Příloha č. 3

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

Vliv n-3 polynenasycených mastných kyselin na rozvoj nealkoholového jaterního postižení v experimentu, výskyt u pacientů s diabetem mellitem 2. typu a metabolickým syndromem, možnosti neinvazivní diagnostiky

MUDr. Karel Dvořák

2015

Příloha č. 3

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školicí pracoviště: 4. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Školitel: doc. MUDr. Radan Brůha, 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.

Příloha č. 3

Abstrakt

Předkládaná práce se zabývá efekty n-3 polynenasycených mastných kyselin (n-3 PUFA) na rozvoj nealkoholového jaterního postižení (NAFLD) v experimentu, výskytem tohoto postižení u pacientů s diabetem mellitem 2. typu (DM2) a metabolickým syndromem a možnostmi neinvazivní diagnostiky.

Cílem práce bylo na experimentálním modelu NAFLD posoudit vliv podávání n-3 PUFA na rozvoj tohoto postižení. V klinické části této práce pak na základě analýzy skupiny pacientů s (DM2) stanovit prevalenci NAFLD u těchto pacientů a u skupiny pacientů s NAFLD zhodnotit neinvazivní metody diagnostiky jaterní fibrózy a přítomnosti nealkoholové steatohepatitidy (NASH).

Na modelu NAFLD indukovaném podáváním vysokotukové methionin-cholin deficientní diety myším kmene C57/Bl6 jsme prokázali příznivý efekt n-3 PUFA na vznik jaterního postižení. Podávání n-3 PUFA vedlo ke zlepšení biochemických parametrů, snížení akumulace lipidů v játrech i zlepšení histologického nálezu. Tyto účinky jsou dány komplexním ovlivněním metabolizmu lipidů, zejména snížením dostupnosti mastných kyselin pro syntézu triacylglycerolů v játrech, změnami hladin adipokinů a snížením prozánětlivého stavu v játrech.

Prevalence NAFLD u skupiny pacientů s DM2 byla téměř 80 %, 14 % těchto pacientů má známky fibrózy či jaterní cirhózy. U pacientů s jasně definovaným NAFLD lze v diagnostice jaterní fibrózy a přítomnosti NASH s velkou přesností využít neinvazivní parametry (hyaluronová kyselina v séru, ELF skóre, OELF skóre pro diagnostiku fibrózy a fragmenty cytokeratinu 18 v séru k diagnostice NASH).

Výsledky předložené práce prokazují příznivý vliv podávání n-3 PUFA na rozvoj NAFLD v experimentu, dokládají vysokou prevalenci NAFLD u pacientů s DM2 a demonstrují dobrou přesnost neinvazivní diagnostiky tohoto postižení.

Abstract

This thesis focuses on the effects of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) on development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in experiment, on prevalence of this condition in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome and also on non-invasive diagnostics.

The aim was to study the effect of n-3 PUFA on NAFLD development in an experimental model and based on analysis of a group of patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome to assess the prevalence of this condition. Lastly we aimed to evaluate non-invasive diagnostic methods of liver fibrosis and NASH.

We demonstrated beneficial effects of n-3 PUFA administration on NAFLD development in a C57/Bl6 mice high fat methionin–cholin defficient dietary model of NAFLD. n-3 PUFA administration led to biochemical improvement, decrease of lipid accumulation in the liver as well as improvement of histology. These effects are determined by complex modulation of lipid metabolism, mainly due to decrease in availability of fatty acids for triglyceride synthesis in the liver, changes of adipokine levels and amelioration of proinflammatory status in the liver.

In a group of type 2 diabetics we found NAFLD prevalence of almost 80%, 14% of these patients had also signs of liver fibrosis or cirrhosis. Non-invasive methods (serum hyaluronic acid, ELF score, OELF score for liver fibrosis staging and cytokeratin 18 fragments for NASH presence evaluation) pose an accurate diagnostic tool in patients with clearly defined NAFLD.

Presented results demonstrate beneficial effects of n-3 PUFA administration on NAFLD development in experiment, document high prevalence of NAFLD in patients with type 2 diabetes and show good accuracy of non-invasive diagnostics of NAFLD.

Obsah

1. Úvod 6
Epidemiologie 6
Patogeneze 6
Experimentální modely NAFLD 7
n-3 polynenasycené mastné kyseliny a jejich význam pro játra 7
Neinvazivní diagnostika NASH a jaterní fibrózy 8
2. Hypotézy a cíle práce 9
Experimentální část 9
Klinická část 9
3. Materiál a metodika 10
4. Výsledky a diskuse 12
Závěry 14
6. Seznam zkratek 16
7. Použitá literatura 17
Seznam publikací 19

1. Úvod

NAFLD (z anglického non-alcoholic fatty liver disease, česky tedy nealkoholové postižení jater při steatóze) zahrnuje spektrum patologických stavů od prosté jaterní steatózy přes nealkoholovou steatohepatitidu (NASH), která se kromě steatózy vyznačuje ještě známkami zánětlivého postižení jaterního parenchymu a eventuálně různým stupněm fibrózy, až po jaterní cirhózu s jejími možnými komplikacemi včetně portální hypertenze a hepatocelulárního karcinomu (1). Nyní je tento stav považován za integrální součást metabolického syndromu a podle současných poznatků se jedná o nejčastější chronické jaterní onemocnění moderního (nejen západního) světa, jehož incidence bude díky vzrůstajícímu výskytu nadváhy nejspíše dále narůstat.

