

[Výzkumné projekty](#) [Publikace](#) [Personální obsazení](#)

[Vybavení a metody](#) [Spolupráce](#) [Granty](#)

Výzkumná práce skupiny se zaměřuje na hodnocení jaterních účinků a kinetiky žlučových kyselin, cholesterolu a xenobiotik včetně stávajících nebo potenciálních léčiv. Pozornost je soustředěna na enzymové a transportní kaskády zodpovědné za produkci a sekreci žluče a na jejich regulační mechanismy, především nukleární receptory FXR, PXR a CAR.

Tvorba žluče je základní funkcí jater a při jejím narušení během jaterních a systémových onemocnění dochází k cholestáze, která je spojena s hromaděním toxických produktů metabolismu a xenobiotik s následnou akcelerací jaterní patologie s možností rozvoje zánětu, fibrózy a přechodu do cirhózy i vzniku hepatocelárního karcinomu. Kromě primárně cholestatických onemocnění typu primární biliární cholangitidy (PBC) a primární sklerotizující cholangitidy (PSC), vzniká porucha tvorby žluče především během aktivace zánětlivých dějů v játrech, či vlivem cholestatických látek včetně léčiv. Význam výzkumu v dané oblasti je akcentován stoupající incidencí jaterních onemocnění spojených s cholestázou, především těch, charakterizovaných kombinací zánětu a ztukovatění jater (NASH, nealkoholová steatohepatitida) v rámci obrazu metabolického syndromu, onemocnění postihujícího velkou část populace. Proto je v současnosti věnována nemalá pozornost komerční i akademické sféry na hledání vhodných látek, které by mohly zamezit rozvoji cholestázy a pozitivně modulovat vyvolávající patologii. Takováto účinná terapie prozatím neexistuje a jediným řešením zůstává v mnoha případech transplantace jater. I proto je nezbytně nutné hodnotit všechna léčiva už během vývoje, aby negativně neovlivňovala mechanismy tvorby žluče a asociovanou integritu membrán.

Výzkum v posledním desetiletí ukázal, že v oblasti léčiv s možným příznivým účinkem na cholestatické mechanismy během různých jaterních patologií jsou to především látky ovlivňující nukleární receptory FXR (farnesoidní X receptor), PXR (pregnanový X receptor) a CAR (konstitutivní androstanový receptor). Tyto receptory jsou klíčové faktory regulace homeostázy lipidů a žlučových kyselin i adaptace jater na patologické změny. Cílem skupiny je proto výzkum látek schopných selektivní stimulace těchto receptorů ať už na bázi syntetické, tak i přírodní. Jejich účinek je následně ověřován v sérii in vitro i in vivo experimentů. Potenciální benefit těchto látek u cholestatických jaterních patologií je rovněž testován na relevantních myších a potkaních in vivo modelech NASH a intrahepatální cholestázy. Výsledky jsou porovnávány se stávajícími terapeutickými možnostmi, což umožní kvalifikovanou predikci možných přínosů pro další využití těchto látek. Sekundárním cílem je rovněž výzkum látek, které jsou již v běžném klinickém použití, ale v jiných terapeutických indikacích, což by v případě úspěchu mohlo výrazně urychlit jejich implementaci do stávajících terapeutických schémata a zvýšit zájem aplikační sféry.

S ohledem na předmět výzkumu jsou proto používané metody zaměřené na in vivo hodnocení stavu jater (biochemické, histologické, ELISA), sekreci látek do žluče (LC-MS a další analytické metody, ELISA), expresi enzymů, transportérů a regulujících kaskád (RT-PCR, Western blot, imunohistochemie), v kombinaci s detekcí mechanismů regulace (cellulární studie s transfekcí genů, miRNA, selektivními agonisty nebo antagonisty v kombinaci s RT-PCR a Western blotem).

Výzkumné projekty

Experimentální terapie Nealkoholové steatohepatitidy a Intrahepatální cholestázy v těhotenství

Nealkoholová steatohepatitida (NASH) je časté onemocnění doprovázené řadou metabolických a kardiovaskulárních rizik. Intrahepatální cholestáza (ICP) je nejčastější onemocnění jater během těhotenství. Recentní práce demonstrují, že se v patofyziologii obou klinických situací se významně uplatňují modifikace homeostázy žlučových kyselin a jejich žlučové sekrece. Proto je u všech léčiv používaných u NASH, ICP nebo v léčbě průvodních rizik důležitá znalost jejich vlivu na dané mechanismy. Primárním cílem této části je proto detailně studovat vliv látek často používaných v léčbě kardiovaskulárních a metabolických rizik u onemocnění doprovázejících NASH a ICP na mechanismy tvorby žluče a homeostázu žlučových kyselin na relevantních zvířacích. Tato léčiva vykazují potenciál pro příznivé změny v procesech tvorby žluče, nicméně konkrétní informace v literatuře scházejí. Změny detekované na úrovni exprese zapojených enzymů, transportérů a nukleárních receptorů v játrech a ileu jsou proto korelovány s hladinami jednotlivých žlučových kyselin a dalších endobiotik v plazmě a žluči, a současně s histopatologickými změnami v játrech s cílem odhalit vzájemné patofyziologické vazby. Neméně důležité je popsání účinku plánovaných léčiv na zmíněné vazby u zdravých zvířat, jelikož daná léčiva jsou klinicky často používána i v situacích bez přítomnosti NASH nebo ICP.

