acids (BA) are the primary cholesterol metabolites that are continuously formed in the liver, undergo enterohepatic circulation, and have many endo- and exocrine functions in the homeostasis of nutrients, especially fats. When the circulation of BAs is impaired, their retention often manifests with toxicity, especially in the liver. This retention can also be observed in non-alcoholic fatty liver disease, the most common liver disease, if its more severe form, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), develops. NASH is associated with gradual deterioration of liver damage, and there is a risk of progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The emergence and development of NASH is supported by accumulating BAs, therefore it is important to look for a treatment that can favorably affect both NASH pathology and BA homeostasis. At the same time, it is advisable to avoid the administration of drugs that could worsen the retention of BA in the body in the given situation. In our study, we therefore analyzed the ability to induce changes in BA homeostasis with carvedilol and atorvastatin, drugs used in clinical practice in the treatment of cardiovascular complications accompanying the metabolic syndrome and NASH. At the same time, the potential cholestatic effect of labetalol, a drug with an identical mechanism of action as carvedilol, was analyzed.

Carvedilol is a combined antagonist of  $\alpha_1$  and  $\beta$ -adrenoreceptors, which may in rare cases induce symptoms of cholestasis. However, in patients with cirrhosis and portal hypertension, carvedilol as the drug of choice reduces the incidence of vascular complications. Using a diet-induced NASH mouse model, with simultaneous comparison of the effect in healthy animals, we were able to demonstrate that carvedilol provoked cholestasis symptoms with increased plasma levels of BAs in healthy mice. This accumulation was caused by the reduction of the Ntcp transporter for the entry of BAs into the liver through the blockade of the  $\beta$ -adrenoreceptor-cAMP-Epac1 pathway ensuring the intracellular transfer and insertion of Ntcp into the membrane. In NASH, on the other hand, carvedilol showed a positive effect on hepatic fat accumulation and reduced the intensity of inflammation and fibrosis. Consequently, as a result of these positive effects, carvedilol did not worsen the BA accumulation seen in untreated NASH mice. In addition, in mice with NASH, carvedilol changed the profile of individual BAs in favor of hydrophilic representatives. This study thus clarified the significant positive effects of carvedilol in NASH and thus supports the possibility of using this substance in clinical practice. In addition, we managed to identify the mechanism by which carvedilol can lead to an increase in plasma concentrations of BA in individuals without liver pathology.

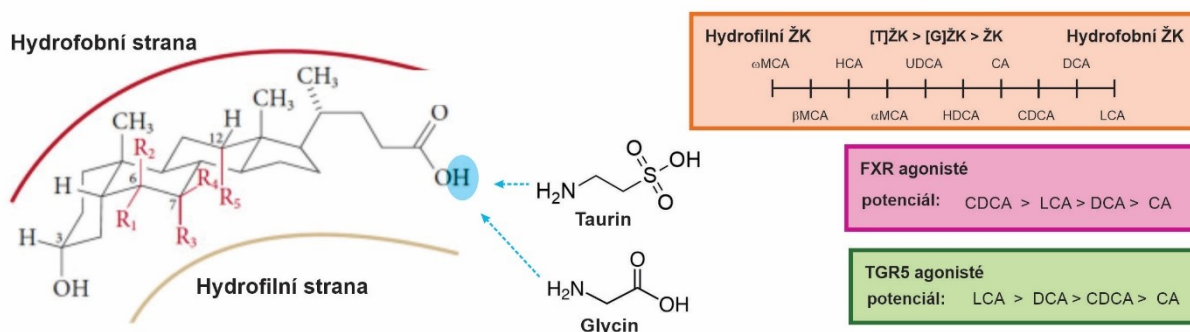
The mouse model of NASH was also used in the second study to analyze the effect of atorvastatin, one of the main statins used in clinical practice. It was significant that atorvastatin even reduced the plasma concentrations of BAs in the control group. This reduction was a consequence of the repression of liver enzymes synthesizing BAs such as Cyp8b1, Cyp27a1 and Cyp2c70, and the Asbt transporter in the ileum ensuring reabsorption of BAs from intestinal contents, which led to an increase in fecal BA excretion. In mice with NASH, the effect of atorvastatin on BA was minor. However, it was interesting to see an increase in the proportion of deoxycholic acid after atorvastatin administration in plasma, bile and faeces through the reduction of enzymes for the synthesis of BAs via an alternative pathway. The diagnostic value of deoxycholic acid determination during statin therapy needs to be further investigated. However, atorvastatin significantly reduced hepatic fat deposition and the degree of inflammation in NASH mice by affecting NF- $\kappa$ B pro-inflammatory signaling. The explanation of the involved mechanisms in our study supports the safe use of statins in patients with NASH, which is recently starting to be recommended by expert hepatology societies as well.

In the third study, we further analyzed the effect of combined blockade of  $\alpha_1$  and  $\beta$ -adrenergic receptors by means of labetalol in experimental estrogen-induced cholestasis, which is a model of intrahepatic cholestasis during pregnancy. Such a situation can occur in clinical practice if a pregnant woman with preeclampsia is treated with labetalol and at the same time has intrahepatic cholestasis with high levels of BAs, which represent the main risk of damage to the fetus. The analysis of BAs in our study indeed confirmed an increase in their plasma levels in the group with simultaneous administration of estrogen and labetalol due to the induction of the Mrp4 transporter for the export of BAs from hepatocytes to the bloodstream. In addition, labetalol was able to increase plasma BA levels even in a mouse transgenic model of preeclampsia with high levels of soluble endoglin and estrogen-induced cholestasis. At the same time, we found that estrogenic cholestasis itself leads to an increase in the levels of soluble endoglin in the plasma and thus promotes the development of preeclampsia. This study thus brought an important finding that labetalol may not be a suitable drug in women with preeclampsia and a predisposition to cholestasis, as it can significantly worsen the accumulation of BAs in the plasma. In addition, we were able to confirm that the increase in plasma levels of soluble endoglin may be the link between the increased simultaneous occurrence of cholestasis and preeclampsia in pregnancy.

# 1 Úvod

## 1.1 Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny (ŽK) jsou amfipatické molekuly syntetizované z cholesterolu v játrech všech obratlovců, jenž mají polární i nepolární oblasti, které udělují molekule hydrofilní i lipofilní vlastnosti umožňující tvorbu micel a transport nepolárních látek ve vodném prostředí. Z toho důvodu ŽK mj. tvoří podstatnou část žluče, kde umožňují transport steroidních endo i xenobiotik do střeva a ve střevě pak emulgují tuky a v nich rozpuštěné vitamíny a živiny před jejich absorpcí (Ding, Yang, Wang, & Huang, 2015; Choudhuri & Klaassen, 2022). V posledních letech se také objevuje význam ŽK jako signálních molekul v širokém spektru biologických procesů prostřednictvím interakce s nukleárními receptory (Obrázek 1) farnesoidním X receptorem (FXR), konstitutivním androstanovým receptorem (CAR), pregnanovým X receptorem (PXR) a receptorem pro vitamín D (VDR), dále s receptory spojenými s G-proteinem jako je GPBAR-1 (TGR5) a sфинgosin-1-fosfát receptor 2 (S1PR2) a některými buněčnými signálními dráhami jako c-Jun N-kinázou (JNK) a extracelulární signální redukovanou kinázou (ERK). Prostřednictvím těchto interakcí pomáhají ŽK regulovat metabolismus glukózy, lipidů a lipoproteinů (Di Ciaula et al., 2017). Nicméně při cholestatických jaterních patologiích dochází ke kumulaci ŽK a v závislosti na stoupající koncentraci se může uplatňovat především jejich toxický vliv. Stupeň kumulace ŽK tak často koreluje se závažností jaterního poškození, jak je tomu například u nealkoholové steatohepatitidy (NASH), nejčastějšího fibrotického jaterního onemocnění postihujícího až 5,3 % populace (Cheng, Chen, Schnabl, Chu, & Yang, 2023; Younossi et al., 2023).



**Obrázek 1: Struktura, fyzikálně-chemické a farmakologické vlastnosti ŽK**

Obecné znázornění molekulární struktury ŽK a jejich aminokyselinových konjugátů (taurinu a glycinu). Zobrazení hydrofobního/hydrofilního profilu ŽK a hodnocení ŽK jako endogenních agonistů FXR a TGR5. Převzato a upraveno z: (Fleishman & Kumar, 2024)

*Použité zkratky: MCAs, muricholové kyseliny; UDCA, ursodeoxycholová kyselina; CA, cholová kyselina; CDCA, chenodeoxycholová kyselina; DCA, deoxycholová kyselina; LCA, litholová kyselina; HCA, hyocholová kyselina; HDCA, hyodeoxycholová kyselina; [T] nebo [G], taurinem nebo glycinem konjugované ŽK; FXR, farnesoidní X receptor; TGR5, receptor 1 pro žlučové kyseliny spřažený s G proteinem*

### **1.1.1 Syntéza žlučových kyselin**

Produkce ŽK v játrech je nejvyšší v perivenózních hepatocytech obklopujících centrální žílu. Syntéza ŽK představuje hlavní cestu katabolismu hydrofobního cholesterolu a tvoří téměř 50 % jeho denního obratu. Produkce ŽK je velmi složitý proces a podílí se na něm celá řada enzymů ve více buněčných kompartmentech včetně cytosolu, endoplazmatického retikula, mitochondrií a peroxisomů (di Gregorio, Cautela, & Galantini, 2021; Choudhuri & Klaassen, 2022). Primární ŽK jsou syntetizovány dvěma hlavními cestami: cestou klasickou (neutrální) a alternativní (kyselá) (Obrázek 2). U lidí je zhruba 75 % celkových ŽK tvořeno cestou klasickou, zatímco u hlodavců je až polovina z celkového počtu ŽK tvořena cestou alternativní (Cheng et al., 2023).

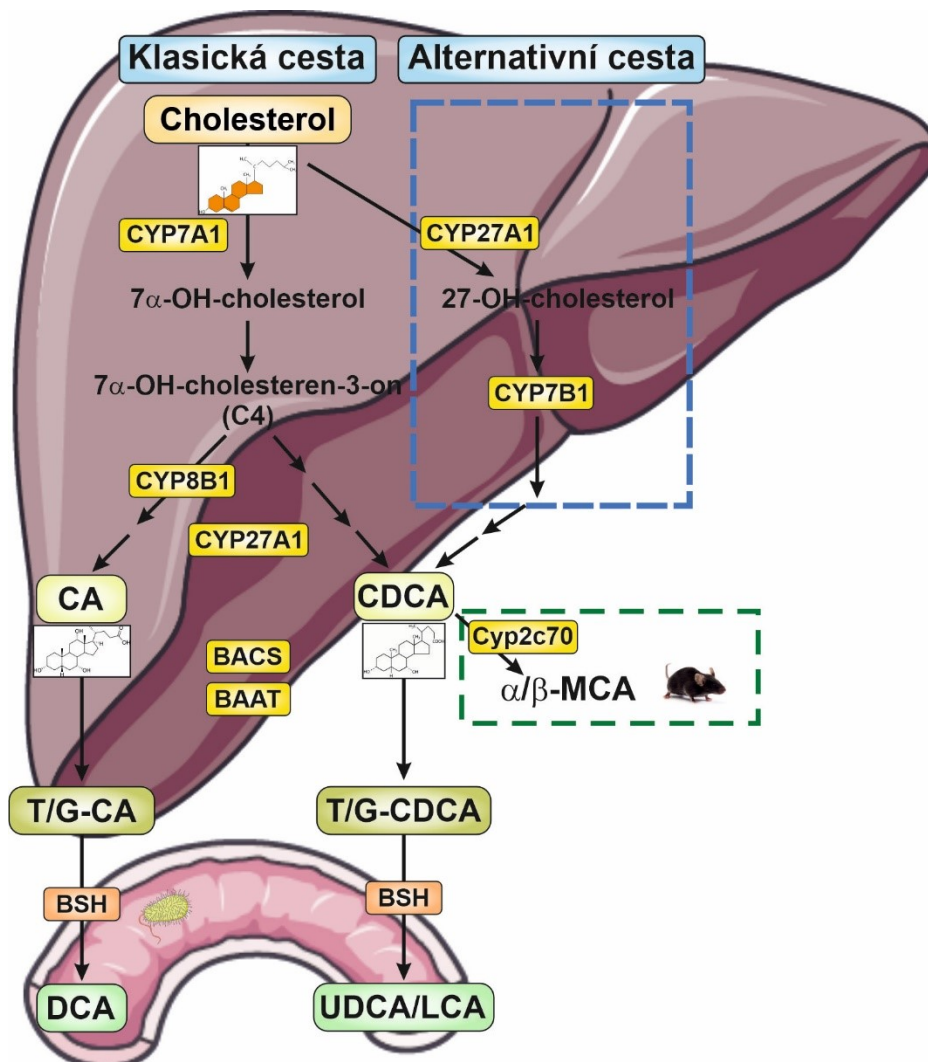
#### **1.1.1.1 Klasická cesta tvorby žlučových kyselin**

V klasické (neutrální) dráze dochází nejprve k modifikaci steroidního jádra cholesterolu a až později k oxidaci jeho postranního řetězce. Většina meziproductů tedy nemá karboxylovou skupinu, ta je vnesena do molekuly až oxidací postranního řetězce enzymem CYP27A1 (Choudhuri & Klaassen, 2022). Prvním krokem v klasické dráze syntézy ŽK je hydroxylace cholesterolu v poloze C7, která je katalyzována rychlost limitujícím mikrozomálním enzymem cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylasou (CYP7A1) (Cheng et al., 2023). Vzniklý 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol se dále přeměňuje na 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-on (Chiang, 2017). Mitochondriální sterol-27-hydroxylasa (CYP27A1) zprostředkovává oxidaci a štěpení steroidního postranního řetězce a v konečném důsledku vzniká kyselina cholová (CA) jako hlavní primární ŽK klasické cesty a chenodeoxycholová (CDCA), hlavní primární ŽK alternativní cesty (T. Li & Chiang, 2009). Vzájemný poměr těchto primárních kyselin je dán aktivitou enzymu sterol-12 $\alpha$ -hydroxylasy (CYP8B1), jehož aktivita zajišťuje produkci CA (Obrázek 2) (Choudhuri & Klaassen, 2022).

#### **1.1.1.2 Alternativní cesta tvorby žlučových kyselin**

Naproti tomu alternativní (kyselá) cesta začíná nejprve oxidací postranního řetězce cholesterolu, kde se uplatňuje enzym CYP27A1. Až následně dochází k modifikaci steroidního jádra prostřednictvím oxysterol-7 $\alpha$ -hydroxylasy (CYP7B1) za vzniku většiny CDCA. Z toho je zřejmé, že CYP27A1 se podílí na syntéze ŽK oběma cestami (Obrázek 2). Markerem pro alternativní cestu je tedy CYP7B1. Složení a syntéza ŽK u myši je od lidí odlišná. Primární ŽK

u myší se skládají z CA a  $\alpha/\beta$  muricholových kyselin ( $\alpha/\beta$ -MCA), které vznikají přeměnou CDCA prostřednictvím sterol-6 $\beta$ -hydroxylasy (Cyp2c70) a epimerizací  $\alpha$ MCA (Obrázek 2). Přeměna CDCA (endogenní agonista FXR) na MCA (antagonista FXR) může změnit signální vlastnosti ŽK u myší (Cheng et al., 2023). Poslední krok v syntéze ŽK zahrnuje přidání aminokyseliny prostřednictvím amidové vazby na C24. Většina ŽK (CA a CDCA) je konjugována s glycinem nebo taurinem působením dvou enzymů BACS (Bile acyl-CoA syntetasa) a BAAT (Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferasa). Konjugace ŽK snižuje jejich toxicitu a zvyšuje rozpustnost ve žluči (di Gregorio et al., 2021; Chiang, 2009). U lidí jsou primární ŽK konjugovány s taurinem a glycinem v poměru 1/3, zatímco u myší je většina ŽK konjugována s taurinem (Cheng et al., 2023).



**Obrázek 2: Syntéza žlučových kyselin**

Schematické znázornění hlavních enzymů podílejících se na syntéze primárních ŽK klasickou nebo alternativní cestou. Následná konjugace ŽK s taurinem nebo glycinem zajišťuje zvýšení jejich rozpustnosti a snížení hydrofobicity. Působením střevního mikrobiomu vznikají ve střevě sekundární ŽK. Převzato a upraveno z: (Monteiro-Cardoso, Corliano, & Singaraja, 2021).