Epidemiologie

NAFLD se vyskytuje po celém světě a jeho prevalence odpovídá převážně výskytu obezity a DM2. Prevalence je tak nejvyšší v zemích s nejvyšším výskytem těchto stavů, tedy Spojených státech amerických (34 %) (2), nejnižší v zemích, kde jsou obezita a diabetes nejnižší, jako je například venkovské oblasti Indie (9 %) (3). Studie založené na ultrasonografickém vyšetření jater nebo užívající magnetickou rezonanční (MR) spektroskopii, což jsou senzitivnější metody než zvýšené jaterní testy, konzistentně ukazují prevalenci NAFLD mezi 20 a 30 % v západních zemích, na Blízkém východě a v Japonsku (4-6). U rizikových skupin pacientů je však prevalence NAFLD výrazně vyšší. Mezi dobře dokumentované rizikové faktory NAFLD patří akumulace viscerálního tuku a obezita. U pacientů s těžkou obezitou podstupujících bariatrický výkon se NAFLD vyskytuje ve více než 90 % a až 5 % těchto pacientů má neočekávanou cirhózu (7). Velmi vysoká prevalence NAFLD je rovněž přítomna u pacientů s DM2, kde se podle různých prací vyskytuje ve více než 80 % (8). Další skupinu pacientů s vysokým výskytem NAFLD představují pacienti s dyslipidémií, zejména s hypertriglyceridémií a nízkým HDL-cholesterolem. U těchto pacientů se NAFLD vyskytuje cca v 50 % (9).

Patogeneze

Přesný patofyziologický mechanizmus vedoucí ke vzniku NAFLD a k následující progresi choroby není zcela objasněn. Účastní se ho genetické a epigenetické faktory, faktory zevního prostředí, vysoký kalorický příjem, nevhodné složení stravy a nízká fyzická aktivita. Podle současných poznatků je patogeneze NAFLD komplexní. Původně navrhovaná teorie dvou zásahů („two hits theory“) předpokládala, že ke vzniku choroby je potřeba dvou

následných „zásahů“. Prvním byla akumulace tuku v játrech (vznik NAFLD) a druhým například endotoxin pocházející ze střeva vedoucí ke vzniku NASH (10). Tato teorie je v současnosti nahrazena hypotézami zahrnujícími daleko širší spektrum paralelních inzultů, které ve svém důsledku vedou ke vzniku NAFLD a NASH (11, 12). Klíčovou roli v patogenezi NAFLD však jistě představuje:1/ zvýšená nabídka volných mastných kyselin (FFA – free fatty acids) při zvýšené lipolýze (podkožního/ viscerálního tuku) a/nebo zvýšený dietní příjm tuku; 2/ snížená oxidace mastných kyselin; 3/ zvýšená de novo lipogeneze v játrech; 4/ snížená sekrece VLDL z jater (13). Téměř dvě třetiny akumulovaných tuků v játrech pochází z FFA dodaných do jater (14). Zdrojem FFA je zejména tuková tkáň (dysfunkční a inzulín-rezistentní adipocyty) (15). Tuková tkáň je také zdrojem velkého množství cytokinů a adipokinů Snížená sekrece adiponektinu při obezitě mění lipidový metabolizmus a inzulínovou senzitivitu v játrech.

Experimentální modely NAFLD

Ideální zvířecí model NAFLD by měl reflektovat všechny aspekty jeho patogeneze, typický histologický nález v jednotlivých fázích choroby a také metabolické změny, které jsou s NAFLD spjaty. Vzhledem k patogenezi a přirozenému vývoji NAFLD (pomalý vývoj a progrese, multifaktoriální patogeneze) může ideální model tohoto stavu těžko existovat. Vysokotuková dieta nebývá užívána pouze k indukci steatózy jater, ale rovněž u experimentálních modelů metabolického syndromu, obezity a inzulínové rezistence, což jsou významné prvky vzniku NAFLD, a tak tyto modely více odpovídají patogenezi než modely genetické, nebo založené na nutriční deficienci (16).

n-3 polynenasycené mastné kyseliny a jejich význam pro játra

Tuk v potravě může ovlivnit řadu fyziologických procesů v těle, což může mít dopad na patofyziologii různých chorob (17). Vysoký příjem n-6 PUFA vede k prozánětlivému a protrombotickému stavu se zvýšenou krevní viskozitou, vasospazmy a vasokonstrikcí. Naopak vyšší příjem n-3 PUFA má protizánětlivý, antitrombotický, vasodilatační a hypolipidemický efekt (18, 19).

