

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

**Autoreferát disertační práce**



**Metabolická a genetická rizika vzniku a rozvoje nealkoholové tukové choroby jater u pacientů po transplantaci jater a její význam pro přežívání pacientů a štěpů**

**Metabolic and genetic risks of development of non-alcoholic fatty liver disease in patients after liver transplantation and its impact on patient and graft survival**

**MUDr. Mgr. Irena Míková, roz. Hejlová**

Praha, 2022

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

**Studijní obor:** Fyziologie a patofyziologie člověka

**Předseda oborové rady:** prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc.

**Školící pracoviště:** Institut klinické a experimentální medicíny, Praha, Česká republika

**Školitel:** MUDr. Pavel Trunečka, CSc.

**Konzultant:** prof. MUDr. Mgr. Milan Jirsa, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

<b>Obsah</b>	
Souhrn.....	4
Abstract.....	5
1. Úvod.....	6
1.1. Prevalence nealkoholové tukové choroby jater (NAFLD) v obecné populaci a u pacientů po transplantaci jater (LT).....	6
1.2. Získané příčiny NAFLD v obecné populaci a u pacientů po LT.....	6
1.3. Metabolické rizikové faktory NAFLD v obecné populaci a u pacientů po LT.....	7
1.4. Genetické rizikové faktory NAFLD v obecné populaci a u pacientů po LT.....	7
1.5. Souhrn patogeneze nealkoholové steatohepatitidy (NASH).....	8
1.6. Význam NAFLD v obecné populaci a u pacientů po LT.....	8
2. Cíle disertační práce.....	8
3. Metodika.....	9
4. Výsledky a diskuze.....	9
4.1. Hodnocení prevalence, vývoje, rizikových faktorů a významu steatózy po LT (publikace č.1 k tématu disertace).....	9
4.1.1. Prevalence, incidence a vývoj steatózy/steatohepatitidy po LT.....	9
4.1.2. Předtransplantační a potransplantační metabolické rizikové faktory steatózy/steatohepatitidy po LT.....	9
4.1.3. Vliv steatózy/steatohepatitidy po LT na progresi fibrózy a funkci štěpu.....	10
4.1.4. Vliv steatózy po LT na celkovou a jaterní mortalitu pacientů.....	10
4.1.5. Diskuze.....	11
4.2. Význam genotypů <i>TM6SF2</i> rs58542926 a <i>PNPLA3</i> rs738409 dárce a příjemce v patofyziologii steatózy po LT (publikace č.2 k tématu disertace).....	11
4.2.1. Frekvence genotypů <i>TM6SF2</i> rs58542926 a <i>PNPLA3</i> rs738409 u příjemců, dárců a v obecné populaci.....	11
4.2.2. Příspěvek genotypů <i>TM6SF2</i> rs58542926 a <i>PNPLA3</i> rs738409 dárce a příjemce k rozvoji steatózy po LT.....	12
4.2.3. Vliv interakce alel <i>TM6SF2</i> c.499A a <i>PNPLA3</i> c.444G dárce na obsah jaterního tuku po LT.....	13
4.2.4. Účinky alel <i>TM6SF2</i> c.499A a <i>PNPLA3</i> c.444G dárce významně stoupají s vyšším BMI příjemce.....	13
4.2.5. Alely <i>TM6SF2</i> c.499A a <i>PNPLA3</i> c.444G dárce a alela <i>PNPLA3</i> c.444G příjemce jsou asociovány s vyšším NAS v hodnocené biopsii.....	13
4.2.6. Diskuze.....	13
4.3. Význam inzulínové rezistence (IR) pro vznik a progresi NAFLD po LT (publikace č.3 k tématu disertace).....	14
4.3.1. Prevalence a vývoj IR před a po LT.....	14
4.3.2. Vztah předtransplantační IR a klinických a metabolických faktorů.....	15
4.3.3. Vztah potransplantační IR a klinických a metabolických faktorů a podávané imunosuprese.....	15
4.3.4. Vztah potransplantační IR ke vzniku a progresi NAFLD po LT.....	15
4.3.5. Diskuze.....	15
5. Závěry.....	16
6. Seznam zkratk.....	17
7. Literatura.....	17
8. Seznam publikací.....	20

## Souhrn

Nealkoholová tuková nemoc jater (NAFLD) se často vyskytuje nejen v obecné populaci, ale i u pacientů po transplantaci jater (LT). Data o prevalenci, vývoji, příčinách a významu steatózy u pacientů po LT jsou omezená. V rozsáhlé retrospektivní studii pacientů po LT s histologickým hodnocením steatózy jsme zjistili vysokou prevalenci steatózy (56,4 %) a steatohepatitidy (10,4 %), přičemž prevalence steatózy narůstala s dobou od LT. Mezi předtransplantační prediktory steatózy patřily alkoholická cirhóza a vysoké BMI, naopak zvýšená hodnota alkalické fosfatázy a počáteční imunosuprese s mykofenolát mofetilem měly protektivní účinek. Mezi potransplantační prediktory přítomnosti steatózy patřily BMI, sérové triglyceridy, konzumace alkoholu a přítomnost diabetu 2. typu, zatímco vyšší hladina sérového kreatininu měla protektivní účinek. Přítomnost významné steatózy/steatohepatitidy po LT nebyla doprovázena vyšším stupněm fibrózy. Výskyt steatózy byl srovnatelný u funkčních a selhaných štěpů. Přežívání pacientů s významnou steatózou a bez ní bylo srovnatelné, ale s patrným trendem k vyšší dlouhodobé mortalitě pacientů s významnou steatózou. Při hodnocení významu genotypů *TM6SF2* rs58542926 a *PNPLA3* rs738409 dárce a příjemce v patofyziologii steatózy po LT jsme zjistili, že na zvýšení obsahu tuku v transplantovaných játrech mají nezávislý a aditivní vliv alely *TM6SF2* c.499A a *PNPLA3* c.444G dárce (jaterní exprese), vliv genotypů příjemce (mimojaterní exprese) jsme neprokázali. Účinky alel *TM6SF2* c.499A a *PNPLA3* c.444G dárce významně stoupají s vyšším BMI příjemce. V následné prospektivní studii jsme potvrdili, že vznik potransplantační NAFLD i její progresse do NASH a fibrotizující formy souvisí s potransplantační inzulinovou rezistencí (IR), která má úzký vztah k nárůstu BMI. Neprokázali jsme význam podávané imunosuprese pro vznik a stupeň potransplantační IR.

**Klíčová slova:** Steatóza, NAFLD, NASH, transplantace jater, *PNPLA3*, *TM6SF2*, inzulinová rezistence, imunosuprese

## **Abstract**

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) occurs frequently not only in the general population, but also in liver transplant (LT) recipients. The data about prevalence, evolution, causes and significance of steatosis in patients after LT are limited. In a large retrospective study in LT recipients with histological evaluation of steatosis, we found high prevalence of steatosis (56,4 %) and steatohepatitis (10,4 %), the prevalence of steatosis increased over time since LT. Pretransplant predictors of steatosis included alcoholic cirrhosis and high BMI, whereas increased alkaline phosphatase and initial immunosuppression with mycophenolate mofetil were protective. Posttransplant predictors of steatosis included BMI, serum triglycerides, alcohol consumption and presence of type 2 diabetes mellitus, whereas increased serum creatinine was protective. Presence of significant steatosis/steatohepatitis was not associated with increased grade of fibrosis. There was no difference between the occurrence of steatosis in functioning and lost grafts. Survival of patients with/without significant steatosis was similar with a trend to higher long-term mortality of patients with significant steatosis. In the evaluation of the impact of *TM6SF2* rs58542926 and *PNPLA3* rs738409 genotypes of the donor and recipient on pathophysiology of steatosis after LT, we found that *TM6SF2* c.499A and *PNPLA3* c.444G alleles of the donor (hepatic expression), but not of the recipient (extrahepatic expression) predicted increased liver fat content after LT and their effect was additive. The effect of the donor *TM6SF2* c.499A and *PNPLA3* c.444G alleles increased with higher BMI of the recipient. In a subsequent prospective study, we confirmed that posttransplant NAFLD and its progression to NASH and graft fibrosis is linked with posttransplant insulin resistance (IR), which has a close relationship to increase of BMI. We did not prove the effect of immunosuppression on posttransplant IR.

**Key words:** Steatosis, NAFLD, NASH, liver transplantation, PNPLA3, TM6SF2, insulin resistance, immunosuppression

## 1. Úvod

Nealkoholová tuková choroba jater (NAFLD; non-alcoholic fatty liver disease) je charakterizovaná nadměrným hromaděním tuku v játrech (steatózou) spojeným s inzulinovou resistencí (IR) <sup>1</sup>. NAFLD je jedním z nejčastějších jaterních onemocnění s narůstající prevalencí, což mimo jiné značně komplikuje dárcovský program transplantací jater (LT; liver transplantation) vzhledem k významně zvýšenému riziku ztráty štěpu postiženého středně těžkou až těžkou steatózou. NAFLD je navíc spojena s vyšší celkovou a kardiovaskulární mortalitou a morbiditou, u části pacientů pak progresivní forma onemocnění označovaná jako nealkoholová steatohepatitida (NASH; non-alcoholic steatohepatitis) dospěje v důsledku progredující fibrózy až do stádia nevratného selhání jater vyžadujícího transplantační léčbu. O narůstajícím významu onemocnění svědčí dramatický nárůst indikací k LT pro NASH cirhózu v posledních letech. O výskytu, příčinách, vývoji a významu NAFLD po LT, ať již jako rekurentní formy či onemocnění *de novo*, existuje jen omezené množství dat.

V klinických doporučeních Evropské asociace pro studium jater (EASL; European Association for the Study of the Liver) z roku 2016 je steatóza definována jako přítomnost tuku ve > 5 % hepatocytů při histologickém vyšetření jater nebo >5,6 % při hodnocení protonovou magneticko-rezonanční spektroskopií (<sup>1</sup>H MRS) nebo MR zobrazením <sup>1</sup>. NAFLD zahrnuje dva odlišné stavy s rozdílnou prognózou: nealkoholovou steatózu (NAFL; non-alcoholic fatty liver), která je definována jako přítomnost jaterní steatózy bez průkazu hepatocelulárního poškození, a NASH, což je přítomnost jaterní steatózy a zánětu se současným poškozením hepatocytů (balónovou degenerací). Ke stanovení diagnózy NAFLD jakožto primárního onemocnění je nutné vyloučit sekundární příčiny steatózy/steatohepatitidy a významnou konzumaci alkoholu <sup>1</sup>. V současné době je některými autory pojem NAFLD nahrazen pojmem MAFLD (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease; tuková nemoc jater asociovaná s metabolickou dysfunkcí). Definice MAFLD je založena na přítomnosti jaterní steatózy, a navíc jednoho z následujících třech kritérií: nadváha/obezita, diabetes mellitus 2. typu (T2DM) nebo známky metabolické dysregulace <sup>2</sup>.