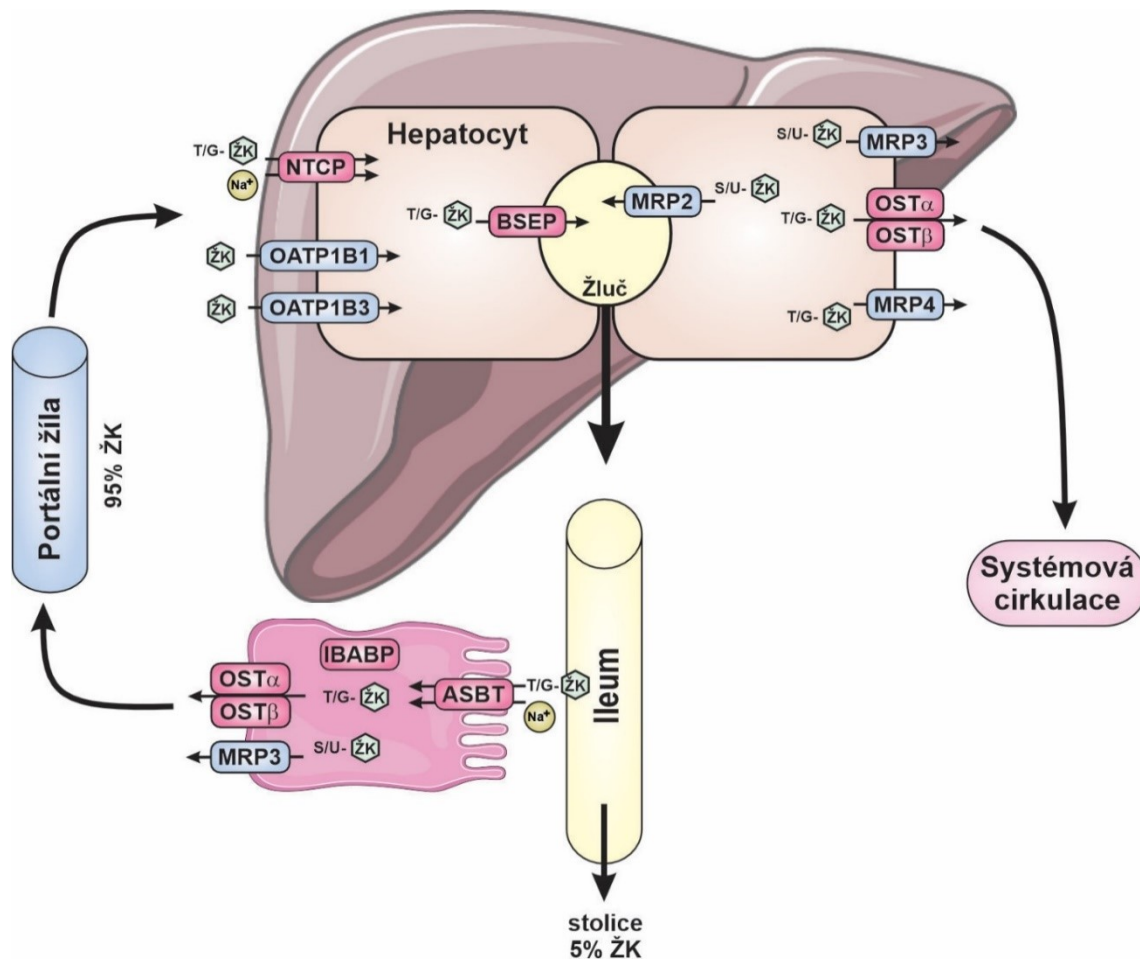
Použité zkratky: CYP7A1, cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylasa; CYP27A1, sterol-27-hydroxylasa; CYP7B1, oxysterol-7 $\alpha$ -hydroxylasa; CYP8B1, sterol-12 $\alpha$ -hydroxylasa; Cyp2c70, sterol-6 $\beta$ -hydroxylasa; BACS, bile acyl:CoA syntetasa; BAAT, bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferasa; BSH, bile salt hydrolasa; CA, kyselina cholová; CDCA, kyselina chenodeoxycholová;  $\alpha/\beta$ -MCA, kyselina muricholová  $\alpha/\beta$ ; T/G, taurinem/glycinem konjugované ŽK; DCA, kyselina deoxycholová; UDCA, kyselina ursodeoxycholová; LCA, kyselina lithocholová

### 1.1.2 Enterohepatální cirkulace

Konjugované primární ŽK jsou vylučovány z hepatocytů do žlučových kanálků proti koncentračnímu gradientu prostřednictvím exportní pumpy ŽK (BSEP). Organické anionty spolu se sulfatovanými ŽK jsou transportovány do žlučovodů převážně prostřednictvím MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2). Při cholestáze je navíc část ŽK vylučována do systémové cirkulace pomocí přenašečů organických látek  $\alpha/\beta$  (OST $\alpha/\beta$ ) a MRP3/4 (multidrug resistance-associated protein 3/4), které jsou exprimovány na bazolaterální membráně hepatocytů (Cheng et al., 2023). Žlučové kyseliny spolu s cholesterolem a fosfolipidy vytváří ve žlučových kanálcích smíšené micely, které jsou skladovány ve žlučníku (Chiang, 2017). Příjem jídla stimuluje sekreci cholecystokininu, který vede ke kontrakci žlučníku a uvolnění ŽK do duodena (Alnouti, 2009; Chiang, 2017). Ve střevě napomáhají ŽK trávení a vstřebávání cholesterolu, triglyceridů a vitamínů rozpustných v tucích. Většina konjugovaných ŽK je reabsorbována prostřednictvím apikálního transportéru ŽK závislém na sodíku (ASBT), který je lokalizován na apikální straně enterocytů v terminálním ileu (Obrázek 3). V daleko menší míře přispívají k transportu ŽK přes apikální membránu po celé délce střeva také transportní polypeptidy organických aniontů (OATP). Všechny tyto transportéry mají vyšší afinitu pro konjugované ŽK. Nekonjugované ŽK jsou absorbovány v celém střevním traktu spíše pasivní difuzí (Alnouti, 2009).

Uvnitř enterocytů se ŽK vážou na protein vázající ŽK (IBABP) a následně jsou prostřednictvím heterodimeru OST $\alpha/\beta$ , lokalizovaného na bazolaterální membráně, vylučovány do portálního oběhu (Obrázek 3). Žlučové kyseliny jsou vychytávány ze sinusové krve hepatocyty pomocí NTCP (Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide) a v menší míře transportními polypeptidy organických aniontů (OATP) (Cheng et al., 2023). Konjugované ŽK, které nejsou absorbovány v terminálním ileu, vstupují do tlustého střeva, kde podléhají dekonjugaci a biotransformaci (Di Ciaula et al., 2017). Střevní bakterie dekonjugují ŽK prostřednictvím hydroxylasy žlučových solí (BSH), která je exprimována hlavně u rodů *Bifidobacterium*, *Lactobacillum*, *Clostridium* a *Bacteroides*. Nekonjugované ŽK jsou dále dehydroxylovány v pozici 7 $\alpha$  za vzniku sekundárních ŽK. Kyselina CDCA je přeměňována na kyselinu lithocholovou (LCA) a podobně CA na kyselinu deoxycholovou (DCA) (Obrázek 2). Kromě toho mohou bakterie diverzifikovat sekundární ŽK prostřednictvím epimerizace (Cheng

et al., 2023). U lidí může být LCA dále metabolizována ve střevě na více hydrofilní kyseliny HCA (hyocholová kyselina) a UDCA (ursodeoxycholová kyselina) (Choudhuri & Klaassen, 2022). Podobně u myši jsou také  $\alpha/\beta$ -MCA střevními bakteriemi transformovány na jejich odpovídající sekundární ŽK včetně hyodeoxycholové kyseliny (Cheng et al., 2023). Na rozdíl od člověka je u myši možná přeměna sekundárních ŽK zpět na primární za účasti Cyp2a12. Některé ŽK mohou také inhibovat růst bakterií, především grampozitivních. Vyšší antibakteriální aktivitu přitom vykazují nekonjugované ŽK (Choudhuri & Klaassen, 2022).



### Obrázek 3: Enterohepatální cirkulace

Schematické znázornění hlavních transportérů ŽK podílejících se na enterohepatální cirkulaci. Alternativní cesta pro vylučování ŽK do systémové cirkulace je zprostředkována transportéry OST $\alpha/\beta$  a MRP3/4, které jsou exprimované na bazolaterální membráně hepatocytů. Konjugované ŽK jsou vylučovány z hepatocytů do žlučových kanálků prostřednictvím BSEP. Organické anionty spolu se sulfatovanými ŽK jsou transportovány do žlučovýchodů pomocí MRP2. Žlučové kyseliny jako součást žluče vstupují do střeva, kde emulgují lipidy. Převážná část ŽK je pak reabsorbována v terminálním ileu pomocí ASBT, který je exprimován na apikální membráně enterocytů. Žlučové kyseliny se uvnitř enterocytů vážou na protein IBABP a následně jsou pomocí heterodimeru OST $\alpha/\beta$ , lokalizovaného na bazolaterální membráně, vylučovány do portálního oběhu. Žlučové kyseliny jsou vychytávány ze sinusové krve hepatocyty pomocí NTCP a transportními polypeptidy organických aniontů (OATP). Přibližně 95 % ŽK je reabsorbováno prostřednictvím aktivní a pasivní absorpce. Pouze 5 % ŽK je vylučováno stolicí. Převzato a upraveno z: (Wang, Xu, Zhou, Chen, & Zhou, 2024)

Použité zkratky: BSEP, bile salt export pump; MRP, multidrug resistance-associated protein; OST $\alpha/\beta$ , organic solute transporter  $\alpha/\beta$ ; ASBT, apical sodium-dependent bile acid transporter; IBABP, protein vážající žlučové

*kyseliny v ileu; NTCP, Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide; OATP(1B1/1B3), polypeptidy transportující organické anionty; T/G-ŽK, žlučové kyseliny konjugované taurinem/glycinem; S/U-ŽK žlučové kyseliny sulfátované/glukuronidované*

Přibližně 95 % ŽK dodaných do střeva žlučí je reabsorbováno prostřednictvím aktivní a pasivní absorpce a tento cyklus se opakuje 4 - 12krát za den. Pouze 5 % (0,2-0,6 g/den) ŽK je vylučováno spolu se stolicí (Obrázek 3) (Di Ciaula et al., 2017). Ve zdravém organismu zůstává zásoba ŽK v ustáleném stavu, neboť množství *de novo* syntetizovaných ŽK v hepatocytech kompenzuje ŽK ztracené stolicí (Di Ciaula et al., 2017; Cheng et al., 2023).

## **1.2 Transportní systémy ŽK v játrech a střevě**

### ***1.2.1 Kanalikulární transport v játrech***

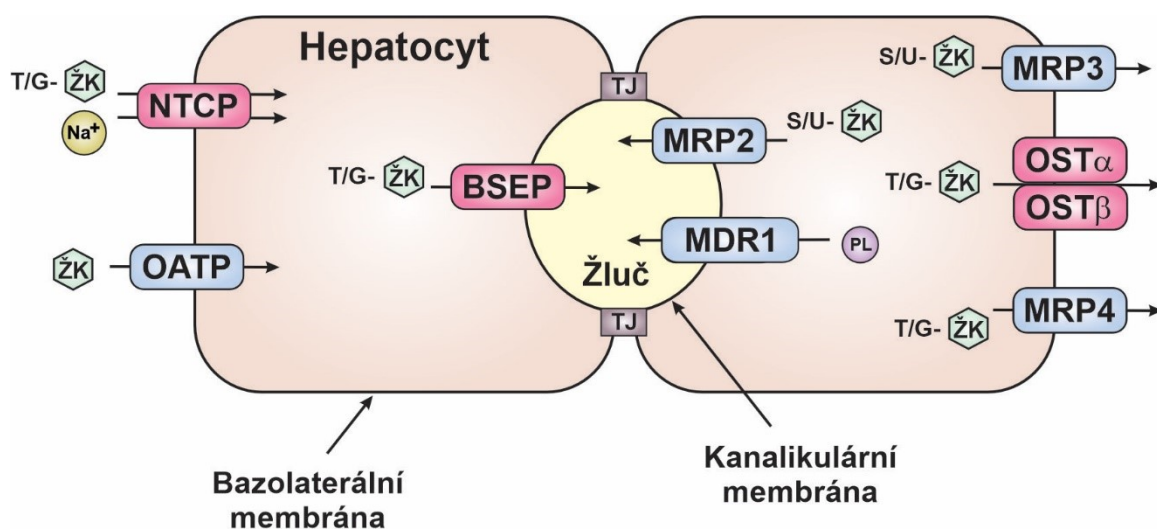
Vychytávání ŽK a iontů z plazmy přes bazolaterální (sinusoidální) membránu, jejich transport uvnitř hepatocytu a vylučování přes kanalikulární (apikální) membránu jsou hlavními kroky podílejícími se na tvorbě žluče. Většina kanalikulárních membránových transportérů jsou členy ABC rodiny a zajišťují vylučování organických látek do žluče proti koncentračnímu gradientu za spotřeby energie ve formě ATP. Mutace těchto apikálních transportérů může vést až k cholestatickému onemocnění jater (Boyer, 2013). V následujících odstavcích jsou podrobněji popsány transportéry BSEP (bile salt export pump) a MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2).

#### **1.2.1.1 MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2, gen *ABCC2*)**

MRP2 patří do velké podrodiny ABCC proteinů, které zprostředkovávají ATP závislý transport látek konjugovaných s glutathionem (GSH), glukuronátem nebo sulfátem. MRP2 také zprostředkovává kotransport nekonjugovaných amfifilních sloučenin spolu s volným GSH a přispívá ke kontrole hladiny intracelulárního GSSG (glutathion disulfid). MRP2 je exprimován převážně na kanalikulární membráně hepatocytů (Obrázek 4) a apikální membráně epitelu buněk proximálních tubulů ledvin (Homolya, Varadi, & Sarkadi, 2003). Mezi hlavní endogenní substráty tohoto přenašeče patří bilirubin, diglukuronidy, konjugáty s GSH a GSSG, leukotrieny, těžké kovy, sulfátované a glukuronidované substráty, včetně ŽK, stejně jako řada různých léčiv a dalších exogenních sloučenin. Mutace genu *ABCC2* způsobuje Dubinův-Johnsonův syndrom, který se vyznačuje konjugovanou hyperbilirubinémií (Boyer, 2013). Vzhledem ke specializované úloze MRP2 se zdá, že tento transportní protein brání intracelulární akumulaci konjugátů lipofilních toxických sloučenin, a tím přispívá k obranné reakci organismu (Homolya et al., 2003).

### 1.2.1.2 BSEP (bile salt export pump, gen *ABCB11*)

Exportní pumpa žlučových kyselin BSEP patří do podrodiny ABC transportérů a je hlavním přenašečem zajišťujícím sekreci ŽK z hepatocytů do žluče. Exprimován je výhradně v játrech a převážně je lokalizován na kanalikulární membráně hepatocytů (Obrázek 4) (Kubitz, Droge, Stindt, Weissenberger, & Haussinger, 2012). Transportuje konjugované i nekonjugované ŽK s vyšší afinitou ke konjugovaným. Přestože téměř výhradně transportuje ŽK, některé endogenní látky stejně jako léčiva (cyklosporin, rifampicin, glyburid) mohou působit jako inhibitory (Kis et al., 2012). Inhibice BSEP vede k hromadění ŽK v játrech s následnou cholestázou. BSEP je regulován jak na transkripční, tak posttranskripční úrovni a jeho exprese je ovlivněna mnoha fyziologickými a patologickými podněty (Boyer, 2013). Hlavními regulátory exprese jsou transkripční faktory farnesoidní X receptor (FXR), homolog jaterního receptoru 1 (LRH1) a nukleární faktor NRF2. Mutace proteinu BSEP jsou spojeny se středně těžkými až těžkými formami cholestázy včetně progresivní familiární intrahepatální cholestázy typu 2 (PFIC-2), benigní recidivující cholestázy typu 2 (BRIC-2) a intrahepatální těhotenské cholestázy (ICP) (Kubitz et al., 2012).



**Obrázek 4: Grafické znázornění hlavních kanalikulárních a bazolaterálních transportérů ŽK**

*Použité zkratky: MRP2, multidrug resistance-associated protein 2; BSEP, bile salt export pump; MDR1, multidrug resistance protein 1; NTCP, Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide; OATP, organic anion transporting polypeptide; MRP3, multidrug resistance-associated protein 3; MRP4, multidrug resistance-associated protein 4; OSTα/β, organic solute transporter α/β; TJ, těsný spoj; T/G-ŽK, žlučové kyseliny konjugované s taurinem/glycinem; S/U-ŽK, žlučové kyseliny sulfatované/glukuronidované; PL, fosfolipidy. Převzato a upraveno z: (Vitale et al., 2023)*

### 1.2.2 Bazolaterální import v játrech

Žlučové kyseliny sekretované z hepatocytů jsou buď nově syntetizované nebo recyklované. Pro recyklaci ŽK je nezbytný jejich příjem hepatocyty ze sinusoidální krve. Příjem

ŽK do jaterních buněk (asi ze 70-90 %) je zprostředkován dvěma hlavními cestami. V prvním případě se jedná o proces závislý na sodíkových iontech, kdy příjem konjugovaných ŽK je řízen vnitřním gradientem  $\text{Na}^+$  pomocí transportéru NTCP (natrium taurocholate cotransporting polypeptide). Druhý způsob je naopak proces zvýhodněný pro nekonjugované žlučové soli využívající rodinu transportérů označovaných OATP (organic anion transporting polypeptides) (Deng & Bae, 2020).

#### **1.2.2.1 NTCP ( $\text{Na}^+$ -taurocholate cotransporting polypeptide, gen *SLC10A1*)**

NTCP je hlavní transportér pro příjem konjugovaných ŽK z portální krve do hepatocytů. Jako hnací sílu využívá gradient udržovaný  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázou a vnitřní negativní membránový potenciál. Sodíková pumpa je také lokalizována na bazolaterální membráně a je exprimována v celém jaterním lalůčku. Vzniklá energie umožňuje transportéru NTCP přijímat ŽK z portální krve proti koncentračnímu gradientu do hepatocytů spolu se dvěma sodnými ionty (Obrázek 4). NTCP je exprimován pouze v savčích hepatocytech. Substrátová specifita je do značné míry omezena na ŽK, v menší míře mohou být substrátem také sulfatované steroidy, některá léčiva nebo jejich metabolity (rosuvastatin, bromsulfoftalein) (Stieger, 2011). Expze NTCP je nepřímou regulována ŽK prostřednictvím nukleárního receptoru FXR. Ten stimuluje expresi malého heterodimerního proteinu (SHP), který svými účinky blokuje vazbu RXR/RAR k promotoru NTCP. Expze NTCP může být také upregulována posttranskripčně cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP), který stimuluje bazolaterální transport taurocholátu a zvyšuje přemístění defosforylovaného NTCP na bazolaterální membránu. Jako ochrana před kumulací cytotoxických ŽK v hepatocytech může být expze tohoto transportéru downregulována řadou fyziologických a patofyziologických stavů, např. působením estrogenů, léčiv, endotoxinů, obstrukcí žlučovodů a v těhotenství (Boyer, 2013). Inhibice proteinu může být částečně kompenzována transportem ŽK nezávislým na sodíku, konkrétně polypeptidy transportující organické anionty (OATP) (Stieger, 2011).

#### **1.2.2.2 OATP (organic anion transporting polypeptides, gen *SLCO*)**

OATP proteiny jsou exprimovány v celé řadě tkání v těle a zajišťují na sodíku nezávislý transport široké škály strukturně nepříbuzných sloučenin. Obecně jsou zodpovědné za příjem amfipatických organických aniontů s molekulovou hmotností větší než 300 kDa, ale také mohou transportovat kationty nebo neutrální sloučeniny výměnou za intracelulární  $\text{HCO}_3^-$  nebo glutathion (GSH) (Alrefai & Gill, 2007). Mezi endogenní substráty patří ŽK, konjugované steroidní hormony, hormony štítné žlázy a cyklické a lineární peptidy. Mezi exogenní substráty patří léčiva ze skupin antibiotik, antidiabetik, antihypertenziv, statinů a řada dalších (Obaidat,

Roth, & Hagenbuch, 2012). Jedná se o velkou rodinu proteinů, které se dělí do podrodin na základě jejich aminokyselinové sekvenční homologie.

U člověka bylo zjištěno 11 genů patřící do rodiny OATP (Kalliokoski & Niemi, 2009). Někteří zástupci OATP rodiny mohou být tkáňově specifictí, jiní jsou exprimováni ve více tkáních. Příkladem tkáňově specifických OATP, jejichž přítomnost byla prokázána v lidských játrech je OATP1B1 a OATP1B3. Expres obou proteinů byla potvrzena výhradně na bazolaterální membráně hepatocytů a OATP1B3 byl mnohem silněji exprimován v pericentrální oblasti než periportální části jaterního lalůčku. V lidských játrech byla prokázána také přítomnost proteinů OATP1A2 a OATP2B1, které jsou tkáňově nespecifické a jsou tedy exprimovány také v dalších tkáních (např. v enterocytech, v mozku a placentě) (Obaidat et al., 2012).