Esenciální mastné kyseliny tvoří důležité komponenty buněčných membrán a ovlivňují jejich fluiditu a vlastnosti membránově vázaných enzymů a receptorů (19). n-3 PUFA (obzvláště EPA a DHA) významně ovlivňují klíčové dráhy metabolizmu lipidů v játrech regulací transkripčních faktorů (PPARα, PPARγ, SREBP-1, ChREBP) (18, 20). n-3 PUFA jsou významným aktivátorem PPARα, který aktivuje geny účastnící se β-oxidace mastných kyselin (21). Dále se podílejí na down-regulaci genů prozánětlivých cytokinů jako

jsou TNFα a IL-6 (22) a aktivují PPARγ, čímž zvyšují oxidaci tuků a zlepšují inzulínovou senzitivitu. Kromě zvýšení β-oxidace mastných kyselin n-3 PUFA snižují rovněž endogenní produkci lipidů díky inhibici exprese a následného zpracování SREBP-1 (23) a také supresí aktivity ChREBP, což vede k inhibici glykolýzy a lipogeneze v játrech (24).

Neinvazivní diagnostika NASH a jaterní fibrózy

Diagnostikovat NASH není úplně snadné. Souvisí to jak s nutností jaterní biopsie, tak s variabilitou vzorků jaterní tkáně a se subjektivitou jejich hodnocení (25). Právě tyto faktory významně komplikují vývoj, porovnání a validaci neinvazivních metod (26). Jednotlivé běžné parametry jako jsou například jaterní testy se k rozlišení pacientů s NAFLD a NASH nehodí. Nejlepší výsledky byly v rozlišení prosté steatózy a NASH dosaženy při hodnocení cytokeratinu 18 v séru (26).

Pokročilost jaterní fibrózy je pravděpodobně nejpodstatnější informací týkající se prognózy konkrétního pacienta. Komponenty extracelulární matrix - zejména hyaluronová kyselina (HA) jsou relativně specifickou diagnostickou možností. Produkce hyaluronové kyseliny je zvýšena při zvýšené syntéze kolagenu a díky sinusoidální endotelové dysfunkci v pokročilém stádiu jaterních chorob je snížena i její clearance. Existují práce dokumentující predikci pokročilé fibrózy s dobrou přesností (27). Další možností jsou četné prediktivní modely a skórovací systémy. Obvykle mají dobrou přesnost pro pokročilou fibrózu, méně přesné jsou pro fibrózu mírnou a středně pokročilou. Ve svém hodnocení zahrnují od několika běžně dostupných parametrů po komplikovanější, běžně nestanovované parametry. Některé testy jsou dostupné pouze komerčně.

2. Hypotézy a cíle práce

Experimentální část

Hypotéza: n-3 polynenasycené mastné kyseliny vykazují komplexní metabolické efekty, které příznivě ovlivňují vznik NAFLD.

Cíl: 1/ Na zvířecím modelu NAFLD/NASH indukovaném podáváním vysokotukové methionin-cholin deficientní diety myším kmene C57/Bl6 posoudit vliv podávání n-3 nenasycených mastných kyselin na rozvoj tohoto onemocnění.

Klinická část

Hypotéza: Četnost výskytu NAFLD u pacientů s diabetem mellitem 2. typu a metabolickým syndromem je v České republice obdobná výskytu jinde ve světě a pohybuje se kolem 75 %, významná část těchto pacientů může mít pokročilou jaterní fibrózu. Diagnostika jaterního postižení u těchto pacientů může být provedena pomocí neinvazivních metod.

Cíle: 2/ Na základě analýzy skupiny pacientů s diabetem mellitem 2. typu dispenzarizovaných na 4. interní klinice VFN a 1. LF UK stanovit prevalenci NAFLD u těchto pacientů.

3/ U skupiny pacientů s NAFLD provést neinvazivní hodnocení stupně jaterní fibrózy a přítomnosti steatohepatitidy a tam, kde bude provedena jaterní biopsie, korelovat tyto parametry s histologickým nálezem a biochemickými ukazateli.

3. Materiál a metodika

Zvířata a design experimentu

Všechny experimenty na zvířatech splňovaly požadavky na užití a péči o laboratorní zvířata a byly schváleny Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Samci myší C57/Bl6 (do firmy Anlab, Praha, ČR) byli rozděleni do 4 skupin. 2 skupiny představovaly model NASH a byly krmeny HFMCD dietou po dobu 6 týdnů (skupiny M – po 11 zvířatech v každé skupině). Jedné skupině byly podávány n-3 PUFA směsi D56,25mg EPA + 42,5mg DHA (skupina MP), druhé fyziologický roztok (skupina M) po celou dobu experimentu. Myši z kontrolních skupin (skupiny C – po 6 zvířatech v každé skupině) byly krmeny standardní dietou a dostávaly buď n-3 PUFA (skupina CP) nebo fyziologický roztok (skupina C) ve stejných dávkách jako skupiny M.