Jaterní účinky aktivace nukleárních receptorů PXR, FXR a CAR

Pregnanový X receptor (PXR) a Konstitutivní androstanový receptor (CAR) mají hlavní funkci v regulaci exprese enzymů a transportních proteinů zásadních pro metabolismus, distribuci a exkreci léčiv. Jejich stimulací jsou mimo

jiné zprostředkovány lékové interakce založené na indukci metabolismu a exkrece. Farnesoidní X receptor (FXR) má centrální roli v regulaci syntézy a transportu žlučových kyselin. Jeho hlavní rolí je ochrana hepatocytů před toxickým vlivem kumulujících se žlučových kyselin během cholestatických onemocnění. Receptor je aktivován žlučovými kyselinami, což vede k supresi jaterní exprese enzymů zodpovědných za jejich syntézu z cholesterolu (např. CYP7A1, CYP8B1, nebo CYP27A1) a současně je indukována exprese transportních proteinů zprostředkujících exkreci žlučových kyselin z hepatocytů na apikální (BSEP) i bazolaterální membráně (MRP4, OSTalpha/beta). Kromě těchto účinků však PXR, FXR i CAR receptor vykazují při stimulaci řadu účinků na intermediární metabolismus např. sacharidů, lipidů, nebo cholesterolu, což prokázalo pozitivní účinky nejenom u cholestatických onemocnění, ale i u regenerace jater nebo NASH. Cílem této části výzkumu skupiny je proto hodnotit vliv aktivace zkoumaných nukleárních receptorů během různých fyziologických a patologických situací.

Tato část je řešena v úzké spolupráci se skupinou prof. PharmDr. Petra Pávka, Ph.D. z Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Farmakokinetika léčiv v preklinických studiích

Znalost farmakokinetických charakteristik studovaných léčiv, tj. absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece, je základním předpokladem úspěšné farmakoterapie při minimu nežádoucích účinků a lékových interakcí. Naše skupina se proto dlouhodobě věnuje hodnocení kinetických parametrů (clearance, biliární a močová exkrece, distribuční objem, biologický poločas eliminace a biologická dostupnost) u stávajících nebo nově vyvíjených léčiv. Základem je použití vhodných in vivo a in vitro modelů ve spojení s pokročilými analytickými a matematickými metodami.