### 1.1. Prevalence NAFLD v obecné populaci a u pacientů po transplantaci jater (LT)

NAFLD je nejběžnějším jaterním onemocněním západních zemí, celosvětová prevalence dosahuje 25,2 %. Prevalence NASH se odhaduje na 3-6 % <sup>3</sup>. Prevalence NAFLD významně narůstá spolu s nárůstem abdominální obezity a T2DM <sup>4</sup>. K rekurenci NAFLD po LT dochází u 31 % až 88 % pacientů. Prevalence NAFLD *de novo* po LT je 26 % (14,7-52 %) <sup>5</sup>.

### 1.2. Získané příčiny NAFLD v obecné populaci a u pacientů po LT

Klíčovou roli v rozvoji NAFLD a jaterní IR má obezita, čemuž nasvědčuje rychlý pokles obsahu jaterního tuku a vymizení jaterní IR po redukci tělesné hmotnosti <sup>6</sup>. Pokles hmotnosti navozený režimovými opatřeními nebo bariatrickým výkonem vede k velmi častému vymizení NASH i regresi fibrózy. Obezita je rizikovým faktorem NAFLD i po LT <sup>7</sup>. K nárůstu hmotnosti po LT přispívá obnovená funkce jater, návrat chuti k jídlu, celkové zlepšení stavu a sedavý způsob života. Strava s velkým množstvím jednoduchých cukrů zvyšuje obsah jaterního tuku. Důležitou roli v patogenezi NAFLD má monosacharid fruktóza, která napodobuje toxický účinek alkoholu. Konzumace fruktózy byla spojena i s vyšším stupněm fibrózy u NASH <sup>8</sup>. Podobně i dieta s velkým množstvím nasycených tuků zvyšuje obsah jaterního tuku. V jedné studii odpovídala strava pacientů po LT dietě západního stylu s vysokým množstvím nasycených tuků <sup>9</sup>. Sedavý způsob života a pokles fyzické aktivity jsou nezávislými rizikovými faktory NAFLD. Fyzická aktivita zvyšuje svalovou inzulinovou senzitivitu a snižuje obsah jaterního tuku nezávisle na efektu na tělesnou hmotnost <sup>10</sup>. Pacienti po LT jsou fyzicky méně aktivní než obecná populace <sup>11</sup>.

### 1.3. Metabolické rizikové faktory NAFLD v obecné populaci a u pacientů po LT

NAFLD se často vyskytuje u pacientů s metabolickým syndromem a T2DM, jejich společným znakem je přítomnost IR v játrech, svalech i tukové tkáni. Jaterní IR se vyznačuje sníženou supresí glukoneogeneze, zatímco účinek na lipogenezi je zachován nebo zvýšen, což se označuje jako selektivní IR. Nedostatečný účinek inzulínu v tukové tkáni vede ke zvýšení lipolýzy a nabídce volných mastných kyselin (FFA) v játrech pro syntézu triglyceridů (TG). Za kritérium IR lze v běžné klinické praxi použít index homeostatic model assessment IR (HOMA-IR)  $\geq 2,5-3,0$ . NAFLD je doprovázena dyslipidemií, kdy se zvyšuje jaterní tvorba lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL) bohatých na TG, dochází k poklesu HDL cholesterolu a rovněž k tvorbě aterogenních lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) <sup>12</sup>. Výskyt metabolického syndromu a T2DM po LT je častý. Na vzniku DM po LT se významně podílí léčba kalcineurinovými inhibitory (CNI), které způsobují poruchu sekrece inzulínu <sup>13</sup>. Riziko hyperlipidémie je zvýšeno léčbou CNI <sup>14</sup> a sirolimem <sup>15</sup>.

### 1.4. Genetické rizikové faktory NAFLD v obecné populaci a u pacientů po LT

Hlavním genetickým faktorem rozvoje NAFLD je polymorfismus v genu patatin-like phospholipase domain-containing 3 (*PNPLA3*). Varianta *PNPLA3* rs738409 c.444 C>G, p.Ile148Met je významně spojena se zvýšeným obsahem jaterního tuku a aktivitou sérové alaninaminotransferázy (ALT) <sup>16</sup>. *PNPLA3* kóduje protein o velikosti 481 aminokyselin <sup>17</sup>. U lidí se *PNPLA3* nejvíce exprimuje v hepatocytech, v jaterních hvězdčovitých buňkách (HSC; hepatic stellate cells) a dále i v tukové tkáni <sup>18</sup>. Wild type *PNPLA3* je účinně ubiquitylována a rychle odstraněna proteazomální degradací, zatímco varianta p.Ile148Met se ubiquitylaci a proteazomální degradaci vyhýbá, což vede ke hromadění *PNPLA3* na povrchu tukových kapének a sníženému uvolňování TG z tukových kapének <sup>19</sup>. Hromadící se mutovaná *PNPLA3* nadměrně vyvazuje proteinový kofaktor CGI-58, který je společný pro *PNPLA3* a homologní *PNPLA2* (synonymum ATGL; adipose triglyceride lipase). Nedostatek CGI-58 snižuje aktivitu *PNPLA2*, která je hlavní hydrolázou TG v tukové tkáni i v hepatocytech <sup>20</sup>. *PNPLA3* se podílí na aktivaci HSC a u varianty *PNPLA3* c.444G se zvyšuje zánětlivý a fibrogenní fenotyp HSC <sup>21</sup>. V kohortách pacientů s histologicky potvrzenou NAFLD byl prokázán vliv alely *PNPLA3* c.444G na rozvoj steatózy, NASH, fibrózy <sup>22</sup> a hepatocelulárního karcinomu (HCC) <sup>23</sup>. U pacientů po LT bylo popsáno zvýšené riziko steatózy štěpu u alely *PNPLA3* c.444G příjemce <sup>24 25</sup>, studie pacientů po LT pro HCV naopak prokázala význam genotypu dárce <sup>26</sup>.

Dalším faktorem spojeným se zvýšeným obsahem jaterního tuku je varianta transmembrane 6 superfamly member 2 (*TM6SF2*) rs58542926 c.499 G>A, p.Glu167Lys, která je spojena i s vyšší aktivitou ALT. Její účinky nezávisejí na BMI, HOMA-IR nebo genotypu *PNPLA3* rs738409 <sup>27</sup>. *TM6SF2* kóduje protein o velikosti 351 aminokyselin, který je lokalizovaný v endoplasmatickém retikulu (ER) a v ER-Golgiho intermediárním kompartmentu, ale není přítomen v tukových kapénkách <sup>28</sup>. U lidí se *TM6SF2* exprimuje převážně v tenkém střevě, játrech a ledvinách <sup>27</sup>. U *Tm6sf2* knockout myši klesá sekrece VLDL-TG, přičemž sekrece jaterního apolipoproteinu B (ApoB) je zachovalá, což svědčí pro význam *TM6SF2* při ukládání TG do VLDL <sup>29</sup>. *TM6SF2* má význam při stabilizaci ApoB. Defektní stabilizace ApoB v důsledku deficitu *TM6SF2* nebo mutace c.499A může vysvětlit narušenou lipidaci nebo sekreci lipoproteinových částic obsahujících ApoB s následným hromaděním jaterních TG <sup>30</sup>. U pacientů s NAFLD je varianta *TM6SF2* c.499A asociována s vyšším stupněm steatózy, NASH a fibrózou/cirhózou <sup>31</sup>, v obecné populaci zvyšuje riziko cirhózy a HCC <sup>32</sup>. Studie, která hodnotila vliv genotypu *TM6SF2* rs58542926 na rozvoj NAFLD *de novo* po LT neprokázala efekt genotypu příjemce, hodnocení genotypu dárce nebylo k dispozici <sup>25</sup>.

Varianty *PNPLA3* c.444G a *TM6SF2* c.499A představují pouze mírné riziko rozvoje NAFLD u štíhlých osob, ale jsou hlavním rizikovým faktorem u osob s vyšším BMI.

## **1.5. Souhrn patogeneze nealkoholové steatohepatitidy**

Klíčovou roli v patogenezi NASH hraje vysoký příjem energie zejména v podobě nasycených tuků nebo jednoduchých cukrů a sedavý způsob života, které vedou k dysfunkci tukové tkáně, rozvoji IR, nárůstu lipolýzy, *de novo* lipogeneze a vzniku steatózy jater. Poškození hepatocytů není způsobeno TG, ale akumulací jiných typů lipidů (FFA, diacylglyceroly, cholesterol a jiné), jejichž metabolismus zvyšuje oxidační stres a může vést k poškození mitochondrií a ER. Poškozené hepatocyty nastartují regenerační proces, který zahrnuje akumulaci zánětlivých buněk a expanzi jaterních progenitorových buněk a myofibroblastů. Na rozvoji jaterního zánětu a fibrózy se podílí i dysbióza, která zvyšuje střevní permeabilitu pro nebezpečné signály pocházející ze střevních mikroorganismů, které aktivují TLR4 na jaterních Kupfferových buňkách a HSC, což stimuluje prozánětlivou a profibrogenní dráhu<sup>33</sup>. Narůstající množství dat dokládá primární roli genetických faktorů pro vznik NAFLD a její progresi do cirhózy a HCC, přičemž jejich vliv je výrazně navýšen současně přítomnou obezitou.

## **1.6. Význam NAFLD v obecné populaci a u pacientů po LT**

U NASH progreduje fibróza zhruba o 1 stupeň za 7 let, u NAFL o 1 stupeň za 14 let<sup>34</sup>. Přítomnost a stupeň fibrózy je u NAFLD hlavním rizikovým faktorem spojeným s nepříznivou prognózou<sup>35</sup>. V Evropě významně narůstá procento indikací k LT pro NASH cirhózu z 1,2 % v roce 2002 na 8,4 % v roce 2016<sup>36</sup>. Přítomnost NAFLD s sebou nese riziko vzniku HCC, které zvyšuje současná konzumace alkoholu. Pacienti s NAFLD mají vyšší mortalitu než pacienti bez NAFLD<sup>37</sup> a vyšší riziko kardiovaskulárních příhod<sup>38</sup>. Některé studie popsaly podobné přežívání pacientů s potransplantační NAFLD a bez ní<sup>39</sup>.