### ***1.2.3 Transport žlučových kyselin ve střevě***

#### **1.2.3.1 ASBT (apical sodium–bile acid transporter, gen *SLC10A2*)**

Na sodíku závislý apikální transportér žlučových kyselin (ASBT), také známý jako ileální transportér žlučových kyselin (IBAT) hraje klíčovou roli v enterohepatální cirkulaci ŽK. Je exprimován na apikální membráně enterocytů a zprostředkovává absorpci ŽK z ilea. V tenkém střevě tvoří ASBT asi 6 % všech transportérů. Kromě distálního ilea je ASBT hojně exprimován také v renálních proximálních tubulech a epitelu žlučvodů a cholangiocytů (Choudhuri & Klaassen, 2022; N. Yang et al., 2020). Žlučové kyseliny jsou transportovány proti koncentračnímu gradientu spolu se dvěma sodnými ionty, jejichž gradient je udržovaný bazolaterální  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázou. Přednostně jsou prostřednictvím ASBT transportovány konjugované ŽK (oproti nekonjugovaným). Ve srovnání s NTCP je ASBT podstatně více substrátově specifický. Regulace ASBT je složitá a je ovlivněna různými transkripčními faktory. Příkladem mohou být glukokortikoidní receptor (GR), receptor vitamínu D (VDR), retinoidní X receptor (RXR), které aktivují expresi ASBT různou měrou. Naopak malý heterodimerní partner (SHP), aktivovaný FXR, funkci ASBT inhibuje (Xiao & Pan, 2017). V současnosti je farmakologická inhibice ASBT se snížením reabsorpce ŽK a zvýšením jejich exkrece stolicí zkoumána jako možná terapie mnoha onemocnění, například zácpy, dyslipidémie, aterosklerózy, diabetu mellitu 2. typu, NAFLD a cholestatického onemocnění jater (Choudhuri & Klaassen, 2022). Správné fungování ASBT je klíčové pro homeostázu ŽK a cholesterolu.

### **1.2.3.2 IBABP (ileal bile acid-binding protein, gen *FABP6*)**

Intracelulární protein IBABP zajišťuje transport ŽK z apikální membrány na basolaterální stranu enterocytů. Spolu s dalšími proteiny odpovědnými za transport ŽK (ASBT, OST $\alpha/\beta$ ) je exprimován v enterocytech tenkého střeva. Tento protein je schopen transportovat jak žlučové, tak mastné kyseliny, ale větší afinitu vykazuje pro vazbu ŽK (Choudhuri & Klaassen, 2022).

### **1.2.3.3 OST $\alpha/\beta$ (organic solute transporter $\alpha/\beta$ , gen: *SLC51A/B*)**

Heterodimer OST $\alpha/\beta$  je exprimován na bazolaterální membráně buněk tenkého střeva a zajišťuje na Na<sup>+</sup> nezávislý transport ŽK z enterocytů do portálního oběhu. Kromě ŽK mohou jako substráty sloužit také další látky, např. estrogen sulfát, digoxin a prostaglandin. Expres obou podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$  se vzájemně regulují (Choudhuri & Klaassen, 2022). Nedostatečná exprese heterodimeru OST $\alpha/\beta$  vede k hromadění ŽK uvnitř enterocytů a může způsobit jejich poškození.

## **1.3 Celkový obsah ŽK (pool) a jeho regulace**

Celkové množství ŽK v lidském těle je označováno jako tzv. celkový pool ŽK, a tvoří jej především ŽK ve střevě (80-85 %), žluči (10-15 %) a v játrech (1-5 %). Složení ŽK se v jednotlivých částech organismu liší, v séru je například většina ŽK v nekonjugované formě. Játra, žluč a tenké střevo obsahují převážně konjugované ŽK, zatímco v tlustém střevě a stolici převládají nekonjugované formy, především DCA. Změna celkového poolu nebo složení ŽK může nastat v důsledku onemocnění jater, obstrukce žlučových cest, hladovění, vlivem léčiv atd. Zvýšení celkového poolu ŽK lze pozorovat u zvýšené syntézy, zvýšené střevní absorpce nebo sníženého vylučování stolicí. Naproti tomu ke snížení celkového množství ŽK dochází při jejich snížené syntéze, biliární sekreci a střevní reabsorpci, nebo při zvýšené exkreci stolicí. Snížení poolu ŽK tak lze typicky pozorovat během cholestázy, kdy je narušen tok žluče, vzniká retence ŽK v játrech a systémové cirkulaci, a naopak klesá obsah ŽK ve střevě (Chiang & Ferrell, 2020).

Zásadní role ŽK v řadě metabolických pochodů a současně jejich potenciální toxicita vyžaduje precizní regulaci jejich celkového poolu, ale i obsahu v jednotlivých orgánech, především v játrech. U řady onemocnění hrozí zejména nadměrná kumulace ŽK s rozvojem poškození tkání, proto se fylogeneticky vyvinuly zpětnovazebné mechanismy omezující v případě kumulace ŽK především jejich syntézu, vstup do jater a střevní reabsorpci. Centrální roli má v této regulaci farnesoidní X receptor (FXR) (Y. Zhang & Edwards, 2008).

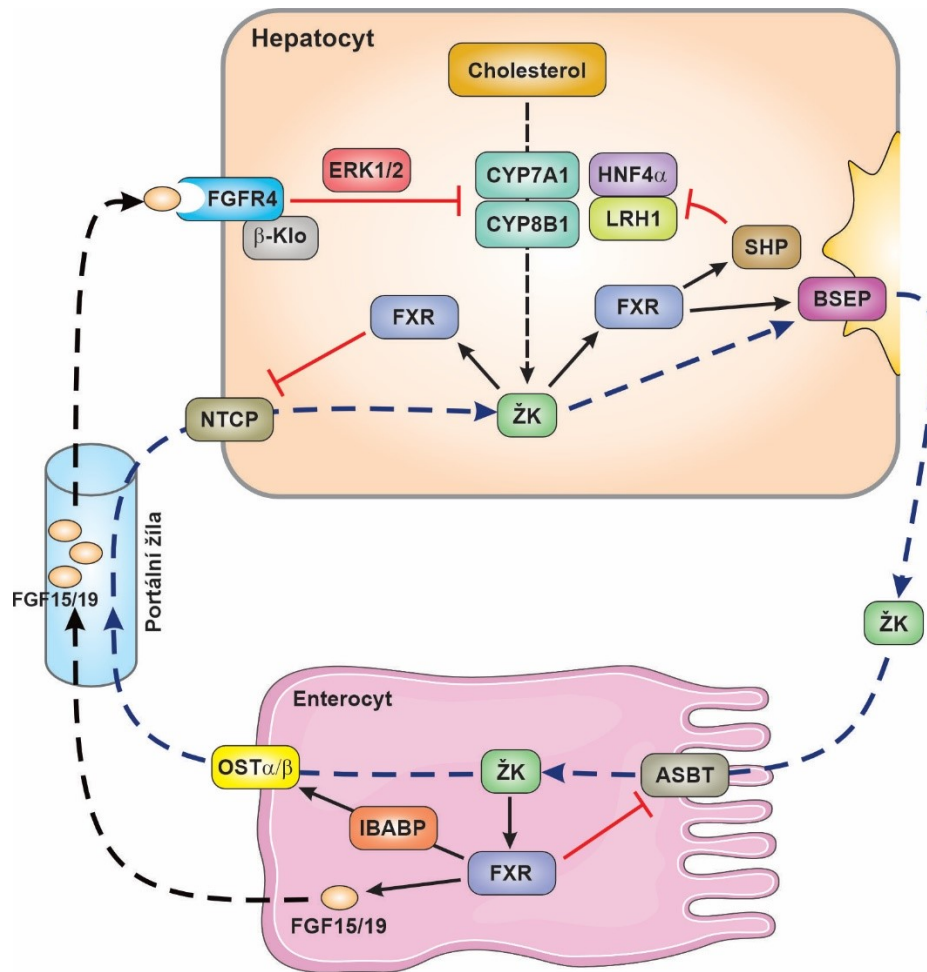
### 1.3.1 FXR

Farnesoidní X receptor (FXR) patří do velké rodiny nukleárních receptorů, které se vážou na specifické sekvence DNA a regulují genovou expresi. Transkripční aktivita je stimulována agonisty, kteří se vážou na specifické vazebné místo receptoru (LBD, ligand binding domain) a mění konformaci, která často vede k uvolnění korepresorů, rekrutaci koaktivátorů a aktivaci genové transkripce. Mezi specifické agonisty FXR patří především ŽK, ale také steroidní hormony, hormon štítné žlázy a fosfolipidy (Y. Zhang & Edwards, 2008). Schopnost aktivovat FXR se mezi jednotlivými ŽK liší v pořadí CDCA > LCA > DCA > CA. Hydrofilní ŽK, jako UDCA nebo MCA, nejsou agonisty FXR a v konjugované formě působí spíše jako antagonisté.

FXR hraje hlavní roli v regulaci homeostázy ŽK (T. Li & Chiang, 2014; Sinal et al., 2000). Aktivace FXR v hepatocytech snižuje intracelulární obsah ŽK prostřednictvím indukce BSEP a MRP3/4 se zvýšením sekrece konjugovaných ŽK do žluče a portální cirkulace a represí NTCP s následně sníženým vylučováním ŽK z portální cirkulace (Obrázek 5). Aktivovaný FXR navíc indukuje represor transkripce SHP, který inhibuje transkripci genů CYP7A1 a CYP8B1 (Obrázek 5). Aktivovaný FXR naopak indukuje enzymy zapojené do konjugace ŽK, což zvyšuje hydrofilitu a jejich následný export z hepatocytu do žluče a portální krve. Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy BACS (bile acyl-CoA syntetasa) a BAAT (bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferasa).

Paralelní aktivace FXR v enterocytech ilea snižuje expresi apikálního ASBT, a tím snižuje reabsorpci ŽK ze střevního obsahu, za současné indukce bazolaterálních transportérů pro eflux ŽK z enterocytů do portální cirkulace, tzn. OST $\alpha/\beta$ . Aktivace střevního FXR vede také k indukci fibroblastového růstového faktoru 19 (FGF19) u lidí, resp. jeho Fgf15 ortologu u myši (Obrázek 5). FGF19 uvolněný z enterocytů je transportován portálním krevním oběhem a váže se na hepatocytech na membránový komplex FGF receptor 4/ $\beta$ -Klotho, který intracelulárně aktivuje extracelulárně regulovanou kinázu 1 a 2 (ERK1/2), která následně inhibuje transkripci CYP7A1 a CYP8B1 (Obrázek 5) (Tiangang Li & Chiang, 2020). Signální dráha střevních FXR/FGF19 a jaterních FGFR4/ $\beta$ -Klotho/ERK1/2 je v současnosti považovaná za hlavní mechanismus zpětnovazebné regulace syntézy ŽK.





**Obrázek 5: Regulace homeostázy žlučových kyselin prostřednictvím FXR**

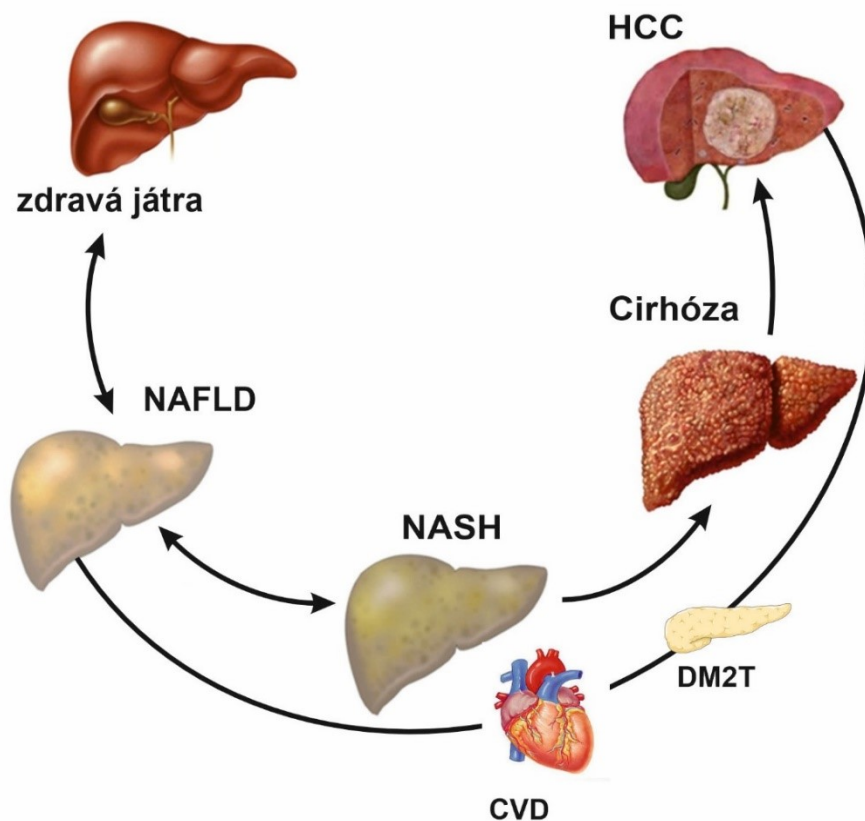
V hepatocytech FXR negativně reguluje syntézu ŽK represí hlavních syntetických enzymů CYP7A1 a CYP8B1. Po aktivaci FXR indukuje expresi SHP, která následně interaguje s HNF4 $\alpha$  a LRH-1 za účelem potlačení transkripce CYP7A1 a CYP8B1. Současně FXR indukuje expresi transportéru BSEP a zároveň inhibuje import ŽK negativní regulací NTCP. V enterocytech potlačuje FXR vychytávání ŽK ze střevního lumen inhibicí aktivity transportéru ASBT a zvyšuje expresi OST $\alpha/\beta$ , aby se zvýšila exkrece ŽK do portální žíly. Převzato a upraveno z: (Tiangang Li & Chiang, 2020). *Použité zkratky:* BSEP, bile salt export pump; NTCP, Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide; CYP7A1, cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylasa; CYP8B1, sterol-12 $\alpha$ -hydroxylasa; HNF4 $\alpha$ , hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ; LRH-1, liver receptor homolog-1; SHP, small heterodimer partner; FGFR4, fibroblast growth factor receptor 4;  $\beta$ -Klo,  $\beta$ -klotho protein; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; ASBT, apical sodium–bile acid transporter; IBABP, ileal bile acid binding protein; FXR, farnesoid X receptor; OST $\alpha/\beta$ , organic solute transporter  $\alpha/\beta$ ; FGF15/19, fibroblast growth factor 15/19; ŽK, žlučové kyseliny.

Centrální role aktivace FXR v obraně před cholestatickou kumulací složek žluče vedla k syntéze řady syntetických agonistů s cílem vyvinout látku pro léčbu cholestázy. Do praxe se prozatím podařilo zavést kyselinu obeticholovou pro léčbu primární biliární cholangitidy v kombinaci s UDCA u dospělých s nedostatečnou odpovědí na monoterapii UDCA. Nicméně léčba může být provázena selháním a nežádoucími účinky, a proto se hledají další terapeutické cíle. V tomto směru se pozornost upírá na další nukleární receptory podílející se na regulaci homeostázy ŽK (Y. Zhang & Edwards, 2008), pregnanový X receptor (PXR), receptor pro

vitamín D (VDR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR). Tyto receptory potlačují syntézu ŽK represí CYP7A1. Společně pravděpodobně odpovídají za regulaci CYP7A1 a řízení syntézy ŽK z cholesterolu, a tím se také uplatňují v ochranné reakci během cholestázy (Y. Zhang & Edwards, 2008).

#### 1.4 NASH

Nealkoholová steatohepatitida (NASH) je závažnější formou nealkoholového ztukovatění jater (NAFLD), nejčastějšího chronického onemocnění jater, které celosvětově postihuje asi 30 % dospělé populace zejména ve formě nekomplikované prosté steatózy. Přibližně u čtvrtiny těchto pacientů se vyvine nealkoholová steatohepatitida (NASH). Tato agresivní varianta je charakterizovaná steatózou jater, poškozením hepatocytů (balooning) a zánětem, který vede až k jaterní fibróze s možností přechodu do cirhózy a hepatocelulárního karcinomu (Obrázek 6). NASH se postupně stala druhou hlavní indikací pro transplantaci jater. Její incidence a prevalence však stále stoupá a navzdory naléhavé potřebě léčby, uspokojivá terapie zatím není k dispozici (Adorini & Trauner, 2023). Je to dáno i tím, že se dosud nepodařilo zcela dostatečně objasnit patofyziologii. NASH je velmi často doprovázena řadou onemocnění, které podporují její progresi, jako například obezita, inzulínová rezistence, zánětlivé projevy nebo genetická predispozice.



### **Obrázek 6: Postup onemocnění od prosté steatózy přes NASH až k hepatocelulárnímu karcinomu**

Většina pacientů (asi 30 % populace) vykazuje pouze nekomplikované ztukovatění jater, bez poškození jaterních buněk a zánětu. Pouze u některých pacientů (asi 1/4) s NAFLD dochází k rozvoji NASH, kdy steatóza je doprovázená poškozením jaterních buněk, zánětem a počínající fibrózou. Dokud nedojde k plnému rozvoji NASH se všemi jejími průvodními znaky, je onemocnění vratné. S postupující fibrózou může u části pacientů (až 50 %) přejít NASH v cirhózu. Onemocnění může vyústit až v hepatocelulární karcinom v jakékoli fázi a riziko stoupá se závažností NASH. Vývoj onemocnění je obvykle pomalý, ale někteří pacienti mohou rychle progredovat. NAFLD zvyšuje riziko rozvoje cukrovky a onemocnění srdce a cév. Převzato a upraveno: (Francque et al.)

*Použité zkratky:* NAFLD, nealkoholové ztukovatění jater; NASH, nealkoholová steatohepatitida; HCC, hepatocelulární karcinom; CVD, kardiovaskulární onemocnění; DM2T, diabetes mellitus 2. typu.

Role ŽK v patogenezi NASH je do značné míry kontroverzní. S progredujícím poškozením jater u nemocných s NAFLD dochází k vzestupu plazmatických hladin ŽK (Cheng et al., 2023). Stupeň této kumulace ŽK pozitivně koreluje s přítomností inzulínové rezistence, metabolického syndromu a diabetu mellitu 2. typu (Kalhan et al., 2011), ale především s přítomností zánětu (Puri et al., 2018) a se stupněm jaterní fibrózy (Caussy et al., 2019; Gottlieb, Bechmann, & Canbay, 2018; Nimer et al., 2021; Puri et al., 2018). Pozorován je především vzestup konjugovaných ŽK (Puri et al., 2018) hydroxylovaných v pozici 12 $\alpha$ , což svědčí pro částečnou aktivaci anti-cholestatických obranných mechanismů akcentujících syntézu více polárních, a tím pádem méně toxických konjugátů. Proto bylo navrženo měření profilů ŽK v plazmě jako jeden z bioindikátorů pro stratifikaci závažnosti NAFLD. Současně však platí, že zvýšené hladiny ŽK přispívají k progresi NASH zvýšením jaterní kumulace tuků, a především aktivací produkce cytokinů a chemokinů v hepatocytech, které aktivují a udržují zánět. Tyto mechanismy mají rovněž významnou roli v přechodu prosté steatózy do NASH (Allen, Jaeschke, & Copple, 2011).