Real-time-PCR

Vzorky jaterní tkáně pro měření genové exprese byly po odběru uloženy do RNAlater (Life Technologies, USA) a uchovány při -25°C do další analýzy. Celková RNA byla izolována kitem Perfect Pure RNA Tissue Kit (5Prime, USA) a získaná mRNA byla následně přepsána do cDNA pomocí High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies, USA) dle doporučení výrobce. Real-time PCR pro sledované geny (jaké+číslo, jinak se uvádí primery) byla provedena pomocí TaqMan® Gene Expression Assay Kit (Life Technologies, USA) dle doporučení výrobce na přístroji ABI-ViA-7ii (výrobce). Získaná data byla vyhodnocena pomocí metody komparativních Ct (ΔΔCt) pro relativní kvantifikaci s využitím endogenních kontrol glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy a hypoxantin-fosforibosyltransferázy (Life Technologies, USA). Výsledky byly vyjádřeny jako násobek změny ve srovnání s kontrolou.

Stanovení mastných kyselin v séru

Celkové sérové mastné kyseliny byly izolovány z 50 µl séra podle Folcha (28) s modifikací dle Carlsona (29). Jako interní standard bylo použito 10 mg methylester nonadekanové kyseliny přidané do každého vzorku. Dále následovala extrakce hexanem a vzorky byly odpařeny pod proudem dusíku. Dále rozpuštěny v 100 µl n-heptanu a uchovány v – 20 °C pod dusíkem do dalšího zpracování. Všechny reakce byly provedeny v atmosféře dusíku na plynovém chromatografu Trace-GC. Analýza methylesterů mastných kyselin byla provedena na koloně z taveného křemíku pokryté chemicky navázanou stacionární fází CP-

Sil 88 CB (100 m, 0.32 mm I.D.). K získání dat a ovládání byl použit software Clarity version 2.4.1.57 (Data Apex Ltd. Prague, Czech Rep.)

Stanovení adipokinů

Koncentrace adiponektinu a leptinu v séru myší byly měřeny sendvičovou ELISA metodou se spektrofotometrickou detekcí při 450 nm (ELISA kits, Uscn Life Science Inc., Wuhan, Čína).

Statistické metody

Ke zhodnocení rozdílu mezi skupinami byl použit t-test (případně Mann-Whitney rank test pro negaussovsky rozložené proměnné). K porovnání kategoriálních dat byl použit $\chi 2$ test. Korelace mezi různými parametry byly hodnoceny Pearsonovým či Spearmanovým korelačním koeficientem a lineární regresí. Ke zhodnocení významu jednotlivých neinvazivních parametrů v rozlišení mezi pacienty s/bez významné jaterní fibrózy nebo mezi pacienty s a bez steatohepatitidy byly použity analýzy ROC křivek. Za statisticky významnou byla považována hodnota $p \leq 0.05$. Statistické analýzy byly provedeny pomocí BMDP Statistical Software verze 8.1 a programu STATISTICA CZ v. 8 (StatSoft, Praha, ČR).

Pacienti – skupina diabetiků 2. typu

Sledováno bylo celkem 180 pacientů s DM2, kteří jsou dispenzarizováni na IV. interní klinice VFN a 1. LF UK v Praze (n = 180, věk = 64,2 ± 9,3 roků, muži/ženy 113/67). Všichni tito pacienti byli ambulantně vyšetřeni na IV. interní klinice VFN a 1. LF UK mezi lednem a prosincem 2012). U všech byly stanoveny jaterní testy (bilirubin, ALT, AST, GGT, ALP), koncentrace cholesterolu, triacyglycerolů, kyseliny močové a dále parametry diabetu (glykémie a glykovaný hemoglobin). Dále byly zjišťovány základní antropometrické údaje (výška, tělesná hmotnost, BMI a obvod pasu).

Pacienti – skupina pacientů s NAFLD

Do prospektivního sledování jsme zařadili 112 pacientů. Jednalo se o pacienty vyšetřené na 4. interní klinice VFN a 1. LF UK v létech 2010 – 2013, u kterých byla stanovena diagnóza NAFLD. Laboratorní výsledky byly buď z doby jaterní biopsie, nebo z doby diagnózy NAFLD u pacientů, kteří k jaterní biopsii indikováni nebyli. Indikace k jaterní biopsii byla závislá na klinické situaci a rozhodnutí pacienta.

Diagnóza NAFLD

Diagnóza NAFLD byla založena na diagnostických kritériích v doporučených postupech AASLD (30): Pacienti měli 1/ známky jaterní steatózy podle zobrazovacích metod nebo histologie; 2/ žádná jiná příčina sekundární akumulace tuku v játrech.

Jaterní biopsie

Jaterní biopsie byla provedena u 56 pacientů. Vzorky jaterní tkáně byly standardně barveny a poté hodnoceny zkušeným histopatologem, který nebyl seznámen s dalšími klinickými nebo laboratorními údaji. Jaterní fibróza byla hodnocena podle Kleinera a Bruntové (31, 32). Důvody neprovedení jaterní biopsie byly zejména nesouhlas pacienta a klinické a laboratorní známky svědčící pro prostou steatózu (normální nebo mírně zvýšené ALT, typický ultrazvukový nález).

