

Novel insights into toxic and chronic liver disease

Citation for published version (APA):

Zoubek Aranda, M. E. (2021). *Novel insights into toxic and chronic liver disease: from molecular pharmacology to clinical practice*. [Doctoral Thesis, Maastricht University, University of Malaga]. ProefschriftMaken. <https://doi.org/10.26481/dis.20210929mz>

Document status and date:

Published: 01/01/2021

DOI:

[10.26481/dis.20210929mz](https://doi.org/10.26481/dis.20210929mz)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

In *Chapter 1*, an updated literature review on the topic of drug-induced liver injury has been carried out. The most relevant findings and contributions to the field in recent years have been highlighted in detail. Apart from diverse basic definitions and essential classifications, a particular focus on the underlying pathophysiology, mechanisms, clinical features, differential diagnosis, causality assessment, and risk factors in DILI have been considered. As paraphrase, a summarized overview of the topic “hepatocellular carcinoma” as well as an introduction to the experimental chronic liver disease model “NEMO” have been included. Additionally, the main objectives and outline for the current investigations have been briefly described.

In *Chapter 2*¹ a systematic analysis was performed in order to examine the information on ibuprofen-induced liver injury available in the literature. Our investigation covered prospective hepatotoxicity cohorts, case series, and case reports, and the data was thoroughly examined in terms of demographics, clinical presentation, biochemical parameters, and outcome. Of note, ibuprofen stood out as the most frequent NSAID in prospective DILI databases from Spain and India. Twelve out of 22 identified idiosyncratic ibuprofen hepatotoxicity cases had female gender, and the mean age was 31 years. The average cumulative dose of ibuprofen was 30g, whereas treatment duration and time to onset was 14 and 12 days, respectively. Characteristically, hepatic cytolytic features predominated and a total number of six cases developed vanishing bile duct syndrome. Full recovery occurred after a mean time of 14 weeks, whilst 5 patients developed acute liver failure that led to death or the need for a liver transplant.

Despite rare, given its extensive use, ibuprofen has been convincingly associated with hepatotoxicity across literature and prospective cohorts of DILI cases and, thus, it needs to be considered as a potential culprit agent during causality assessment. Ibuprofen DILI presents commonly with short latency, hepatocellular damage and can potentially progress to death or the need for liver transplantation.

In *Chapter 3*² the prevalence and features of ibuprofen-induced liver injury cases enrolled in the Spanish DILI Registry as well as in the Latin-American DILI Network were thoroughly analyzed and characterized. Only cases where ibuprofen was the unique culprit drug were included in the study. To investigate a potential signature of ibuprofen hepatotoxicity, ibuprofen DILI events were compared with DILI due to other nonsteroidal and other non-NSAID drugs. An ibuprofen hepatotoxicity cohort of 26 total events was obtained; half of the individuals were female with a mean age of 51 years. Most patients were treated with 1200 mg ibuprofen per day or higher (77%), median treatment duration was 16 days and the median time to DILI onset 15 days. Moreover, 58% of the patients required hospitalization, 69% presented with jaundice and 50% had hypersensitivity features. Hepatocellular injury was the most frequent hepatic injury pattern (69%). Average BMI was higher in ibuprofen DILI subjects than in DILI due to other NSAIDs or Non-NSAIDs ($p=0.06$). The median time to onset lasted shorter for ibuprofen hepatotoxicity (15 days). Diabetes mellitus was significantly more prevalent in ibuprofen DILI patients ($p=0.038$). Fatal

outcome was higher for ibuprofen hepatotoxicity (12%) versus other NSAIDs (5%) and other non-NSAID agents (3%).

Thus, a higher prevalence of ibuprofen-induced liver injury events was found in our database compared to other large published DILI cohorts. Critically, ibuprofen DILI was associated with a higher fatal outcome rate. Hence, patients diagnosed with ibuprofen DILI should undergo more exhaustive monitoring during follow-up. Our data reflected that idiosyncratic mechanisms of immunoallergic and metabolic nature seem to play from a mechanistic point of view a relevant role in ibuprofen DILI, despite more extensive studies are required to better understand the role of ibuprofen in DILI.

Our previous investigations prompted us to investigate the mechanisms associated with ibuprofen-induced liver injury. In *Chapter 4*³ a novel ibuprofen hepatotoxicity model *in vitro* and *in vivo* was developed in order to analyze the underlying pathomolecular bases underlying ibuprofen-induced acute liver injury (ALI). For this purpose, several cytotoxicity studies for ibuprofen were performed *in vitro* on Hepa 1-6 and HepaRG cell lines, which were then complemented primary murine hepatocytes, which were freshly isolated from 8-week-old Wt mice. Subsequently, our studies were completed with a murine model of ibuprofen hepatotoxicity *in vivo*. Overnight fasted male C57BL/6 mice (6-8 weeks of age) were *i.p.* injected with 600 mg/kg of ibuprofen and sacrificed 8h later. To assess the role of JNK, we used animals carrying a constitutive deletion of Jnk1 (Jnk1^{-/-}) or Jnk2 (Jnk2^{-/-}). Next, we expanded our assessment to animals, which presented a lack of Jnk1 uniquely in hepatocytes (Jnk1^{Δhepa}). To generate animals with a redundant expression of Jnk2 at hepatocellular level, 0.2 mg/kg of siRNA of Jnk2 (siJnk2^{Δhepa}) were tail vein-injected one week prior to ibuprofen challenge. As a translational approach, the role of JNK was investigated in human liver specimens who had suffered from ibuprofen-induced liver injury. Enhanced JNK phosphorylation was evident in the cytoplasm of hepatocytes in ibuprofen-induced ALI liver samples compared with healthy tissue at the human and murine level. Ibuprofen challenge produced a greater degree of liver injury than that observed in vehicle-treated control mice, based on levels of serum markers and histopathology analysis of the respective liver tissue samples.

Of note, siJnk2^{Δhepa} animals exhibited a remarkable decline in response to liver injury after ibuprofen hepatotoxicity, which correlated with significantly higher serum liver enzymes and worsened liver histology features compared to Jnk1^{Δhepa} or Wt animals. The molecular pathways associated with ibuprofen-induced liver injury in mice were examined, and we found increased activation of PKC α , AKT and JNK, eight hours after Ibuprofen challenge in mice. The results of this study showed cytoplasmic JNK activation in hepatocytes as a hallmark of Ibuprofen-related hepatotoxicity in human and murine samples. Hepatocellular deficiency of Jnk2 was associated with a worsened response to ibuprofen-induced acute liver injury.

The JNK pathway has proven to play a crucial role in the pathophysiology of acute and chronic liver disease. For this purpose, in *Chapter 5*⁴ the presence of phosphorylated JNK was examined in liver tissue from drug-induced liver injury patients, and the role of hepatocytic JNK was investigated in experimental models of murine acute and chronic liver disease. Liver sections from patients with DILI induced by diverse culprit agents were

studied and the JNK expression profile was analyzed. In parallel, mice with hepatocyte-specific deletion of Jnk1 (Jnk1^{Δhepa}) or combined Jnk1 and Jnk2 (Jnk^{Δhepa}) deletion, as well as Jnk1-floxed C57BL/6 (control) mice, were given injections of CCl₄ to induce fibrosis (0.6ml/kg *i.p.* every 3 days during 4 weeks) or were challenged with acetaminophen to induce acute toxic hepatitis (500mg/kg *i.p.*). Liver tissue samples from DILI patients displayed more activated JNK, predominantly in nuclei of hepatocytes and in immune cells than healthy tissue. The injection of acetaminophen to Jnk^{Δhepa} mice induced a greater level of liver injury than that observed in Jnk1^{Δhepa} or control mice, based on levels of serum markers and microscopic and histologic analysis of liver tissues. Administration of CCl₄ also induced more substantial hepatic injury in Jnk^{Δhepa} mice, based on increased inflammation, cell proliferation, and fibrosis progression, compared with Jnk1^{Δhepa} or control mice. Hepatocytes from Jnk^{Δhepa} mice challenged with acetaminophen had an increased oxidative stress response, leading to decreased activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase, total protein adenosine monophosphate-activated protein kinase levels, and pJunD and subsequent necrosis. Administration of SP600125 (30mg/kg *i.p.*) before or with acetaminophen protected Jnk^{Δhepa} and control mice from liver injury. These findings show that JNK1 and JNK2 in hepatocytes appear to have combined effects in protecting mice from CCl₄- and acetaminophen-induced liver injury. Additionally, the JNK inhibitor SP600125 shows off-target effects.

332

Methylprednisolone is commonly used in the treatment of acute liver injury with severe features, among many other indications. The fact that recently several case reports of MP-induced liver injury have been published, in particular in patients suffering from underlying autoimmune diseases, encouraged us to investigate this circumstance. In *Chapter 6*⁵ we aimed to contribute to characterize the phenotypic expression of MP-induced liver injury and investigated all available cases enrolled in the Spanish and Latin-American DILI databases. Demographical, clinical, laboratory, and outcome data were analyzed. An extensive search for earlier published MP-induced liver injury events was provided. Furthermore, a comparative analysis of novel MP-DILI events identified in the above-mentioned databases and earlier obtained cases from the literature was performed. Three young females with multiple sclerosis and a further one with Crohns' disease suffered an acute recrudescence and were treated subsequently with intravenous MP pulses. After one (patient 3), two (patient 1), and five (patient 2) and six (patient 4) weeks of initiating medication, liver injury occurred. Time to recovery took eight and six weeks for patients 2 and 3, respectively, while patient 1 showed a resolving tendency after 10 weeks (lost of follow up) and patient 4 after 2 weeks. Positive rechallenge occurred in three patients (patients 2, 3, and 4). An extensive literature analysis resulted in a total of 45 MP-induced liver injury events. These were associated with the female gender (84%) and the mean age was 41 years. The most common indications for treatment were multiple sclerosis (24 cases) and Graves' ophthalmopathy (13 patients). Hepatocellular damage was observed as the predominant injury pattern in all the cases with available data and positive autoantibodies were detected in 35% of the subjects. The average time to onset was six weeks. Four cases developed a fatal outcome. In 17 cases (38%), a positive rechallenge with the drug followed. These findings indicate that patients suffering from MS and GO are particularly susceptible to develop hepatotoxicity due to MP use.

The included study in *Chapter 7*⁶ aimed to analyze time to liver enzyme resolutions to establish the best definition and risk factors of DILI chronicity. Up to 298 individuals out of 850 patients in the Spanish DILI Registry with no preexisting disease affecting the liver and follow-up to resolution ≥ 1 year were analyzed. Chronicity was defined as abnormal liver biochemistry, imaging test or histology one year after DILI recognition.

Out of 298 patients enrolled, 273 (92%) resolved ≤ 1 year from DILI recognition and 25 patients (8%) were chronic. Independent risk factors for chronicity were older age (OR: 1.06, $p=0.011$), dyslipidemia (OR: 4.26, $p=0.04$) and severe DILI (OR: 14.22, $p=0.005$). Alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and total bilirubin (TB) median values were higher in the chronic group during follow-up. Values of ALP and TB >1.1 x upper limit of normal (xULN) and 2.8 xULN, respectively, in the second month from DILI onset, were found to predict chronic DILI ($p<0.001$). The main drug classes involved in chronicity were statins (24%) and antiinfectives (24%). Histological examination in chronic patients demonstrated two cases with ductal lesion and seven with cirrhosis. Hence, the achieved results suggest that one year is the best cut-off point to define chronic DILI or prolonged recovery, with risk factors being older age, dyslipidemia, and severity of the acute episode. Statins are distinctly related to chronicity. ALP and TB values in the second month could help predict chronicity or very prolonged recovery.