Naopak pozitivní účinky ŽK u NAFLD se mohou uplatnit prostřednictvím aktivace FXR a TGR5 receptorů. Aktivovaný FXR receptor snižuje jaterní obsah lipidů (aktivací  $\beta$ -oxidace a inhibicí lipogeneze), glykémii (poklesem glukoneogeneze a zvýšením syntézy glykogenu), zánět (potlačení NF- $\kappa$ B signalizace, NLRP3 inflammasomu a prozánětlivé infiltrace) a fibrózu (snižuje aktivitu hvězdicových buněk a depozici kolagenu). Aktivace TGR5 receptoru snižuje inzulínovou resistenci a má významný protizánětlivý účinek. Jednotlivé ŽK se pak liší, jak svou schopností aktivovat nebo blokovat FXR a TGR5, tak i přímou toxicitou na buňky a schopností indukovat zánět (typická zejména u hydrofobních ŽK typu LCA nebo DCA). Proto spontánně nedochází k dostatečné aktivaci těchto receptorů a v patogenezi NASH dominují nežádoucí účinky kumulujících se ŽK. Pro terapeutické účely aktivace FXR a TGR5 receptorů je nutné použít selektivní syntetické látky s vysokou afinitou a vnitřní aktivitou (Cheng et al., 2023). V této souvislosti byla recentně testovaná řada látek ovlivňujících jeden (pro FXR např. obeticholová kyselina a tropifexor; pro TGR5 např. BAR501), nebo oba uvedené receptory

(např. INT-767). Navzdory velmi slibným výsledkům experimentálních studií, jejich podání v klinických studiích je u FXR agonistů často spojeno s nežádoucími účinky typu svědění a zvyšování hladin LDL cholesterolu; u TGR5 agonistů byla kromě svědění pozorovaná distenze žlučníku a pro-proliferativní efekt na cholangiocyty (Reich et al., 2016). Z toho je zjevné, že pro terapii NASH je nutno hledat bezpečnější alternativy a roli kumulujících se ŽK vnímat jako negativní.

#### **1.4.1 Střevní mikrobiom**

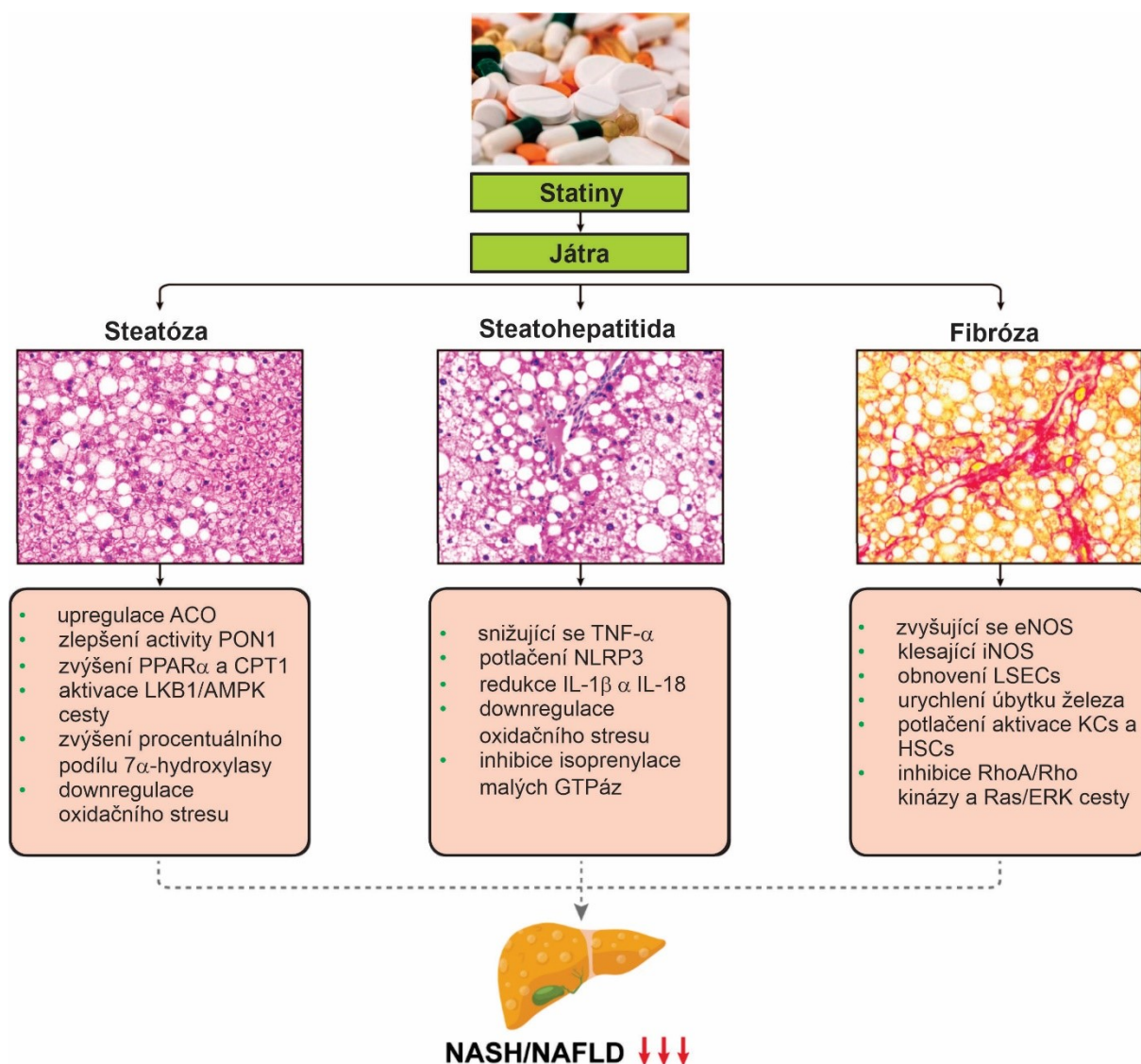
Ve studiu patofyziologie NASH se v posledním desetiletí akcentovala role střevního mikrobiomu, zejména dvou hlavních kmenů *Firmicutes* (60 % střevních bakterií) a *Bacteroidetes* (22 %) s menším podílem kmenů *Actinobacteria* (17 %) a *Proteobacteria* (1 %). *Firmicutes* jsou bakterie produkující butyrát, zatímco *Bacteroidetes* degradují sacharidy. Nárůst poměru *Firmicutes* ku *Bacteroidetes* je běžně pozorovaný u pacientů s obezitou a umožňuje střevním mikrobům získávat efektivněji energii z potravy s vysokým obsahem tuků, což prostřednictvím zvýšené dodávky prekurzorů mastných kyselin zvyšuje adipozitu tkání. Významné zvýšení gramnegativních proteobakterií vyskytující se při pokročilé fibróze, může naznačovat jejich úlohu v patofyziologii onemocnění (Chiang & Ferrell, 2020).

Důležitou roli střevního mikrobiomu v rozvoji NAFLD podpořila také série experimentálních studií u bezmikrobních myší, které byly rezistentní ke vzniku obezity indukované dietou. Přítomnost střevního mikrobiomu podporovala nárůst tělesné hmotnosti a jaterní steatózu prostřednictvím mechanismů závislých na FXR receptoru (Arab, Karpen, Dawson, Arrese, & Trauner, 2017; Parseus et al., 2017). V souvislosti s tím, bezmikrobní myši vykazují větší celkový pool ŽK než konvenční zvířata, což patrně souvisí s antagonismem FXR zprostředkovaným tauro- $\beta$ -muricholovou kyselinou v terminálním ileu s následným snížením exprese *Fgf15* a indukci *Cyp7a1* v játrech (Sayin et al., 2013). Naopak transplantace střevní mikroflóry z myší s NAFLD bezmikrobním myším vedla k rozvoji jaterního postižení. Je tedy zřejmé, že střevní mikrobiom kontroluje prostřednictvím signalizace střevního FXR/*Fgf15* (FGF19), jak složení ŽK, tak i jejich celkový pool a následně přispívá i k aktivitě NAFLD. Komunita střevních bakterií může být narušena dietou, léky (antibiotika), alkoholem a toxickými bakteriálními metabolity s negativním vlivem na metabolismus hostitele. Narušení mikrobiomu se tak podílí na rozvoji obezity, diabetu mellitu 2. typu (DM2T), NAFLD, nebo hepatocelulárního karcinomu (HCC) (Chiang & Ferrell, 2020) patrně i prostřednictvím vlivu na ŽK a jejich signalizaci. Naopak ŽK mají zásadní roli v regulaci střevního mikrobiomu např. svým přímým detergenčním vlivem a pomáhají tak udržovat nepropustnost střevní bariéry

narušovanou přerůstáním bakterií a uvolňováním jejich toxinů. V moderních studiích NASH ve vztahu k ŽK je proto nutné korelovat analýzy jednotlivých ŽK v enterohepatálním systému s analýzou střevního mikrobiomu.

## 1.5 Statiny

Statiny představují důležitou skupinu léčiv, která přinesla velký kvalitativní posun v léčbě hypercholesterolemie a aterosklerózy (Chatrath, Vuppalanchi, & Chalasani, 2012). Jejich účinek spočívá v kompetitivní inhibici hydroxymethylglutaryl koenzym A (HMG-CoA) reduktasy, klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu. Snížení intracelulárního cholesterolu vede ke zvýšení počtu receptorů pro lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL receptory), čímž se zvyšuje vychytávání LDL cholesterolu z plazmy (Gutierrez-Cuevas, Santos, & Armendariz-Borunda, 2021; Malhotra & Goa, 2001). Statiny snižují hladiny LDL cholesterolu (o 20–60 %), triglyceridů a mírně zvyšují hladiny HDL cholesterolu (Fu, Cui, & Klaassen, 2014; Chatrath et al., 2012). Mají také pleiotropní vlastnosti, které jsou zodpovědné za jejich protizánětlivé, antiproliferativní, antitrombotické, antioxidační a imunomodulační působení *in vitro* a *in vivo*. Pro jejich významné účinky ve snižování LDL cholesterolu jsou často používány u obézních nemocných s vysokým rizikem NASH (Eslami, Aghili, & Ghafi, 2024; Gutierrez-Cuevas et al., 2021). V souvislosti s využitím statinů u NASH byl jejich pozitivní účinek prokázán v několika klinických studiích (Boutari, Pappas, Anastasilakis, & Mantzoros, 2022; Dongiovanni et al., 2015), kde byl pozorován pokles steatózy i fibrózy společně se zlepšením aktivity transamináz v séru. Navíc léčba statiny snížila u nemocných s NAFLD/NASH kardiovaskulární morbiditu a mortalitu: a) o polovinu ve srovnání s nemocnými léčenými statiny s normální strukturou a funkcí jater, b) o 2/3 ve srovnání s pacienty s NAFLD/NASH, kteří nedostali statiny (90 % této populace statiny nedostalo kvůli neopodstatněnému strachu z poškození jater) (Athyros et al., 2018). Evropská hepatologická společnost ve svém klinickém doporučení k léčbě NASH proto uvádí, že ačkoliv statiny prozatím nebyly dostatečně testovány pro zařazení do rutinní preskripce v této indikaci, jejich použití u nemocných s NAFLD je bezpečné, přináší významné kardiovaskulární benefity bez zvýšeného rizika hepatotoxicity a může přinést snížení transamináz (European Association for the Study of the Liver, 2016, 2024). Experimentální studie podpořily tento účinek průkazem řady dílčích mechanismů na úrovni redukce steatózy, zánětu a fibrózy (Obrázek 7) (Lastuvkova et al., 2021; S. Zhang, Ren, Zhang, Lan, & Liu, 2024).



**Obrázek 7: Potenciální mechanismy působení statinů na játra u NASH/NAFLD**

Schematické znázornění pleiotropních účinků statinů na játra a možné mechanismy vedoucí ke zlepšení patologického stavu jater. Šipky směřující dolů označují downregulaci. Převzato a upraveno z: (S. Zhang et al., 2024)

Použité zkratky: ACO, acyl-CoA oxidasa; PON1, paraoxonasa 1; PPAR $\alpha$ , receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem; CPT1, karnitin palmitoyltransferasa 1; LKB1/AMPK, AMP aktivovaná protein kináza; TNF- $\alpha$ , faktor nádorové nekrózy  $\alpha$ ; NLRP3, protein obsahující NOD-, LRR- a pyrinovou doménu; IL-1 $\beta$  (18), cytokin interleukin 1 $\beta$  (18); GTPázy, malé proteiny vázající guanosintrifosfát; eNOS, endoteliální syntasa oxidu dusnatého; iNOS, indukovatelná syntasa oxidu dusnatého; LSECs, endotelové buňky jaterních sinusoid; KCs, Kupfferovy buňky; HSCs, jaterní hvězdicové buňky; Ras/ERK, Ras-extracelulární signálem regulovaná kináza; NASH, nealkolová steatohepatitida; NAFLD, nealkoholového tukovatění jater

V klinickém používání statinů dominuje zejména preskripce atorvastatinu a rosuvastatinu, které vykazují delší biologický poločas eliminace, a tudíž stabilnější účinek než další zástupci této skupiny. Pro detailnější výzkum vlivu statinů na obrat ŽK u NASH jsme proto zvolili atorvastatin. Farmakodynamický profil atorvastatinu (žádoucí i nežádoucí účinky) koresponduje s mechanismy a účinky popisovanými u dalších statinů, nicméně proti ostatním zástupcům nabízí výhodnější farmakokinetické vlastnosti.

Tato látka patří k lipofilnějším zástupcům skupiny, po perorálním podání vykazuje spolehlivou absorpci v rozsahu přibližně 30 % a podléhá účinku prvního průchodu. Biologická dostupnost atorvastatinu je asi 14 % a více jak z 98 % je vázán na plazmatické bílkoviny. Metabolismus léčiva je zprostředkován CYP3A4, izoformou cytochromu P450, kdy vznikají ortho- a para-hydroxylované deriváty a různé  $\beta$ -oxidační produkty (Malhotra & Goa, 2001). Výhodou je spolehlivá distribuce do parenchymatózních i neparenchymatózních buněk jater, což podporuje jeho preferenci v klinických i experimentálních studiích s NAFLD (Eslami et al., 2024).

## 1.6 $\beta$ -blokátory

Antagonisté  $\beta$ -adrenergických receptorů ( $\beta$ -blokátory) jsou klinicky často používanou skupinou látek, které jsou indikovány k léčbě angíny pectoris, srdečních arytmií, srdečního selhávání a hypertenze. Také se používají v profylaxi migrény, v léčbě úzkosti, v prevenci esenciálního třesu a v blokování vedlejších účinků hypertyreózy. Neselektivní blokátory jsou také doporučovány k léčbě portální hypertenze u pacientů s cirhózou. Podle své schopnosti blokovat  $\beta_1$  nebo  $\beta_2$  receptory je dělíme na selektivní nebo neselektivní a obě skupiny mohou mít vnitřní sympatomimetickou aktivitu (ISA). Některé z nich navíc vykazují schopnost blokovat  $\alpha_1$ -adrenergický receptor s redukcí periferní cévní rezistence, což nabízí benefit v situaci s vyšším krevním tlakem, např. během preeklampsie u těhotných žen. Antagonisté  $\beta$  receptorů se také liší schopností působit jako tzv. inverzní agonisté, tj. blokují i bazální aktivitu receptoru bez přítomnosti agonisty, což může být spojeno s příznivými výsledky u chronických remodelujících onemocnění typu srdečního selhávání nebo jaterní fibrózy. S ohledem na tyto příznivé vlastnosti byl pro naši studii vybrán karvedilol.

### 1.6.1 *Karvedilol*

Karvedilol se řadí do skupiny neselektivních  $\beta$ -blokátorů bez ISA, s  $\alpha_1$ -blokádou a mírným vazodilatačním účinkem prostřednictvím stimulace uvolňování oxidu dusnatého (Tripathi, Therapondos, Lui, Stanley, & Hayes, 2002; Zacharias et al., 2018). Někdy je také označován jako  $\beta$ -blokátor třetí generace (Arzani, Haeri, Daeihamed, Bakhtiari-Kaboutaraki, & Dadashzadeh, 2015). Jedná se o racemát, kde oba enantiomery blokují  $\alpha_1$ -adrenoreceptor podobným způsobem, ale pouze S-enantiomer poskytuje také blokádu  $\beta$  receptorů. Z farmakokinetického hlediska je karvedilol po perorálním podání rychle absorbován a maximální plazmatické koncentrace je dosaženo za 1,5 až 2 hod. Karvedilol je rozpustný v tucích a snadno se distribuuje extravaskulárně. V krvi je převážně vázán na plazmatické

proteiny (> 95 %), především na albumin a jeho biologický poločas eliminace ( $t_{1/2}$ ) je 7 až 10 hodin. Z velké části je metabolizován v játrech, především glukuronidací, oxidací aromatického kruhu a oxidací alifatického postranního řetězce. Metabolismus karvedilolu v játrech je zprostředkován enzymy cytochromu P450, především CYP2D6 a CYP2C9 a jeho aktivní i neaktivní metabolity jsou vylučovány převážně žlučí (Carlson & Oberg, 1999).

Karvedilol má široké použití při léčbě systémové hypertenze, chronického srdečního selhání a stabilní angíny pectoris. S ohledem na jaterní patologie je důležité, že podobně jako ostatní neselektivní  $\beta$ -blokátory je používán k redukci portálního tlaku a prevenci rekurentního krvácení z varixů u pacientů s cirhózou a portální hypertenzí (Zacharias et al., 2018), kde recentně prokázal lepší efektivitu než další prototypový zástupce této skupiny, propranolol. Ačkoliv bylo působení karvedilolu studováno v řadě *in vivo* studií jaterních patologií, včetně steatózy, mechanismus jeho protektivního účinku dosud nebyl objasněn, podobně jako jeho vliv na homeostázu ŽK. Analýza těchto vlastností je přitom důležitá, protože v klinické praxi byly popsány jednotlivé případy cholestázy podmíněné karvedilolem (Rua et al., 2019). Experimentálně přitom karvedilol působí proti poškození jaterních mitochondrií vyvolaném CDCA (Rolo, Oliveira, Moreno, & Palmeira, 2003).



## 2 Cíle

Žlučové kyseliny sehrávají významnou roli v patofyziologii nealkoholové steatohepatitidy, proto může prohlubování těchto znalostí významně přispět k identifikaci mechanismů, které jsou buď bioindikátory progresu onemocnění s využitím v diagnostice, nebo je možná i následná terapeutická intervence. Znalosti o změnách homeostázy žlučových kyselin během různých terapií navíc přispívají k poznání potenciálních toxických účinků léčiv na játra. Cíle této disertační práce byly proto následující:

- Porovnání detailů enterohepatální cirkulace jednotlivých žlučových kyselin u myši se zdravými játry a s játry změněnými NASH.
- Zhodnocení vlivu dvou klinicky důležitých léčiv karvedilolu a atorvastatinu na metabolom žlučových kyselin u myši s NASH v porovnání se zdravou populací.
- Prozkoumání změn metabolomu žlučových kyselin vlivem podání labetalolu na myším modelu estrogenem indukované cholestázy.

### 3 Výsledky a komentáře

Tato disertační práce je uspořádána jako komentovaný soubor tří původních výzkumných článků. Všechny tyto tři články jsou publikovány v mezinárodních časopisech s AIS v Q1-Q2. Žadatelka je první autorkou dvou z těchto článků (Q1 a Q2 dle AIS). Níže jsou uvedeny souhrny hlavních výsledků prezentovaných v jednotlivých publikacích spolu s komentáři.