Publikace z posledních let

- Alaei Faradonbeh F, Lastuvkova H, Cermanova J, Hroch M, Nova Z, Uher M, Hirsova P, Pavek P, Micuda S. Multidrug Resistance-Associated Protein 2 Deficiency Aggravates Estrogen-Induced Impairment of Bile Acid Metabolism in Rats. *Front Physiol.* 2022 Mar 21;13:859294. IF = 4,3; Q1 dle AIS
- Skoda J, Dohnalova K, Chalupsky K, Stahl A, Templin M, Maixnerova J, Micuda S, Grøntved L, Braeuning A, Pavek P. Off-target lipid metabolism disruption by the mouse constitutive androstane receptor ligand TCPOBOP in humanized mice. *Biochem Pharmacol.* 2021 Dec 28;197:114905. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114905. IF = 5,858; Q1; AIS 1,144
- Faradonbeh FA, Sa II, Lastuvkova H, Cermanova J, Hroch M, Faistova H, Mokry J, Nova Z, Uher M, Nachtigal P, Pavek P, Micuda S. Metformin impairs bile acid homeostasis in ethinylestradiol-induced cholestasis in mice. *Chem Biol Interact.* 2021 May 28;109525. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109525. IF = 5,192; Q2; AIS 0,728
- 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 1,123
- Vicen M, Igreja Sá IC, Tripská K, Vitverová B, Najmanová I, Eissazadeh S, Micuda S, Nachtigal P. Membrane and soluble endoglin role in cardiovascular and metabolic disorders related to metabolic syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 2021 Mar;78(6):2405-2418. IF = 9,261; Q1; AIS 2,226
- Stefela A, Kaspar M, Drastik M, Kronenberger T, Micuda S, Dracinsky M, Klepetarova B, Kudova E, Pavek P. (E)-7-Ethylidene-lithocholic Acid (7-ELCA) Is a Potent Dual Farnesoid X Receptor (FXR) Antagonist and GPBAR1 Agonist Inhibiting FXR-Induced Gene Expression in Hepatocytes and Stimulating Glucagon-like Peptide-1 Secretion From Enterendocrine Cells. *Front Pharmacol.* 2021 Aug 13;12:713149. IF = 5,811; Q1; AIS 1,139
- Igreja Sá IC, Tripska K, Hroch M, Hyspler R, Ticha A, Lastuvkova H, Schreiberova J, Dolezelova E, Eissazadeh S, Vitverova B, Najmanova I, Vasinova M, Pericacho M, Micuda S, Nachtigal P. Soluble Endoglin as a Potential Biomarker of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Development, Participating in Aggravation of NASH-Related Changes in Mouse Liver. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 27;21(23):9021. IF = 5,923; Q1; AIS 1,123
- Smutny T, Dusek J, Hyrsova L, Nekvindova J, Horvatova A, Micuda S, Gerbal-Chaloin S, Pavek P. The 3'-untranslated region contributes to the pregnane X receptor (PXR) expression down-regulation by PXR ligands and up-regulation by glucocorticoids. *Acta Pharm Sin B.* 2020 Jan;10(1):136-152. doi: 10.1016/j.apsb.2019.09.010. IF 6,150; Q1; AIS 1,090
- Skoda J, Dusek J, Drastik M, Stefela A, Dohnalova K, Chalupsky K, Smutny T, Micuda S, Gerbal-Chaloin S, Pavek P. Diazepam Promotes Translocation of Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) via Direct Interaction with the Ligand-Binding Domain. *Cells.* 2020 Nov 24;9(12):2532. IF = 6,600; Q2; AIS 1,282
- Stefela A, Kaspar M, Drastik M, Holas O, Hroch M, Smutny T, Skoda J, Hutníková M, Pandey AV, Micuda S, Kudova E, Pavek P. 3?-Isoobetic acid efficiently activates the farnesoid X receptor (FXR) due to its epimerization to 3?-epimer by hepatic metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2020 Jun 4:105702. IF = 4,292; Q2; AIS 0,905
- Igreja Sá IC, Tripska K, Hroch M, Hyspler R, Ticha A, Lastuvkova H, Schreiberova J, Dolezelova E, Eissazadeh S, Vitverova B, Najmanova I, Vasinova M, Pericacho M, Micuda S, Nachtigal P. Soluble Endoglin as a Potential Biomarker of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Development, Participating in Aggravation of NASH-Related Changes in Mouse Liver. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 27;21(23):9021. IF = 5,923; Q1/2; AIS 1,123

Personální obsazení

Vedoucí skupiny

prof. MUDr. Stanislav Mičuda, Ph.D.

Odborná asistentka

MUDr. Jolana Schreiberová, Ph.D.

Ph.D. studenti

Ing. Hana Laštůvková

Laborantky

Bc. Kristýna Trubačová

Vybavení a metody

Laboratoře skupiny LivPharm na Ústavu farmakologie LF HK jsou dobře vybaveny tak, aby umožňovaly in vivo a in vitro studie kinetiky a dynamiky léčiv spolu s podrobnou analýzou získaných vzorků běžnými analytickými, biochemickými a molekulárně biologickými metodami.

Vybavení

- Quant Studio-7 qPCR (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) for qRT-PCR nucleic acid analyses;
- Simple WES automatic analyser and/or Bio-Rad electrophoretic and transblot units together with chemiluminiscent analyser Fusion Solo S (Vilber, France) for Western blot protein analysis;
- Agilent 1260 Infinity II HPLC system (Palo Alto, CA, USA);
- IVIS Spectrum (Perkin Elmer) in vivo imaging system, Vetscan II biochemical analyser, inhalation anesthesia, syringe pumps, heated platforms and temperature controls for in vivo experiments;
- Spark microplate reader with CO2 module (Tecan, Grödig, Austria) for biochemical and in vitro cellular analyses;
- Microscope BX51 (Olympus) with imageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsweb.nih.gov/ij/>) and NIS software analysis (Laboratory Imaging, Czech Republic) for histological evaluation.
- Standard hematological and biochemical analyses of blood and serum samples from rats are performed by routine methods in Central laboratories of University Hospital using Sysmex XE-2100 analyzer (Sysmex, Kobe, Japan) and Modular PP analyzer (Roche, Basel, Switzerland), respectively.
- LC-MS analyses are performed at cooperating Department of Biochemistry on a HPLC system Dionex Ultimate 3000 (Dionex Softron GmbH, Germany) and a triple quadrupole mass spectrometer TSQ Quantum Access Max with H-ESI II probe (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)