Skórovací systémy pro neinvazivní hodnocení jaterní fibrózy

Jednotlivá skóre pro neinvazivní hodnocení jaterní fibrózy byla kalkulována na základě v literatuře publikovaných vzorců.

4. Výsledky a diskuse

Podávání HFMCD diety vedlo ke změnám typickým pro NAFLD (vyšší hmotnost, vyšší aktivitu ALT a hladinu cholesterolu v séru, Játra byla celkově těžší, s histologickým obrazem jaterní steatózy). **Podávání n-3 PUFA zabraňovalo nárůstu hmotnosti zvířat a mělo příznivý vliv na jaterní poškození.** Celkové množství lipidů v játrech myší bylo podáváním HFMCD ve srovnání s kontrolami zvýšeno. Podávání n-3 PUFA kontrolní skupině ke zvýšení celkového obsahu lipidů v játrech nevedlo. Hypolipdemický vliv n-3 PUFA je komplexní povahy. Souvisí s prokázanými účinky n-3 PUFA na metabolizmus lipidů vedoucími zejména ke snížení lipogeneze v játrech a ke zvýšení oxidace FA (33).

Celkové koncentrace mastných kyselin v séru byly zvýšeny u skupin s HFMCD a kontrolní dietou, podávání n-3 PUFA vedlo k jejich poklesu. Sérové koncentrace EPA a DHA byly ve srovnání s kontrolou podáváním HFMCD signifikantně sníženy, suplementace vedla k jejich signifikantnímu zvýšení. **Jak zvířata v kontrolní skupině, tak v HFMCD skupině vykazovala vysoký poměr n-6/n-3 PUFA v séru.** Má se za to, že zvýšení n-6 PUFA může

být jednou z přímých patogenetických příčin NAFLD a NASH (39). Přítomnost nadbytku n-6 PUFA vede k tvorbě eikosanoidů z arachidonové kyseliny, které mají prozánětlivé účinky (40). Suplementace n-3 PUFA tento poměr v našem experimentu vrátila do fyziologického rozmezí (1:1 – 1:4). Změny poměru n-6/n-3 PUFA ve prospěch n-6 jsou známy i ze studií u pacientů s NAFLD (41-43). To souvisí i s dietními návyky těchto pacientů. Ve srovnání s kontrolami vykazují nižší konzumaci ryb (44), polynenasycených tuků (45) a vyšší konzumaci n-6/n-3 tuků (46).

Podávání n-3 PUFA také ovlivňuje hladinu adipokinů. Hladina adiponektinu v séru byla v našem experimentu nejvyšší ve skupinách s HFMCD dietou, což je poněkud v rozporu s výše uvedenými mechanizmy. Podávání n-3 PUFA nicméně vedlo ke zvýšení jeho sérové koncentrace. Naopak podávání n-3 PUFA mělo za následek signifikantní snížení hladiny leptinu, která byla nejvyšší u myší s HFMCD. To koresponduje s literárními údaji, že obezita a inzulínová rezistence je spojena se zvýšenou hladinou leptinu (47).

Jaterní exprese mRNA genů kódujících klíčové prozánětlivé cytokiny (TNFα, IL-2, IL-6) byla podáváním HFMCD v našem experimentu výrazně zvýšena. Podávání n-3 PUFA vedlo k její opětovné normalizaci. Exprese mRNA protizánětlivého IL-10 nebyla změněna ani podávádním HFMCD ani n-3 PUFA. Zvýšení exprese prozánětlivých cytokinů souvisí například s plazmatickou hladinou FFA, která byla nejvyšší právě u myší s HFMCD. Zvýšená hladina FFA indukuje produkci TNF v játrech (52) a neutralizace TNFα protilátkou na zvířecím modelu zlepší histologický nález na játrech (53). Dále se uvádí, že FFA cirkulují ve vyšších koncentracích u pacientů s NAFLD, a že jejich koncentrace koreluje se závažností postižení (54).

Údaje o vysokém výskytu NAFLD u vysoce rizikových skupin pacientů (zejména u DM2) jsou známy z literatury v posledních 5 letech (55-57), obdobná data z České republiky nebyla dosud k dispozici. **Naše práce potvrzuje vysoký výskyt NAFLD u pacientů s DM2 a metabolickým syndromem, který odpovídá literárním údajům.** Také ukazuje, že přítomnost jaterního postižení závisí spíše na jednotlivých komponentech metabolického syndromu, než na kompenzaci diabetu. Naše pozorování ukazují, že prakticky všichni pacienti s jaterní lézí mají rovněž metabolický syndrom. To dobře koresponduje s názory z poslední doby, že NAFLD vznik metabolického syndromu a diabetu předchází (58).