#### 3.1 Karvedilol narušuje homeostázu žlučových kyselin u myši: důsledky u nealkoholové steatohepatitidy

##### Publikace č. 1:

*Lastuvkova H, Nova Z, Hroch M, Alaei Faradonbeh F, Schreiberova J, Mokry J, Faistova H, Stefela A, Dusek J, Kucera O, Hyspler R, Dohnalkova E, Bayer RL, Hirsova P, Pavek P, Micuda S. Carvedilol impairs bile acid homeostasis in mice: implication for nonalcoholic steatohepatitis. Toxicol Sci. 2023 Aug 26:kfad088 (IF = 3.8; Q1/AIS)*

Karvedilol je kombinovaný antagonist  $\alpha_1$  a  $\beta$ -adrenoreceptorů využívaný v klinické praxi u některých kardiovaskulárních onemocnění a také pro mírnění portální hypertenze u jaterních cirhóz. Nicméně, kromě významných benefitů, byl v ojedinělých případech u nemocných léčených karvedilolem popsán rozvoj cholestázy. Mechanismus tohoto účinku nebyl dosud vysvětlen. Proto byl v této studii experimentálně hodnocen vliv karvedilolu na homeostázu ŽK, jako hlavní patofyziologické komponenty cholestáz, a to jak u zdravých myši, tak i u myši s nealkoholovou steatohepatidou (NASH), která sama může být provázená cholestázou.

Nealkoholová steatohepatitida byla u myši navozena 24týdenní dietou s vysokým obsahem nasycených mastných kyselin (40 % energetické hodnoty diety) a cholesterolu (0,2 %) v kombinaci s přísadkou glukózy (18,1 g/l) a fruktózy (24 g/l) v pitné vodě. Kontrolní skupiny obdržely standardní dietu. Karvedilol byl podáván gastrickou gaváží v dávce 10 mg/kg/den po dobu posledních 3 týdnů na dietě. Následně byly provedeny odběry plazmy, žluče, stolice, jater a střev na analýzy profilů jednotlivých ŽK pomocí LC-MS metody. Enzymy, transportní proteiny a jejich regulátory odpovědné za homeostázu ŽK v játrech a v ileu byly analyzovány metodami Western blot a qRT-PCR.

Výsledky ukázaly, že karvedilol zvyšuje plazmatické koncentrace ŽK u kontrolních myši, a to snížením jejich vychytávání do hepatocytů prostřednictvím downregulace Ntcp

transportéru na bazolaterální membráně. To bylo pravděpodobně způsobeno blokadou dráhy  $\beta$ -adrenoreceptor-cAMP-Epac1 zajišťující posttranskripčně intracelulární přesun a inserci Ntcp do membrány. Karvedilol naopak nezhoršil kumulaci ŽK v plazmě myši s NASH, a navíc přeměroval jejich syntézu ve prospěch hydrofilní a méně toxické kyseliny muricholové a jejího sekundárního metabolitu, kyseliny hyocholové. Změna spekter ŽK se ve střevě pozitivně projevila stimulací Fxr receptoru v enterocytech ilea a snížením obsahu bakterií kmene *Firmicutes*, které jsou odpovědné za syntézu více toxických lipofilních sekundárních ŽK. Současně karvedilol u zvířat s NASH významně snížil kumulaci tuků v hepatocytech prostřednictvím downregulace stearoyl-CoA desaturasy 1 (Scd1), klíčového enzymu pro *de novo* syntézu mastných kyselin. Navíc se podařilo prokázat významný protizánětlivý a antifibrotický účinek karvedilolu, m.j. zprostředkovaný přímým inhibičním vlivem na aktivaci jaterních hvězdicových buněk.

Celkově naše zjištění naznačují příznivé účinky karvedilolu u jaterních fibróz spojených s NASH, což podporuje bezpečné užívání léčiva u nemocných s portální hypertenzí. Současně se podařilo objasnit mechanismus možného cholestatického působení karvedilolu u citlivých jedinců. Za této situace lze v klinické praxi doporučit monitorování spekter ŽK v plazmě a včasnou změnu terapie.

### **Příspěvek kandidáta:**

- Provádění experimentů, konkrétně:
  - *In vivo* část studie
  - Příprava vzorků plazmy pro biochemickou analýzu
  - Příprava vzorků stolice k analýze žlučových kyselin
  - Izolace mRNA
  - Syntéza cDNA pro qPCR a izolace proteinu pro WB
- Analýza exprese genů v játrech a ileu pomocí qPCR
- Analýza proteinů jater a ilea pomocí WB
- Analýza dat, interpretace výsledků, vizualizace
- Psaní článku a příprava k odevzdání

### **3.2 Atorvastatin moduluje homeostázu žlučových kyselin u myši s dietně indukovanou nealkoholovou steatohepatidou**

#### **Publikace č. 2:**

***Lastuvkova H, Faradonbeh FA, Schreiberova J, Hroch M, Mokry J, Faistova H, Nova Z, Hyspler R, Igreja Sa IC, Nachtigal P, Stefela A, Pavek P, Micuda S. Atorvastatin Modulates Bile Acid Homeostasis in Mice with Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis. Int J Mol Sci. 2021 Jun 16;22(12):6468. (IF = 5,923; Q2/AIS)***

U nemocných s metabolickým syndromem a přidruženou NASH je nutné léčit další průvodní rizikový faktor, kterým je hypercholesterolemie a ateroskleróza. V této indikaci se jako léčiva první volby používají inhibitory HMG-CoA reductasy, tzv. statiny. Kromě snížení hladin cholesterolu v séru vykazují tato léčiva pozitivní účinky i u NASH. Tyto benefity by mohly m.j. vyplývat ze schopnosti statinů měnit homeostázu ŽK, nicméně v této oblasti bylo jen omezené množství informací. Proto byl v této studii hodnocen účinek atorvastatinu na mechanismy tvorby žluče a homeostázu ŽK u myši s NASH, ale i zdravých zvířat.

Podobně jako v předešlé studii byla NASH vyvolaná 24týdenním podáváním diety s vysokým obsahem nasycených mastných kyselin (40 % energetické hodnoty diety) a cholesterolu (0,2 %) společně s přísadkou glukózy a fruktózy (42 g/l) do pitné vody. U kontrolních skupin byla zvířatům podávána standardní laboratorní dieta. Atorvastatin byl podáván gastrickou gaváží (20 mg/kg/den) po dobu třech posledních týdnů na dietě. Žlučové kyseliny byly následně stanoveny v plazmě, ve žluči a ve stolici a tato data byla porovnána s výsledky exprese odpovědných enzymů a transportérů hodnocených metodami qRT-PCR a Western blot.

Dosažené výsledky ukázaly, že atorvastatin podávaný myším s NASH snížil jaterní steatózu a zánět v důsledku snížení jaterní exprese klíčového lipogenního enzymu Scd1 a inhibice prozánětlivé signalizace NF-κB. Atorvastatin u myši s NASH neovlivňoval celkový obsah ŽK, nicméně proporcionálně zvyšoval plazmatickou koncentraci, biliární sekreci a fekální vylučování deoxycholové kyseliny (DCA) a potlačoval alternativní cestu syntézy ŽK prostřednictvím downregulace enzymů Cyp7b1 a Cyp2c70, což může představovat pozitivní mechanismus akcentující přítomnost méně toxických ŽK hydroxylovaných na pozici 12 $\alpha$ . Možný protektivní účinek na homeostázu ŽK byl dále podpořen schopností atorvastatinu snížit plazmatické hladiny ŽK u myši na standardní kontrolní dietě. Mechanismem tohoto snížení bylo zvýšené vylučování ŽK stolicí v důsledku snížené reabsorpce ŽK zprostředkované

poklesem exprese Asbt transportéru v ileu, ale přispět mohlo i snížení exprese enzymů syntetizujících ŽK v játrech, Cyp8b1, Cyp27a1 a Cyp2c70.

Výsledky této studie ukázaly, že atorvastatin významně moduluje homeostázu ŽK prostřednictvím změny jejich střevního zpracování a jaterní syntézy. Úplně poprvé byl takto analyzován vliv statinu na obrat ŽK u myši s NASH, kde lék uniformně zvyšoval tvorbu DCA. Potenciální role DCA jako indikátoru jaterního účinku statinu u NASH by měla být dále objasněna. Atorvastatin navíc vykazoval signifikantní protektivní vliv na rozvoj jaterního zánětu a fibrózy, což podporuje jeho výhodné terapeutické užití za této situace. Současně výsledky u kontrolní skupiny vysvětlily schopnost statinu snižovat celkové plazmatické koncentrace ŽK, což může mít pozitivní význam u různých cholestatických jaterních onemocnění.

#### **Příspěvek kandidáta:**

- Provádění experimentů, konkrétně:
  - *In vivo* část studie
  - Příprava vzorků plazmy pro biochemickou analýzu
  - Příprava vzorků stolice k analýze žlučových kyselin
  - Izolace mRNA, syntéza cDNA pro qPCR a izolace proteinu pro WB
- Analýza exprese genů v játrech a ileu pomocí qPCR,
- Analýza proteinů jater a ilea pomocí WB
- Analýza dat, interpretace výsledků, vizualizace
- Psaní článku a příprava k odevzdání

### **3.3 Labetalol a solubilní endoglin zhoršují retenci žlučových kyselin u myši s cholestázou indukovanou ethinylestradiolem**

#### **Publikace č. 3:**

*Cristina Igreja Sá I, Tripska K, Alaei Faradonbeh F, Hroch M, **Lastuvkova H**, Schreiberova J, Kacerovsky M, Pericacho M, Nachtigal P, Micuda S. Labetalol and soluble endoglin aggravate bile acid retention in mice with ethinylestradiol-induced cholestasis. Front Pharmacol. 2023 Jan 26;14:1116422 (IF = 5.6; Q1/AIS)*

Léčiva mohou být významným rizikovým nebo protektivním faktorem rozvoje cholestázy. Potenciální rizika musejí být zvážena zejména v situaci, kdy se rozvine více onemocnění současně a základní léčivo jednoho z nich nese potenciál pro zhoršení průvodního onemocnění. K takovéto situaci dochází během těhotenství, kdy byl prokázán zvýšený současný výskyt intrahepatální cholestázy (ICP) a preeklampsie s hypertenzí a vysokými hladinami solubilního endoglinu (sEng). Základním léčivem hypertenze v této situaci je labetalol, antagonist  $\alpha_1$  a  $\beta$ -adrenergických receptorů. Naše studie s dalším kombinovaným antagonistou  $\alpha$  a  $\beta$  receptorů, karvedilolem, poukázala na jeho možný negativní vliv na retenci ŽK. Jelikož během těhotenství dochází k progresivní redukci tvorby žluče, labetalol by mohl vést ke klinické manifestaci cholestázy. V této studii jsme proto testovali hypotézu, že aplikace labetalolu zhoršuje kumulaci ŽK v plazmě za podmínek modelové ICP a preeklampsie.

Jako model cholestázy v těhotenství byl využit cholestatický potenciál ethinylestradiolu (10 mg/kg) aplikovaného s.c. myším po dobu 5 dnů. Labetalol byl podáván současně s.c. (10 mg/kg) pro simulaci parenterálního podání během akutní terapie. Jako model současné preeklampsie byly použity transgenní myši s vysokými plazmatickými hladinami lidského sEng, kterým byl podáván ethinylestradiol (10 mg/kg, s.c.) a labetalol (10 mg/kg, s.c.) po dobu 5 dnů. Žlučové kyseliny byly poté stanoveny v plazmě, žluči a stolici společně s expresí odpovídajících genů v játrech a ileu. Plazma na stanovení ŽK a sEng byla odebrána také zdravým těhotným ženám a nemocným s ICP.

Podání labetalolu myším s estrogenní cholestázou podpořilo zvýšení plazmatických koncentrací ŽK prostřednictvím indukce Mrp4, efluxního transportéru pro ŽK v játrech. Labetalol rovněž potencoval zvýšení plazmatických hladin sEng vyvolané estrogenem. Zvýšené plazmatické hladiny sEng byly také pozorovány u nemocných s ICP v porovnání se zdravými těhotnými ženami. Kromě toho zvýšené plazmatické hladiny lidského sEng u transgenních myši zhoršily estrogenem indukovanou cholestázu u myši léčených labetalolem

a zvýšily koncentraci ŽK v plazmě prostřednictvím jejich zvýšené reabsorpce v ileu v důsledku upregulace transportéru Asbt.

V této studii bylo prokázáno, že labetalol zvyšuje plazmatické koncentrace ŽK během estrogenem indukované cholestázy a sEng jako jeden z hlavních mediátorů preeklampsie tuto retenci zhoršuje. Současně naše výsledky ukazují, že zvýšené hladiny sEng vznikající v důsledku kumulace ŽK během ICP mohou podnítit rozvoj preeklampsie, a tak představovat nový mechanismus vysvětlující koincenci ICP s preeklampií. Naše údaje podporují prospěšnost monitorování ŽK v plazmě těhotných žen s preeklampií a léčbou labetalolem.

### **Příspěvek kandidáta:**

- Provádění experimentů, konkrétně:
  - *In vivo* část studie
  - Příprava vzorků plazmy pro biochemickou analýzu
  - Příprava vzorků stolice k analýze žlučových kyselin
- Analýza dat, interpretace výsledků, vizualizace
- Revize manuskriptu

## 4 Diskuse

### 4.1 Žlučové kyseliny a NASH

Pro lepší pochopení patofyziologické role ŽK u NASH jsme se v prováděném výzkumu soustředili na stanovení spekter všech farmakologicky důležitých ŽK v jejich hlavních kompartmentech současně s kvantifikací změn indukovaných testovanou léčbou. Náš rozbor u myši s NASH potvrdil významný vzestup plazmatických koncentrací ŽK a v souladu s klinickými daty se jednalo především o konjugované ŽK hydroxylované v pozici 12 $\alpha$ , tj. TCA a TDCA, nicméně zvýšeny byly i další jako TMCA, TCDCA a TUDCA. V důsledku rozvoje jaterního zánětu a fibrózy byla značně zpomalena rychlost tvorby žluče a biliární sekrece ŽK, nicméně aktivované hepatocelulární anti-cholestatické mechanismy zabránily kumulaci ŽK v játrech. Dle předpokladu došlo k výraznému snížení proteinové exprese enzymů syntetizujících ŽK (Cyp7a1, Cyp8b1, Cyp27a1 a Cyp2c70) a jejich transportérů (především Ntcp a Bsep), což bylo v souladu s daty z předešlých studií, které se ale obvykle soustředily pouze na dílčí měření vybraných parametrů (Suga et al., 2019). Analýzy mRNA těchto molekul navíc ukázaly, že regulace transportních proteinů a enzymů zapojených do homeostázy ŽK v játrech probíhá u NASH zejména na transkripční úrovni aktivací kaskád navazujících na zánětlivou signalizaci. Výjimkou byly pouze Mrp4 transportér a enzym Cyp7b1, u kterých byla změna v mRNA (zvýšení u *Abcc4/Mrp4* a snížení u *Cyp7b1*) sledována opačnou změnou v hladině proteinu, což svědčí o významné posttranskripční regulaci.

Hlavními mechanismy zprostředkujícími posttranskripční regulaci homeostatických mechanismů ŽK na úrovni hepatocytu jsou cAMP-EPAC1, MEK/ERK a cAMP-PKA kaskády. Cesta cAMP-EPAC1 je aktivovaná přes  $\beta_2$ -adrenoreceptory, ale i glukagonem nebo UDCA (X. Li et al., 2016; Zucchetti et al., 2013) a zvyšuje přesun Mrp4, Ntcp (Mukhopadhyay et al., 1997), Bsep a Mrp2 transportérů z Golgiho aparátu na apikální nebo bazolaterální membránu podle typu transportéru (Misra, Varticovski, & Arias, 2003). Tím akceleruje transhepatocytární transport ŽK z krve do žluče, což je spojeno se zvýšením tvorby žluče. Naopak, aktivace MEK/ERK (např. během zánětu) brání inserci transportérů na membránu a aktivace GPR30-cAMP-PKA (např. kumulujícími se steroidními hormony) podporuje odstranění transportérů z membrán (Barosso et al., 2018). V souladu s tímto konceptem jsme našli v játrech s NASH zvýšenou expresi aktivní fosforované formy p-MEK a snížení p-EPAC1. Tímto přístupem se nám podařilo prohloubit znalosti o transkripčních i posttranskripčních mechanismech narušení procesů tvorby žluče u NASH.



Přínosné bylo i popsání změn střevní homeostázy ŽK. Navzdory významnému snížení biliární sekrece ŽK se jejich obsah ve střevě zvyšoval. Příčinou tohoto stavu byla patrně zvýšená vazba na tukový střevní obsah u zvířat na vysokotukové dietě, ale přesný mechanismus není objasněn. Současně došlo i ke zvýšené fekální eliminaci ŽK, což je v souladu s nálezem u nemocných s NASH (Mouzaki et al., 2016). To nastalo především v důsledku výrazné represe exprese *Slc10a2* (Asbt), hlavního transportéru pro reabsorpci žlučových kyselin v ileu. Snížení *Slc10a2* a současná indukce *Fgf15* svědčily pro aktivaci Fxr receptoru v ileu u myši s NASH. Tyto změny vysvětlují i výraznou represi *Cyp7a1*, který je inhibován zejména *Fgf15* přinášeným portálním řečištěm z ilea do jater. Za této situace lze aktivaci střevního Fxr spíše připsat zvýšenému střevnímu obsahu agonistických ŽK, jakými jsou CDCA, ale i DCA a CA. Střevní ŽK tak vytvářejí depo, které může nepříznivě přispívat k jaterní patologii. Proto byly v předešlých studiích učiněny terapeutické pokusy s FGF19 analogy (aldaferrin) a Asbt inhibitory (např. eloxibat a volixibat) na snížení syntézy ŽK a na jejich odstranění z organismu. Zástupci obou skupin vykazují snížení jaterního obsahu tuku a redukci fibrózy, nicméně u aldaferrinu to bylo spojeno s bolestivými průjmy a rizikem proliferace hepatocytů a rozvoje hepatocelulárního karcinomu; u volixibatu klinická studie nepotvrdila efekt na aktivitu NASH. Velmi nadějně se v tomto smyslu jeví eloxibat (Yamauchi et al., 2021), nicméně je zapotřebí dalších studií. Tato data dále zdůrazňují potřebu hledat léčiva s kombinovaným metabolickým a protizánětlivým/antifibrotickým účinkem.