In *Chapter 8* we displayed three brief case reports on drug-induced liver injury of diverse etiology from our daily clinical practice, which presented an exciting learning point. In the first report, the case of a young woman who suffered from acute liver failure and required partial liver transplantation is described. The cause for the severe hepatic episode was unclear. When we investigated her precedent medical history, recent treatment with ibuprofen and occasionally acetaminophen as well as positive serology for HSV, fell into the spotlight. Nevertheless, the cause could not be clearly adjudicated. Our second case report dealt with a woman whose liver dysfunction was uncovered after suffering from rechallenge with the antidepressant sertraline. Prior to that, she had presented extramedullar manifestations of an underlying *Morbus* Walderström that had initially acted as a confounding factor and consequently led to a new inadvertent exposure with sertraline. Case report 3 referred to a patient who presented with advanced chronic liver disease, including advanced liver cirrhosis and reiterated refractory hydropic decompensations. Additionally, the patient exhibited dilated cardiomyopathy, but no plausible cause could be found. Detailed investigations of her past medical history revealed that the patient had been in chronic treatment with venlafaxine during the four previous years and was most likely the cause of her clinical condition. Interestingly, we performed a genetic test for cytochrome P450 and found that the patient presented polymorphic variations for CYP2D6, which were compatible with being an ultra-rapid metabolizer of venlafaxine.

In *Chapter 9*⁷ a review on the reversal of liver fibrosis has been carried out. The most representative animal models that have been used to expand our knowledge on liver fibrosis have been displayed; however, these are subjected to diverse limitations that need to be re-defined in the future. The extensive investigations achieved in the field during the

last decades have shown that the condition of a fibrotic liver can be reversible by modifying the underlying inflammatory environment, elimination or regression of activated HSCs as well as degradation of ECM.

Currently, there is a vast potential therapeutic arsenal aiming at reversing liver fibrosis that is undergoing clinical trial studies, as shown, with particular focus on patients suffering from non-alcoholic steatohepatitis. Thus, now more than ever, the promising progress in the reversal of liver fibrosis seems to be turning real.

Previously, we have demonstrated that c-Jun N-terminal kinases (Jnk) genes play a crucial role not only in acute liver disease but also in chronic liver disease (CLD). In *Chapter 10*⁸, we aimed to investigate the relevance of hepatocyte-specific Jnk2 inhibition in an experimental model of CLD. Genetic deletion of Jnk2 gene was performed using hepatocyte-specific deletion of Jnk2 ($JNK2^{\Delta\text{hepa}}$) in NEMO/IKK γ ($NEMO^{\Delta\text{hepa}}$) mice and by siRNA silencing (siJnk2) *in vitro* and *in vivo* in wild-type (WT) and in $NEMO^{\Delta\text{hepa}}$ mice, respectively. Disease progression was analyzed using imaging analysis of combined molecular fluorescence and microcomputed tomography (FMT/ μ CT), protein expression, IHC, IF, and histopathology. In one-year-old $NEMO^{\Delta\text{hepa}}$ mice, Jnk2 deletion reduced liver fibrosis and hepatocarcinogenesis (HCC), as observed by the reduced total number of HCC nodules. Both $NEMO/JNK2^{\Delta\text{hepa}}$ ($DKO^{\Delta\text{hepa}}$) and hepatocyte-specific liposomal-delivered siJnk2 in end-stage diseased NEMO mice resulted in the improved liver parenchyma, serum levels and markers of fibrogenesis. Furthermore, siJnk2 chronic treatment was associated with a change in the immune response as a reduction of myeloid cells, and an increase in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells was found. Most importantly, chronic siJnk2 treatment reduced the presence of premalignant and malignant liver tumors corresponding to reduced tumor initiation. Interestingly, hepatocyte-specific liposomal-delivered siJnk2 diminished liver function at an early phase of CLD in $NEMO^{\Delta\text{hepa}}$ mice. siJnk2 caused increased liver transaminases, hepatocellular apoptosis, and compensatory proliferation, a phenomenon that we validated in 12 week-old $DKO^{\Delta\text{hepa}}$ mice.

Our findings demonstrate a stage-dependent role of Jnk2 during CLD progression in $NEMO^{\Delta\text{hepa}}$ mice. Notably, siJnk2 delivery to hepatocytes ameliorated hepatitis, fibrogenesis, and HCC initiation and thus might be an attractive therapeutic option for personalized medicine in CLD.

The aim of *Chapter 11*⁹ was to uncover the functional role of Fas signaling in an experimental model of chronic liver disease. We, therefore, generated $NEMO^{\Delta\text{hepa}}/Fas^{lpr}$ mice, while $NEMO^{\Delta\text{hepa}}$, $NEMO^{f/f}$ as well as Fas^{lpr} animals served as controls and characterized their phenotype during liver disease progression. Liver damage was evaluated by serum transaminases, histological, immunofluorescence procedures, and biochemical and molecular biology techniques. Proteins were detected by Western Blot, expression of mRNA by RT-PCR, and infiltration of inflammatory cells was determined by FACs analysis, respectively. Fas^{lpr} mutation in $NEMO^{\Delta\text{hepa}}$ mice resulted in overall decreased liver injury, enhanced hepatocyte survival, and reduced proliferation at 8 weeks of age

compared with NEMO^{Δhepa} mice. Moreover, NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr} animals elicited significantly decreased parameters of liver fibrosis, such as Collagen IA1, MMP2, and TIMP1, and reduced proinflammatory macrophages and cytokine expression. At 52 weeks of age, NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr} exhibited less malignant growth, as evidenced by reduced HCC burden associated with a significantly decreased number of nodules and LW/BW ratio and decreased myeloid populations. The deletion of TNFR1 further reduced the tumor load of 52-weeks-old NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr} mice. The functionality of FasL/Fas might affect inflammation-driven tumorigenesis in an experimental model of chronic liver disease. These results help to develop alternative therapeutic approaches and extend the limitations of tumor therapy against HCC.

Samenvatting

Hoofdstuk 1 geeft een literatuuroverzicht over het onderwerp geneesmiddelen geïnduceerde leverbeschadiging. De meest relevante bevindingen van de afgelopen jaren zijn gedetailleerd beschreven. Er is aandacht besteed aan basisdefinities en classificaties maar ook aan onderliggende pathofysiologie, mechanismen, klinische kenmerken, differentiële diagnose, causaliteitsbeoordeling en risicofactoren van medicatie geïnduceerde leverbeschadiging (drug induced liver injury:DILI). Bovendien zijn de belangrijkste doelstellingen en hoofdlijnen voor de uitgevoerde onderzoeken kort beschreven. Een inleiding over chronische leverziekte en het experimentele model “Nemo” is bijgevoegd.

In *Hoofdstuk 2*¹ werd een systematische analyse uitgevoerd om de in de literatuur beschikbare informatie over door ibuprofen geïnduceerde leverbeschadiging te onderzoeken. Ons onderzoek had betrekking op, casusreeksen en casusrapporten van potentiële hepatotoxiciteitscohorten en de verkregen gegevens werden grondig onderzocht ten aanzien van demografische, klinische en biochemische aspecten. Opvallend was dat ibuprofen de meest voorkomende NSAID is die DILI veroorzaakt zoals bleek uit DILI-gegevensbestanden uit Spanje en India. Twaalf van de 22 geïdentificeerde idiosyncratische gevallen van ibuprofen hepatotoxiciteit waren van het vrouwelijk geslacht met een gemiddelde leeftijd van 31 jaar. De gemiddelde cumulatieve dosis ibuprofen was 30g, terwijl de behandelingsduur en starttijd respectievelijk 14 en 12 dagen waren. Kenmerkende beschadiging waren voornamelijk cytolyse en een totaal aantal van zes gevallen ontwikkelde het verdwenen galwegen syndroom (vanishing bile duct syndrome). Volledig herstel vond plaats na een gemiddelde periode van 14 weken, terwijl vijf patiënten een acuut leverfalen ontwikkelden dat leidde tot de dood of de noodzaak voor een levertransplantatie. Ofschoon weinig voorkomend bij het frequent gebruik, is ibuprofen overtuigend geassocieerd met hepatotoxiciteit in de literatuur en de registratie cohorten van DILI-gevallen en daarom moet het worden beschouwd als een potentiële veroorzaker bij de beoordeling van DILI causaliteit. Ibuprofen-afgeleide DILI vertoont gewoonlijk een korte latentie, hepatocellulaire schade en kan potentieel de dood tot gevolg hebben of de noodzaak van een levertransplantatie.

In *Hoofdstuk 3*² werden de prevalentie en kenmerken van door ibuprofen geïnduceerde leverschade in het Spaanse DILI-register, evenals de Latijns-Amerikaanse tak, een prospectieve database voor humane hepatotoxiciteit, geanalyseerd en gekarakteriseerd. Alleen die gevallen met ibuprofen als DILI veroorzakende medicatie werden opgenomen in de studie. Om een mogelijke signatuur van ibuprofen hepatotoxiciteit te onderzoeken, werden deze vergeleken met andere soorten DILI, .

Een ibuprofen hepatotoxiciteit cohort met in totaal 26 patiënten werd verkregen, de helft van de personen waren van het vrouwelijk geslacht en de gemiddelde leeftijd was 51 jaar. De meeste patiënten werden behandeld met 1200 mg ibuprofen per dag of hoger (77%), de mediane behandelingsduur bedroeg 16 dagen en de mediane tijd tot aan het begin duurde 15 dagen. Bovendien werd 58% van de patiënten gehospitaliseerd, 69% presenteerde met geelzucht en 50% voldeed aan de overgevoeligheid criteria. Hepatocellulaire beschadiging was het meest voorkomende patroon (69%). De gemiddelde BMI was hoger in de ibuprofen DILI groep in vergelijking tot de DILI als gevolg van andere NSAID's of niet-NSAID's ($p=0.06$). De mediane tijd tot aan het begin van de verschijnselen was korter voor ibuprofen hepatotoxiciteit (15 dagen). Diabetes mellitus werd significant vaker vastgesteld bij ibuprofen DILI patiënten ($p=0.038$). Fatale afloop was hoger voor ibuprofen hepatotoxiciteit (12%) versus andere NSAIDs (5%) en andere niet-NSAID middelen (3%). Opvallend was dat er een hogere prevalentie van ibuprofen-geïnduceerde leverschade gevallen werd gevonden in ons register in vergelijking met andere grote gepubliceerde DILI cohorten. Ibuprofen DILI was eveneens geassocieerd met een hoger percentage fatale afloop. Dit suggereert dat patiënten met ibuprofen DILI een langdurigere monitoring in de follow-up nodig hebben. We concluderen uit ons onderzoek dat de immunoallergische en metabole factoren in het idiosyncratische mechanisme een rol spelen in de pathogenese van ibuprofen DILI.