## **2. Cíle disertační práce**

### **2.1. Zhodnocení prevalence, vývoje, rizikových faktorů a významu steatózy po LT**

2.1.1. Zjistit prevalenci, incidenci a popsat vývoj steatózy/steatohepatitidy po LT

2.1.2. Identifikovat předtransplantační a potransplantační metabolické rizikové faktory steatózy/steatohepatitidy po LT

2.1.3. Zjistit vliv steatózy/steatohepatitidy po LT na progresi fibrózy a funkci štěpu

2.1.4. Zjistit vliv steatózy po LT na celkovou a jaterní mortalitu pacientů

### **2.2. Zhodnocení významu genotypů *TM6SF2* rs58542926 a *PNPLA3* rs738409 dárce a příjemce v patofyziologii steatózy po LT**

2.2.1. Porovnat frekvence genotypů *TM6SF2* rs58542926 a *PNPLA3* rs738409 u příjemců, dárců a v obecné populaci

2.2.2. Posoudit příspěvek genotypů *TM6SF2* rs58542926 a *PNPLA3* rs738409 dárce a příjemce k rozvoji steatózy po LT

2.2.3. Zhodnotit vliv interakce genotypů *TM6SF2* rs58542926 a *PNPLA3* rs738409 na rozvoj steatózy po LT

2.2.4. Zhodnotit význam interakce genotypů *TM6SF2* rs58542926 a *PNPLA3* rs738409 s obezitou na rozvoj steatózy po LT

2.2.5. Zjistit vliv genotypů *TM6SF2* rs58542926 a *PNPLA3* rs738409 dárce a příjemce na rozvoj steatohepatitidy po LT

### **2.3. Zhodnocení významu inzulínové rezistence (IR) pro vznik a progresi NAFLD po LT**

2.3.1. Zjistit prevalenci a popsat vývoj IR před a po LT

2.3.2. Zhodnotit vztah předtransplantační IR a klinických a metabolických faktorů

2.3.3. Zjistit případnou souvislost potransplantační IR s klinickými a metabolickými faktory a podávanou imunosupresí

2.3.4. Zhodnotit souvislost potransplantační IR se vznikem a progresí NAFLD po LT



### 3. Metodika

Biopsie jaterního štěpu byly hodnoceny na přítomnost steatózy definované jako přítomnost tukových kapének ve  $\geq 5$  % hepatocytů a re/klasifikovány podle Kleiner a steatóza kvantifikována jako stupeň "0" u  $< 5$  % postižených hepatocytů, stupeň "1" u 5-33 % hepatocytů, stupeň "2" u 33,1-66 % hepatocytů a stupeň "3" u  $> 66$  % hepatocytů<sup>40</sup>. Steatohepatitida byla definovaná jako NAFLD Activity Score (NAS)  $\geq 5$ <sup>40</sup>. Steatózu stupně 2 nebo 3 jsme označovali jako „významná“ steatóza.

DNA příjemců a dárců byla izolována z periferní krve pomocí kitu Qiagen QIAamp (Qiagen, Hilden, Germany) nebo biorobotů Qiagen GenoVision GenoM6 nebo EZ1. Lokus rs58542926 v *TM6SF2* byl analyzován pomocí TaqMan SNP analýzy č. C\_89463510\_10 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Lokus rs738409 v *PNPLA3* byl genotypován pomocí TaqMan SNP analýzy č. C\_7241\_10. Obě analýzy byly provedeny na Real-Time PCR přístroji Applied Biosystems ABI 7300 (Thermo Fischer Scientific).

Inzulinová rezistence byla hodnocena pomocí HOMA-IR  $\{[\text{lačná inzulinémie } (\mu\text{U/ml})] \times [\text{lačná glykémie } (\text{mol/l})]\} / 22,5$  a QUICKI indexu  $1 / \{\log [\text{lačná inzulinémie } (\mu\text{U/ml})] + \log [\text{lačná glykémie } (\text{mg/dl})]\}$ . Za kritérium IR byl použit HOMA-IR  $\geq 3,0$  a QUICKI index  $< 0,357$ .

**Statistické hodnocení.** V epidemiologické studii bylo přežívání pacientů hodnoceno Kaplan-Meierovou metodou, rozdíly mezi skupinami log-rank testem. Multivariální analýza byla provedena metodou logistického regresního modelu. Ve studii hodnotící vliv genetických faktorů byl účinek alel dárce a příjemce a dalších proměnných na stupeň steatózy hodnocen ordinální logistickou regresní analýzou. Pro výpočet odds ratio (OR) byly použity dominantní modely. U dárců, příjemců a u náhodně vybraného českého populačního vzorku 623 účastníků studie MONICA<sup>41</sup> byly testovány frekvence genotypů *TM6SF2* rs58542926 a *PNPLA3* rs738409 na Hardyho-Weinbergovu rovnováhu. V prospektivní studii hodnotící význam IR byla na hladiny významnosti použita Bonferroniho korekce pro mnohonásobná srovnání. Vztah HOMA-IR ke kategorickým proměnným byl hodnocen Kruskal-Wallisovým testem a vztah ke spojitým proměnným byl popsán Spearmanovým korelačním koeficientem. Za statisticky významné byly použity hodnoty  $p < 0,05$ , všechny hodnoty  $p$  odpovídaly výsledkům oboustranných testů. Pro statistické hodnocení byly použity statistické softwary JMP 10.0.0 statistický software, SAS Institute Inc. 2012 a BMDP 8.1, Statistical Solutions Ltd. 2009.

### 4. Výsledky a diskuze

#### 4.1. Hodnocení prevalence, vývoje, rizikových faktorů a významu steatózy po LT (publikace č.1 k tématu disertace)

**Charakteristika sledovaného souboru.** Prevalenci, vývoj, rizikové faktory a význam steatózy po LT jsme hodnotili ve studii 548 dospělých příjemců LT (560 štěpů) z období 1/1995-4/2010, kteří měli provedenou  $\geq 1$  biopsii  $> 30$  dní po LT. Celkem bylo analyzováno 2360 biopsií.

##### 4.1.1. Prevalence, incidence a vývoj steatózy/steatohepatitidy po LT

Steatóza byla nalezena u 309 (56,4 %) pacientů, a to stupeň 3 u 42 (7,7 %) pacientů, stupeň 2 u 51 (9,3 %) pacientů a stupeň 1 u 216 (39,4 %) pacientů. Významná steatóza byla nalezena u 93 (17,0 %) a steatohepatitida u 57 (10,4 %) pacientů. Medián doby do prvního výskytu steatózy byl 13,1 měsíců po LT. Prevalence steatózy v čase narůstala z 30,3 % v 1 roce na 38,7 % v 5 letech a 47,6 % v 10 letech po LT ( $p < 0,001$ ). Incidence steatózy se v čase nelišila ( $p = 0,85$ ).

##### 4.1.2. Předtransplantační a potransplantační metabolické rizikové faktory steatózy/steatohepatitidy po LT

Rizikové faktory steatózy byly hodnoceny porovnáním skupiny 90 pacientů, kteří vyvinuli významnou (stupeň 2 nebo 3) steatózu  $> 5$  měsíců po LT (steatotická skupina) a 214 pacienty, kteří ve sledovaném období steatózu nevyvinuli a měli  $\geq 1$  biopsii  $> 5$  měsíců po LT (kontrolní skupina). Multivariální analýza (**Tabulka 1**) prokázala, že mezi nezávislé předtransplantační rizikové faktory významné steatózy patřila alkoholická cirhóza jako

indikace k LT a vysoké BMI, zatímco zvýšená hodnota ALP a mykofenolát mofetil (MMF) v iniciální imunosupresi (IS) měly na rozvoj steatózy protektivní účinek. **Potransplantační** rizikové faktory významné steatózy zahrnovaly vyšší BMI, sérové TG, konzumace alkoholu a T2DM, zatímco vyšší hladina sérového kreatininu měla na rozvoj steatózy protektivní účinek.

**Tabulka 1. Rizikové faktory významné stupně 2-3) steatózy. Multivariantní analýza.**

Předtransplantační faktory a iniciální IS	OR	95%CI	p
Indikace k LT: Alkoholická cirhóza	3,62	2,04–6,42	<0,001
BMI (vzestup o 1 kg/m <sup>2</sup> )	1,13	1,05–1,22	0,002
ALP (vzestup o 1 $\mu$ kat/l)	0,88	0,80–0,98	0,01
MMF v iniciální IS	0,48	0,28–0,84	0,009
Potransplantační faktory v době hodnocené biopsie			
BMI (vzestup o 1 kg/m <sup>2</sup> )	1,27	1,17–1,38	<0,001
TG (vzestup o 1 mmol/l)	1,97	1,46–2,65	<0,001
Konzumace alkoholu	9,46	2,32–38,6	0,005
Kreatinin (vzestup o 1 $\mu$ mol/l)	0,987	0,977–0,996	0,02
DM 2. typu	1,97	1,04–3,74	0,048

Multivariantní analýza rozdílů mezi podskupinou pacientů se steatohepatidou (NAS  $\geq$ 5) a podskupinou s prostou steatózou (NAS <5) u steatotické skupiny prokázala, že nezávislým rizikovým faktorem steatohepatitidy bylo pouze ženské pohlaví (OR 3,00, 95 % CI 1,22-7,40; p=0,02).

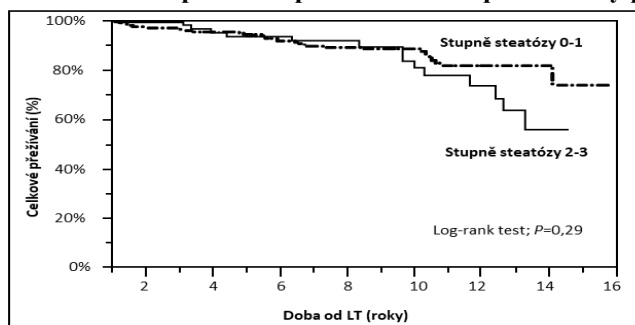
#### 4.1.3. Vliv steatózy/steatohepatitidy po LT na progresi fibrózy a funkci štěpu

Nález významné steatózy nebyl doprovázen vyšším stupněm fibrózy než v kontrolní skupině (p=0,62). Ve skupině pacientů s významnou steatózou došlo od hodnocené biopsie do poslední dostupné biopsie k častější progresi fibrózy (52,5 % pacientů vs 31,5 %; p=0,01) než u kontrolní skupiny, pacienti s významnou steatózou však měli delší interval mezi biopsiemi (53,1  $\pm$  31,2 měsíců) než pacienti z kontrolní skupiny (35,8  $\pm$  24,0 měsíců; p<0,001). Přítomnost steatohepatitidy nebyla doprovázena vyšším stupněm fibrózy (p=0,17) ani častější progresí fibrózy (p=0,31). Výskyt steatózy byl srovnatelný u 531 funkčních štěpů a 29 selhaných štěpů (p=0,96).