#### **4.2 Karvedilol narušuje homeostázu žlučových kyselin u myši: důsledky u nealkoholové steatohepatitidy**

Karvedilol byl v souvislosti s NASH námi studován jako léčivo, které je používáno u nemocných s portální hypertenzí v důsledku cirhózy. Současně prokázal pozitivní účinky u různých experimentálních modelů jaterního poškození (Abdel-Kawy, 2021; Araujo Junior et al., 2016), ale jeho vliv na obrat ŽK a NASH nebyl dosud komplexně studován. Hlavním zjištěním naší studie bylo, že karvedilol může zvýšit plazmatické koncentrace ŽK u zdravých myši s intaktními játry. Příčinou zvýšeného průniku ŽK do systémové cirkulace byla posttranskripční downregulace transportérů *Ntcp* a *Bsep* a upregulace *Cyp7a1*, což vedlo ke sníženému vychytávání ŽK do jater, které bylo kompenzováno jejich zvýšenou syntézou a sníženou biliární sekrecí. Proto současně nedošlo ke změnám jaterních koncentrací a biliární sekrece ŽK. Význam tohoto zjištění spočívá v tom, že jsme poprvé představili mechanismus cholestatického poškození jater občasně popisovaného během terapie karvedilolem (Rua et al., 2019). Zvýšené systémové koncentrace ŽK mohou také vysvětlit pruritus, který se vyskytuje

u těchto nemocných. Proto lze u pacientů s poškozením jater vyvolaným karvedilolem doporučit měření plazmatických hladin ŽK.

Snížená exprese transportérů Bsep, Ntcp a Mrp4 po blokádě  $\beta$  receptorů je v souladu se snížením dispozice cAMP, tzv. druhého posla produkovaného kaskádou aktivovanou  $\beta$ -adrenoreceptory. U kontrolní skupiny léčené karvedilolem jsme zapojení této signalizace prokázali detekcí snížené exprese Epac1 proteinu, který je senzorem cAMP zajišťujícím přesun a stabilizaci těchto transportních proteinů na buněčné membráně hepatocytu v odpovídající lokalizaci (Ntcp v bazolaterální membráně a Bsep v kanalikulární membráně). Naproti tomu Mayati a kol. (Mayati et al., 2017) prezentovali *in vitro* výsledky z primárních lidských hepatocytů a diferencovaných HepaRG buněk, kde uvádějí, že aktivace  $\beta_2$ -adrenoreceptorů může potlačit expresi NTCP a BSEP na úrovni mRNA. Tento účinek jsme však u myši nepozorovali a nebyli jsme úspěšní při reprodukci represe *ABCB11* (protein BSEP) a *SLC10A1* (protein NTCP) agonistou  $\beta_2$ -adrenoreceptoru salbutamolem v buňkách HepaRG. Proto jsme konstatovali, že hlavním mechanismem zvýšených koncentrací ŽK v plazmě u kontrolních myši léčených karvedilolem je cAMP-závislá posttranskripční modulace jaterních transportérů ŽK.

Na rozdíl od kontrol, podávání karvedilolu myším s NASH nezměnilo obsah celkových ŽK v hodnocených kompartmentech, karvedilol však modifikoval složení ŽK. Zejména jsme naměřili zvýšení hydrofilních  $\alpha$ MCA v plazmě a játrech a (T)HCA ve žluči, tenkém střevě a stolici. Tyto změny jsou v souladu s aktivací syntézy  $\alpha$ MCA prostřednictvím Cyp2c70 indukovaného v játrech (de Boer et al., 2020). mRNA exprese Cyp2c70 je udržována receptorem TGR5 (Carino et al., 2021). K upregulaci Cyp2c70 karvedilolem u zvířat krmených vysokotukovou dietou však došlo posttranskripčně. Proto by měla být dále analyzována možnost přímé regulace Cyp2c70 nebo Cyp7a1  $\beta$ -adrenoreceptory. Navíc  $\alpha$ MCA nebyla detekována ve stolici, protože v játrech se přeměňuje na  $\beta$ MCA pomocí C7-epimerizace zprostředkované také Cyp2c70 anebo na HCA C6-epimerizací zprostředkovanou bakteriemi ve střevě (de Boer et al., 2020). Zvýšení (T)HCA ve žluči, tenkém střevě, stolici a snížený poměr primární/sekundární ŽK ve stolici naznačují, že karvedilol zvýšil syntézu sekundárních ŽK změnou střevního mikrobiomu.

Expanze třídy *Bacilli* kmene *Firmicutes* byla detekována ve střevním mikrobiomu u myši s inaktivovanými  $\beta_1/\beta_2$ -adrenoreceptory (Bartley et al., 2018). Kmen *Firmicutes* se velkou měrou podílí na 7 $\alpha$ -dehydroxylaci primárních ŽK a vzniku sekundárních ŽK. Většina studií uvádí zvýšený poměr *Firmicutes/Bacteroidetes* u NASH (Albhaisi, Bajaj, & Sanyal,

2020), což je v souladu s naší analýzou mikrobiomu a zvýšeným podílem sekundárních ŽK ve střevě myši s NASH. Snížením kmene *Firmicutes* posunul karvedilol u myši s NASH spektrum střevních bakterií směrem k fyziologickému stavu. Tato změna však nevedla k inhibici syntézy HCA. Důležitým důsledkem tohoto zjištění je, že akumulace HCA může vykazovat významný metabolický účinek prostřednictvím aktivace receptoru TGR5 (Zheng et al., 2021), a tím se podílet na pozitivním účinku karvedilolu u NASH.

Kromě vlivu na ŽK naše studie u myši s NASH prokázala i výrazné snížení jaterního zánětu a fibrózy. Toto zjištění dále podpořilo významné antifibrotické působení karvedilolu detekované na dalších modelech chronického poškození jater vyvolaných etanolem (Araujo Junior et al., 2016), tetrachlormethanem (Abdel-Kawy, 2021) nebo podvazem žlučového (Tian et al., 2017). Tyto účinky karvedilolu jsou připisovány inhibici produkce IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  a snížené aktivaci NF- $\kappa$ B v hepatocytech, což následně brání infiltraci neutrofilů a aktivaci Kupfferových buněk (Araujo Junior et al., 2016). V této studii jsme navíc prokázali přímou schopnost karvedilolu snížit hlavní profibrotickou jaterní Tgf- $\beta$  signalizaci prostřednictvím zabránění aktivace jaterních hvězdicových buněk (Ling et al., 2019; Meng et al., 2018). Jaterní hvězdicové buňky exprimují  $\alpha/\beta$ -adrenoreceptory a svou aktivací reagují na zvýšenou činnost sympatiku pozorovanou během NAFLD (Sigala et al., 2013). Inhibice této aktivace karvedilolem tedy může představovat jeho hlavní mechanismus zeslabení fibrózy u NASH.

V souladu s našimi zjištěními Soliman a kol (Soliman et al., 2019) nedávno prokázali, že karvedilol snižuje v játrech imunopozitivitu  $\alpha$ -aktinu hladkého svalstva (indikátor aktivace hvězdicových buněk), obsah malondialdehydu (marker oxidačního stresu) a triglyceridů u potkanů s vysokotukovou dietou. Úspěšně jsme reprodukovali redukční účinek karvedilolu na nadměrnou kumulaci triglyceridů v játrech myši s NASH. Podrobná molekulární analýza odhalila, že k tomu dochází prostřednictvím represe *Scd1*, enzymu důležitého pro syntézu mononenasyčených mastných kyselin (MUFA). Snížení aktivity *Scd1* u hlodavců, buď genetickým deficitem (Miyazaki et al., 2009) nebo léčbou inhibitorem aramcholem (Fernandez-Ramos et al., 2020), významně snížilo obsah triglyceridů v játrech (Dobrzyn et al., 2004). Zdá se, že syntéza mastných kyselin aktivovaná inzulinem se snižuje v důsledku redukce jaterních MUFA. Navíc Shi a kol. (Shi et al., 2021) pomocí agonisty  $\beta_2$  receptoru nedávno prokázali indukci steatózy jater u myši prostřednictvím aktivace lipogeneze. V tomto kontextu proto snížení kumulace tuků v játrech v důsledku blokády  $\beta$  receptorů karvedilolem představuje další příznivý mechanismus tohoto léčiva u NASH.

### **4.3 Atorvastatin moduluje homeostázu žlučových kyselin u myší s nealkoholovou steatohepatitidou indukovanou dietou**

Pozitivní účinky statinů na NASH byly již potvrzeny nejen v *in vivo*, ale i v některých klinických studiích (Athysos et al., 2017; Doumas et al., 2018; Sigler, Congdon, & Edwards, 2018). Naše zjištění mírnějšího histologického poškození jater společně se zlepšením biochemických parametrů ve skupině zvířat s NASH léčené atorvastatinem jsou v souladu s těmito údaji. Předchozí experimentální studie také prokázaly zlepšení jaterní fibrózy po podání statinu (Chong et al., 2015; Park et al., 2016), které nebylo v naší studii detekováno. V odpovídajícím modelu steatózy indukované dietou s vysokým obsahem tuků a vysokým cholesterolem však bylo nutné podávání atorvastatinu po dobu 8 týdnů. Proto předpokládáme, že 3 týdny podávání atorvastatinu v naší studii, které identifikovalo primární kroky jeho hepatoprotektivních mechanismů u NASH, bylo příliš krátké na rozvoj antifibrotického účinku.

Žádná z existujících studií dosud nepředložila komplexnější hodnocení obratu ŽK u zvířat s NASH léčených statiny. He a kol. (He et al., 2017) analyzovali pouze změny v relativním zastoupení ŽK v plazmě, kde simvastatin snížil podíly (T)CDCA, DCA a TUDCA a zvýšil procento LCA u myší s prostou steatózou jater. V naší studii jsme ukázali, že atorvastatin neovlivňuje celkovou koncentraci ŽK v plazmě myší s NASH. To koresponduje s pozorováním ve skupině nemocných s NASH léčených atorvastatinem (Puri et al., 2018). Nicméně atorvastatin snížil poměr primárních/sekundárních ŽK a poměr konjugovaných/nekonjugovaných ŽK v plazmě u myší s NASH. To bylo způsobeno zvýšenými koncentracemi relativně méně toxických (T)DCA a UDCA. Podobně atorvastatin snižoval poměr primárních/sekundárních ŽK ve žluči prostřednictvím rostoucí exkrece (T)DCA. Deoxycholová kyselina byla jediná ŽK, která byla působením atorvastatinu zvýšená ve stolici nemocných zvířat. Rovnoměrný nárůst koncentrace DCA (agonista receptoru Fxr) ve žluči a stolici byl v souladu se zvýšenou expresí cílových genů Fxr, jako jsou *Shp* a *Fgf15* v ileu a *Bsep* v játrech myší s NASH. K odhalení, zda DCA může být indikátorem působení statinu u NASH, jsou zapotřebí další studie.

Zvýšené vylučování stolicí a celkový obsah DCA ve skupině NASH s atorvastatinem jsou v souladu s dříve popsáním rostoucím relativním výskytem DCA ve slepém střevě potkanů léčených simvastatinem s jednoduchou jaterní steatózou (B. Yang et al., 2020). To naznačuje, že statiny zvyšují syntézu sekundárních ŽK modulací střevní mikroflóry. Terapie statiny skutečně snižuje bakteriální diverzitu střevní mikroflóry u obézních lidí (Khan, Ahmed, Zamzami, Siddiqui, et al., 2018) a myší (Nolan et al., 2017) a zvyšují relativní zastoupení rodů

*Bacteroides* (Kim et al., 2015), *Proteobacteria* a redukuje kmen *Firmicutes* (He et al., 2017; Khan, Ahmed, Zamzami, Mohamed, et al., 2018). Ačkoli zvýšená produkce DCA obvykle odpovídá expanzi *Firmicutes* prostřednictvím  $7\alpha/\beta$ -dehydroxylace (zejména zprostředkované *Clostridium leptum*) (Ridlon, Kang, Hylemon, & Bajaj, 2014), kmen *Bacteroides* také zprostředkuje přeměnu primárních ŽK na sekundární prostřednictvím aktivity hydrolasy žlučových solí (Sun et al., 2018). Naši hypotézu podporuje také snížený poměr konjugovaných/nekonjugovaných ŽK ve skupině zdravých myši, kterým byl podán atorvastatin. Zvýšená koncentrace DCA je také v souladu se supresí enzymů nezbytných pro kyselou cestu syntézy ŽK, zejména Cyp7b1 a Cyp2c70, což může vést k přesměrování syntézy ve prospěch  $12\alpha$ -hydroxylovaných ŽK, jakou je DCA. Podrobnosti o takové regulaci nejsou v současnosti známy, ale naše data představují komplexní účinek statinů na metabolom ŽK.

Experimentální studie analyzující mechanismy tlumení aktivity NASH statiny společně připisují jejich účinek potlačení jaterního zánětu a fibrózy (Athiros et al., 2017). Statiny snižují rekrutování a aktivaci jaterních makrofágů (Van Rooyen et al., 2013) prostřednictvím redukce molekul odvozených od mevalonátu, jako je farnesylpyrofosfát, který je nezbytný pro prenylaci malých GTPáz, jako je RhoA/Rho-kináza, Ras nebo RAC1 umožňující jejich ukotvení a aktivaci v buněčné membráně (Schierwagen et al., 2016). Další ochranné mechanismy statinů zahrnují inaktivaci kináz typu JNK (Van Rooyen et al., 2013), NgBR, ERK1/2 nebo Akt (W. Zhang et al., 2018). Potlačení aktivity makrofágů jsme potvrdili prostřednictvím sníženého zastoupení F4/80 markeru a NF- $\kappa$ B prozánětlivého transkripčního faktoru.

Prozatím nedostatečně byly prozkoumány mechanismy podílející se na redukcí jaterní steatózy působením statinů (Ji, Zhao, Leng, Liu, & Jiang, 2011), což navíc nebylo v některých studiích potvrzeno (Van Rooyen et al., 2013). Popisováno je několik možných mechanismů; statiny mohou buď obnovit peroxizomální  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin (MK) (Egawa et al., 2003) nebo zeslabit aktivovanou syntézu MK ve steatotických játrech prostřednictvím inhibice syntasy MK (Fasn) a acetyl-CoA karboxylasy (Acc) (Ji et al., 2011). Podobný mechanismus vyplývá ze snížení jaterní steatózy u *ob/ob* myši s deletovanými Rho-kinázami prostřednictvím represe Fasn a Scd1 bez vlivu na oxidaci MK. Koncept snižování syntézy MK statiny koresponduje s nálezem redukované mRNA *Scd1* v naší studii. Toto samostatné snížení mRNA *Scd1* během tří týdnů léčby atorvastatinem může naznačovat počáteční bod jeho účinku na jaterní homeostázu MK u myši s NASH. Primární účinek statinů na *Scd1* je také podpořen dříve popisovaným snížením jaterních mononenasyčených volných MK u myši krmených dietou s vysokým obsahem tuku léčených atorvastatinem (Van Rooyen et al., 2013).

Kromě pozitivních účinků atorvastatinu na játra u myši s NASH jsme také prokázali, že atorvastatin snížil plazmatické koncentrace ŽK u kontrolních myši navzdory snížení jejich biliární sekrece. To naznačuje sníženou systémovou dostupnost ŽK, která je v souladu se sníženou velikostí celkového obsahu ŽK, i když beze změny plazmatických koncentrací ŽK (Fu et al., 2014). Fu a kol. (Fu et al., 2014) předpokládali, že mechanismus redukce velikosti poolu ŽK statiny vyplývá ze snížení dispozice cholesterolu pro syntézu ŽK. Stejná studie také prokázala tendenci ke zvýšení eliminace ŽK stolicí, ale možná kvůli menším experimentálním skupinám a krátké době použité terapie se jí nepodařilo dosáhnout statistické významnosti. Expres mRNA transportérů ŽK v ileu byla také nezměněna (Fu et al., 2014). V naší studii jsme nezjistili snížený obsah cholesterolu v játrech, což souhlasí s výsledky předchozích studií s odpovídající dávkou atorvastatinu (Van Rooyen et al., 2013). Toto pozorování lze vysvětlit tím, že statiny primárně regulují hladiny LDL cholesterolu, který je ve srovnání s lidmi minoritní složkou v plazmatických lipoproteinech myši (Schonewille et al., 2016). Na rozdíl od toho jsme s použitím adekvátního množství studované populace zvířat a třítydenního podávání léčiva skutečně prokázali statisticky významné zvýšení fekálního vylučování ŽK. Exkrece ŽK stolicí se zvýšila navzdory snížené dodávce ŽK do střeva v důsledku poklesu biliární sekrece, což indikuje snížení reabsorpce ŽK ze střeva u kontrolní skupiny léčené atorvastatinem. Následná analýza Asbt, hlavního transportéru pro reabsorpci ŽK z ilea, poprvé odhalila represivní účinek atorvastatinu na jeho expresi. Toto je typický důsledek aktivované signalizace Fxr, která může být způsobena zvýšenými koncentracemi DCA a sníženým dodáváním antagonistické MCA. To podporuje i pokles exprese syntetických enzymů Cyp8b1, Cyp27a1 a Cyp2c70, který se může podílet na snížené biliární sekreci. Celkově naše zjištění naznačují schopnost statinů snižovat plazmatické koncentrace ŽK v důsledku poklesu střevní reabsorpce a jaterní syntézy.

#### **4.4 Labetalol a solubilní endoglin zhoršují retenci žlučových kyselin u myši s cholestázou indukovanou ethinylestradiolem**

V části studie relevantní k tématu disertační práce jsme se dále věnovali vlivu kombinovaných antagonistů  $\alpha_1/\beta$ -adrenergických receptorů na mechanismy tvorby žluče. Konkrétně se jednalo o léčivo labetalol, které se mimo jiné používá jako antihypertenzivum v rámci léčby preeklampsie u těhotných žen. Vzhledem ke zvýšené koincidenci preeklampsie s intrahepatální cholestázou v těhotenství (ICP) (Marathe et al., 2017; Mor et al., 2020; Raz et al., 2015) je zvýšená šance, že při této formě cholestázy bude použita antihypertenzní léčba labetalolem. Z výsledků naší studie s karvedilolem bylo zřejmé, že kombinovaná blokáda

$\alpha_1/\beta$ -adrenergických receptorů může vést ke zvýšení plazmatických hladin ŽK. Právě zvýšené plazmatické hladiny ŽK jsou hlavním patologickým faktorem vyvolávajícím poškození plodu u matek s ICP, tj labetalol sebou nese potenciální riziko dalšího zvýšení plazmatických hladin ŽK. Navíc jsou u labetalolu známy případy lékového poškození jater u těhotných žen (Firoz, Webber, & Rowe, 2015; Whelan, Izewski, Berkelhammer, Walloch, & Kay, 2020). Proto jsme hodnotili dopad léčby labetalolem na obrat ŽK u estrogenem indukované cholestázy, což je zvířecí model pro ICP. Hlavním zjištěním bylo, že labetalol zdvojnásobil plazmatické koncentrace ŽK u myši indukovaných ethinylestradiolem, které tak dosáhly průměrné koncentrace 20  $\mu\text{M}$ . Koncentrace ŽK v plazmě těhotných žen  $\geq 20 \mu\text{mol/l}$  je diagnostickým ukazatelem ICP s doporučením zahájení farmakoterapie, protože stav významně zvyšuje pravděpodobnost fetálních komplikací, jako jsou spontánní předčasné porody, asfyxické příhody a mekoniové zbarvení plodové vody, placenty a membrán (Glantz, Marschall, & Mattsson, 2004).