Onze eerdere onderzoeken hebben ons ertoe aangezet de mechanismen te onderzoeken die verband houden met door ibuprofen geïnduceerde leverbeschadiging. In *Hoofdstuk 4*³ werd een nieuw ibuprofen hepatotoxiciteitsmodel *in vitro* en *in vivo* ontwikkeld om de onderliggende pathomoleculaire basis te analyseren die ten grondslag zou kunnen liggen aan door ibuprofen geïnduceerde hepatotoxiciteit. Voor dit doel werden verschillende cytotoxiciteitsstudies voor ibuprofen *in vitro* uitgevoerd op Hepa 1-6 en HepaRG cellijnen, die vervolgens werden aangevuld met primaire muizenhepatocyten, die vers werden geïsoleerd uit 8 weken oude Wt-muizen. Vervolgens werden onze studies afgerond met een muizenmodel van ibuprofen hepatotoxiciteit *in vivo*. Mannelijke C57BL/6 muizen van 6-8 weken oud werden gedurende nacht niet gevoed en kregen *i.p.* 600 mg/kg ibuprofen geïnjecteerd en werden 8 uur later opgeofferd. Om de rol van JNK te beoordelen, gebruikten we dieren met constitutieve deletie van Jnk1 (Jnk1^{-/-}) of Jnk2 (Jnk2^{-/-}). Vervolgens hebben we onze beoordeling uitgebreid naar dieren, die een uniek Jnk1-tekort in hepatocyten (Jnk1^{Δhepa}) vertoonden. Om dieren met redundante expressie van Jnk2 op hepatocellulair niveau te genereren, werd 0.2 mg/kg siRNA van Jnk2 (siJnk2^{Δhepa}) een week voorafgaand aan ibuprofen-challenge-injectie geïnjecteerd in de staartader. Als translationele benadering werd de rol van JNK onderzocht bij menselijke leverspecimens, die hadden geleden aan door ibuprofen geïnduceerde leverbeschadiging. Verbeterde JNK-fosforylering werd aangetoond in het cytoplasma van hepatocyten in door ibuprofen

geïnduceerde DILI-levermonsters in vergelijking met gezond weefsel op humaan en muizenniveau. Ibuprofen-challenge produceerde een grotere mate van leverbeschadiging dan die waargenomen bij met vehikel behandelde controlemuizen, op basis van concentratie serummarkers en histopathologie-analyse van de respectieve leverweefsel sampels. Een opmerkelijke respons afname in siJnk2^{Δhepa}-dieren werd aangetoond gecorreleerd aan de significant hogere serum-leverenzymen en verslechterde leverhistologiekenmerken in vergelijking met Jnk1^{Δhepa}- of Wt-dieren. Vervolgens werden de moleculaire routes geassocieerd met door ibuprofen geïnduceerde leverbeschadiging bij muizen onderzocht. Verhoogde activatie van PKCα, AKT en JNK, acht uur na Ibuprofen-challenge-behandeling werd bij muizen aangetoond. De resultaten van deze studie toonden cytoplasmatische JNK-activering in hepatocyten aan als kenmerk van Ibuprofen-intoxicatie in monsters van mensen en muizen. Hepatocellulaire deficiëntie van Jnk2 werd geassocieerd met een verslechterde reactie op door ibuprofen geïnduceerde acute leverbeschadiging.

De JNK-routelijkt een cruciale rol te spelen in de pathofysiologie van acute en chronische leverziekte. Om dit verder te onderzoeken werd in *Hoofdstuk 5*⁴ de aanwezigheid van gefosforyleerd JNK onderzocht in leverweefsel van patiënten met geneesmiddelen geïnduceerde leverbeschadiging. Tevens werd de rol van het JNK werkingmechanisme onderzocht in experimentele modellen van acute en chronische leverziekten bij muizen. Leverbiopten van patiënten met DILI, geïnduceerd door verschillende stoffen, werden bestudeerd en het JNK-expressieprofiel werd daarbij geanalyseerd. Parallel hieraan werd in muizen met hepatocyt-specifieke deletie van JNK1 (Jnk1^{Δhepa}) of gecombineerde JNK1 en JNK2 (Jnk^{Δhepa}) deletie, alsmede JNK1-floxed C57BL/6 controle muizen bestudeerd wat de leverschade was na injecties van CCl₄ (om leverfibrose te induceren; 0.6ml/kg *i.p.* elke 3 dagen gedurende 4 weken) of paracetamol (om toxische hepatitis te induceren; 500mg/kg *i.p.*).

Leverweefsel van DILI patiënten toonde meer geactiveerd JNK, voornamelijk in kernen van hepatocyten en immuuncellen, ten opzicht van gezond controle weefsel. De injectie van paracetamol in Jnk^{Δhepa} muizen induceerde een grotere mate van leverschade dan bij Jnk1^{Δhepa} controle muizen, gebaseerd op metingen van serum markers en microscopische en histologische analyse van leverweefsel. Toediening van CCl₄ veroorzaakte een sterkere leverbeschadiging in Jnk^{Δhepa} muizen, gemeten aan de hand van verhoogde ontstekingsparameters, celproliferatie, en fibrose progressie, in vergelijking met Jnk1^{Δhepa} controle muizen. Hepatocyten van met paracetamol behandelde Jnk^{Δhepa} muizen, hadden een verhoogde oxidatieve stressrespons wat leidde tot een verminderde activering van adenosine monofosfaat geactiveerd proteïne kinase, totaal eiwit adenosine monofosfaat geactiveerd proteïne kinase niveaus en pJunD waardoor er necrose ontstond. Toediening van SP600125 (30mg/kg *i.p.*) vóór of met paracetamol, beschermde Jnk^{Δhepa} en controle muizen tegen leverschade. Deze bevindingen tonen aan dat JNK1 en JNK2 in hepatocyten een gecombineerd beschermend effect induceren bij muizen die met CCl₄- en paracetamol waren behandeld. Daarnaast toont de JNK inhibitor SP600125 off-target effecten, dus onafhankelijk van JNK.

In *Hoofdstuk 6*⁵ was het doel de methylprednisolon (MP) geïnduceerde leverschade nader te karakteriseren met de beschrijving van vier nieuwe gevallen uit het Spaanse en Latijns-Amerikaanse DILI register. Demografische, klinische, laboratorium en follow-up gegevens werden geanalyseerd. Ter vergelijking werd een uitgebreide screening van de literatuur uitgevoerd naar MP geïnduceerde leverschade gevallen. Drie jonge vrouwen met multiple sclerose en een andere met de ziekte van Crohn kregen een acute exacerbatie van hun ziekte en werden vervolgens behandeld met intraveneuze MP pulstherapie. Leverbeschadiging trad op na één (patiënt 3), twee (patiënt 1), vijf (patiënt 2) en zes (patiënt 4) weken na start van de medicatie. De tijd tot herstel vergde acht en zes weken voor respectievelijk patiënten 2 en 3, terwijl patiënt 1 na tien weken verbetering vertoonde en patiënt 4 na 2 weken. Bij drie patiënten (patiënten 2, 3 en 4) werd MP opnieuw gegeven met optreden van dezelfde bijwerkingen.

Een uitgebreid literatuuroverzicht leverde in totaal 45 door MP geïnduceerde leverbeschadigingsgevallen op. Deze waren geassocieerd met vrouwelijk geslacht (84%) bij een gemiddelde leeftijd van 41 jaar. De meest voorkomende MP indicaties voor de behandeling waren multiple sclerose (24 gevallen) en 13 gevallen van Graves oftalmopathie (GO). Hepatocellulaire schade werd aangetoond als de meest voorkomende beschadiging, positieve autoantilichamen werden gedetecteerd in 35%. De gemiddelde tijd tot het begin van de verschijnselen was zes weken. Vier gevallen ontwikkelden zich met fatale afloop. In 17 (38%) patiënten werd opnieuw met het MP behandeld met dezelfde reactie tot gevolg. Deze bevindingen wijzen erop dat patiënten met MS en GO bijzonder vatbaar zijn voor het ontwikkelen van leverschade als gevolg van het gebruik van MP.

De studie in *Hoofdstuk 7*⁶ werd gefocust op het analyseren van herstelduur van leverenzymen en om de beste definitie en de risicofactoren van DILI chroniciteit vast te stellen. Van 298 personen van de 850 geregistreeerde patiënten uit het Spaanse DILI register werden onderzocht. De patiënten waren niet gekend met een aandoening van de lever en follow-up gegevens van ≥ 1 jaar na herstel werden geanalyseerd. Chroniciteit werd gedefinieerd als gestoorde lever biochemie, afwijkende beeldvorming of histologie een jaar na DILI diagnose. Van de 298 geïncludeerde patiënten waren 273 (92%) hersteld binnen een jaar na Dili diagnose en 25 patiënten (8%) waren chronisch. Onafhankelijke risicofactoren voor chroniciteit waren oudere leeftijd (OR: 1.06, $p=0.011$), dyslipidemie (OR: 4.26, $p=0.04$) en ernstige DILI (OR: 14.22, $p=0.005$). De mediane waarden van alanine aminotransferase (ALT), alkalische fosfatase (ALP) en totaal bilirubine (TB) waren hoger in de chronische groep gedurende de follow-up. De waarden van ALP >1.1 maal de bovengrens van normaal (xULN) en TB >2.8 xULN in de tweede maand van Dili aanvang, bleken chronische DILI ($p<0.001$) te voorspellen. Voornaamste medicament groepen betrokken bij chroniciteit waren statines (24%) en anti-infectiva (24%). Histologisch onderzoek bij chronische patiënten toonde twee gevallen met ductale laesies en zeven met cirrose.

Deze gegevens suggereren dat het interval van een jaar de beste cut-off tijd is om chronische DILI of vertraagd herstel te definiëren, met als risicofactoren oudere leeftijd, dyslipidemie en de ernst van de acute episode. Statines zijn duidelijk gerelateerd aan chroniciteit. ALP en TB-waarden in de tweede maand zijn van diagnostische waarde om chroniciteit of zeer traag herstel te voorspellen.

In *Hoofdstuk 8* hebben we als interessant leerpunt, drie korte casus over door geneesmiddelen geïnduceerde leverbeschadiging van diverse etiologie uit onze dagelijkse klinische praktijk weergegeven. In de eerste casus wordt het geval beschreven van een jonge vrouw, die leed aan acuut leverfalen behandeld met een paratiele levertransplantatie. De oorzaak voor het leverfalen was onduidelijk. Toen we haar medische geschiedenis uitgebreider onderzochten, kwam een recente behandeling met ibuprofen gecombineerd met paracetamol aan het licht alsook positieve serologie voor HSV. Niettemin kon de causaliteit niet duidelijk worden aangetoond. De tweede casus beschrijft een vrouw bij wie leverfunctiestoornissen ontdekt werden nadat ze opnieuw was blootgesteld aan het antidepressivum sertraline. De voorgeschiedenis vermeldde extramedullaire manifestaties bij een onderliggende morbus Walderström. De verschijnselen werden aanvankelijk verklaard passend bij de aandoening. Herintroductie van sertraline, na een periode zonder dit medicament deed de klachten opnieuw ontstaan en er werd een duidelijke causaliteit vastgesteld met sertraline. In gevalsbeschrijving 3 wordt een patiënte beschreven, verwezen met gevorderde chronische leverziekte waarbij een cirrose met portale hypertensie was aangetoond. Er werd refractaire hydropische decompensatie vastgesteld en eveneens een cardiomyopathie zonder evidente plausibele oorzaak. Uit gedetailleerd onderzoek van haar medische geschiedenis bleek dat de patiënt de afgelopen vier jaar een intensieve behandeling met venlafaxine had gehad die als enige verklaring werd gevonden voor haar huidige klinische toestand met gecompliceerde levercirrose. Uitgebreid onderzoek leverde een genetische afwijking op van het cytochroom P450. Patiënte was een ultrasnelle metaboliseerder van venlafaxine waarbij gesuggereerd werd dat metaboliëten verantwoordelijk zijn geweest voor zowel de hepatologische als cardiale gevolgen.

In *Hoofdstuk 9*⁷ is een overzicht gegeven van de reversibiliteit van leverfibrose. De meest representatieve diermodellen die zijn gebruikt om onze kennis over leverfibrose te vergroten, zijn weergegeven. Er zijn verschillende beperkingen op te merken die in de toekomst opnieuw moeten worden gedefinieerd. De uitgebreide onderzoeken die in de afgelopen decennia op dit gebied zijn uitgevoerd, hebben aangetoond dat de conditie van een fibrotische lever reversibel kan zijn door de onderliggende inflammatie te behandelen, eliminatie of regressie van geactiveerde HSC's te induceren en degradatie van extra cellulaire matrix (ECM) te modificeren.