V současnosti dostupná data ukazují, že apoptóza hepatocytů, vysoce organizovaná a geneticky řízená forma zániku buněk, hraje v jaterním poškození a progresi NAFLD významnou roli (12). S tím souvisí i fakt, že za nejslibnější neinvazivní parametr NASH je v současnosti považováno stanovení fragmentů cytokeratinu 18 v séru. Fragmenty

cytokeratinu 18 představují biomarker apoptózy a nekrózy hepatocytů (60). Z celé řady různých fragmentů cytokeratinu 18 byly studovány zejména M30 (brány jako marker apoptózy) a M65 (marker nekrózy buněk) (61-63).

V naší práci byly výsledky při stanovení fragmentů cytokeratinu 18 ještě lepší. AUROC při rozlišení NASH a prosté steatózy 0,89 pro M65 a 0,85 pro M30. A také senzitivita a specificita byly vyšší (80 % a 82 % pro M65 a 75 % a 81 % pro M30). Podle našich výsledků je tak stanovení fragmentů M65 cytokeratinu 18 v séru (s cut-off hodnotou 750 U/l) nejlepší jednotlivý neinvazivní marker NASH. Naše výsledky rovněž podporují návrh na použití M30/M65 jako screeningový test NASH, protože jejich hodnoty byly mezi skupinou pacientů s NASH a kontrolami statisticky významně rozdílné.

Další podstatnou informací pro lékaře pečujícího o pacienta s chronickou jaterní chorobou je stupeň pokročilosti jaterní fibrózy. **Důležitým nálezem naší práce hodnotícím možnosti neinvazivní diagnostiky jaterní fibrózy je, že stanovením sérové koncentrace hyaluronové kyseliny, tedy užitím jediného biochemického parametru, lze rozlišit pacienty s nebo bez signifikantní jaterní fibrózy.** Užité cut-off hodnoty HA 20 – 30 μg/l byly obdobné jako u jiných autorů (64), avšak senzitivita a specificita byla v naší práci vyšší. Užitím tohoto parametru jsme docházeli k akceptovatelným falešně pozitivním a negativním výsledkům. Podobných výsledků bylo dosaženo při použití OELF a ELF skóre. Zůstává však otázkou, jestli může být nákladné a v rutinní praxi nedostupné vyšetření některých jejich parametrů (PIIINP a TIMP) přeneseno do rutinní klinické praxe. Další zajímavé pozorování představuje **vysoké procento pacientů s možnou pokročilou jaterní fibrózou ve skupině nebioptovaných pacientů s NAFLD**.

Závěry

NAFLD představuje potenciálně závažné jaterní postižení, jehož incidence bude díky nárůstu obezity a metabolického syndromu v budoucnosti narůstat. Pacienti s NAFLD jsou v riziku vzniku jaterní cirhózy a jejich komplikací. Přesné patogenetické mechanizmy vedoucí ke vzniku a progresi tohoto stavu nejsou známy, stejně tak jako prokazatelně účinná farmakologická léčba.

Podávání vysokotukové methionin-cholin deficientní diety myším vedlo k jaternímu poškození s laboratorními i histologickými znaky charakteristickými pro NAFLD. V játrech těchto zvířat jsme dále prokázali zvýšený obsah triacylglycerolů a zvýšenou expresi mRNA

genů prozánětlivých cytokinů. Změny byly rovněž patrné v plazmatických hladinách mastných kyselin a adipokinů.

Podávání n-3 PUFA myším s experimentálně indukovanou steatoheptitidou vykazovalo příznivé účinky. Vedlo k redukci nárůstu hmotnosti experimentálních zvířat, normalizaci hodnot ALT v séru i zlepšení histologického nálezu v játrech. Tyto účinky souvisí s komplexním ovlivněním metabolizmu lipidů a snížením prozánětlivého stavu v jaterní tkáni. n-3 PUFA snižují dostupnost mastných kyselin pro syntézu triacylglycerolů v játrech, ovlivňují hladiny adipokinů, normalizují plazmatický poměr n-6/n-3 PUFA. Výsledkem je snížená plazmatická hladina cholesterolu, triacylglycerolů, snížení prozánětlivého stavu a akumulace lipidů v játrech.

Prevalence nealkoholového jaterního postižení je u pacientů s DM2 (a metabolickým syndromem) v naší populaci téměř 80 %. Navíc 14 % těchto pacientů má známky fibrózy či jaterní cirhózy. Novým poznatkem je fakt, že přítomnost NAFLD nezávisí na kompenzaci diabetu.

U pacientů s jasně definovaným NAFLD lze s velkou přesností využít neinvazivní parametry k posouzení jak stupně fibrózy (hyaluronová kyselina v séru, ELF skóre, OELF skóre) tak přítomnosti steatohepatitidy (fragmenty cytokeratinu 18: M30, M65 prokazující podíl apoptózy na jaterním poškození).