#### 4.1.4. Vliv steatózy po LT na celkovou a jaterní mortalitu pacientů

Ze 507 pacientů, kteří přežili více než 1 rok po LT, bylo ke konci sledování naživu 456 pacientů a zemřelo 51 pacientů. Mezi přežíváním pacientů s významnou steatózou (n=91) a pacientů se steatózou stupně 0-1 (n=416) nebyl významný rozdíl (**Obr. 1**; p=0,29), pacienti s významnou steatózou však měli patrný trend k horšímu dlouhodobému přežívání (81,3 % versus 89,0 % v 10 letech a 56,2 % versus 74,6 % v 15 letech po LT) oproti pacientům se steatózou 0-1.

**Obr. 1. Potransplantační přežívání dle stupně steatózy po LT**



Rozdíly mezi příčinami úmrtí u pacientů s významnou steatózou (n=14) a pacientů se steatózou stupně 0-1 (n=37) nebyly významné (p=0,43), pacienti s významnou steatózou měli trend

k vyšší kardiovaskulární mortalitě a nižší mortalitě na malignity, jaterní mortalita byla srovnatelná.

#### 4.1.5. Diskuze

Naše práce <sup>42</sup> představuje jednu z nejrozsáhlejších studií, která hodnotila prevalenci, rizikové faktory, vývoj a význam steatózy u neselektované kohorty pacientů po LT. Prevalence steatózy po LT zjištěná v našem souboru (56,4 %) přesahuje prevalenci NAFLD *de novo* po LT udávanou v recentní metaanalýze (26 %, s rozmezím 14,7-52 %) <sup>5</sup>. U našich příjemců byla častá potransplantační nadváha/obezita (52,4 %), DM (29,4 %) a hypertriglyceridémie (55,7 %), potransplantační konzumace alkoholu byla naopak zřídka. K častému nálezu steatózy mohla přispět dlouhá doba sledování a vysoký počet biopsií. Potvrdili jsme vztah obezity, T2DM a hypertriglyceridémie s rozvojem steatózy po LT <sup>7</sup>. Podobně jako v jiných studiích jsme našli vyšší riziko steatózy po LT u pacientů indikovaných pro alkoholickou cirhózou. Jen malá část z nich připustila návrat ke konzumaci alkoholu po LT, výskyt nadváhy/obezity a T2DM před i po LT u nich byl naopak vysoký, což v kombinaci s absencí NASH cirhózy v našem souboru a nízkou hranicí konzumovaného alkoholu pro stanovení diagnózy alkoholická cirhóza nasvědčuje, že řada našich pacientů indikovaných pro alkoholovou nemoc jater mohla mít současně i NAFLD, která běžně po LT rekuruje. Z pohledu nově navrhané reklasifikace NAFLD na MAFLD by tento rozpor patrně vymizel. Vyšší předtransplantační ALP bylo v naší práci spojeno s nižším rizikem steatózy. Vysoké hodnoty ALP jsou typické pro pacienty s cholestatickými chorobami, u kterých bylo popsáno nízké riziko rozvoje NAFLD *de novo* po LT <sup>5</sup>, a indikují agresivnější formu biliární cirhózy, zatímco v patogenezi biliární cirhózy s nízkým ALP mohou hrát roli kofaktory jako oxidativní stres, obezita, steatóza a příjem alkoholu. Významná steatóza měla v naší práci vztah k nižším sérovým hodnotám kreatininu. Kreatinin je markerem množství svalové hmoty a nízký poměr kreatininu k tělesné hmotnosti byl spojen se zvýšeným rizikem NAFLD <sup>43</sup>. MMF podávaný iniciálně byl spojen s nižším rizikem steatózy v naší studii, vliv typu CNI nebo jiné imunosupresivní léčby jsme neprokázali. Vztah MMF a steatózy nebyl v literatuře popsán. Na zvířecích modelech měl MMF preventivní účinek před rozvojem zánětlivých infiltrátů pankreatu a hyperglykémie <sup>44</sup>. MMF by tak mohl ovlivňovat metabolismus glukózy, IR a následně i rozvoj steatózy. Imunosuprese bez MMF nezávisle predikovala časné úmrtí po LT z kardiovaskulárních příčin <sup>45</sup>. Ženy měly v naší studii vyšší riziko steatohepatitidy. Příčinou těžších stupňů steatózy a fibrotizující NASH u postmenopauzálních žen je pravděpodobně deficit estrogenů <sup>46</sup>. Významná steatóza nebyla v naší studii doprovázena vyšším stupněm fibrózy, mírná nebo středně závažná fibróza však byla častá bez ohledu na přítomnost steatózy. Progresivní fibróza jaterního štěpu může být zapříčiněna i např. rekurencí HCV nebo chronickou alloreaktivitou, která nedosáhla stupně manifestní rejekce. Přítomnost steatózy nebyla v naší práci doprovázena častějším selháním štěpu. I když rozdíl v přežívání mezi skupinami nebyly statisticky významné, u pacientů s významnou steatózou jsme pozorovali trend k horšímu dlouhodobému přežívání oproti pacientům bez významné steatózy a současně i trend k vyšší kardiovaskulární mortalitě, mortalita z jaterních příčin se nelišila.

#### 4.2. Význam genotypů *TM6SF2* rs58542926 a *PNPLA3* rs738409 dárce a příjemce v patofyziologii steatózy po LT (publikace č.2 k tématu disertace)

Studijní skupina zahrnuje 268 dospělých příjemců LT, u kterých byl k dispozici vzorek krve příjemce i dárce a měli provedenou  $\geq 1$  biopsii jater odebranou 6-30 měsíců po LT. Celkem bylo u těchto pacientů k dispozici 576 biopsií štěpu provedených 6-30 měsíců po LT.

##### 4.2.1. Frekvence genotypů *TM6SF2* rs58542926 a *PNPLA3* rs738409 u příjemců, dárců a v obecné populaci

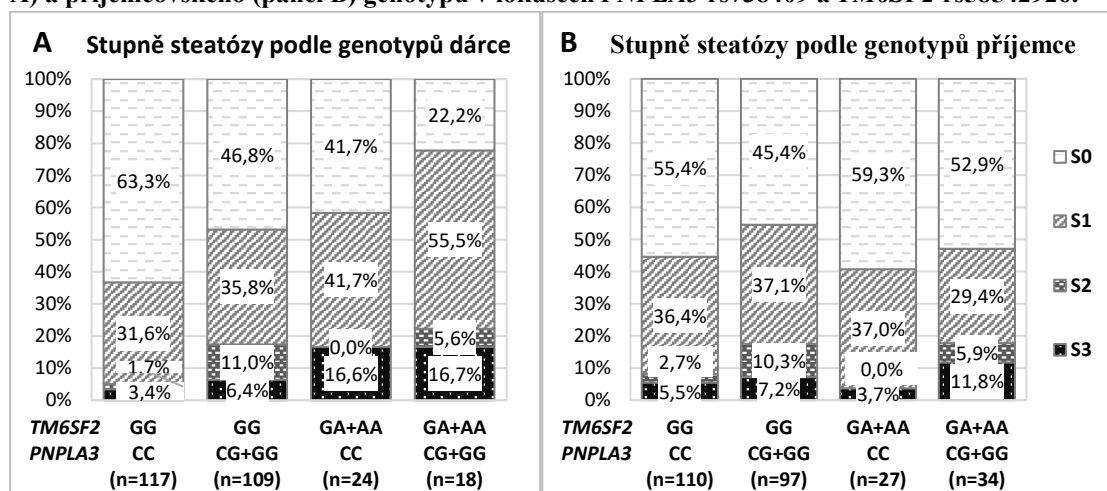
Frekvence genotypů *TM6SF2* rs58542926 GG/GA/AA byly 0,773/0,205/0,022 u příjemců,

0,843/0,153/0,004 u dárčů a 0,848/0,146/0,006 u účastníků studie MONICA<sup>41</sup>. Zastoupení genotypů u dárčů odpovídalo ( $p=0,927$ ) zastoupení ve studii MONICA. Vyšší frekvence *TM6SF2* rs58542926 AA homozygotů u příjemců LT než ve studii MONICA ( $p=0,024$ ) naznačuje potenciální vliv tohoto polymorfismu při progresi jaterních chorob. Frekvence genotypů *PNPLA3* rs738409 CC/CG/GG byly 0,511/0,381/0,108 u příjemců, 0,526/0,414/0,060 u dárčů a 0,566/0,372/0,062 ve studii MONICA. Frekvence *PNPLA3* rs738409 genotypů se u dárčů ( $p=0,999$ ) ani u příjemců ( $p=0,117$ ) nelišily od studie MONICA.

#### 4.2.2. Příspěvek genotypů *TM6SF2* rs58542926 a *PNPLA3* rs738409 dárce a příjemce k rozvoji steatózy po LT

Steatóza byla nalezena u 129 (48,1 %) pacientů, u 18 (6,7 %) stupně 3, u 15 (5,6 %) stupně 2 a u 96 (35,8 %) stupně 1. Distribuce stupňů steatózy u skupin pacientů klasifikovaných podle kombinací genotypu *PNPLA3* rs738409 a *TM6SF2* rs58542926 jsou zobrazeny v Obr. 2.

Obr. 2. Distribuce stupňů steatózy u skupin pacientů klasifikovaných podle kombinací dárcovského (panel A) a příjemcovského (panel B) genotypu v lokusech *PNPLA3* rs738409 a *TM6SF2* rs58542926.



Multivariantní analýza (Tabulka 2) potvrdila, že pouze nosičství alel *TM6SF2* c.499A a *PNPLA3* c.444G dárce, potransplantační BMI a hladina sérových TG nezávisle predikují zvýšený obsah jaterního tuku ve štěpu, zatímco necirhotické jaterní onemocnění bylo spojeno s nižším rizikem steatózy štěpu. Pacienti indikovaní pro necirhotické jaterní onemocnění byli mladší než pacienti s ostatními diagnózami ( $p=0,058$ ) a žádný z nich neměl DM ( $p<0,001$ ).