Momenteel bestaat er een enorm potentieel therapeutisch arsenaal dat gericht is op het omkeren van leverfibrose. Verschillende klinische studies worden momenteel uitgevoerd, met bijzondere aandacht voor patiënten die lijden aan niet-alcoholische steatohepatitis. Dus, meer dan ooit, lijkt de veelbelovende vooruitgang van de omkering van leverfibrose realiteit te worden.

Eerder hebben we aangetoond dat c-Jun N-terminale kinasen (Jnk)-genen een cruciale rol spelen, niet alleen bij acute leverziekte, maar ook bij chronische leverziekte (CLD). In *Hoofdstuk 10*⁸ was het doel om de relevantie van hepatocyt specifieke Jnk2-remming te onderzoeken in een experimenteel CLD model. Genetische deletie van het Jnk2-gen werd uitgevoerd met behulp van hepatocyt specifieke deletie van Jnk2 (JNK2^{Δhepa}) in NEMO / IKKγ (NEMO^{Δhepa})-muizen en door siRNA-silencing (siJnk2) *in vitro* en *in vivo* in respectievelijk

wildtype (WT) en in NEMO^{Δhepa}-muizen. Ziekteprogressie werd geanalyseerd met behulp van beeldvormende analyse van gecombineerde fluorescentie moleculaire en microcomputed tomography (FMT/μCT), eiwitexpressie, IHC, IF en histopathologie. Bij één jaar oude NEMO^{Δhepa}-muizen verminderde Jnk2-deletie leverfibrose en hepatocarcinogenese, zoals waargenomen door een verminderd totaal aantal hepatocellulaire carcinoom (HCC)-noduli. Zowel NEMO/JNK2^{Δhepa} (DKO^{Δhepa}) als hepatocyt specifieke liposomaal afgegeven siJnk2 in NEMO-muizen met eindstadium leverziekte resulteerden in verbeterde leverparenchym, serumspiegels en markers van fibrogenese. Bovendien werd de chronische behandeling met siJnk2 geassocieerd met een verandering in de immuunrespons omdat een vermindering van myeloïde cellen en een toename van CD4⁺ en CD8⁺ T-cellen werd gevonden. Het belangrijkste is dat chronische siJnk2-behandeling de aanwezigheid van premaligne en kwaadaardige levertumoren verminderde, wat overeenkomt met verminderde tumor-initiatie. Een interessante bevinding was het feit dat hepatocyt specifiek liposomaal afgegeven siJnk2 de leverfunctie verminderde in een vroege fase van CLD bij NEMO^{Δhepa}-muizen. siJnk2 veroorzaakte verhoogde levertransaminasen, hepatocellulaire apoptose en compenserende proliferatie, een fenomeen dat we valideerden bij 12 weken oude DKO^{Δhepa}-muizen. Onze bevindingen tonen een fase-afhankelijke rol van Jnk2 tijdens CLD-progressie bij NEMO^{Δhepa}-muizen. Met name de afgifte van siJnk2 aan hepatocyten verbeterde hepatitis, fibrogenese en HCC-initiatie en zou dus een aantrekkelijke therapeutische optie kunnen zijn voor gepersonaliseerde geneeskunde bij CLD.

In *Hoofdstuk 11*⁹ wordt het onderzoek naar de functionele rol van Fas-signalering in een experimenteel model van chronische leverziekte beschreven. We genereerden NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr}-muizen, terwijl NEMO^{Δhepa}, NEMO^{f/f} en Fas^{lpr}-dieren als controles dienden met hun fenotypische kenmerk van de progressie van de leverziekte. Leverbeschadiging werd geëvalueerd met serumtransaminasen, histologische, immunofluorescentie-procedures en biochemische en moleculaire-biologisch technieken. Eiwitten werden geanalyseerd met Western Blot, expressie van mRNA door RT-PCR en infiltratie van ontstekingscellen werd bepaald door respectievelijk FACS-analyse. Fas^{lpr}-mutatie bij NEMO^{Δhepa}-muizen resulteerde in een algehele verminderde leverbeschadiging, verbeterde overleving van hepatocyten en verminderde proliferatie op 8 weken oud in vergelijking met NEMO^{Δhepa}-muizen. Bovendien ontwikkelden NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr}-dieren aanzienlijk verlaagde parameters van leverfibrose, zoals collageen IA1, MMP2 en TIMP1, en verlaagde pro-inflammatoire macrofagen en cytokine-expressie. Op de leeftijd van 52 weken vertoonde NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr} minder kwaadaardige groei, zoals bleek uit een verminderde HCC-last geassocieerd met een aanzienlijk verlaagd aantal noduli en de LW/BW-ratio alsook verminderde myeloïde populaties. Deletie van TNFR1 verminderde de tumorbelasting van de 52 weken oude NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr}-muizen verder.

De functionaliteit van FasL/Fas kan de ontstekingsgestuurde tumorigenese beïnvloeden in een experimenteel model van chronische leverziekte. Deze resultaten helpen bij het ontwikkelen van alternatieve therapeutische benaderingen en vergroten de beperkingen van tumortherapie tegen HCC.

Resumen

En el *Capítulo 1* se realizó una revisión bibliográfica actualizada sobre la temática del daño hepático inducido por fármacos (drug-induced liver injury, DILI). Los hallazgos y contribuciones más relevantes a dicho campo temático en los últimos años han sido examinados en detalle. Además de diversas definiciones básicas y clasificaciones esenciales, se ha llevado a cabo un enfoque particular sobre la fisiopatología subyacente, mecanismos, características clínicas, diagnóstico diferencial, evaluación de causalidad y factores de riesgo en DILI. Como paráfrasis, se ha adjuntado una descripción resumida respecto al "carcinoma hepatocelular", así como una breve introducción al modelo experimental de hepatopatía crónica "NEMO". Además, se describieron brevemente los objetivos principales de las presentes investigaciones.

En el *Capítulo 2*¹ se realizó un análisis sistemático para examinar la información disponible sobre el daño hepático inducido por ibuprofeno en la literatura científica. Nuestras investigaciones abarcaron cohortes prospectivas de hepatotoxicidad, series de casos y casos clínicos, y los datos obtenidos se examinaron exhaustivamente a nivel demográfico, clínico, bioquímico y resolutivo. Es de destacar que el ibuprofeno destacó como AINE más frecuentemente involucrado en las bases de datos prospectivas de DILI en España e India. Doce de los 22 casos idiosincrásicos de hepatotoxicidad por ibuprofeno identificados tenían sexo femenino y la edad media era de 31 años. La dosis acumulada promedia de ibuprofeno fue de 30g, mientras que la duración del tratamiento y el tiempo de incubación de la reacción hepatotóxica fue de 14 y 12 días, respectivamente. Predominaron las características citolíticas en cuanto al perfil de daño hepático y un total de seis casos desarrollaron un síndrome de los conductillos biliares evanescentes. La recuperación completa de los pacientes se produjo tras un intervalo medio de 14 semanas, mientras que hasta cinco casos desarrollaron fallo hepático fulminante, lo cual condujo a la muerte o la necesidad de un trasplante de hígado. Aun siendo poco frecuente, dado el uso extenso, es importante que los clínicos tengan en cuenta que ibuprofeno ha sido asociado convincentemente con la hepatotoxicidad en la literatura y cohortes prospectivas de DILI y, por lo tanto, debe ser considerada como una potencial causa de DILI durante la evaluación de la causalidad. La hepatotoxicidad derivada de ibuprofeno se presenta comúnmente con una latencia corta, daño de rasgo hepatocelular y puede progresar potencialmente a una condición severa que podría conllevar la necesidad de un trasplante de hígado o incluso el exitus en el peor de los casos.

En el *Capítulo 3*², la prevalencia y las características de los casos de daño hepático inducido por ibuprofeno declarados al Registro Español de Hepatotoxicidad (Spanish DILI Registry), así como a su red latinoamericana (Latin-American DILI Network), fueron identificados y analizados en detalle. Exclusivamente aquellos casos que presentaban ibuprofeno como único fármaco imputable fueron finalmente adjudicados al presente estudio. Para investigar rasgos característicos de la hepatotoxicidad por ibuprofeno, se compararon los eventos de DILI de ibuprofeno con otros tipos de DILI inducidos por otros medicamentos

antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y otros medicamentos no AINE. Se obtuvo así una cohorte de hepatotoxicidad por ibuprofeno de 26 casos totales, la mitad de los sujetos resultó tener género femenino y la edad promedio fue de 51 años. La mayoría de los pacientes habían recibido tratamiento con dosis de 1200mg o más altas de ibuprofeno al día (77%), la mediana de la duración del tratamiento fue de 16 días y la mediana del intervalo onset abarcó 15 días. Además, el 58% de los pacientes requirió hospitalización, el 69% presentó ictericia y el 50% cumplió con criterios de hipersensibilidad. La lesión hepatocelular fue el patrón de lesión hepática más frecuente (69%). El IMC promedio fue mayor en sujetos con DILI por ibuprofeno que en DILI debido a otros AINEs o medicamentos no AINE ($p=0.06$). La mediana del tiempo de incubación de la reacción adversa abarcó un intervalo menor para la hepatotoxicidad por ibuprofeno (15 días). Diabetes mellitus fue significativamente más prevalente en pacientes con DILI inducido por ibuprofeno ($p=0.038$). Formas graves se asociaron más frecuentemente con la hepatotoxicidad por ibuprofeno (12%) que en otros AINEs (5%) u otros agentes no AINE (3%). En conclusión, se encontró una mayor prevalencia de eventos de daño hepático inducido por ibuprofeno en nuestra base de datos en comparación con otras grandes cohortes de DILI publicadas. Críticamente, DILI por ibuprofeno se asoció con una mayor tasa de resultados graves. Por lo tanto, los pacientes diagnosticados con DILI por ibuprofeno deben someterse a un control exhaustivo durante su seguimiento. Nuestros datos reflejan que los mecanismos idiosincrásicos de naturaleza inmunoalérgica y metabólica posiblemente puedan jugar un papel relevante en la hepatotoxicidad por ibuprofeno, aunque se requieren estudios más amplios para determinar el papel de ibuprofeno en DILI.

Nuestras investigaciones previas nos llevaron a investigar los mecanismos asociados al daño hepático inducido por ibuprofeno. En el *Capítulo 4*³ se desarrolló así un nuevo modelo experimental de hepatotoxicidad por ibuprofeno a nivel *in vitro* e *in vivo* con el objetivo de poder analizar las bases patomoleculares subyacentes a dicho fenómeno. Para este propósito, se realizaron inicialmente diversos estudios de citotoxicidad sobre ibuprofeno *in vitro* a partir de líneas celulares Hepa 1-6 y HepaRG, que más tarde fueron complementados con otro estudio realizado en hepatocitos murinos primarios aislados en fresco a partir de ratones Wt de 8 semanas de edad. Posteriormente, nuestros estudios *in vitro* fueron ampliados con un modelo murino de hepatotoxicidad inducida por ibuprofeno *in vivo*. Para ello, ratones C57BL/6 machos (6-8 semanas de edad) en ayuno nocturno fueron sometidos a una inyección *i.p.* de ibuprofeno en dosis de 600 mg/kg y sacrificados 8h más tarde. Para evaluar el papel de JNK, utilizamos animales portadores de delección constitutiva de Jnk1 (Jnk1^{-/-}) o Jnk2 (Jnk2^{-/-}). En un segundo tiempo, concentramos nuestra evaluación sobre JNK a nivel hepatocitario, empleando animales que presentaron deficiencia de Jnk1 exclusivamente en los hepatocitos (Jnk1^{Δhepa}). Para generar animales con expresión redundante de Jnk2 a nivel hepatocelular, se administraron 0.2mg/kg de siRNA (ARN de interferencia) de Jnk2 (siJnk2^{Δhepa}) una semana antes de replicar la exposición hepatotóxica con ibuprofeno en los mismos. A nivel traslacional, se investigó además el papel de JNK en muestras de hígado humano, que fueron extraídas de pacientes que habían

sufrido un daño hepático inducido por ibuprofeno. La fosforilación de JNK se hizo evidente en el citoplasma hepatocitario de dichas muestras en comparación con tejido sano a nivel humano y murino. La sobreexposición experimental con ibuprofeno produjo un mayor grado de daño hepático que el observado en ratones controles tratados solo con el vehículo, como así reflejaron los marcadores serológicos bioquímicos y el análisis de histopatológico de las muestras hepáticas respectivas. Es de destacar que los animales $\text{siJnk2}^{\Delta\text{hepa}}$ mostraron un agravamiento notable en la respuesta al daño hepático inducido por ibuprofeno y que se correlacionó con enzimas hepáticas en suero significativamente elevadas y empeoramiento de las características histológicas del parénquima hepático en comparación con los animales $\text{Jnk1}^{\Delta\text{hepa}}$ y Wt. A continuación, se investigaron las vías moleculares asociadas al daño hepático inducido por ibuprofeno en el presente modelo experimental y se observó un aumento de la activación de PKC α , AKT y JNK, 8h tras la sobreexposición a ibuprofeno. En resumen, los resultados del presente estudio demostraron una activación de JNK a nivel citoplásmico en hepatocitos como sello distintivo de la intoxicación por ibuprofeno tanto en muestras humanas como en murinas. La deficiencia hepatocelular de Jnk2 se asoció con un empeoramiento en la respuesta de la lesión hepática aguda inducida por ibuprofeno, haciendo de éste una potencial diana terapéutica de interés.