6. Seznam zkratek

ALA	kyselina α-linolenová
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
AUROC	Area under Reciever Operating Characteristic
BMI	body mass index
CDT	karbohydrát-deficientní transferin
CK-18	cytokeratin 18
CN: n DB	carbon number (počet uhlíků): počet dvojných vazeb (DB - double bond)
CT	počítačová tomografie
DHA	dokosahexaenová kyselina
DM2	diabetes mellitus 2. typu
ELF	European Liver Fibrosis Study Group
EPA	eikosapentaenová kyselina
FA	mastné kyseliny
FFA	volné mastné kyseliny
GGT	gamaglutamyltransferáza
HA	hyaluronová kyselina
HCC	hepatocelulární karcinom
HDL	high density lipoproteins - lipoproteiny o vysoké hustotě
HFMCD	vysokotuková methionin-cholin deficientní dieta
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
ChREBP	carbohydrate-responsive element-binding protein
IDF	International Diabetes Foundation
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL	interleukin
LA	kyselina linolová
LPS	lipopolysacharid
MCD	methionin-cholin deficientní dieta
MR	magnetická rezonance
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease, česky nealkoholové postižení jater při steatóze
NASH	nealkoholová steatohepatitida
OELF	Original European Liver Fibrosis
PNPLA3	pentatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
RBP-4	retinol binding protein 4
RCT	randomizovaná kontrolovaná studie
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
TAG	triglyceridy
TGFβ	transforming growth factor β
TLR	toll-like receptor
TNFα	tumor nekrotizující faktor α

UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	very low density lipoproteins - lipoproteiny o velmi nízké hustotě
WHO	Světová zdravotnická organizace

7. Použitá literatura

1. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med 2002;346:1221-1231.
2. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. Hepatology 2004;40:1387-1395.
3. Das K, Das K, Mukherjee PS, Ghosh A, Ghosh S, Mridha AR, Dhibar T, et al. Nonobese population in a developing country has a high prevalence of nonalcoholic fatty liver and significant liver disease. Hepatology 2010;51:1593-1602.
4. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005;288:E462-468.
5. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. Hepatology 2005;42:44-52.
6. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. Liver Int 2006;26:856-863.
7. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. J Hepatol 2006;45:600-606.
8. Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. Liver Int 2009;29:113-119.
9. Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. Dig Dis Sci 2000;45:1929-1934.
10. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? Gastroenterology 1998;114:842-845.
11. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. Hepatology 2010;52:1836-1846.
12. Schuppan D, Schattenberg JM. Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches. J Gastroenterol Hepatol 2013;28 Suppl 1:68-76.
13. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 2008;134:424-431.
14. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest 2005;115:1343-1351.
15. Barrows BR, Parks EJ. Contributions of different fatty acid sources to very low-density lipoprotein-triacylglycerol in the fasted and fed states. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:1446-1452.
16. Kucera O, Cervinkova Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. World J Gastroenterol 2014;20:8364-8376.
17. Lee S, Gura KM, Puder M. Omega-3 fatty acids and liver disease. Hepatology 2007;45:841-845.
18. Jump DB. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. Curr Opin Lipidol 2008;19:242-247.
19. Das UN. Biological significance of essential fatty acids. J Assoc Physicians India 2006;54:309-319.
20. Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. Circ Res 2004;94:1168-1178.
21. Pawar A, Jump DB. Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. J Biol Chem 2003;278:35931-35939.
22. Stienstra R, Mandard S, Patsouris D, Maass C, Kersten S, Muller M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against obesity-induced hepatic inflammation. Endocrinology 2007;148:2753-2763.
23. Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. J Biol Chem 1999;274:23577-23583.

24. Dentin R, Benhamed F, Pegorier JP, Foufelle F, Viollet B, Vaulont S, Girard J, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. J Clin Invest 2005;115:2843-2854.
25. Merriman RB, Ferrell LD, Patti MG, Weston SR, Pabst MS, Aouizerat BE, Bass NM. Correlation of paired liver biopsies in morbidly obese patients with suspected nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2006;44:874-880.
26. Machado MV, Cortez-Pinto H. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. J Hepatol 2013;58:1007-1019.
27. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Liver Int 2005;25:779-786.
28. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 1957;226:497-509.
29. Carlson LA. Extraction of lipids from human whole serum and lipoproteins and from rat liver tissue with methylene chloride-methanol: a comparison with extraction with chloroform-methanol. Clin Chim Acta 1985;149:89-93.
30. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. Gastroenterology 2012;142:1592-1609.
31. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. Am J Gastroenterol 1999;94:2467-2474.
32. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2005;41:1313-1321.
33. Rossmeisl M, Medrikova D, van Schothorst EM, Pavlisova J, Kuda O, Hensler M, Bardova K, et al. Omega-3 phospholipids from fish suppress hepatic steatosis by integrated inhibition of biosynthetic pathways in dietary obese mice. Biochim Biophys Acta 2014;1841:267-278.
34. Sanderson LM, de Groot PJ, Hooiveld GJ, Koppen A, Kalkhoven E, Muller M, Kersten S. Effect of synthetic dietary triglycerides: a novel research paradigm for nutrigenomics. PLoS One 2008;3:e1681.
35. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. Annu Rev Nutr 2005;25:317-340.
36. Flachs P, Rossmeisl M, Bryhn M, Kopecky J. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. Clin Sci (Lond) 2009;116:1-16.
37. Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, Ruzickova J, et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. Diabetologia 2006;49:394-397.
38. Piscitelli F, Carta G, Bisogno T, Murru E, Cordeddu L, Berge K, Tandy S, et al. Effect of dietary krill oil supplementation on the endocannabinoidome of metabolically relevant tissues from high-fat-fed mice. Nutr Metab (Lond) 2011;8:51.
39. El-Badry AM, Graf R, Clavien PA. Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver? J Hepatol 2007;47:718-725.
40. Simopoulos AP. Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects. World Rev Nutr Diet 2003;92:1-22.
41. Pettinelli P, Del Pozo T, Araya J, Rodrigo R, Araya AV, Smok G, Csendes A, et al. Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR-alpha ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. Biochim Biophys Acta 2009;1792:1080-1086.
42. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Clin Sci (Lond) 2004;106:635-643.
43. Elizondo A, Araya J, Rodrigo R, Poniachik J, Csendes A, Maluenda F, Diaz JC, et al. Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. Obesity (Silver Spring) 2007;15:24-31.
44. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, Webb M, Blendis L, Halpern Z, Oren R. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. J Hepatol 2007;47:711-717.
45. Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Faga E, et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2003;37:909-916.