Metody

- Studie na zvířatech. Kinetika endogenních nebo exogenních látek se analyzuje na potkanech nebo myších odběrem vzorků krve, žluči, moči a stolice a odběrem tkání v příslušných časových bodech. Všem zvířatům byla poskytnuta humánní péče v souladu se směrnicemi stanovenými institucionální komisí pro použití a péči o zvířata LF HK. Protokoly pokusů jsou diskutovány a schvalovány stejnou komisí.
- Pro studium poškození jater analyzujeme příslušné bioindikátory v plazmě, provádíme histologické a imunohistologické barvení jater, zjišťujeme koncentrace redukováného a oxidovaného glutathionu, cholesterolu a žlučových kyselin v játrech. Koncentrace BA v plazmě, žluči a stolici se měří metodou LC-MS.
- Na základě studie analyzujeme 30-50 genů (pomocí qRT-PCR) a proteinů (pomocí Western blotu), abychom odhalili změny enzymů, transportérů a jejich regulátorů uplatňujících se v lipidomice a produkci žluči.
- Experiment in vitro provádíme na buňkách HepaRG a HepG2.

Spolupráce

- **Assoc. prof. Otta Kučera, M.D. Ph.D., Prof. Zuzana Červinková, M.D., Ph.D., Prof. Milan Holecek, M.D., Ph.D.**, Department of Physiology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Simkova 870, Hradec Kralove 50003, Czech Republic
- **Prof. Jaroslav Mokry, M.D. Ph.D.**, Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Simkova 870, Hradec Kralove 50003, Czech Republic
- **Assoc. Prof. Marian Kacerovsky, M.D., Ph.D.**, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, Hradec Kralove 50005, Czech Republic
- **Jiri Grim, M.D., Ph.D.**, Department of Oncology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, Hradec Kralove 50005, Czech Republic
- **Prof. Petr Pavek, PharmD., Ph.D.**, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, Hradec Kralove 50005, Czech Republic
- **Prof. Petr Nachtigal, PharmD., Ph.D.**, Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, Hradec Kralove 50005, Czech Republic
- **Prof. Frantisek Staud, PharmD., Ph.D.**, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, Hradec Kralove 50005, Czech Republic
- **Prof. Libor Vitek, M.D., Ph.D.**, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN
- **Petra Hirsova, PharmD., Ph.D.**, Mayo Clinic, Rochester, USA
- **Prof. Mathieu Vinken**, Department of Toxicology, Faculty of Medicine and Pharmacy, Vrije Universiteit Brussel, Laarbeeklaan 103, 1090 Brussels, Belgium
- **Nathan Cherrington, PhD, ATS**, Department of Pharmacology and Toxicology, University of Arizona, Tucson, AZ, 85721, USA.

Řešení grantů

Období	Název grantu (číslo)	Grantová agentura
2019-2021	Novel interventions for the treatment of triglycerides, cholesterol and bile acids diseases with human CAR ligands (19-14497S)	GAČR
2018-2020	Role of iron depletion and Mrp2 deficiency for development of estrogen-induced cholestasis (556218)	GAUK
2018-2020	Effect of cardiovascular drugs on the development of non-alcoholic steatohepatitis (346218)	GAUK
2018-2021	PERSONMED - The centre for personalized medicine development in age-dependend disorders (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_048/0007441)	MŠMT EDRF
2017-2019	Dynamics of nuclear receptor-mediated gene regulation:implement for the understanding of detoxification functions and optimization of therapy (GA17-06841S)	GAČR
2015-2017	Tissue and soluble endoglin and their importance in endothelial dysfunction and atherogenesis in vivo and in vitro (GA15-24015S)	GAČR
2012-2015	Increasing of the R&D capacity at Charles University through new position for graduates of doctoral studies (Postdoci II UK) - CZ.1.07/2.3.00/30.0061	MŠMT-OP VVV
2012-2014	Breast cancer pathophysiology and its modulation by plant anticancer agents boldine and alpha-tomatine (NT13473)	IGA
2009-2011	The study of potential importance of epigallocatechin gallate in the prevention and treatment of the liver injury caused by intrahepatic and extrahepatic cholestasis (116807)	GAUK
2008-2010	The study of the potential therapeutic importance of pravastatin in the treatment of the liver injury caused by acute and chronic extrahepatic cholestasis and biliary cirrhosis in rats. (122408).	GAUK
2005-2009	COST B.25.10 (1P05OC062): Physiologically based prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies: Focus on hepatic and renal elimination.	COST
2005-2007	Cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance proteins MDR1 and MRP2 as a major cause of drug-drug interactions at the level of drug elimination from organism (92/2005/C)	GAUK

2002-2004	Evaluation of changes in MRP2 expression on the canalicular membrane of hepatocytes and their influence on liver methotrexate elimination (89/2002/C/LFHK)	GAUK
2000-2005	COST B.15.30. Prediction of metabolic drug-drug interactions based on in vitro experiments	COST
1997-1999	In vivo evaluation of CYP3A4 activity (57/1997/C)	GAUK