La vía asociada a las c-Jun N-terminal kinases (JNK) ha resultado desempeñar un papel crucial en la fisiopatología de la enfermedad hepática aguda y crónica. Para este propósito, en el *Capítulo 5^a* se examinó la presencia de JNK fosforilado en tejido hepático proveniente de pacientes con daño hepático inducido por fármacos y se investigó el papel de JNK hepatocítico en modelos experimentales murinos de enfermedad hepática aguda y crónica. Las muestras histológicas hepáticas de pacientes con DILI inducido por diversos agentes farmacológicos fueron estudiadas y se analizó el perfil de expresión de JNK. En paralelo, ratones con delección de Jnk1 ($\text{Jnk1}^{\Delta\text{hepa}}$) o delección concomitante de Jnk1 y Jnk2 ($\text{Jnk}^{\Delta\text{hepa}}$) específicamente en hepatocitos, así como ratones controles $\text{Jnk1}^{\text{f/f}}$ (floxed) C57BL/6 fueron sometidos a inyecciones de CCl_4 para inducir fibrosis hepática (0.6 ml/kg *i.p.* cada 3 días durante 4 semanas) o fueron expuestos a dosis de 500 mg/kg *i.p.* de acetaminofén (APAP) para inducir una hepatitis tóxica aguda. Las muestras de tejido hepático derivadas de enfermos de DILI exhibieron significativamente un mayor perfil de activación de JNK, que predominó en núcleos de hepatocitos y en células inmunes, comparado con tejido sano. La sobreexposición con acetaminofén en ratones $\text{Jnk}^{\Delta\text{hepa}}$ indujo un mayor nivel de daño hepático que el observado en $\text{Jnk1}^{\Delta\text{hepa}}$ o en los ratones control, en base a los niveles de marcadores serológicos de daño hepático y el análisis histológico. La administración de CCl_4 también indujo una lesión hepática más fuerte en ratones $\text{Jnk}^{\Delta\text{hepa}}$, que se caracterizó por un aumento de la inflamación, proliferación celular y progresión de la fibrosis, comparado con ratones $\text{Jnk1}^{\Delta\text{hepa}}$ o controles. Los hepatocitos de ratones $\text{Jnk}^{\Delta\text{hepa}}$ expuestos a APAP sufrieron una peor respuesta al estrés oxidativo, lo que condujo a una disminución en la fosforilación de la proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina, niveles totales de proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina y pJunD y necrosis posterior.

La administración del inhibidor SP600125 (30mg/kg *i.p.*) antes o simultáneamente con APAP protegió a Jnk^{Ahepa} y atenuó la lesión hepática consiguiente. Estos hallazgos demuestran que JNK1 y JNK2 a nivel hepatocitario parecen tener efectos combinados de ámbito protector respecto a la lesión hepática inducida por CCl₄ y APAP. Además, se ha podido probar que el inhibidor SP600125 tiene efectos “off-target”.

La metilprednisolona (MP) se usa comúnmente en hepatología para el tratamiento de la lesión hepática aguda con características graves, a parte de otras indicaciones. El hecho de que recientemente se hayan publicado numerosos casos clínicos sobre daño hepático inducido por MP, en particular en pacientes que padecen enfermedades autoinmunes subyacentes, nos motivó a investigar esta circunstancia. Así en el *Capítulo 6⁵* quisimos contribuir a la caracterización de la expresión fenotípica de la lesión hepática inducida por MP e investigamos todos los casos disponibles declarados a las bases de datos DILI españolas y latinoamericanas (Spanish DILI Registry; Latin-American DILI Network). Se analizaron datos demográficos, clínicos, de laboratorio y de resolución. Adicionalmente, se proporcionó una revisión bibliográfica analizando casos de DILI inducidos por MP publicados anteriormente. Además, se realizó un análisis comparativo entre los nuevos eventos MP-DILI identificados en las bases de datos mencionadas anteriormente y los casos obtenidos anteriormente de la literatura. Tres mujeres jóvenes con esclerosis múltiple y una más con enfermedad de Crohn sufrieron una recaída aguda de su enfermedad y fueron tratadas con bolos intravenosos de MP. Después de una (paciente 3), dos (paciente 1) y cinco (paciente 2) y seis (paciente 4) semanas tras el inicio del tratamiento, se produjo un daño hepático. El tiempo de recuperación abarcó ocho y seis semanas para las pacientes 2 y 3 respectivamente, mientras que la paciente 1 mostró una tendencia a la resolución tras 10 semanas (pérdida de seguimiento) y la paciente 4 tras 2 semanas. Se produjo una reexposición positiva en tres de las pacientes (pacientes 2, 3 y 4). Un extenso análisis de la literatura resultó en un total de 45 eventos de lesión hepática inducida por MP. Estos se asociaron al género femenino (84%) y la edad promedio fue de 41 años. Las indicaciones más comunes para el tratamiento con MP fueron la esclerosis múltiple (EM; 24 casos) y la oftalmopatía de Graves (OG; 13 casos). Se observó daño hepatocelular como el patrón de daño predominante en todos los casos con datos disponibles y se detectaron autoanticuerpos positivos en el 35% de los enfermos. El tiempo medio de incubación fue de seis semanas. Cuatro casos desarrollaron un desenlace fatal. En 17 casos (38%) se produjo una reexposición positiva con el medicamento. Estos hallazgos indican que los pacientes que padecen EM y OG son particularmente susceptibles a sufrir un episodio de hepatotoxicidad inducida por MP.

El estudio incluido en el *Capítulo 7⁶* tuvo como objetivo analizar el intervalo temporal hasta alcanzar los marcadores de daño hepático la normalización, establecer la definición de cronicidad y determinar los factores de riesgo de la cronicidad en DILI. Se analizaron 298 individuos de un total de 850 pacientes incluidos en el Spanish DILI Registry sin enfermedad previa que afectara a hígado y se realizó seguimiento hasta alcanzar la resolución ≥ 1 año.

La cronicidad se definió como anormalidad presentada en una bioquímica hepática, prueba radiodiagnóstica o histopatología un año después del diagnóstico establecido de DILI. De los 298 pacientes incluidos en el estudio, 273 (92%) resolvieron ≤ 1 año a partir del diagnóstico de DILI y complementariamente los 25 pacientes restantes desarrollaron cronicidad (8%). Entre los factores de riesgo independientes para la condición de cronicidad en nuestra cohorte de DILI se encontraron la edad avanzada (OR: 1.06, $p=0.011$), dislipidemia (OR: 4.26, $p=0.04$) o la gravedad del episodio de DILI (OR: 14.22, $p=0.005$). Se determinaron valores promedios de alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP) y bilirrubina total (TB) mayores en el grupo de pacientes crónicos durante la fase de seguimiento. Asimismo, se pudo apreciar que los valores de ALP y TB $>1.1 \times$ límite superior de normal (xULN) y $2.8 \times$ ULN respectivamente, en el segundo mes tras el inicio del episodio de DILI, predicen la cronicidad del mismo ($p<0.001$). Las principales clases de fármacos asociadas a cronicidad en el presente análisis fueron las estatinas (24%) y los antibióticos (24%). El examen histopatológico en pacientes crónicos mostró dos casos con lesión ductal y siete con cirrosis hepática. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que un año es el mejor punto de corte para definir la cronicidad en DILI o una recuperación prolongada, con factores de riesgo la edad avanzada, dislipidemia y gravedad del episodio agudo. Las estatinas están claramente relacionadas con la cronicidad. Los valores de ALP y TB en el segundo mes podrían ayudar a predecir la cronicidad o una recuperación muy prolongada.

En el *Capítulo 8*, adjuntamos tres breves informes de casos clínicos sobre lesiones hepáticas inducidas por fármacos de etiología diversa originados en el entorno de nuestra práctica clínica, que seleccionamos por aportar alguna particularidad de interés para el aprendizaje. En el primer informe, se describe el caso de una mujer joven, que sufrió un fallo hepático fulminante y requirió un trasplante parcial de hígado. La causa del episodio hepático grave no estaba clara. Cuando se investigaron sus antecedentes previos, llamó la atención que la paciente había recibido un tratamiento reciente con ibuprofeno y que tomó ocasionalmente también acetaminofén, así como una serología positiva de HSV (*Herpes Simplex*). No obstante, la etiología del episodio no pudo ser adjudicada con precisión. Nuestro segundo caso clínico trató sobre una mujer cuya disfunción hepática fue descubierta tras sufrir una nueva exposición con el fármaco antidepresivo sertralina. Anteriormente, la paciente había presentado manifestaciones extramedulares de un síndrome de Walderström subyacente que inicialmente había actuado como factor de confusión y, en consecuencia, condujo a una nueva exposición accidental con sertralina. Nuestro tercer caso clínico hace referencia a una paciente que presentó rasgos de una enfermedad hepática crónica avanzada, que incluía cirrosis hepática avanzada y descompensaciones hidrópicas refractarias. Además, la paciente exhibió también miocardiopatía dilatada, pero no se pudo encontrar una causa plausible. Investigaciones más detalladas de sus antecedentes médicos previos revelaron que la paciente había estado en tratamiento crónico con el fármaco venlafaxina durante los cuatro años anteriores, siendo probablemente una reacción adversa medicamentosa la causa de su condición clínica. De interés, realizamos una prueba de genotipado para el citocromo P450

y descubrimos que la paciente presentaba variaciones polimórficas para CYP2D6, que eran compatibles con un metabolizador ultrarrápido de venlafaxina.

En el *Capítulo 9*⁷ se realizó una revisión bibliográfica sobre la reversibilidad de la fibrosis hepática. Se han descrito los modelos animales experimentales más representativos que se han utilizado para ampliar nuestro conocimiento sobre la fibrosis hepática hasta la fecha, sin embargo, estos están sujetos a diversas limitaciones que deben ser redefinidas en el futuro. Las extensas investigaciones realizadas en el campo durante las últimas décadas han demostrado que la condición de un hígado fibrótico puede ser reversible modificando el nicho inflamatorio subyacente, la eliminación o la involución de las células estrelladas hepáticas (hepatic stellate cells, HSC) activadas, así como la degradación de la matriz extracelular (extracellular matrix, ECM). Actualmente, existe un enorme arsenal terapéutico potencial dirigido a revertir la fibrosis hepática que se encuentra sometido a distintas fases de ensayos clínicos. Por lo tanto, ahora más que nunca, el prometedor progreso en la reversibilidad de la fibrosis hepática parece estar convirtiéndose en una realidad.