Tabulka 2. Rizikové faktory steatózy štěpu v multivariantní analýze (n=249)

Vstupní proměnné	Rizikový faktor	OR	95%CI	p
Dárcovský genotyp <i>TM6SF2</i> rs58542926	AA/AG versus GG	2,46	1,20–5,05	0,014
Dárcovský genotyp <i>PNPLA3</i> rs738409	GG/GC versus CC	2,17	1,41–3,35	<0,001
Příjemcovský genotyp <i>PNPLA3</i> rs738409	GG/GC versus CC	1,07	0,71–1,61	ns
Věk příjemce	rok	1,02	0,99–1,05	ns
Indikace k LT: alkoholická/HCV cirhóza		1,05	0,55–2,02	ns
necirhotické onemocnění jater		0,10	0,02–0,45	0,003
<b>Proměnné 1 rok po LT</b>				
BMI	kg/m <sup>2</sup>	1,16	1,08–1,25	<0,001
DM		1,02	0,55–1,91	ns
Hypertenze		0,76	0,42–1,40	ns
HDL cholesterol	mmol/l	0,45	0,20–1,03	ns
TG	mmol/l	1,28	1,01–1,64	0,047
AST	μkat/l	0,92	0,20–4,32	ns
ALT	μkat/l	1,73	0,53–5,57	ns
Kortikoidy		0,66	0,37–1,17	ns

#### 4.2.3. Vliv interakce alel *TM6SF2* c.499A a *PNPLA3* c.444G dárce na obsah jaterního tuku po LT

Vliv dárcovské alely *TM6SF2* c.499A a dárcovské alely *PNPLA3* c.444G byl aditivní, přičemž při přítomnosti obou dárcovských rizikových alel bylo OR 4,90 (95 % konfidenční interval (CI) 2,01-13,00;  $p < 0,001$ ), zatímco při přítomnosti pouze jedné z dárcovských rizikových alel bylo OR 2,22 (95 % CI 1,42-3,61;  $p = 0,002$ ). Prevalence steatózy stoupala z 36,7 % u pacientů bez rizikových alel dárce, na 53,2 % u pacientů s alelou *PNPLA3* c.444G dárce, 58,3 % u pacientů s alelou *TM6SF2* c.499A dárce a 77,8 % u pacientů s alelou *TM6SF2* c.499A i *PNPLA3* c.444G dárce (Obr. 2A;  $p = 0,001$ ).

#### 4.2.4. Účinky alel *TM6SF2* c.499A a *PNPLA3* c.444G dárce významně stoupají s vyšším BMI příjemce

Vliv přítomnosti rizikové alely *TM6SF2* c.499A dárce na obsah jaterního tuku byl významně vyšší u 116 pacientů s BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> (OR 4,66, 95 % CI 1,77–12,31;  $p = 0,002$ ), stejně tak i přítomnost alely *PNPLA3* c.444G dárce (OR 2,23, 95 % CI 1,12–4,43;  $p = 0,022$ ) a nedosahoval významnosti v podskupině 152 pacientů s BMI  $< 25$  kg/m<sup>2</sup> u alely *TM6SF2* c.499A dárce ( $p = 0,137$ ) ani u alely *PNPLA3* c.444G dárce ( $p = 0,174$ ).

#### 4.2.5. Alely *TM6SF2* c.499A a *PNPLA3* c.444G dárce a alela *PNPLA3* c.444G příjemce jsou asociovány s vyšším NAS v hodnocené biopsii

Dárcovský genotyp *TM6SF2* rs58542926 +A byl asociován s vyšším NAS než genotyp GG ( $p = 0,022$ ), vliv genotypu příjemce ( $p = 0,064$ ) jsme neprokázali. Alela *TM6SF2* c.499A dárce ( $p = 0,303$ ) ani příjemce ( $p = 0,888$ ) neměly vliv na stádium fibrózy.

Dárcovský genotyp *PNPLA3* rs738409 +G byl asociován s vyšším NAS než genotyp CC ( $p = 0,001$ ), a rovněž i příjemcovský genotyp *PNPLA3* rs738409 +G byl asociován s vyšším NAS než genotyp CC ( $p = 0,033$ ). Alela *PNPLA3* c.444G dárce byla hraničně asociována s vyšším stupněm fibrózy ( $p = 0,055$ ), vliv alely *PNPLA3* c.444G příjemce jsme neprokázali ( $p = 0,984$ ).

#### 4.2.6. Diskuze

Naše práce<sup>47</sup> jako první hodnotila vliv genotypu *TM6SF2* rs58542926 dárce a příjemce na rozvoj biopticky potvrzené steatózy jaterního štěpu po LT. Prokázali jsme, že varianty *TM6SF2* c.499A a *PNPLA3* c.444G v genomu dárce představují nezávislé rizikové faktory zvýšeného množství jaterního tuku ve štěpu pacientů po LT, zatímco efekt příjemcovských genotypů jsme neprokázali. Dvě studie, které hodnotily vliv genotypu *TM6SF2* rs58542926 na rozvoj NAFLD po LT<sup>25 48</sup>, neprokázaly účinek genotypu příjemce, vzorky DNA dárců neměli autoři studie k dispozici. Jejich pozorování je v souladu s našimi výsledky i s experimentálními daty<sup>29</sup>. Naše studie rovněž potvrzuje, že dárcovská, ale nikoliv příjemcovská varianta *PNPLA3* c.444G významně ovlivňuje obsah tuku v jaterním štěpu, což odpovídá výsledkům naší předchozí studie<sup>49</sup>, experimentálními daty<sup>50</sup> i studii příjemců LT pro HCV<sup>26</sup>. Naopak ve studii z Rakouska nebyl vliv dárcovské varianty *PNPLA3* c.444G významný, zatímco varianta *PNPLA3* c.444G u příjemců zvyšovala riziko steatózy 5 let po LT<sup>24</sup>. Rozdílné výsledky mohou být způsobeny menším počtem pacientů, hodnocením steatózy jednorázovým CT vyšetřením místo opakovaných biopsií a častějšími indikacemi spojenými s variantou *PNPLA3* c.444G, zejména alkoholickou cirhózou, v rakouské studii<sup>24</sup>. Význam dárcovských, nikoliv příjemcovských genotypů svědčí pro to, že obsah jaterního tuku je primárně ovlivněn jaterní expresí hypomorfních variant *PNPLA3* rs738409 a *TM6SF2* rs58542926 a nikoliv mimojaterní expresí. Naše výsledky jsou v souladu s dalšími studiemi, kde měla současná přítomnost variant *TM6SF2* c.499A a *PNPLA3* c.444G aditivní účinky na steatózu<sup>51</sup>, NASH a významnou fibrózu<sup>52</sup>. Naše data potvrzují významnou interakci genů a adiposity, při které je vliv variant *PNPLA3* c.444G a *TM6SF2* c.499A na obsah jaterního tuku větší u obézních než u štíhlých osob<sup>53</sup>. Pozorovali jsme zvýšené NAS u pacientů s dárcovskými variantami *TM6SF2* c.499A a *PNPLA3* c.444G, což odpovídá zvýšené nekroinflamatorní aktivitě popsané v literatuře.

V naší práci byla se zvýšeným NAS skóre asociována i příjemcovská varianta *PNPLA3* c.444G. Expresní varianty *PNPLA3* c.444G v tukové tkáni příjemce ke vzniku a progresi NAFLD však pravděpodobně nepřispívá<sup>50</sup>. U příjemce s variantou *PNPLA3* c.444G se na progresi jaterní choroby nejspíše podílely i metabolické rizikové faktory (obezita, T2DM), které mohou přispívat i k NAFLD/NASH po LT.

### 4.3. Význam inzulinové rezistence (IR) pro vznik a progresi NAFLD po LT (publikace č.3 k tématu disertace)

**Charakteristika sledovaného souboru.** Do prospektivní studie jsme zařadili 123 pacientů zařazených na čekací listině k LT z období 5/2015 až 4/2017, z nichž 77 absolvovalo všechny 4 plánované kontroly: před LT v době zařazení na čekací listinu (V0), 6 měsíců po LT (V1), 1 rok po LT (V2) a 2 roky po LT (V3). Indikací k LT byla nejčastěji alkoholická cirhóza (29,9 %), biliární cirhóza (20,8 %), NASH (13,0 %) a HCV (13,0 %).

#### 4.3.1. Prevalence a vývoj IR před a po LT

IR definovanou jako HOMA-IR  $\geq 3,0$  mělo 26 pacientů (41,3 %) před LT, 16 pacientů (25,4 %) v 6M po LT, 22 pacientů (34,9 %) v 1R po LT a 29 pacientů (46,0 %) v 2R po LT, vzestup mezi 6M a 2R po LT byl významný ( $p=0,028$ ; **Tabulka 3**).