Během ICP a dalších cholestáz souvisejících s kumulací estrogenů jsou koncentrace ŽK v plazmě zvýšeny v důsledku jejich zhoršené biliární sekrece v návaznosti na poruchu fungování zprostředkujících transportních proteinů (Anwer, 2004; Appelman, Wettengel, Protzer, Oude Elferink, & van de Graaf, 2021; Faradonbeh et al., 2021). Tento efekt byl jasně patrný také u našich myši s aplikovaným estrogenem, kde došlo k výraznému snížení sekrece ŽK kvůli downregulaci Ntcp a Bsep transportérů. Důsledkem byl proporcionální pokles fekální exkrece ŽK. Labetalol překvapivě nemodifikoval změny indukované estrogenem ve vylučování ŽK žlučí a stolicí a ani neměnil expresi Ntcp transportéru, což naznačovalo, že zvýšené koncentrace ŽK v plazmě u této skupiny byly způsobeny zvýšeným efluxem ŽK z hepatocytů do krve. To jsme potvrdili detekcí indukovaného Mrp4, bazolaterálního transportéru zajišťujícího tuto funkci (Trauner & Boyer, 2003). V naší cholestatické skupině navíc labetalol způsobil další downregulaci Bsep, což mohlo přispívat k reverznímu transportu ŽK zpět do plazmy v důsledku jejich zvýšeného obsahu v hepatocytech. Biliární sekrece ŽK byla stále udržována alternativním kanikulárním transportérem pro žlučové kyseliny, Mrp2 (Alaei Faradonbeh et al., 2022), který nebyl labetalolem změněn. Díky těmto výsledkům můžeme říci, že hlavní mechanismus, kterým dochází ke zvýšení plazmatických ŽK během terapie labetalolem u estrogenem indukované cholestázy, je návrat ŽK z hepatocytů do krve prostřednictvím indukovaného Mrp4. Vzhledem k výrazné koincidenci preeklampsie a ICP nás uvedené výsledky vedou k doporučení, že léčba labetalolem u preeklamptických žen v sobě má

potenciál pro zhoršení již existující ICP v důsledku zvýšení plazmatických koncentrací ŽK, které je proto vhodné monitorovat a při jejich vzestupu zvolit alternativní antihypertenzivum.



## 5 Závěry

V našich studiích jsme provedli komplexní výzkum změn homeostázy ŽK na uznávaném myším modelu NASH a současně jsme popsali a vysvětlili změny navozené klinicky důležitými léčivy, která jsou pravidelně aplikována v indikacích souvisejících s metabolickým syndromem a NASH. Získané výsledky nám přinesly několik důležitých poznatků:

- NASH je spojena s výrazným narušením homeostázy ŽK, které se kumulují v organismu v závislosti na stupni jaterního zánětu a fibrózy. Kromě možnosti použít měření plazmatických koncentrací ŽK jako bioindikátoru stupně onemocnění, představuje tato kumulace i rizikový faktor progrese onemocnění. Detailní popsání zapojených mechanismů proto představuje atraktivní molekulární cíl vývoje efektivní terapie. Naše výsledky v tomto směru přinesly analýzu na úrovni jednotlivých ŽK ve všech hlavních kompartmentech regulujících jejich homeostázu a také jednotlivých enzymů a transportérů zodpovědných za tuto homeostázu. Tyto informace tak představují racionální podklad pro vývoj potenciálních terapeutik pro NASH.
- Kombinovaná blokáda adrenoreceptorů karvedilolem odhalila u kontrolních myší cholestatický potenciál látky založený na posttranskripční regulaci jaterních transportérů pro ŽK, zejména Ntcp, což poprvé odhalilo možné mechanismy cholestázy, kterou je karvedilol schopen sporadicky navodit v klinické praxi. Naopak karvedilol u myší s NASH vykazoval významné pozitivní jaterní účinky ve smyslu snížení kumulace tuků, zánětu a fibrózy. Za této situace se rozvinuly i pozitivní změny v homeostáze ŽK dané zvýšením podílu hydrofilních, méně toxických zástupců, jako MCA a HCA. Naše výsledky demonstrují významný terapeutický potenciál karvedilolu u nemocných s NASH, u kterých se používá jako součást léčebných režimů průvodních kardiovaskulárních onemocnění.
- Studie s atorvastatinem objasnila mechanismy vlivu statinů na enterohepatální cirkulaci ŽK u zdravých myší a myší s NASH. Naše výsledky prokázaly zvýšenou ztrátu ŽK stolicí, což vede ke snížené sekreci ŽK žlučí a sníženým plazmatickým koncentracím zjištěným u myší s intaktními játry. Tyto změny byly podmíněny sníženou střevní reabsorpcí ŽK v důsledku downregulace Asbt v ileu a sníženou syntézou v játrech. Atorvastatin prokázal terapeutický účinek na NASH s významným zlepšením sérové ALT, jaterní steatózy a zánětu. Poprvé jsme prokázali změny

v metabolomu ŽK zahrnující zejména větší obrat sekundární ŽK, DCA. Potenciální role DCA jako indikátoru účinku statinů na játra u NASH by měla být dále studována.

- Ve studii s labetalolem podaným myším s cholestázou vyvolanou estrogenem jsme poprvé ukázali, že labetalol zhoršuje kumulaci ŽK v plazmě prostřednictvím jejich zvýšeného přesunu z hepatocytů přes indukovaný transportér Mrp4. Naše výsledky proto naznačují důležitost sledování koncentrací ŽK v plazmě těhotných žen s preeklamsií léčenou labetalolem, aby se snížilo riziko současného rozvoje těhotenské cholestázy.

## 6 Seznam použité literatury

- Abdel-Kawy, H. S. (2021). Effect of carvedilol versus propranolol on acute and chronic liver toxicity in rats. *Drug Chem Toxicol*, 44(1), 101-111. doi:10.1080/01480545.2019.1576718
- Adorini, L., & Trauner, M. (2023). FXR agonists in NASH treatment. *J Hepatol*, 79(5), 1317-1331. doi:10.1016/j.jhep.2023.07.034
- Alaei Faradonbeh, F., Lastuvkova, H., Cermanova, J., Hroch, M., Nova, Z., Uher, M., . . . Micuda, S. (2022). Multidrug Resistance-Associated Protein 2 Deficiency Aggravates Estrogen-Induced Impairment of Bile Acid Metabolomics in Rats. *Front Physiol*, 13, 859294. doi:10.3389/fphys.2022.859294
- Albhaisi, S. A. M., Bajaj, J. S., & Sanyal, A. J. (2020). Role of gut microbiota in liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 318(1), G84-G98. doi:10.1152/ajpgi.00118.2019
- Allen, K., Jaeschke, H., & Copple, B. L. (2011). Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am J Pathol*, 178(1), 175-186. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.026
- Alnouti, Y. (2009). Bile Acid sulfation: a pathway of bile acid elimination and detoxification. *Toxicol Sci*, 108(2), 225-246. doi:10.1093/toxsci/kfn268
- Alrefai, W. A., & Gill, R. K. (2007). Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res*, 24(10), 1803-1823. doi:10.1007/s11095-007-9289-1
- Anwer, M. S. (2004). Cellular regulation of hepatic bile acid transport in health and cholestasis. *Hepatology*, 39(3), 581-590. doi:10.1002/hep.20090
- Appelman, M. D., Wettengel, J. M., Protzer, U., Oude Elferink, R. P. J., & van de Graaf, S. F. J. (2021). Molecular regulation of the hepatic bile acid uptake transporter and HBV entry receptor NTCP. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1866(8), 158960. doi:10.1016/j.bbalip.2021.158960
- Arab, J. P., Karpen, S. J., Dawson, P. A., Arrese, M., & Trauner, M. (2017). Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: Molecular insights and therapeutic perspectives. *Hepatology*, 65(1), 350-362. doi:10.1002/hep.28709
- Araujo Junior, R. F., Garcia, V. B., Leitao, R. F., Brito, G. A., Miguel Ede, C., Guedes, P. M., & de Araujo, A. A. (2016). Carvedilol Improves Inflammatory Response, Oxidative Stress and Fibrosis in the Alcohol-Induced Liver Injury in Rats by Regulating Kupffer Cells

- and Hepatic Stellate Cells. *PLoS One*, *11*(2), e0148868. doi:10.1371/journal.pone.0148868
- Arzani, G., Haeri, A., Daeihamed, M., Bakhtiari-Kaboutaraki, H., & Dadashzadeh, S. (2015). Niosomal carriers enhance oral bioavailability of carvedilol: effects of bile salt-enriched vesicles and carrier surface charge. *Int J Nanomedicine*, *10*, 4797-4813. doi:10.2147/IJN.S84703
- Athyros, V. G., Alexandrides, T. K., Bilianou, H., Cholongitas, E., Doumas, M., Ganotakis, E. S., . . . Mantzoros, C. (2017). The use of statins alone, or in combination with pioglitazone and other drugs, for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis and related cardiovascular risk. An Expert Panel Statement. *Metabolism*, *71*, 17-32. doi:10.1016/j.metabol.2017.02.014
- Athyros, V. G., Boutari, C., Stavropoulos, K., Anagnostis, P., Imprialos, K. P., Doumas, M., & Karagiannis, A. (2018). Statins: An Under-Appreciated Asset for the Prevention and the Treatment of NAFLD or NASH and the Related Cardiovascular Risk. *Curr Vasc Pharmacol*, *16*(3), 246-253. doi:10.2174/1570161115666170621082910
- Barosso, I. R., Mischczuk, G. S., Ciriaci, N., Andermatten, R. B., Maidagan, P. M., Razori, V., . . . Sanchez Pozzi, E. J. (2018). Activation of insulin-like growth factor 1 receptor participates downstream of GPR30 in estradiol-17beta-D-glucuronide-induced cholestasis in rats. *Arch Toxicol*, *92*(2), 729-744. doi:10.1007/s00204-017-2098-3
- Bartley, A., Yang, T., Arocha, R., Malphurs, W. L., Larkin, R., Magee, K. L., . . . Zubcevic, J. (2018). Increased Abundance of Lactobacillales in the Colon of Beta-Adrenergic Receptor Knock Out Mouse Is Associated With Increased Gut Bacterial Production of Short Chain Fatty Acids and Reduced IL17 Expression in Circulating CD4(+) Immune Cells. *Front Physiol*, *9*, 1593. doi:10.3389/fphys.2018.01593
- Boutari, C., Pappas, P. D., Anastasilakis, D., & Mantzoros, C. S. (2022). Statins' efficacy in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr*, *41*(10), 2195-2206. doi:10.1016/j.clnu.2022.08.001
- Boyer, J. L. (2013). Bile formation and secretion. *Compr Physiol*, *3*(3), 1035-1078. doi:10.1002/cphy.c120027
- Carino, A., Marchiano, S., Biagioli, M., Scarpelli, P., Bordoni, M., Di Giorgio, C., . . . Fiorucci, S. (2021). The bile acid activated receptors GPBAR1 and FXR exert antagonistic effects on autophagy. *FASEB J*, *35*(1), e21271. doi:10.1096/fj.202001386R
- Carlson, W., & Oberg, K. (1999). Clinical Pharmacology of Carvedilol. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, *4*(4), 205-218. doi:10.1177/107424849900400402

- Caussy, C., Hsu, C., Singh, S., Bassirian, S., Kolar, J., Faulkner, C., . . . Loomba, R. (2019). Serum bile acid patterns are associated with the presence of NAFLD in twins, and dose-dependent changes with increase in fibrosis stage in patients with biopsy-proven NAFLD. *Aliment Pharmacol Ther*, *49*(2), 183-193. doi:10.1111/apt.15035
- de Boer, J. F., Verkade, E., Mulder, N. L., de Vries, H. D., Huijkman, N., Koehorst, M., . . . Kuipers, F. (2020). A human-like bile acid pool induced by deletion of hepatic Cyp2c70 modulates effects of FXR activation in mice. *J Lipid Res*, *61*(3), 291-305. doi:10.1194/jlr.RA119000243
- Deng, F., & Bae, Y. H. (2020). Bile acid transporter-mediated oral drug delivery. *J Control Release*, *327*, 100-116. doi:10.1016/j.jconrel.2020.07.034
- Di Ciaula, A., Garruti, G., Lunardi Baccetto, R., Molina-Molina, E., Bonfrate, L., Wang, D. Q., & Portincasa, P. (2017). Bile Acid Physiology. *Ann Hepatol*, *16*(Suppl. 1: s3-105.), s4-s14. doi:10.5604/01.3001.0010.5493
- di Gregorio, M. C., Cautela, J., & Galantini, L. (2021). Physiology and Physical Chemistry of Bile Acids. *Int J Mol Sci*, *22*(4). doi:10.3390/ijms22041780
- Ding, L., Yang, L., Wang, Z., & Huang, W. (2015). Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases. *Acta Pharm Sin B*, *5*(2), 135-144. doi:10.1016/j.apsb.2015.01.004
- Dobrzyn, P., Dobrzyn, A., Miyazaki, M., Cohen, P., Asilmaz, E., Hardie, D. G., . . . Ntambi, J. M. (2004). Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(17), 6409-6414. doi:10.1073/pnas.0401627101
- Dongiovanni, P., Petta, S., Mannisto, V., Mancina, R. M., Pipitone, R., Karja, V., . . . Valenti, L. (2015). Statin use and non-alcoholic steatohepatitis in at risk individuals. *J Hepatol*, *63*(3), 705-712. doi:10.1016/j.jhep.2015.05.006
- Doumas, M., Imprialos, K., Dimakopoulou, A., Stavropoulos, K., Binas, A., & Athyros, V. G. (2018). The Role of Statins in the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Pharm Des*, *24*(38), 4587-4592. doi:10.2174/1381612825666190117114305
- Egawa, T., Toda, K., Nemoto, Y., Ono, M., Akisaw, N., Saibara, T., . . . Onishi, S. (2003). Pitavastatin ameliorates severe hepatic steatosis in aromatase-deficient (Ar<sup>-/-</sup>) mice. *Lipids*, *38*(5), 519-523. doi:10.1007/s11745-003-1093-x
- Eslami, Z., Aghili, S. S., & Ghafi, A. G. (2024). Atorvastatin on Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients. *Chonnam Med J*, *60*(1), 13-20. doi:10.4068/cmj.2024.60.1.13

- European Association for the Study of the Liver, D., Obesity. (2016). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, *64*(6), 1388-1402. doi:10.1016/j.jhep.2015.11.004
- European Association for the Study of the Liver, D., Obesity. (2024). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *J Hepatol*, *81*(3), 492-542. doi:10.1016/j.jhep.2024.04.031
- Faradonbeh, F. A., Sa, II, Lastuvkova, H., Cermanova, J., Hroch, M., Faistova, H., . . . Micuda, S. (2021). Metformin impairs bile acid homeostasis in ethinylestradiol-induced cholestasis in mice. *Chem Biol Interact*, *345*, 109525. doi:10.1016/j.cbi.2021.109525
- Fernandez-Ramos, D., Lopitz-Otsoa, F., Delacruz-Villar, L., Bilbao, J., Pagano, M., Mosca, L., . . . Mato, J. M. (2020). Arachidyl amido cholanoic acid improves liver glucose and lipid homeostasis in nonalcoholic steatohepatitis via AMPK and mTOR regulation. *World J Gastroenterol*, *26*(34), 5101-5117. doi:10.3748/wjg.v26.i34.5101
- Firoz, T., Webber, D., & Rowe, H. (2015). Drug-induced fulminant hepatic failure in pregnancy. *Obstet Med*, *8*(4), 190-192. doi:10.1177/1753495X15598909
- Fleishman, J. S., & Kumar, S. (2024). Bile acid metabolism and signaling in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*, *9*(1), 97. doi:10.1038/s41392-024-01811-6
- Francque, S. M., Marchesini, G., Kautz, A., Walmsley, M., Dorner, R., Lazarus, J. V., . . . Lionis, C. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease: A patient guideline. *JHEP Rep*, *3*(5), 100322. doi:10.1016/j.jhepr.2021.100322
- Fu, Z. D., Cui, J. Y., & Klaassen, C. D. (2014). Atorvastatin induces bile acid-synthetic enzyme Cyp7a1 by suppressing FXR signaling in both liver and intestine in mice. *J Lipid Res*, *55*(12), 2576-2586. doi:10.1194/jlr.M053124
- Glantz, A., Marschall, H. U., & Mattsson, L. A. (2004). Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates. *Hepatology*, *40*(2), 467-474. doi:10.1002/hep.20336
- Gottlieb, A., Bechmann, L., & Canbay, A. (2018). The Presence and Severity of Nonalcoholic Steatohepatitis Is Associated with Specific Changes in Circulating Bile Acids. *Ann Hepatol*, *17*(3), 340-341. doi:10.5604/01.3001.0011.7378
- Gutierrez-Cuevas, J., Santos, A., & Armendariz-Borunda, J. (2021). Pathophysiological Molecular Mechanisms of Obesity: A Link between MAFLD and NASH with Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*, *22*(21). doi:10.3390/ijms222111629

- He, X., Zheng, N., He, J., Liu, C., Feng, J., Jia, W., & Li, H. (2017). Gut Microbiota Modulation Attenuated the Hypolipidemic Effect of Simvastatin in High-Fat/Cholesterol-Diet Fed Mice. *J Proteome Res*, *16*(5), 1900-1910. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00984
- Homolya, L., Varadi, A., & Sarkadi, B. (2003). Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors*, *17*(1-4), 103-114. doi:10.1002/biof.5520170111
- Chatrath, H., Vuppalanchi, R., & Chalasani, N. (2012). Dyslipidemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*, *32*(1), 22-29. doi:10.1055/s-0032-1306423
- Cheng, Z., Chen, Y., Schnabl, B., Chu, H., & Yang, L. (2023). Bile acid and nonalcoholic steatohepatitis: Molecular insights and therapeutic targets. *J Adv Res*. doi:10.1016/j.jare.2023.06.009
- Chiang, J. Y. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res*, *50*(10), 1955-1966. doi:10.1194/jlr.R900010-JLR200
- Chiang, J. Y. (2017). Recent advances in understanding bile acid homeostasis. *F1000Res*, *6*, 2029. doi:10.12688/f1000research.12449.1
- Chiang, J. Y., & Ferrell, J. M. (2020). Bile acid receptors FXR and TGR5 signaling in fatty liver diseases and therapy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *318*(3), G554-G573. doi:10.1152/ajpgi.00223.2019
- Chong, L. W., Hsu, Y. C., Lee, T. F., Lin, Y., Chiu, Y. T., Yang, K. C., . . . Huang, Y. T. (2015). Fluvastatin attenuates hepatic steatosis-induced fibrogenesis in rats through inhibiting paracrine effect of hepatocyte on hepatic stellate cells. *BMC Gastroenterol*, *15*, 22. doi:10.1186/s12876-015-0248-8
- Choudhuri, S., & Klaassen, C. D. (2022). Molecular Regulation of Bile Acid Homeostasis. *Drug Metab Dispos*, *50*(4), 425-455. doi:10.1124/dmd.121.000643
- Ji, G., Zhao, X., Leng, L., Liu, P., & Jiang, Z. (2011). Comparison of dietary control and atorvastatin on high fat diet induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in rats. *Lipids Health Dis*, *10*, 23. doi:10.1186/1476-511X-10-23
- Kalhan, S. C., Guo, L., Edmison, J., Dasarathy, S., McCullough, A. J., Hanson, R. W., & Milburn, M. (2011). Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, *60*(3), 404-413. doi:10.1016/j.metabol.2010.03.006
- Kalliokoski, A., & Niemi, M. (2009). Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol*, *158*(3), 693-705. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00430.x