Previamente, hemos demostrado que las c-Jun N-terminal kinases (Jnk) juegan un papel crucial no solo en la enfermedad hepática aguda, sino también en la enfermedad hepática crónica (chronic liver disease, CLD). En el *Capítulo 10*⁸, nuestro objetivo fue investigar la relevancia de la inhibición de Jnk2 específicamente a nivel hepatocitario en un modelo experimental de CLD. La delección del gen *Jnk2* se realizó por partida doble en un primer modelo utilizando la modificación genética de *Jnk2* específicamente en hepatocitos ($JNK2^{\Delta\text{hepa}}$) en ratones NEMO/IKK γ ($NEMO^{\Delta\text{hepa}}$) y en un segundo modelo mediante la aplicación de siRNA dirigido contra *Jnk2* (siJnk2) *in vitro* e *in vivo* en ratones de tipo salvaje (WT) y $NEMO^{\Delta\text{hepa}}$, respectivamente. El seguimiento de progresión de enfermedad hepática se evaluó a partir de análisis de imágenes combinada de fluorescencia molecular y de tomografía microcomputada (FMT/ μ CT), análisis de expresión de proteínas, inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF) e histopatología, entre otros.

En ratones $NEMO^{\Delta\text{hepa}}$ de un año de edad, la delección de *Jnk2* resultó en la reducción de la fibrosis hepática y la hepatocarcinogénesis (HCC), como se observó en base a la reducción del número total de nódulos tumorales. Tanto los animales $NEMO/JNK2^{\Delta\text{hepa}}$ ($DKO^{\Delta\text{hepa}}$) como aquellos ratones $NEMO$ tratados con siJnk2 en una etapa avanzada de enfermedad experimentaron una importante mejoría como así demostraron el parénquima hepático, niveles séricos de enzimas hepáticas y marcadores de fibrogénesis. Adicionalmente, el tratamiento crónico con siJnk2 se asoció con una modificación de la respuesta inmune que se caracterizó por una reducción de la serie mieloide y un aumento en células T CD4⁺ y CD8⁺. Lo más importante es que el tratamiento crónico con siJnk2 redujo drásticamente la presencia de tumores hepáticos tanto premalignos como malignos reduciendo así la tumorigénesis en estos roedores. Curiosamente, siJnk2 dirigido específicamente contra la población hepatocitaria conllevó una disfunción hepática en fases tempranas de CLD en roedores $NEMO^{\Delta\text{hepa}}$. En éstos, siJnk2 provocó un aumento de las transaminasas hepáticas, apoptosis hepatocelular y proliferación compensatoria, un fenómeno que se pudo validar

asimismo en los animales DKO^{Δhepa} de 12 semanas de edad. Nuestros hallazgos por tanto demuestran el condicionamiento de Jnk2 dependiente del estadio de enfermedad en la progresión de CLD en ratones NEMO^{Δhepa}. En particular, la administración de siJnk2 específica a nivel hepatocelular desencadenó una mejoría de la hepatitis, fibrogénesis y tumorigénesis subyacente y, por lo tanto, podría convertirse una opción terapéutica muy atractiva para estrategias de medicina personalizada en CLD.

El objetivo en el *Capítulo 11*⁹ fue aportar nuevos conocimientos sobre el papel funcional de la señalización Fas en un modelo experimental de enfermedad hepática crónica (CLD). Con esta finalidad, se generaron ratones NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr}, mientras que animales NEMO^{Δhepa}, NEMO^{f/f} y Fas^{lpr} sirvieron como controles para el análisis comparativo y se procedió a caracterizar su fenotipo durante la progresión de CLD. El daño hepático fue evaluado a partir de parámetros bioquímicos, análisis histopatológico, inmunofluorescencia y otras técnicas bioquímicas y de biología molecular. La expresión de proteínas se analizó mediante Western Blot, los niveles de ARNm por RT-PCR y la infiltración de células inflamatorias se cuantificó mediante citometría de flujo. La mutación Fas^{lpr} en ratones NEMO^{Δhepa} llevó a una disminución general del daño hepático, una mayor supervivencia hepatocitaria y una reducción de la proliferación a las 8 semanas de edad en comparación con roedores NEMO^{Δhepa}. Además, en animales NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr} se detectó una disminución significativa de los parámetros de fibrosis hepática, tales como colágeno IA1, MMP2 y TIMP1, además de una reducción de macrófagos proinflamatorios y de la expresión de citocinas. A las 52 semanas de edad, roedores NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr} exhibieron un crecimiento de malignomas menor, como demostró la reducción en la carga de HCC asociada con un número significativamente menor de nódulos y una ratio LW/BW en la misma línea además de una disminución de células mieloides. La delección de TNFR1 contribuyó reduciendo aún más la carga tumoral de ratones NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr} de 52 semanas de edad. Así la funcionalidad del eje FasL/Fas podría condicionar el potencial tumorigénico inflamatorio-dependiente en un modelo experimental de CLD. Estos resultados permiten desarrollar enfoques terapéuticos alternativos y contrarrestar las limitaciones en la terapia antitumoral contra el HCC.

Zusammenfassung

In *Kapitel 1* wurde eine aktualisierte Literaturübersicht zur Thematik der arzneimittelinduzierten Leberschädigung durchgeführt (*engl.* drug-induced liver injury; *Abk.* DILI). Die wichtigsten Erkenntnisse und Beiträge aus den letzten Jahren wurden ausführlich behandelt und untersucht. Neben verschiedenen grundlegenden Definitionen und wesentlichen Klassifikationen, wurde ein besonderer Fokus auf die zugrunde liegende Physiopathologie, Mechanismen, klinischen Merkmale, Differentialdiagnosen, Kausalitätsbewertung und Risikofaktoren gelegt. Im Übrigen wurde eine zusammenfassende Übersicht zum Thema „Hepatozelluläres Karzinom“ sowie als auch eine Einführung in das experimentelle CLD-Modell „NEMO“ bearbeitet. Darüber hinaus wurden die Zielvorgaben und der Entwurf für die vorliegenden Untersuchungen resümierend dargestellt.

In *Kapitel 2*¹ wurde eine systematische Analyse durchgeführt, um die in der Literatur verfügbaren Informationen zur Ibuprofen-induzierten Leberschädigung zu analysieren. Unsere Untersuchung umfasste prospektive Hepatotoxizitätskohorten, Fallserien und Fallberichte, und die erhaltenen Daten wurden gründlich auf demografischer, klinischer, biochemischer und prognostischer Basis untersucht. Bemerkenswerterweise war Ibuprofen das häufigste gemeldete nichtsteroidale Antiphlogistikum in prospektiven DILI-Patientendatenbanken aus Spanien und Indien. Insgesamt zwölf von 22 identifizierten idiosynkratischen Ibuprofen-induzierten Leberschädigungsfällen hatten ein weibliches Geschlecht und ein Durchschnittsalter von 31 Jahren. Die durchschnittliche kumulative Dosis von Ibuprofen betrug 30g, während die Behandlungsdauer und die Latenzzeit entsprechend 14 und 12 Tage betrugen. Charakteristischerweise überwogen zytolytische Formen der Hepatotoxizität und in insgesamt sechs Fällen entwickelte sich ein Gallengangsverlustsyndrom. Die vollständige Genesung erfolgte nach einer durchschnittlichen Zeit von 14 Wochen, während in 5 Fällen ein akutes Leberversagen auftrat, das entweder zum Tod oder zur Notwendigkeit einer Lebertransplantation führte. Die vorgelegte Studie belegt, dass Ibuprofen in der Literatur sowie als auch in prospektiven DILI Datenbanken unverkennbar der Hepatotoxizität assoziiert werden kann. Infolgedessen, sollte der Wirkstoff Ibuprofen bei der Kausalitätsbewertung verdächtiger Lebervergiftungsfälle mitberücksichtigt werden. Ibuprofen-induzierte Leberschäden haben charakteristisch eine kurze Latenzzeit, spiegeln ein hepatozelluläres Schädigungsmuster wider und können im Schlimmsten der Fälle zu einem akuten Leberversagen und zur Notwendigkeit einer Lebertransplantation führen.

In *Kapitel 3*² wurden die Prävalenz und die Merkmale der im Spanish DILI Registry und Latin-American DILI Network gemeldeten Fälle von Ibuprofen-induzierten Leberschäden gründlich analysiert und charakterisiert. Ausschließlich Fälle in denen Ibuprofen als einzige Ursache in Betracht kam, wurden in die vorliegende Studie einbezogen. Um eine mögliche Arzneimittelnebenwirkungssignatur der Ibuprofen-assoziierten Hepatotoxizität zu untersuchen, wurden Ibuprofen DILI Ereignisse mit anderen DILI-Formen verursacht durch andere nichtsteroidale Antiphlogistika (*engl.* nonsteroidal antiinflammatory drugs; *Abk.* NSAIDs) und andere nicht-NSAID-Medikamente verglichen.

Eine Ibuprofen-Hepatotoxizitätskohorte von insgesamt 26 Ereignissen konnte erhalten werden, in der die Hälfte der Patienten ein weibliches Geschlecht hatten und das Durchschnittsalter bei 51 Jahren lag. Die meisten Patienten waren mit 1200 mg Ibuprofen pro Tag oder höheren Dosierungen behandelt worden (77%), der Medianwert der Behandlungsdauer betrug 16 Tage, und die mediane Behandlungsdauer umfasste 15 Tage. Darüber hinaus benötigten 58% der Patienten einen Klinikaufenthalt, bis zu 69% entwickelten einen Ikterus und 50% erfüllten Hypersensibilitätskriterien. Die hepatozelluläre Schädigung war das häufigste Leberschädigungsmuster (69%). Der durchschnittliche BMI Wert lag bei Ibuprofen DILI Patienten höher als bei DILI Patienten anderer Genesen ($p=0.06$). Die mediane Latenzzeit hatte im Fall der Ibuprofen

Hepatotoxizität eine kürzere Dauer (15 Tage). Diabetes mellitus war als Begleiterkrankung bei Ibuprofen DILI Patienten signifikanterweise häufiger präsent ($p=0.038$). Die Rate an Todesfällen und Lebertransplantationen lag bei Patienten mit Ibuprofen-induziertem Leberversagen wesentlich höher (12%) als vergleichsweise bei den Fällen, die durch andere NSAID (5%) oder nicht-NSAID Wirkstoffen (3%) verursacht wurden.

Aus diesem Grund sollten Ibuprofen-induzierte Leberschädigungsspatienten einer strengeren Verlaufskontrolle und Nachsorge unterzogen werden. Unsere Daten zeigten, dass idiosynkratische Mechanismen immunallergischen und metabolischen Ursprungs eine relevantere Rolle bei der toxischen Ibuprofen-induzierten Hepatopathie spielen könnten. Des Weiteren, sind umfangreichere Studien nötig um die Rolle des Wirkungsstoffes Ibuprofen in der Hepatotoxizität präziser abklären zu können.