**Tabulka 3. Vývoj klinických a laboratorních parametrů a medikace v čase (n=77)**

Parametry; n(%) / průměr ± SD	V0 (před LT)	V1 (6M po LT)	p (V1 vs V0)	V2 (1R po LT)	V3 (2R po LT)	p (V3 vs V1)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,11 ± 4,59	26,10 ± 4,03	0,008	27,49 ± 4,51	28,30 ± 4,97	<0,001
Obvod pasu (cm)	103,00 ± 13,76	96,87 ± 12,24	<0,001	98,86 ± 13,26	101,27 ± 13,60	<0,001
Hypertenze	33 (42,9)	48 (62,3)	0,011	48 (62,3)	50 (64,9)	ns
DM	37 (48,1)	32 (41,6)	ns	34 (44,2)	30 (39,0)	ns
Metabolický syndrom	42 (54,5)	42 (54,5)	ns	50 (64,9)	46 (59,7)	ns
Celkový chol (mmol/l) (n=63)	3,85 ± 1,47	4,81 ± 1,16	<0,001	4,78 ± 1,10	4,71 ± 1,08	ns
HDL chol (mmol/l) (n=62)	0,84 ± 0,37	1,23 ± 0,35	<0,001	1,13 ± 0,34	1,17 ± 0,40	ns
LDL chol (mmol/l) (n=57)	2,44 ± 0,98	2,73 ± 0,97	ns	2,78 ± 0,81	2,71 ± 0,81	ns
TG	1,07 ± 0,81	1,82 ± 1,79	<0,001	1,86 ± 1,17	1,80 ± 1,05	ns
GGT (μkat/l)	2,07 ± 2,59	1,27 ± 5,39	<0,001	1,00 ± 4,07	0,62 ± 1,33	0,01
Glykémie (mmol/l)	5,39 ± 1,85	6,25 ± 1,71	<0,001	6,21 ± 1,69	6,27 ± 1,63	ns
HbA1c (mmol/mol)	31,74 ± 9,77	35,68 ± 9,61	<0,001	38,17 ± 13,34	40,60 ± 10,03	<0,001
OGTT 120min (mmol/l) (n=22)	10,09 ± 2,68	7,75 ± 2,25	ns	7,62 ± 2,41	7,36 ± 2,01	ns
Inzulinémie (mIU/l) (n=63)	15,94 ± 16,58	9,10 ± 7,94	<0,001	12,66 ± 14,10	11,43 ± 9,06	0,029
HOMA-IR $\geq 3.0$	26 (41,3)	16 (25,4)	ns	22 (34,9)	29 (46,0)	0,028
QUICKI < 0.357	42 (66,7)	42 (66,7)	ns	45 (71,4)	41 (65,1)	ns
Statin	4 (5,2)	6 (7,8)		9 (11,7)	9 (11,7)	
Takrolimus/Cyklosporin		75/2 (97,4/2,6)		77/0 (100,0/0,0)	75/1 (97,4/1,3)	
MMF		62 (80,5)		59 (76,6)	57 (74,0)	
Sirolimus/everolimus		1/1 (1,3/1,3)		0/4 (0,0/5,2)	1/6 (1,3/7,8)	
Kortikoidy		55 (71,4)		38 (49,3)	34 (44,2)	
% tuku jater dle 1H MRS (n=56)	1,25 ± 1,55	1,88 ± 1,99	0,026	2,61 ± 3,96	3,79 ± 5,20	<0,001
Tuhost jater dle SWE (kPa) (n=59)		7,32 ± 1,81		7,25 ± 2,78	7,09 ± 2,32	ns
Jaterní biopsie (n=57)						p (V3vsV2)
Steatóza st. 0/1/2/3				21/24/7/5 (36,8/42,1/12,3/8,8)	18/26/8/5 (31,6/45,6/14,0/8,8)	ns
Zánět st. 0/1/2/3				30/22/5/0 (52,6/38,6/8,8/0,0)	34/19/4/0 (59,7/33,3/7,0/0,0)	ns
Balónová degenerace st.0/1/2				43/11/3 (75,4/19,3/5,3)	41/13/3 (71,9/22,8/5,3)	ns
Fibróza st. 0/1/2/3/4				1/25/24/6/1 (1,8/43,9/42,1/10,5/1,8)	1/25/26/5/0 (1,8/43,9/45,6/8,8)	ns

### 4.3.2. Vztah předtransplantační IR a klinických a metabolických faktorů

Předtransplantační HOMA-IR koreloval s věkem, přítomností metabolického syndromu a indikací k LT, přičemž nejvyšších hodnot HOMA-IR dosahovali pacienti s NASH a HCV cirhózou.

### 4.3.3. Vztah potransplantační IR a klinických a metabolických faktorů a podávané imunosuprese

HOMA-IR hodnocený 2R po LT (**Tabulka 4**) koreloval s BMI, přítomností metabolického syndromu a jeho složek (obvod pasu, DM, hypertenze) a gama-glutamyltransferázou (GGT). Neprokázali jsme vliv imunosupresivní medikace, podávání kortikoidů a jejich dávky nebo podávání statinů na potransplantační IR. Nárůst prevalence IR v období prvních dvou let po LT byl doprovázen nárůstem BMI a obvodu pasu (**Tabulka 3**), výskyt metabolického syndromu, DM a hypertenze byl stabilní, hodnoty GGT klesaly.

### 4.3.4. Vztah potransplantační IR ke vzniku a progresi NAFLD po LT

HOMA-IR hodnocený 2R po LT (**Tabulka 4**) koreloval s množstvím jaterního tuku hodnoceného histologicky i pomocí <sup>1</sup>H MRS, se stupněm balónové degenerace a hraničně i zánětlivých změn v biopsii štěpu a s hodnotami tuhosti jater dle shear wave elastografie (SWE). Pozorovali jsme i nárůst HOMA-IR s rostoucím stupněm fibrózy dle histologie, výsledky nebyly signifikantní. Nárůst prevalence IR v období prvních dvou let byl doprovázen nárůstem množství jaterního tuku dle <sup>1</sup>H MRS (**Tabulka 3**). Histologické parametry NAFLD a hodnoty tuhosti jater dle elastografie byly v prvních dvou letech po LT bez významného vývoje.

Tabulka 4. Korelace mezi HOMA-IR 2R po LT s ostatními faktory 2R po LT

Parametr	HOMA-IR (průměr ± SD)	Spearman ρ	p
Hypertenze ano/ne	4,04 ± 3,62/ 1,98 ± 1,23		0,005
DM ano/ne	4,49 ± 4,34/ 2,60 ± 1,75		0,048
Metabolický syndrom ano/ne	4,29 ± 3,51/ 1,61 ± 1,20		<0,001
BMI		0,505	<0,001
Obvod pasu		0,401	0,001
TG		0,142	ns
Celkový cholesterol		-0,087	ns
LDL cholesterol		-0,059	ns
HDL cholesterol		-0,167	ns
Takrolimus/cyklosporin (n=1)	3,39 ± 3,20/ 1,86		
0/MMF/everolimus	3,20 ± 3,23/3,39 ± 3,23/3,60 ± 3,39		ns
Kortikoidy ano/ne	3,96 ± 4,35/ 2,93 ± 1,91		ns
Dávka kortikoidů (mg)		0,047	ns
Statin ano/ne	3,84 ± 1,66/3,30 ± 3,35		ns
Objem tuku v játrech dle 1H MRS (%)		0,480	<0,001
Tuhost jater dle SWE		0,442	<0,001
Biopsie jaterního štěpu			
Steatóza: stupeň 0/1/2/3	1,96 ± 1,12/3,35 ± 4,05/4,52 ± 3,12/4,93 ± 2,32		0,016
Zánět: stupeň 0/1/2	2,95 ± 3,72/3,74 ± 2,46/4,35 ± 2,87		0,051
Balooning: stupeň 0/1/2	2,79 ± 3,37/4,17 ± 2,87/5,67 ± 2,05		0,005
Fibróza: stupeň 1/2/3	2,39 ± 1,43/3,94 ± 4,11/4,28 ± 3,08		ns

### 4.3.5. Diskuze

V naší prospektivní studii jsme hodnotili prevalenci a vývoj IR první dva roky po LT. Zjistili jsme, že prevalence IR definované jako HOMA-IR ≥ 3,0 je před LT vysoká (41,3 %), během prvních 6 měsíců po LT vykazuje trend k poklesu na 25,4 % a po 2 letech od LT významně stoupne na 46,0 %. Ve studii pacientů s cirhózou a jícnovými varixy dosahovala prevalence IR definované jako HOMA-IR > 3,0 hodnoty 56,6 %<sup>54</sup>. Přítomnost IR u pacientů s cirhózou má negativní prognostickou hodnotu. HOMA-IR >3,0 zvyšovalo riziko dekompenzace jater a

HOMA-IR  $>5,0$  bylo spojeno i s vyšší mortalitou<sup>55</sup>. V naší práci i jiných studiích bylo pozorováno zlepšení inzulinové senzitivity a glukózové tolerance po LT, které jsou způsobeny jak zvýšenou jaterní clearance glukózy, tak i zvýšenou spotřebou glukózy periferními tkáněmi. Hlavní příčinou nárůstu prevalence IR v prvních 2 letech po LT je významný nárůst abdominální obezity po LT. Ostatní klinické faktory související s IR (DM, hypertenze, metabolický syndrom) a hladiny sérových lipidů byly po LT stabilní. Ve studii pacientů průměrně 4 roky po LT byla prevalence IR (HOMA-IR  $\geq 3,0$ ) pouze 16 %, pacienti měli nižší BMI, prevalenci DM, hypertenze a metabolického syndromu<sup>56</sup> než v naší práci. Potransplantační IR byla doprovázena zvýšeným množstvím jaterního tuku hodnoceného jak histologicky, tak i pomocí  $^1\text{H}$  MRS, se stupněm balónové degenerace a hraničně i zánětlivých změn v biopsii štetpu, což potvrzuje vliv IR na vznik steatózy a NASH i u pacientů po LT. Podobně i recentní studie u pacientů po LT prokázala centrální význam IR a alterace adipokinů v patogenezi steatózy štetpu po LT<sup>57</sup>. Stupeň IR v naší studii koreloval se stupněm fibrózy dle SWE, což svědčí pro to, že je IR prediktorem pokročilé fibrózy i po LT. V naší studii byl u naprosté většiny pacientů 2 roky po LT podáván takrolimus, jen jediný pacient byl léčen cyklosporinem, vliv typu CNI na rozvoj IR jsme tak nemohli posoudit. Dlouhodobá monoterapie cyklosporinem nebo takrolimem však u stabilních pacientů po LT nemá negativní účinky na inzulinovou senzitivitu, inzulinovou sekreci a syntézu<sup>58</sup>. Neprokázali jsme významný vliv léčby kortikoidy a jejich dávky na výši HOMA-IR. V prvních měsících po LT dochází ke zlepšení inzulinové senzitivity oproti stavu před LT i přes nově zahájenou terapii CNI a kortikoidy. Transplantace jater je tak schopná upravit charakteristické poruchy glukózového metabolismu přítomné u cirhózy<sup>58</sup>. S rostoucí dobou od LT prevalence IR narůstá, dávky imunosupresiv se naopak významně snižují. Vliv imunosuprese na IR po LT tak pravděpodobně bude málo významný v porovnání s obnovou jaterních funkcí po LT a změnami tělesné hmotnosti.

## 5. Závěry

### 5.1. Zhodnocení prevalence, vývoje, rizikových faktorů a významu steatózy po LT

V našem souboru činí prevalence steatózy jaterního štetpu 56,4 %, prevalence steatohepatitidy je 10,4 %. Prevalence steatózy narůstá z 30,3 % v 1 roce na 47,6 % 10 let po LT. Mezi nezávislé předtransplantační faktory významné steatózy patří alkoholická cirhóza a vysoké BMI, zatímco zvýšená hodnota ALP a iniciální MMF mají protektivní účinek. Mezi nezávislé potransplantační faktory významné steatózy patří vyšší BMI, hladina sérových TG, konzumace alkoholu a přítomnost T2DM, zatímco vyšší hladina sérového kreatininu má protektivní účinek. Nezávislým rizikovým faktorem steatohepatitidy po LT je ženské pohlaví. Steatóza jaterního štetpu je zpravidla součástí NAFLD, abúzus alkoholu po LT je výjimečný (2,2 % pacientů s významnou steatózou). Přítomnost významné steatózy/steatohepatitidy po LT nebyla v našem souboru doprovázena vyšším stupněm fibrózy, výskyt steatózy byl srovnatelný u funkčních a selhaných štetpů. Mezi přežíváním pacientů s významnou steatózou a pacientů se steatózou stupně 0-1 nebyl v našem souboru významný rozdíl, u pacientů s významnou steatózou však byl patrný trend k horšímu dlouhodobému přežívání a vyšší kardiovaskulární mortalitě, mortalita na jaterní onemocnění se mezi skupinami nelišila.