- Khan, T. J., Ahmed, Y. M., Zamzami, M. A., Mohamed, S. A., Khan, I., Baothman, O. A. S., . . . Yasir, M. (2018). Effect of atorvastatin on the gut microbiota of high fat diet-induced hypercholesterolemic rats. *Sci Rep*, 8(1), 662. doi:10.1038/s41598-017-19013-2
- Khan, T. J., Ahmed, Y. M., Zamzami, M. A., Siddiqui, A. M., Khan, I., Baothman, O. A. S., . . . Yasir, M. (2018). Atorvastatin Treatment Modulates the Gut Microbiota of the Hypercholesterolemic Patients. *OMICS*, 22(2), 154-163. doi:10.1089/omi.2017.0130
- Kim, B. H., Han, S., Lee, H., Park, C. H., Chung, Y. M., Shin, K., . . . Ye, S. K. (2015). Metformin enhances the anti-adipogenic effects of atorvastatin via modulation of STAT3 and TGF-beta/Smad3 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 456(1), 173-178. doi:10.1016/j.bbrc.2014.11.054
- Kis, E., Ioja, E., Rajnai, Z., Jani, M., Mehn, D., Heredi-Szabo, K., & Krajcsi, P. (2012). BSEP inhibition: in vitro screens to assess cholestatic potential of drugs. *Toxicol In Vitro*, 26(8), 1294-1299. doi:10.1016/j.tiv.2011.11.002
- Kubitz, R., Droge, C., Stindt, J., Weissenberger, K., & Haussinger, D. (2012). The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 36(6), 536-553. doi:10.1016/j.clinre.2012.06.006
- Lastuvkova, H., Faradonbeh, F. A., Schreiberova, J., Hroch, M., Mokry, J., Faistova, H., . . . Micuda, S. (2021). Atorvastatin Modulates Bile Acid Homeostasis in Mice with Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis. *Int J Mol Sci*, 22(12). doi:10.3390/ijms22126468
- Li, T., & Chiang, J. Y. (2009). Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. *PPAR Res*, 2009, 501739. doi:10.1155/2009/501739
- Li, T., & Chiang, J. Y. (2014). Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacol Rev*, 66(4), 948-983. doi:10.1124/pr.113.008201
- Li, T., & Chiang, J. Y. L. (2020). Bile Acid Metabolism in Health and Disease. In *The Liver* (pp. 269-285).
- Li, X., Yuan, Z., Liu, R., Hassan, H. M., Yang, H., Sun, R., . . . Jiang, Z. (2016). UDCA and CDCA alleviate 17alpha-ethinylestradiol-induced cholestasis through PKA-AMPK pathways in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 311, 12-25. doi:10.1016/j.taap.2016.10.011
- Ling, L., Li, G., Wang, G., Meng, D., Li, Z., & Zhang, C. (2019). Carvedilol improves liver cirrhosis in rats by inhibiting hepatic stellate cell activation, proliferation, invasion and collagen synthesis. *Mol Med Rep*, 20(2), 1605-1612. doi:10.3892/mmr.2019.10401
- Malhotra, H. S., & Goa, K. L. (2001). Atorvastatin. *Drugs*, 61(12), 1835-1881. doi:10.2165/00003495-200161120-00012



- Marathe, J. A., Lim, W. H., Metz, M. P., Scheil, W., Dekker, G. A., & Hague, W. M. (2017). A retrospective cohort review of intrahepatic cholestasis of pregnancy in a South Australian population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, *218*, 33-38. doi:10.1016/j.ejogrb.2017.09.012
- Mayati, A., Moreau, A., Denizot, C., Stieger, B., Parmentier, Y., & Fardel, O. (2017). beta2-adrenergic receptor-mediated in vitro regulation of human hepatic drug transporter expression by epinephrine. *Eur J Pharm Sci*, *106*, 302-312. doi:10.1016/j.ejps.2017.06.010
- Meng, D., Li, Z., Wang, G., Ling, L., Wu, Y., & Zhang, C. (2018). Carvedilol attenuates liver fibrosis by suppressing autophagy and promoting apoptosis in hepatic stellate cells. *Biomed Pharmacother*, *108*, 1617-1627. doi:10.1016/j.biopha.2018.10.005
- Misra, S., Varticovski, L., & Arias, I. M. (2003). Mechanisms by which cAMP increases bile acid secretion in rat liver and canalicular membrane vesicles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *285*(2), G316-324. doi:10.1152/ajpgi.00048.2003
- Miyazaki, M., Sampath, H., Liu, X., Flowers, M. T., Chu, K., Dobrzyn, A., & Ntambi, J. M. (2009). Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency attenuates obesity and insulin resistance in leptin-resistant obese mice. *Biochem Biophys Res Commun*, *380*(4), 818-822. doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.183
- Monteiro-Cardoso, V. F., Corliano, M., & Singaraja, R. R. (2021). Bile Acids: A Communication Channel in the Gut-Brain Axis. *Neuromolecular Med*, *23*(1), 99-117. doi:10.1007/s12017-020-08625-z
- Mor, M., Shmueli, A., Krispin, E., Bardin, R., Sneh-Arbib, O., Braun, M., . . . Hadar, E. (2020). Intrahepatic cholestasis of pregnancy as a risk factor for preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet*, *301*(3), 655-664. doi:10.1007/s00404-020-05456-y
- Mouzaki, M., Wang, A. Y., Bandsma, R., Comelli, E. M., Arendt, B. M., Zhang, L., . . . Allard, J. P. (2016). Bile Acids and Dysbiosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One*, *11*(5), e0151829. doi:10.1371/journal.pone.0151829
- Mukhopadhyay, S., Ananthanarayanan, M., Stieger, B., Meier, P. J., Suchy, F. J., & Anwer, M. S. (1997). cAMP increases liver Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransport by translocating transporter to plasma membranes. *Am J Physiol*, *273*(4), G842-848. doi:10.1152/ajpgi.1997.273.4.G842
- Nimer, N., Choucair, I., Wang, Z., Nemet, I., Li, L., Gukasyan, J., . . . Hazen, S. L. (2021). Bile acids profile, histopathological indices and genetic variants for non-alcoholic fatty liver disease progression. *Metabolism*, *116*, 154457. doi:10.1016/j.metabol.2020.154457

- Nolan, J. A., Skuse, P., Govindarajan, K., Patterson, E., Konstantinidou, N., Casey, P. G., . . . Gahan, C. G. M. (2017). The influence of rosuvastatin on the gastrointestinal microbiota and host gene expression profiles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *312*(5), G488-G497. doi:10.1152/ajpgi.00149.2016
- Obaidat, A., Roth, M., & Hagenbuch, B. (2012). The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *52*, 135-151. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010510-100556
- Park, H. S., Jang, J. E., Ko, M. S., Woo, S. H., Kim, B. J., Kim, H. S., . . . Lee, K. U. (2016). Statins Increase Mitochondrial and Peroxisomal Fatty Acid Oxidation in the Liver and Prevent Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mice. *Diabetes Metab J*, *40*(5), 376-385. doi:10.4093/dmj.2016.40.5.376
- Parseus, A., Sommer, N., Sommer, F., Caesar, R., Molinaro, A., Stahlman, M., . . . Backhed, F. (2017). Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut*, *66*(3), 429-437. doi:10.1136/gutjnl-2015-310283
- Puri, P., Daita, K., Joyce, A., Mirshahi, F., Santhekadur, P. K., Cazanave, S., . . . Sanyal, A. J. (2018). The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology*, *67*(2), 534-548. doi:10.1002/hep.29359
- Raz, Y., Lavie, A., Vered, Y., Goldiner, I., Skornick-Rapaport, A., Landsberg Asher, Y., . . . Rimon, E. (2015). Severe intrahepatic cholestasis of pregnancy is a risk factor for preeclampsia in singleton and twin pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, *213*(3), 395 e391-398. doi:10.1016/j.ajog.2015.05.011
- Reich, M., Deutschmann, K., Sommerfeld, A., Klindt, C., Kluge, S., Kubitz, R., . . . Keitel, V. (2016). TGR5 is essential for bile acid-dependent cholangiocyte proliferation in vivo and in vitro. *Gut*, *65*(3), 487-501. doi:10.1136/gutjnl-2015-309458
- Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B., & Bajaj, J. S. (2014). Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol*, *30*(3), 332-338. doi:10.1097/MOG.0000000000000057
- Rolo, A. P., Oliveira, P. J., Moreno, A. J., & Palmeira, C. M. (2003). Chenodeoxycholate induction of mitochondrial permeability transition pore is associated with increased membrane fluidity and cytochrome c release: protective role of carvedilol. *Mitochondrion*, *2*(4), 305-311. doi:10.1016/S1567-7249(03)00007-2

- Rua, J., Prata, A. R., Marques, R., Silva, R., Gomes, B., Fraga, J., & Fortuna, J. (2019). Carvedilol-Induced Liver Injury, a Rare Cause of Mixed Hepatitis: A Clinical Case. *GE Port J Gastroenterol*, *26*(3), 196-201. doi:10.1159/000490205
- Sayin, S. I., Wahlstrom, A., Felin, J., Jantti, S., Marschall, H. U., Bamberg, K., . . . Backhed, F. (2013). Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab*, *17*(2), 225-235. doi:10.1016/j.cmet.2013.01.003
- Shi, Y., Pizzini, J., Wang, H., Das, F., Abdul Azees, P. A., Ghosh Choudhury, G., . . . Kamat, A. (2021). beta(2)-Adrenergic receptor agonist induced hepatic steatosis in mice: modeling nonalcoholic fatty liver disease in hyperadrenergic states. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *321*(1), E90-E104. doi:10.1152/ajpendo.00651.2020
- Schierwagen, R., Maybuchen, L., Hittatiya, K., Klein, S., Uschner, F. E., Braga, T. T., . . . Trebicka, J. (2016). Statins improve NASH via inhibition of RhoA and Ras. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *311*(4), G724-G733. doi:10.1152/ajpgi.00063.2016
- Schonewille, M., de Boer, J. F., Mele, L., Wolters, H., Bloks, V. W., Wolters, J. C., . . . Groen, A. K. (2016). Statins increase hepatic cholesterol synthesis and stimulate fecal cholesterol elimination in mice. *J Lipid Res*, *57*(8), 1455-1464. doi:10.1194/jlr.M067488
- Sigala, B., McKee, C., Soeda, J., Paziienza, V., Morgan, M., Lin, C. I., . . . Oben, J. A. (2013). Sympathetic nervous system catecholamines and neuropeptide Y neurotransmitters are upregulated in human NAFLD and modulate the fibrogenic function of hepatic stellate cells. *PLoS One*, *8*(9), e72928. doi:10.1371/journal.pone.0072928
- Sigler, M. A., Congdon, L., & Edwards, K. L. (2018). An Evidence-Based Review of Statin Use in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Med Insights Gastroenterol*, *11*, 1179552218787502. doi:10.1177/1179552218787502
- Sinal, C. J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J. M., Lambert, G., & Gonzalez, F. J. (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell*, *102*(6), 731-744. doi:10.1016/s0092-8674(00)00062-3
- Soliman, G. F., Rashed, L. A., Morsi, H., Ibrahim, W., Abdallah, H., Bastawy, N., & Abdel Maksoud, O. M. (2019). Interrelation of liver vascularity to non-alcoholic fatty liver through a comparative study of the vasodilator effect of carvedilol or nicorandil in rats. *Life Sci*, *222*, 175-182. doi:10.1016/j.lfs.2019.02.057

- Stieger, B. (2011). The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb Exp Pharmacol*(201), 205-259. doi:10.1007/978-3-642-14541-4\_5
- Suga, T., Yamaguchi, H., Ogura, J., Shoji, S., Maekawa, M., & Mano, N. (2019). Altered bile acid composition and disposition in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 379, 114664. doi:10.1016/j.taap.2019.114664
- Sun, L., Xie, C., Wang, G., Wu, Y., Wu, Q., Wang, X., . . . Jiang, C. (2018). Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat Med*, 24(12), 1919-1929. doi:10.1038/s41591-018-0222-4
- Tian, X., Zhao, C., Guo, J., Xie, S., Yin, F., Huo, X., & Zhang, X. (2017). Carvedilol Attenuates the Progression of Hepatic Fibrosis Induced by Bile Duct Ligation. *Biomed Res Int*, 2017, 4612769. doi:10.1155/2017/4612769
- Trauner, M., & Boyer, J. L. (2003). Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev*, 83(2), 633-671. doi:10.1152/physrev.00027.2002
- Tripathi, D., Therapondos, G., Lui, H. F., Stanley, A. J., & Hayes, P. C. (2002). Haemodynamic effects of acute and chronic administration of low-dose carvedilol, a vasodilating beta-blocker, in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Aliment Pharmacol Ther*; 16(3), 373-380. doi:10.1046/j.1365-2036.2002.01190.x
- Van Rooyen, D. M., Gan, L. T., Yeh, M. M., Haigh, W. G., Larter, C. Z., Ioannou, G., . . . Farrell, G. C. (2013). Pharmacological cholesterol lowering reverses fibrotic NASH in obese, diabetic mice with metabolic syndrome. *J Hepatol*, 59(1), 144-152. doi:10.1016/j.jhep.2013.02.024
- Vitale, G., Mattiaccio, A., Conti, A., Berardi, S., Vero, V., Turco, L., . . . Morelli, M. C. (2023). Molecular and Clinical Links between Drug-Induced Cholestasis and Familial Intrahepatic Cholestasis. *Int J Mol Sci*, 24(6). doi:10.3390/ijms24065823
- Wang, Y., Xu, H., Zhou, X., Chen, W., & Zhou, H. (2024). Dysregulated bile acid homeostasis: unveiling its role in metabolic diseases. *Med Rev (2021)*, 4(4), 262-283. doi:10.1515/mr-2024-0020
- Whelan, A., Izewski, J., Berkelhammer, C., Walloch, J., & Kay, H. H. (2020). Labetalol-Induced Hepatotoxicity during Pregnancy: A Case Report. *AJP Rep*, 10(3), e210-e212. doi:10.1055/s-0040-1713789
- Xiao, L., & Pan, G. (2017). 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*, 41(5), 509-515. doi:10.1016/j.clinre.2017.02.001
- Yamauchi, R., Takedatsu, H., Yokoyama, K., Yamauchi, E., Kawashima, M., Nagata, T., . . . Hirai, F. (2021). Elobixibat, an ileal bile acid transporter inhibitor, ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatol Int*, 15(2), 392-404. doi:10.1007/s12072-020-10107-0
- Yang, B., Xuan, S., Ruan, Q., Jiang, S., Cui, H., Zhu, L., . . . Zhao, Z. (2020). UPLC/Q-TOF-MS/MS-based metabolomics revealed the lipid-lowering effect of *Ilicis Rotundae* Cortex on high-fat diet induced hyperlipidemia rats. *J Ethnopharmacol*, 256, 112784. doi:10.1016/j.jep.2020.112784
- Yang, N., Dong, Y. Q., Jia, G. X., Fan, S. M., Li, S. Z., Yang, S. S., & Li, Y. B. (2020). ASBT(SLC10A2): A promising target for treatment of diseases and drug discovery. *Biomed Pharmacother*, 132, 110835. doi:10.1016/j.biopha.2020.110835
- Younossi, Z. M., Golabi, P., Paik, J. M., Henry, A., Van Dongen, C., & Henry, L. (2023). The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology*, 77(4), 1335-1347. doi:10.1097/HEP.0000000000000004
- Zacharias, A. P., Jeyaraj, R., Hobolth, L., Bendtsen, F., Gluud, L. L., & Morgan, M. Y. (2018). Carvedilol versus traditional, non-selective beta-blockers for adults with cirrhosis and gastroesophageal varices. *Cochrane Database Syst Rev*, 10(10), CD011510. doi:10.1002/14651858.CD011510.pub2
- Zhang, S., Ren, X., Zhang, B., Lan, T., & Liu, B. (2024). A Systematic Review of Statins for the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis: Safety, Efficacy, and Mechanism of Action. *Molecules*, 29(8). doi:10.3390/molecules29081859
- Zhang, W., Yang, X., Chen, Y., Hu, W., Liu, L., Zhang, X., . . . Duan, Y. (2018). Activation of hepatic Nogo-B receptor expression-A new anti-liver steatosis mechanism of statins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1863(2), 177-190. doi:10.1016/j.bbalip.2017.12.002
- Zhang, Y., & Edwards, P. A. (2008). FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett*, 582(1), 10-18. doi:10.1016/j.febslet.2007.11.015
- Zheng, X., Chen, T., Jiang, R., Zhao, A., Wu, Q., Kuang, J., . . . Jia, W. (2021). Hyocholic acid species improve glucose homeostasis through a distinct TGR5 and FXR signaling mechanism. *Cell Metab*, 33(4), 791-803 e797. doi:10.1016/j.cmet.2020.11.017

Zucchetti, A. E., Barosso, I. R., Boaglio, A. C., Luquita, M. G., Roma, M. G., Crocenzi, F. A., & Sanchez Pozzi, E. J. (2013). Hormonal modulation of hepatic cAMP prevents estradiol 17beta-D-glucuronide-induced cholestasis in perfused rat liver. *Dig Dis Sci*, 58(6), 1602-1614. doi:10.1007/s10620-013-2558-4

## **7 Přílohy**

### **Komentované publikace**

## **7.1 Příloha – publikace č. 1**

*Lastuvkova H, Nova Z, Hroch M, Alaei Faradonbeh F, Schreiberova J, Mokry J, Faistova H, Stefela A, Dusek J, Kucera O, Hyspler R, Dohnalkova E, Bayer RL, Hirsova P, Pavek P, Micuda S. Carvedilol impairs bile acid homeostasis in mice: implication for nonalcoholic steatohepatitis. Toxicol Sci. 2023 Aug 26:kfad088 (IF = 3.8; Q1/AIS). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfad088>*



## 7.2 Příloha – publikace č. 2

**Lastuvkova H**, Faradonbeh FA, Schreiberova J, Hroch M, Mokry J, Faistova H, Nova Z, Hyspler R, Igreja Sa IC, Nachtigal P, Stefela A, Pavek P, Micuda S. Atorvastatin Modulates Bile Acid Homeostasis in Mice with Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 16;22(12):6468. (IF = 5,924; Q2/AIS). <https://doi.org/10.3390/ijms22126468>

### 7.3 Příloha – publikace č. 3

*Cristina Igreja Sá I, Tripska K, Alaei Faradonbeh F, Hroch M, **Lastuvkova H**, Schreiberova J, Kacerovsky M, Pericacho M, Nachtigal P, Micuda S. Labetalol and soluble endoglin aggravate bile acid retention in mice with ethinylestradiol-induced cholestasis. Front Pharmacol. 2023 Jan 26;14:1116422 (IF = 5.6; Q1/AIS). <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1116422>*