Unsere vorherigen Untersuchungen haben uns dazu veranlasst, die mit Ibuprofen-induzierten Leberschäden verbundenen Mechanismen weiter vertieft zu untersuchen. In Kapitel 4³ wurde zu diesem Anlass ein experimentelles Ibuprofen-induziertes Hepatotoxizitätsmodell *in vitro* und *in vivo* entwickelt, um die der Ibuprofen-induzierten toxischen Hepatitis zugrunde liegenden pathomolekularen Mechanismen näher analysieren zu können. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Zytotoxizitätsanalysen mit dem Wirkstoff Ibuprofen *in vitro* an Hepa 1-6 und HepaRG Zelllinien durchgeführt, die später auf primäre Maushepatozyten übertragen wurden, welche frisch aus 8 Wochen alten Wt Mäusen isoliert worden waren. Anschließend wurden unsere Studien mit einem *in vivo* Mausmodell der Ibuprofen-induzierten Hepatotoxizität vervollständigt. Dafür wurden männliche C57BL/6-Mäuse (im Alter von 6-8 Wochen), denen das Futter über Nacht entzogen worden war, *i.p.* mit 600 mg/kg Ibuprofen behandelt und 8 Stunden später eingeschlafert und eliminiert. Um die Rolle der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) untersuchen zu können, wurden zusätzlich Tiere mit konstitutiver Deletion von Jnk1 ($Jnk1^{-/-}$) oder Jnk2 ($Jnk2^{-/-}$) generiert und verwendet. Als nächstes erweiterten wir unsere Untersuchung der Jnk Gene spezifisch auf Hepatozyten und generierten dafür Mäuse die einen Mangel an Jnk1 nur in Hepatozyten ($Jnk1^{\Delta\text{hepa}}$) aufwiesen. Um Tiere mit einer redundanten Expression von Jnk2 auf hepatozellulärer Ebene zu erzeugen, wurden Wt Mäuse mit 0.2 mg/kg einer Jnk2-gerichteten siRNA (siJnk2^{Δhepa}) eine Woche vor dem Versuchsvorhaben in die Schwanzvene injiziert. Des Weiteren, wurde in einem translationalen Ansatz die Rolle von JNK in menschlichen Lebergewebepräparaten untersucht, die von Patienten stammten, welche an einer Ibuprofen-induzierten Leberschädigung gelitten hatten. Eine verstärkte JNK Phosphorylierung war im Zytoplasma von Hepatozyten in den Ibuprofen-induzierten Leberschädigungsgewebeproben im Vergleich zu gesundem Gewebepräparaten sowohl auf menschlicher als auch auf mausspezifischer Ebene zu erkennen. Die Ibuprofen Behandlung führte in Mäusen zu einem Leberschaden im Vergleich zu den Vehikel-injizierten Kontrollmäusen, basierend auf biochemische Leberenzymparameter und der histologischen Auswertung der jeweiligen Lebergewebepräparaten. Bemerkenswerterweise zeigten siJnk2^{Δhepa}-Tiere einen wesentlich stärkeren Leberschaden nach eingeleiteter Ibuprofen Hepatotoxizität, was mit

signifikant höheren Transaminasen und einer verschlechterten Leberhistologie im Vergleich zu $Jnk1^{\Delta hepa}$ - oder Wt-Mäusen korrelierte. Als nächstes wurden im Kontext der mausspezifischen Ibuprofen-induzierten toxischen Hepatitis molekulare Signalwege erforscht und dabei wurde eine erhöhte Aktivierung von $PKC\alpha$, AKT und JNK festgestellt. Die vorliegende Ergebnisse zeigten zusammenfassend eine dominante zytoplasmische JNK-Aktivierung in Hepatozyten als Merkmale der Ibuprofen-ausgelösten Leberschädigung in Mensch und Maus. Die Hemmung der JNK2 Expressierung in Hepatozyten war mit einer äußerst verschlechterten Antwortreaktion auf eine durch Ibuprofen-induzierte toxische akute Leberschädigung verbunden, was auf eine protektive Rolle des $Jnk2$ Gens in Leberparenchymzellen hinweisen lässt.

Wie bereits nachgewiesen spielt der JNK-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Physiopathologie akuter und chronischer Lebererkrankungen. Zu diesem Zweck wurde in *Kapitel 5*⁴ Lebergewebepräparate von Patienten mit arzneimittelinduziertem Leberschaden auf JNK untersucht. Gleichzeitig wurde die Hepatozyten-abhängige Rolle von JNK anhand verschiedener Toxin-induzierter Leberschadenversuchsmodellen in Nagetieren experimentell untersucht. Histologische Leberschnitte von DILI Patienten, deren Genese durch verschiedene Wirkstoffe verursacht wurden, sind untersucht worden und dabei wurde das JNK-Expressionsprofil analysiert. Parallel dazu wurden Mäuse mit hepatozytenspezifischer Deletion von $Jnk1$ ($Jnk1^{\Delta hepa}$) oder kombinierter $Jnk1$ - und $Jnk2$ ($Jnk^{\Delta hepa}$)-Deletion sowie $Jnk1$ -gefloxt C57BL/6 (Kontroll)-Mäuse generiert. Diese wurden dann entweder Injektionen mit CCl_4 ausgesetzt (zur Auslösung einer Leberfibrose; 0.6ml/kg *i.p.* jede 3 Tage für 4 Wochen) oder mit Paracetamol behandelt (zur Induktion einer akuten toxischen Hepatitis; 500mg/kg *i.p.*). Diesbezüglich zeigten Lebergewebepräparate von DILI-Patienten ein erhöhtes JNK Aktivierungsprofil, hauptsächlich in Hepatozytzellkernen und in Immunzellen, im Gegensatz zu gesundem Gewebe. Die Injektion von Paracetamol bewirkte eine schwergradige Leberschädigung in $Jnk^{\Delta hepa}$ -Mäusen verglichen mit $Jnk1^{\Delta hepa}$ - oder Kontrollnagetieren, basierend auf enzymatische Leberserummarker und der mikroskopischen Auswertung von murinem Lebergewebe. Die Verabreichung von CCl_4 verursachte auch eine stärkere Leberschädigung bei $Jnk^{\Delta hepa}$ -Mäusen, die auf eine erhöhte Entzündung und Zellproliferation, und Fortschreitung der Leberfibrose im Vergleich zu $Jnk1^{\Delta hepa}$ -Mäusen oder Kontrollmäusen beruhte. Hepatozyten aus $Jnk^{\Delta hepa}$ -Mäusen, die mit Paracetamol *in vitro* behandelt worden waren, zeigten einen erhöhten oxidativen Stress, was zu einer verminderten Phosphorylierung der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPK), gesenkten Gesamt-AMPK und pJUND Spiegeln, und einschließlich zu einem verminderten Nekroseschaden im Leberparenchym führte. Die Verabreichung vom JNK Inhibitor SP600125 (30 mg/kg *i.p.*) vor oder konkomitierend mit der Paracetamolgabe schützte $Jnk^{\Delta hepa}$ - und Kontrollmäuse vor dem Leberschaden. Diese Ergebnisse zeigen, dass JNK1 und JNK2 auf hepatozellulärer Ebene kombinierte protektive Wirkungen gegen dem CCl_4 - und Paracetamol-induzierten Leberschaden haben. Zusätzlich zeigt der JNK-Inhibitor SP600125 Nebeneffekte.

Methylprednisolon (Abk. MP) wird neben vielen anderen Indikationen auch bei der Behandlung vom akuten Leberversagen eingesetzt. Die Tatsache, dass kürzlich mehrere Fallberichte über MP-induzierte Leberschäden veröffentlicht worden sind, insbesondere bei Patienten, die Autoimmunerkrankungen erlitten, ermutigte uns, diesen Sachverhalt näher zu untersuchen. In *Kapitel 6*⁵ wollten wir daher zur Charakterisierung des Phänotyps der MP-induzierten Leberschädigung beitragen und haben alle verfügbaren Fälle, die in den Spanish DILI Registry und Latin-American DILI Network Datenbanken gemeldet wurden überprüft. Demografische, klinische, Labordiagnostische- und Verlaufparameter wurden analysiert. Zusätzlich wurde eine umfangreiche Recherche der in der Literatur bereits veröffentlichten MP-induzierten Leberschädigungsberichten durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine komparative Analyse dieser Fälle mit denen aus unserer Patientendatenbanken vervollständigt. Drei Frauen jungen Alters mit Multipler Sklerose und eine weitere Frau mit Morbus Crohn erlitten ein Rezidiv und wurden mit intravenösen MP-Boli akut behandelt. Eine (Patientin 3), zwei (Patientin 1), fünf (Patientin 2) und sechs (Patientin 4) Wochen nach Beginn der MP-Boli Verabreichung trat ein Leberschaden auf. Die Zeitdauer bis zur vollständigen Genesung betrug bei Patientin 2 und 3 entsprechend acht und sechs Wochen, während bei Patientin 1 nach 10 Wochen (Verlaufsabbruch) und bei Patient 4 nach 2 Wochen eine Besserungstendenz zu sehen war. Bei drei der Patientinnen (2, 3 und 4) trat ein weiteres lebertoxisches Geschehen auf, welches auf eine erneute Aussetzung zum Wirkstoff MP zurückzuführen war. Die ausführliche Literaturanalyse ergab insgesamt 45 MP-induzierte Leberschädigungsereignisse. Diese wurden mit dem weiblichen Geschlecht in Verbindung gebracht (84%) und das Durchschnittsalter betrug 41 Jahre. Die häufigsten Indikationen für die Behandlung mit MP waren Multiple Sklerose (MS; 24 Fälle) und Morbus Basedow Ophthalmopathie (GO; 13 Fälle). Hepatozelluläre Formen des Leberschadens wurden in allen den Fällen mit verfügbaren Daten als das prädominanteste Leberverletzungsmuster beobachtet, und bei 35% der Patienten konnten positive Autoantikörper nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Behandlungsdauer betrug sechs Wochen. Vier Fälle hatten einen tödlichen Ausgang. In 17 Fällen (38%) folgte ein weiteres lebertoxisches Geschehen nach erneuter Therapie mit dem Medikament MP. Diese Befunde weisen darauf hin, dass Patienten mit MS und GO besonders anfällig für die MP-induzierte Leberschädigung sind.

Die in *Kapitel 7*⁶ enthaltene Studie zielte darauf ab, den optimalsten Zeitpunkt zur Unterscheidung zwischen akute und chronische idiosynkratische arzneimittel-induzierten Leberschädigung fest zu legen. Bis zu 298 von insgesamt 850 im Spanish DILI Registry gemeldete Patienten, bei denen keine vorgängige Lebererkrankung vorlag und die eine Verlaufskontrolle von ≥ 1 Jahr aufwiesen, wurden ausführlich untersucht. Chronizität wurde als abnorme Leberbiochemie, Leberbildgebung oder Leberhistologie ein Jahr nach Erstellung der DILI-Diagnose definiert. Von den 298 gemeldeten Patienten, war in 273 Patienten (92%) die DILI Diagnose ≤ 1 Jahr erstellt worden und in den restlichen 25 Patienten (8%) geschah dies zu einem späteren Zeitpunkt (chronische Fälle). Unabhängige Risikofaktoren für Chronizität waren hohes Alter (OR: 1.06, $p=0.011$), Dyslipidämie (OR:

4.26, $p=0.04$) und schwerergradiges DILI (OR: 14.22, $p=0.005$). Die Mittelwerte für Alaninaminotransferasen (ALT), alkalische Phosphatasen (ALP) und Gesamtbilirubin (TB) waren in der chronischen Gruppe im Verlauf höher. Es konnte festgestellt werden, dass TB- und ALP-Werte entsprechend $>1,1x$ über die Normbereichsgrenze ($xULN$) und $2,8xULN$ im zweiten Monat nach Beginn des Leberschadens, ein chronisches arzneimittelinduziertes Leberschadengeschehen vorhersagen können ($p<0.001$). Die meistverbreiteten an der Chronizität beteiligten Wirkstoffklassen waren Statine (24%) und Antiinfektiva (24%). Die histologische Auswertung in Lebergewebeproben bei chronischen DILI Patienten ergab zwei Fälle mit Gallengangschädigung und sieben Fälle mit Leberzirrhose. Die erzielten Ergebnisse zeigten, dass der ein Jahres Zeitpunkt der geeignetste Grenzwert für die Definition eines chronischen arzneimittel-induzierten Leberschadens ist, wobei fortgeschrittenes Alter, Dyslipidämie und Schweregrad des Leberschadengeschehens als Risikofaktoren zurückzuführen sind. Statine wurden signifikanterweise mit der Chronizität in arzneimittelinduzierten Leberschäden assoziiert. ALP- und TB-Werte könnten im zweiten Erkrankungsverlaufsmonat nach Erstellung der DILI Diagnose die Chronizität oder zumindest einen längeren Genesungsverlauf prognostizieren.