### 5.2. Zhodnocení významu genotypů *TM6SF2* rs58542926 a *PNPLA3* rs738409 dárce a příjemce v patofyziologii steatózy po LT

Výskyt *TM6SF2* rs58542926 AA homozygotů je vyšší mezi příjemci LT než v obecné populaci. Alely *TM6SF2* c.499A a *PNPLA3* c.444G dárce mají nezávislý vliv na zvýšený obsah jaterního tuku po LT, význam genotypů příjemce jsme neprokázali. Obsah jaterního tuku je primárně ovlivněn jaterní expresí hypomorfních variant *TM6SF2* c.499A a *PNPLA3* c.444G, nikoliv mimojaterní expresí. Účinky alel *TM6SF2* c.499A a *PNPLA3* c.444G dárce na obsah jaterního tuku po LT jsou aditivní a významně stoupají s vyšším BMI příjemce. Alely *TM6SF2* c.499A



a *PNPLA3* c.444G dárce a alela *PNPLA3* c.444G příjemce jsou asociovány s vyšším NAS v hodnocené biopsii.

### 5.3. Zhodnocení významu inzulinové rezistence pro vznik a progresi NAFLD po LT

IR definovanou jako HOMA-IR  $\geq 3,0$  mělo 41,3 % pacientů před LT. IR významně narůstá s dobou od LT (25,4 % v 6M, 34,9 % v 1R a 46,0 % 2R po LT). Nárůst prevalence IR v období prvních dvou let po LT je doprovázen nárůstem BMI a obvodu pasu, výskyt metabolického syndromu, DM a hypertenze je stabilní. Neprokázali jsme vliv imunosupresivní medikace, podávání kortikoidů a jejich dávky nebo podávání statinů na přítomnost potransplantační IR. HOMA-IR hodnocený 2R po LT koreluje s množstvím jaterního tuku hodnoceného histologicky i pomocí  $^1\text{H}$  MRS, se stupněm balónové degenerace a hraničně i zánětlivých změn v biopsii štěpu a s hodnotami tuhosti jater dle shear wave elastografie. Nárůst prevalence IR v období prvních dvou let po LT je doprovázen nárůstem množství jaterního tuku dle  $^1\text{H}$  MRS.

## 6. Seznam zkratk

ALP, alkalická fosfatáza; ALT, alaninaminotransferáza; ApoB, apolipoprotein B; AST, aspartátaminotransferáza; ATGL, adipose triglyceride lipase; BMI, body mass index; CGI-58, comparative gene identification-58; CI, konfidenční interval; CNI, kalcineurinový inhibitor; DM, diabetes mellitus; DNA, deoxyribonukleová kyselina; EASL, Evropská asociace pro studium jater; FFA, volné mastné kyseliny (free fatty acids); GGT, gama-glutamyltransferáza; Glu, kyselina glutamová;  $^1\text{H}$  MRS, protonová magneticko-rezonanční spektroskopie; HbA<sub>1c</sub>, glykovaný hemoglobin; HCC, hepatocelulární karcinom; HCV, virová hepatitida C; HDL, lipoproteiny o vysoké hustotě (high-density lipoprotein); HOMA-IR, homeostatic model assessment inzulinové rezistence; HSC, jaterní hvězdčité buňky (hepatic stellate cells); Ile, isoleucin; IR, inzulinová rezistence; IS, imunosuprese; LDL, lipoproteiny o nízké hustotě (low-density lipoprotein); LT, transplantace jater (liver transplantation); Lys, lysin; M, měsíc; MAFLD, tuková nemoc jater asociovaná s metabolickou dysfunkcí (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease); Met, methionin; MMF, mykofenolát mofetil; MR, magnetická rezonance; NAFL, nealkoholová steatóza (non-alcoholic fatty liver); NAFLD, nealkoholová tuková choroba jater (non-alcoholic fatty liver disease); NAS, NAFLD activity score; NASH, nealkoholová steatohepatitida (non-alcoholic steatohepatitis); ns, statisticky nevýznamné; OGTT, orální glukózový toleranční test; OR, odds ratio; *PNPLA3*, patatin-like phospholipase domain-containing 3; R, rok; RNA, ribonukleová kyselina; SD, směrodatná odchylka; SWE, shear wave elastografie; T2DM, diabetes mellitus 2. typu; TG, triglyceridy; TM6SF2, transmembrane 6 superfamily member 2; TLR, toll-like receptor; VLDL, lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low-density lipoprotein);

## 7. Literatura

1. EASL. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64:1388-1402.
2. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol.* 2020;73(1):202-209.
3. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016;64(1):73-84.
4. Younossi Z, Stepanova M, Afendy M, et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;9(6):524-530.
5. Losurdo G, Castellaneta A, Rendina M, Carparelli S, Leandro G, Di Leo A. Systematic review with meta-analysis: de novo non-alcoholic fatty liver disease in liver-transplanted patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;47(6):704-714.

6. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI. Reversal of Nonalcoholic Hepatic Steatosis, Hepatic Insulin Resistance, and Hyperglycemia by Moderate Weight Reduction in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2005;54(3):603-608.
7. Dumortier J, Giostra E, Belbouab S, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in liver transplant recipients: Another story of seed and soil. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(3):613-620.
8. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51(6):1961-1971.
9. McCoy SM, Campbell KL, Lassemillante A-CM, et al. Changes in dietary patterns and body composition within 12 months of liver transplantation. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2017;6(5):317-326.
10. Kantartzis K, Thamer C, Peter A, et al. High cardiorespiratory fitness is an independent predictor of the reduction in liver fat during a lifestyle intervention in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2009;58(9):1281-1288.
11. Masala D, Mannocci A, Unim B, et al. Quality of life and physical activity in liver transplantation patients: results of a case-control study in Italy. *Transplant Proc*. 2012;44(5):1346-1350.
12. Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(11):901-910.
13. Pelaez-Jaramillo MJ, Cardenas-Mojica AA, Gaete P V, Mendivil CO. Post-Liver Transplantation Diabetes Mellitus: A Review of Relevance and Approach to Treatment. *Diabetes Ther*. 2018;9(2):521-543.
14. Roy A, Kneteman N, Lilly L, et al. Tacrolimus as intervention in the treatment of hyperlipidemia after liver transplant. *Transplantation*. 2006;82(4):494-500.
15. Watt KDS, Charlton MR. Metabolic syndrome and liver transplantation: a review and guide to management. *J Hepatol*. 2010;53(1):199-206.
16. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008;40(12):1461-1465.
17. Wilson PA, Gardner SD, Lambie NM, Commans SA, Crowther DJ. Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res*. 2006;47(9):1940-1949.
18. Huang Y, He S, Li JZ, et al. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(17):7892-7897.
19. Basuray S, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology*. 2017.
20. Wang Y, Kory N, BasuRay S, Cohen JC, Hobbs HH. PNPLA3, CGI-58, and Inhibition of Hepatic Triglyceride Hydrolysis in Mice. *Hepatology*. 2019;69(6):2427-2441.
21. Bruschi FV, Claudel T, Tardelli M, et al. The PNPLA3 I148M variant modulates the fibrogenic phenotype of human hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2017;65(6):1875-1890.
22. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51(4):1209-1217.
23. Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, et al. The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(3):325-334.
24. Finkenstedt A, Auer C, Glodny B, et al. Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 rs738409-g in recipients of liver transplants is a risk factor for graft steatosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(12):1667-1672.
25. Liu ZT, Chen TC, Lu XX, et al. PNPLA3 I148M variant affects non-alcoholic fatty liver disease in liver transplant recipients. *World J Gastroenterol*. 2015;21(34):10054-10056.
26. Miyaaki H, Miuma S, Taura N, et al. PNPLA3 as a liver steatosis risk factor following living-donor liver transplantation for hepatitis C. *Hepatol Res*. 2018;48(3):E335-E339.
27. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2014;46(4):352-356.
28. Mahdessian H, Taxiarchis A, Popov S, et al. TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism

- influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(24):8913-8918.
29. Smagris E, Gilyard S, BasuRay S, Cohen JC, Hobbs HH. Inactivation of Tm6sf2, a gene defective in fatty liver disease, impairs lipidation but not secretion of very low density lipoproteins. *J Biol Chem*. 2016;291(20):10659-10676.
  30. Li B-T, Sun M, Li Y-F, et al. Disruption of the ERLIN-TM6SF2-APOB complex destabilizes APOB and contributes to non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS Genet*. 2020;16(8):e1008955.
  31. Liu Y-L, Reeves HL, Burt AD, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun*. 2014;5:4309.
  32. Gellert-Kristensen H, Richardson TG, Davey Smith G, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Stender S. Combined Effect of PNPLA3, TM6SF2, and HSD17B13 Variants on Risk of Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in the General Population. *Hepatology*. 2020;72(3):845-856.
  33. MacHado MV, Diehl AM. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2016;150(8):1769-1777.
  34. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver versus Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Paired-Biopsy Studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(4):643-654.
  35. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, et al. Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389-397.e10.
  36. Haldar D, Kern B, Hodson J, et al. Outcomes of liver transplantation for non-alcoholic steatohepatitis: A European Liver Transplant Registry study. *J Hepatol*. 2019;71(2):313-322.
  37. Calori G, Lattuada G, Ragogna F, et al. Fatty liver index and mortality: The cremona study in the 15th year of follow-up. *Hepatology*. 2011;54(1):145-152.
  38. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol*. 2016;65(3):589-600.
  39. Narayanan P, Mara K, Izzy M, et al. Recurrent or De Novo Allograft Steatosis and Long-term Outcomes After Liver Transplantation. *Transplantation*. 2019;103(1):e14-e21.
  40. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-1321.
  41. Cífková R, Škodová Z, Bruthans J, et al. Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. Czech MONICA and Czech post-MONICA. *Atherosclerosis*. 2010;211(2):676-681.
  42. Hejllova I, Honsova E, Sticova E, et al. Prevalence and risk factors of steatosis after liver transplantation and patient outcomes. *Liver Transplant*. 2016;22(5):644-655.
  43. Okamura T, Hashimoto Y, Hamaguchi M, Obora A, Kojima T, Fukui M. Creatinine-to-bodyweight ratio is a predictor of incident non-alcoholic fatty liver disease: A population-based longitudinal study. *Hepatol Res*. 2020;50(1):57-66.
  44. Maksimovic-Ivanic D, Trajkovic V, Miljkovic DJ, Mostarica Stojkovic M, Stosic-Grujicic S. Down-regulation of multiple low dose streptozotocin-induced diabetes by mycophenolate mofetil. *Clin Exp Immunol*. 2002;129(2):214-223.
  45. D'Avola D, Cuervas-Mons V, Martí J, et al. Cardiovascular morbidity and mortality after liver transplantation: The protective role of mycophenolate mofetil. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2017;23(4):498-509.
  46. Ballestri S, Nascimbeni F, Baldelli E, Marrazzo A, Romagnoli D, Lonardo A. NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. *Adv Ther*. 2017;34(6):1291-1326.
  47. Mikova I, Neroldova M, Hubacek JA, et al. Donor PNPLA3 and TM6SF2 Variant Alleles Confer Additive Risks for Graft Steatosis After Liver Transplantation. *Transplantation*. 2020;104(3):526-534.
  48. Eshraghian A, Moasser E, Azarpira N, et al. Variations in TM6SF2, PCSK9 and PCSK7 genes and risk of hepatic steatosis after liver transplantation: a cross-sectional study. *BMC Gastroenterol*. 2021;21(1):458.