In *Kapitel 8* haben wir drei kleine Fallberichte über arzneimittelinduzierte Leberschäden verschiedener Genesen aus unserer alltäglichen klinischen Praxis ausgewählt, die einen interessanten Lerninhalt darstellten. Im ersten Fallbericht wird der Fall einer jungen Frau beschrieben, die einen akuten Leberversagen erlitt und eine Lebertransplantation benötigte. Die Ursache für die schwere Lebererkrankung war initial unklar. Nachdem die klinische Vorgeschichte untersucht wurde, rückten eine vor kurzem stattgefundene Behandlung mit Ibuprofen und eine gelegentliche Paracetamoleinnahme sowie eine positive Serologie für HSV (*Herpes-Simplex-Virus*) ins Rampenlicht. Trotzdem konnte die Ätiologie nicht eindeutig geklärt werden. Unser zweiter Fallbericht befasste sich mit einer Patientin, deren Leberfunktionsstörung nach einer zweiten Aussetzung dem Antidepressivum Sertralin aufgedeckt werden konnte. Zuvor hatte sich die Patientin mit extramedullären Manifestationen eines zugrunde liegenden Morbus Waldenström vorgestellt, der zunächst als Störfaktor gewirkt hatte und in der Folge zu einer erneuten versehentlichen Behandlung mit Sertralin führte. Fallbericht 3 bezog sich auf eine Patientin mit fortgeschrittener chronischer Lebererkrankung, einschließlich Leberzirrhose und wiederholter refraktärer hydropischer Dekompensation. Zusätzlich wies die Patientin eine erweiterte Kardiomyopathie auf, jedoch konnte keine einleuchtende Ursache am Anfang gefunden werden. Eine detaillierte Untersuchung ihrer Krankengeschichte zeigte retrospektiv, dass die Patientin in den vier vorherigen Jahren mit Venlafaxin kontinuierlich behandelt worden war, sodass dies höchstwahrscheinlich das Antezedens für ihren klinischen Zustand war. Interessanterweise führten wir einen Gentest für die Cytochrom-P450-Isoenzymfamilie durch und stellten fest, dass die Patientin polymorphe Variationen für CYP2D6 aufwies, die sie mit einem ultraschnellen Metabolisierer (*engl.* ultrarapid metabolizer) für Venlafaxin kompatibel machten.

In *Kapitel 9*⁷ wurde eine detaillierte Revision über das Thema der Reversibilität der Leberfibrose durchgeführt. Es wurden die repräsentativsten Tiermodelle behandelt, die allgemein verwendet werden und die uns zur Erweiterung unserer Erkenntnisse bezüglich der Leberfibrose verholfen haben. Diese unterliegen jedoch verschiedenen Einschränkungen, die in der Zukunft neu definiert werden müssen. Die umfangreichen Untersuchungen, die in den letzten Jahrzehnten auf diesem Gebiet durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass der Verlauf einer fibrotischen Leber durch Modulation der zugrunde liegenden Entzündungsnische, Eliminierung oder Rückbildung aktivierter hepatischer Sternzellen sowie Abbau von extrazellulärer Matrix reversibel sein kann. Derzeit steht ein enormes potenzielles Therapiearsenal zur Bekämpfung der Leberfibrose zur Verfügung, das, wie hier gezeigt, in klinischen Studien mit besonderem Schwerpunkt auf Fettleberpatienten aktuell untersucht wird. Daher scheint der vielversprechende Fortschritt der Reversibilität der Leberfibrose mehr denn je wahrhaft zu werden.

Zuvor haben wir gezeigt, dass die c-Jun N-terminale Kinasen (Jnk) eine entscheidende Rolle nicht nur bei akuten Lebererkrankungen, sondern auch bei chronischen Lebergeschehen (*engl.* chronic liver disease; *Abk.* CLD) spielen. In *Kapitel 10*⁸ wollten wir die Relevanz der Hepatozyten-spezifischen *Jnk2*-Hemmung in einem experimentellen CLD-Modell untersuchen. Die genetische Deletion des *Jnk2*-Gens wurde unter Verwendung der Hepatozyten-spezifischen Deletion von *Jnk2* ($JNK2^{\Delta\text{hepa}}$) in NEMO/IKK γ -Mäusen ($NEMO^{\Delta\text{hepa}}$) und durch die Anwendung einer *Jnk2*-gerichteten siRNA (siJnk2; siRNA-Silencing) *in vitro* und *in vivo* in Wildtyp-Mäusen (WT) bzw. in $NEMO^{\Delta\text{hepa}}$ -Mäusen durchgeführt. Der Krankheitsverlauf wurde durch Analysen aus kombinierter molekularer Fluoreszenztomographie und mikrocomputertomographische Bildgebung (FMT/ μ CT), Serumparameter, Proteinexpression, Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, Durchflusszytometrien und Histopathologie untersucht und ausgewertet. Bei einjährigen $NEMO^{\Delta\text{hepa}}$ -Mäusen führte die *Jnk2*-Deletion zu einer Verringerung der Leberfibrose und Hepatokarzinogenese (HCC), die sich durch eine verminderte Gesamtzahl von HCC-Herde widerspiegelte. Sowohl $NEMO/JNK2^{\Delta\text{hepa}}$ ($DKO^{\Delta\text{hepa}}$) als auch *Jnk2*-Herunterregulierung durch eine Hepatozyten-spezifische *Jnk2*-siRNA in NEMO-Mäusen im Endstadium führten zu einer deutlichen Besserung des Leberparenchyms, der Leberserumwerte und der Fibrogenesemarker. Darüber hinaus bewirkte die Behandlung mit siJnk2 im CLD Spätstadium eine Veränderung der Immunantwort, welche sich durch eine Senkung der myeloiden Zellpopulationen und einem Anstieg der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen charakterisierte. Relevanter Weise korrelierte die siJnk2 Therapie mit einer Verminderung von prä- und malignen Lebertumoren, was einer verringerten Tumorgenese entsprach. In Gegensatz dazu beeinträchtigte die Hepatozyten-spezifische siJnk2 die Leberfunktion im Frühstadium des CLD bei $NEMO^{\Delta\text{hepa}}$ -Mäusen. Hier korrelierte die siJnk2 Therapie mit erhöhten Lebertransaminasenwerten, vermehrter hepatozelluläre Apoptose und kompensatorische Proliferation, ein Phänomen, das wir ebenfalls bei 12 Wochen alten $DKO^{\Delta\text{hepa}}$ -Mäusen validieren konnten. Unsere Ergebnisse zeigten hiermit eine stadienabhängige Rolle von Jnk2 im Verlauf des CLD bei $NEMO^{\Delta\text{hepa}}$ -Mäusen. Der

therapeutische Eingriff mit der Hepatozyten-gerichteten siRNA gegen das Gen *Jnk2* verbesserte insbesondere den Hepatitisbefund, die Fibrogenese und zu guter Letzt die Tumorgenese, und könnte daher eine strategisch attraktive Therapiemöglichkeit im Rahmen der personalisierten Medizin im Kampf gegen das CLD sein.

Das Ziel in *Kapitel 11*⁹ war es, die funktionelle Rolle des FasL/Fas-Systems in einem experimentellen Modell der chronischen Lebererkrankung aufzudecken. Wir erzeugten daher NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr}-Mäuse, wobei NEMO^{Δhepa}, NEMO^{ff} sowie Fas^{lpr}-Tiere als Kontrollen dienten, und charakterisierten deren Phänotyp im Verlauf der Lebererkrankung. Der Leberschaden wurde durch Serumleberwerte, histologische- und immunfluoreszenz-Untersuchungsverfahren sowie als auch durch biochemische und molekularbiologische Techniken ausgewertet. Zusätzlich wurde die Proteinexpression durch Western Blot nachgewiesen, mRNA durch RT-PCR gemessen und die Entzündungszelleninfiltration durch Durchflusszytometrieanalysen quantifiziert. Die Fas^{lpr}-Mutation in NEMO^{Δhepa}-Mäusen führte im Vergleich zu NEMO^{Δhepa}-Tieren zu einer insgesamt verminderten Leberschädigung, einer verbesserten Hepatozytenviabilität und einer verringerten Zellproliferation im Frühstadium. Es zeigte sich in NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr}-Tieren signifikant gesenkte Leberfibrosemarker (Kollagen IA1, MMP2 und TIMP1), eine verringerte Anzahl proinflammatorischer Makrophagen und eine eingedämmte Zytokinexpression. Im Spätstadium (52 Wochen) wiesen NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr}-Mäuse ein geringeres Malignomwachstum auf, was durch eine reduzierte HCC-Belastung in Kombination mit einer signifikant gesenkten Anzahl von Tumorherden, einem verringerten LW/BW-Verhältnis und einer niedrigen myeloiden Zellpopulation belegt werden konnte. Die Deletion von TNFR1 verringerte die Tumorlast von NEMO^{Δhepa}/Fas^{lpr}-Mäusen zusätzlich im Spätstadium. Die Modulierung des FasL/Fas-Systems könnte daher einen einflussreichen Eingriff in der entzündungsabhängigen Tumorgenese im experimentellen CLD darstellen. Die vorliegenden Ergebnisse erweitern den Therapieansatzhorizont und bieten eine innovative Alternative die bestehende Einschränkungen im Kampf gegen dem HCC zu durchbrechen.

References

1. Zoubek ME, Lucena MI, Andrade RJ, et al. Systematic review: ibuprofen-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther* 2020;51:603-611.
2. Zoubek ME, Gonzalez-Jimenez A, Medina-Caliz I, et al. High Prevalence of Ibuprofen Drug-Induced Liver Injury in Spanish and Latin-American Registries. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018;16:292-294.
3. Zoubek ME, Woitok MM, Sydor S, et al. Protective role of c-Jun N-terminal kinase-2 (JNK2) in ibuprofen-induced acute liver injury. *J Pathol* 2018.
4. Cubero FJ, Zoubek ME, Hu W, et al. Combined Activities of JNK1 and JNK2 in Hepatocytes Protect Against Toxic Liver Injury. *Gastroenterology* 2016;150:968-81.
5. Zoubek ME, Pinazo-Bandera J, Ortega-Alonso A, et al. Liver injury after methylprednisolone pulses: A disputable cause of hepatotoxicity. A case series and literature review. *United European Gastroenterol J* 2019;7:825-837.
6. Medina-Caliz I, Robles-Diaz M, Garcia-Munoz B, et al. Definition and risk factors for chronicity following acute idiosyncratic drug-induced liver injury. *J Hepatol* 2016;65:532-42.

7. Zoubek ME, Trautwein C, Strnad P. Reversal of liver fibrosis: From fiction to reality. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2017;31:129-141.
8. Voitok MM, Zoubek ME, Doleschel D, et al. Lipid-encapsulated siRNA for hepatocyte-directed treatment of advanced liver disease. *Cell Death Dis.* 2020;11(5):343.
9. Cubero FJ, Voitok MM, Zoubek ME, et al. Disruption of the FasL/Fas axis protects against inflammation-derived tumorigenesis in chronic liver disease. *Cell Death Dis* 2019;10:115