49. Trunecka P, Mikova I, Dlouha D, et al. Donor PNPLA3 rs738409 genotype is a risk factor for graft steatosis. A post-transplant biopsy-based study. *Dig Liver Dis*. January 2018.
50. Li JZ, Huang Y, Karaman R, et al. Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis. *J Clin Invest*. 2012;122(11):4130-4144.
51. Wang X, Liu Z, Wang K, et al. Additive Effects of the Risk Alleles of PNPLA3 and TM6SF2 on Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in a Chinese Population. *Front Genet*. 2016;7:140.
52. Koo BK, Joo SK, Kim D, et al. Additive effects of PNPLA3 and TM6SF2 on the histological severity of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018;33(6):1277-1285.
53. Stender S, Kozlitina J, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, Cohen JC. Adiposity amplifies the genetic risk of fatty liver disease conferred by multiple loci. *Nat Genet*. 2017;49(6):842-847.
54. Maruyama H, Kobayashi K, Kiyono S, Yokosuka O. Interrelationship between insulin resistance and portal haemodynamic abnormality in cirrhosis. *Int J Med Sci*. 2017;14(3):240-245.
55. Calzadilla-Bertot L, Vilar-Gomez E, Torres-Gonzalez A, et al. Impaired glucose metabolism increases risk of hepatic decompensation and death in patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis. *Dig Liver Dis*. 2016;48(3):283-290.
56. Andrade AR, Bittencourt PL, Codes L, et al. New Onset Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease after Liver Transplantation. *Ann Hepatol*. 2017;16(6):932-940.
57. Eshraghian A, Nikeghbalian S, Shamsaefar A, Kazemi K, Fattahi MR, Malek-Hosseini SA. Hepatic steatosis and liver fat contents in liver transplant recipients are associated with serum adipokines and insulin resistance. *Sci Rep*. 2020;10(1):12701.
58. Konrad T, Steinmüller T, Vicini P, et al. Regulation of glucose tolerance in patients after liver transplantation: impact of cyclosporin versus tacrolimus therapy. *Transplantation*. 2000;69(10):2072-2078.

## 8. Seznam publikací

### Publikace k tématu disertace

1. Hejlova I, Honsova E, Sticova E, Lanska V, Hucl T, Spicak J, Jirsa M, Trunecka P. **Prevalence and risk factors of steatosis after liver transplantation and patient outcomes**. *Liver Transplant*. 2016;22(5):644-655. doi:10.1002/lt.24393. **IF=3,910, citováno 14x**
2. Miková I, Neřoldová M, Hubáček JA, Dlouhá D, Jirsa M, Honsová E, Sticová E, Lánská V, Špičák J, Trunečka P. **Donor PNPLA3 and TM6SF2 Variant Alleles Confer Additive Risks for Graft Steatosis After Liver Transplantation**. *Transplantation*. 2020;104(3):526-534. doi:10.1097/TP.0000000000002876. **IF 4,939, citováno 5x.**
3. Miková I, Erhartová D, Dvořáková K, Šedivý P, Drobný M, Dezortová M, Hájek M, Cahová M, Daňková H, Sticová E, Lánská V, Trunečka P. **Vývoj insulinové resistance po transplantaci jater-prospektivní studie**. *Gastroenterologie a hepatologie* 2019;73(4):287-295. Bez IF.

### Kapitoly v monografii

1. Trunečka P, Hejlová I. **Nealkoholová steatóza a steatohepatitida**. In: P. HŮLEK, P. URBÁNEK ed. *Hepatologie*. 3. vyd. Praha: Grada Publishing, 2018, s. 377-389. ISBN 978-80-271-0394-2.
2. Hejlová I. **Nealkoholická tuková nemoc jater**. In: J. ŠPIČÁK. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii II*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2017, s. 213-229. ISBN 978-80-271-0318-8.

### Ostatní publikace v časopisech s IF

1. Burian M, Hajek M, Sedivy P, Mikova I, Trunecka P, Dezortova M. **Lipid Profile and Hepatic Fat Content Measured by <sup>1</sup>H MR Spectroscopy in Patients before and after Liver Transplantation**. *Metabolites*. 2021 Sep 15;11(9):625. doi: 10.3390/metabo11090625. **IF 4,932, citováno 0x.**
2. Erhartova D, Cahova M, Dankova H, Heczko M, Mikova I, Sticova E, Spicak J, Seda O, Trunecka P. **Serum miR-33a is associated with steatosis and inflammation in patients with non-alcoholic fatty liver disease after liver transplantation**. *PLoS One*. 2019 Nov 8;14(11):e0224820. doi: 10.1371/journal.pone.0224820. eCollection 2019. **IF 2,740, citováno 3x.**

3. Šeda O, Cahová M, Míková I, Šedová L, Daňková H, Heczková M, Brátová M, Ďásková N, Erhartová D, Čapek V, Chylíková B, Trunečka P. **Hepatic Gene Expression Profiles Differentiate Steatotic and Non-steatotic Grafts in Liver Transplant Recipients.** Front Endocrinol (Lausanne). 2019 Apr 30;10:270. doi: 10.3389/fendo.2019.00270. eCollection 2019. **IF 3,644, citováno 4x.**
4. Trunečka P, Míková I, Dlouhá D, Hubáček JA, Honsová E, Kolesár L, Lánská V, Fraňková S, Šperl J, Jirsa M, Poledne R. **Donor PNPLA3 rs738409 genotype is a risk factor for graft steatosis. A post-transplant biopsy-based study.** Dig Liver Dis. 2018 May;50(5):490-495. doi: 10.1016/j.dld.2017.12.030. Epub 2018 Jan 9. **IF 3,037, citováno 7x.**
5. Herynek V, Wagnerová D, Hejlová I, Dezortová M, Hájek M. **Changes in the brain during long-term follow-up after liver transplantation.** J. Magn. Reson. Imaging 2012;35:1332–1337. **IF 2,566, citováno 6x.**
6. Hájek M, Dezortová M, Wagnerová D, Skoch A, Voska L, Hejlová I, Trunečka P. **MR spectroscopy as a tool for in vivo determination of steatosis in liver transplant recipients.** MAGMA 2011;24:297–304. **IF 1,883, citováno 8x.**

#### **Ostatní publikace v časopisech bez IF**

1. Míková I, Kyselová D, Kautznerová D, Tupý M, Kysela M, Lánská V, Špičák J, Froněk J, Trunečka P. **Význam sarkopenie a myosteatózy u kandidátů transplantace jater na peritransplantační průběh a přežívání pacientů a štěpů.** Gastroenterologie a Hepatologie 2021; 75(4): 311–322. doi:10.48095/ccgh2021311
2. Hejlová I, Dezortová M, Šedivý P, Drobny M, Hájek M, Cahová M, Daňková H, Sticová E, Lánská V, Trunečka P. **Metabolický profil pacientů po transplantaci jater ve vztahu k rozvoji NAFLD - výsledky pilotní studie.** Gastroenterologie. a Hepatologie. 2016;70:325–330.
3. Hejlová I. **Spolupráce transplantačního centra s VPL u pacientů před a po transplantaci jater.** Practicus (Praha). 2016; 15(1): 8-9.
4. Hejlová I, Komrsková J, Sticová E, Trunečka P, Špičák J, Franeková J. **Makro-AST jako příčina izolované chronicky zvýšené aktivity AST - Popis dvou případů** Gastroenterol. a Hepatol. 2016;70:138–140.
5. Hejlová I. **Olyso(R) (simeprevir).** Gastroenterologie a hepatologie. 2016, 70(4), 368-370.
6. Komrsková J, Hejlová I, Kubíček Z, Bartošová K, Jabor A, Franeková J. **Prukaz makro AST v běžné klinické praxi.** Klin. Biochem. a Metab. 2015;23:171–174.
7. Trunečka P, Froněk J, Janoušek L, Oliverius M, Kučera M, Kieslichová E, Ročeň M, Špičák J, Šperl J, Gottfriedová H, Fraňková S, Drastich P, Hejlová I, Pokorná E, Honsová E, Peregrin J, Lánská V, Hačkajlo D, Janečková L, Herman A. **Prvních 1 000 transplantací jater v IKEM.** Gastroenterologie a Hepatologie 2013;67:399–406.
8. Hejlová I, Špičák J. **Klasifikace varixů jícnu a žaludku.** Gastroenterológia pre prax. 2012;11(2): 64-68.
9. Hájek M, Dezortová M, Wagnerová D, Voska L, Hejlová I, Trunečka P. **Stanovení obsahu jaterního tuku metodou 1H MR spektroskopie.** Časopis lékařů českých. 2011, 150(1), 68-71
10. Hejlová I, Adamec M, Kotalová R, Prehlik M, Kieslichová E, Špičák J, Trunečka P. **Transplantace jater u dětí.** Praktický lékař. 2010; 90(7): 436-439.
11. Hejlová I, Oliverius M, Honsová E, Kautznerová D, Filipová H, Šperl J, Špičák J, Trunečka P. **Absces jater při asymptomatické perforující divertikulitidě imitující maligní nádor jater.** Praktický lékař. 2008; 88(8): 474-477.
12. Hejlová I, Šperl J, Fraňková S, Kamenář D, Sticová E, Špičák J, Šperl J. **Akutní toxická hepatitida po bylinném přípravku.** Praktický lékař. 2008, 88(2), 108-110.