46. Cortez-Pinto H, Jesus L, Barros H, Lopes C, Moura MC, Camilo ME. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? Clin Nutr 2006;25:816-823.
47. Sorensen TI, Echwald S, Holm JC. Leptin in obesity. BMJ 1996;313:953-954.
48. Fuentes T, Ara I, Guadalupe-Grau A, Larsen S, Stallknecht B, Olmedillas H, Santana A, et al. Leptin receptor 170 kDa (OB-R170) protein expression is reduced in obese human skeletal muscle: a potential mechanism of leptin resistance. Exp Physiol 2010;95:160-171.
49. Denver RJ, Bonett RM, Boorse GC. Evolution of leptin structure and function. Neuroendocrinology 2011;94:21-38.
50. Canbakan B, Tahan V, Balci H, Hatemi I, Erer B, Ozbay G, Sut N, et al. Leptin in nonalcoholic fatty liver disease. Ann Hepatol 2008;7:249-254.
51. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review. Metabolism 2015;64:60-78.
52. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. Hepatology 2004;40:185-194.
53. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2003;37:343-350.
54. Nehra V, Angulo P, Buchman AL, Lindor KD. Nutritional and metabolic considerations in the etiology of nonalcoholic steatohepatitis. Dig Dis Sci 2001;46:2347-2352.
55. Musso G, Gambino R, Cassader M. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update. Obes Rev 2010;11:430-445.
56. Lazo M, Hernaez R, Eberhardt MS, Bonekamp S, Kamel I, Guallar E, Koteish A, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. Am J Epidemiol 2013;178:38-45.
57. Yilmaz Y. Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? Aliment Pharmacol Ther 2012;36:815-823.
58. Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: A precursor of the metabolic syndrome. Dig Liver Dis 2015;47:181-190.
59. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, Grimaldi A, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 2005;128:1898-1906.
60. Yilmaz Y, Dolar E, Ulukaya E, Akgoz S, Keskin M, Kiyici M, Aker S, et al. Soluble forms of extracellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis. World J Gastroenterol 2007;13:837-844.
61. Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2006;44:27-33.
62. Joka D, Wahl K, Moeller S, Schlue J, Vaske B, Bahr MJ, Manns MP, et al. Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2012;55:455-464.
63. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. Hepatology 2009;50:1072-1078.
64. Sowa JP, Heider D, Bechmann LP, Gerken G, Hoffmann D, Canbay A. Novel algorithm for non-invasive assessment of fibrosis in NAFLD. PLoS One 2013;8:e62439.
65. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. Hepatology 2006;44:865-873.

Seznam publikací

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s impact factorem *(IF)*

Dvorak K, Stritesky J, Petrtyl J, Vitek L, Sroubkova R, Lenicek M, Smid V, et al. Use of non-invasive parameters of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in daily practice--an exploratory case-control study. PLoS One 2014;9:e111551. **IF 3,53**

Příloha č. 3

Dvořák K., Hainer R., Petrtýl J., Zeman M., Vařeka T., Žák A., Sroubková R., Švestka T., Vítek L., Brůha R. The prevalence of nonalcoholic lever steatosis in patients with type 2 diabetes mellitus in the Czech Republic. Biomed Pap 2014; 158:XX. **IF 1,66**

b) bez IF

Dvořák, K. Možnosti neinvazivní diagnostiky u NAFLD. Gastrent Hepatol 2015;69(2): 110-115.

Brůha, R., **Dvořák, K.**, Petrtýl, J. Onemocnění jater u diabetiků Vnitřní Lékařství 2013; 59 (7): 546-550.

Dvořák K. Nealkoholická steatohepatitida (NASH) - týká se nás všech. Gastroent Hepatol 2012; 66(5): 377-383.

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) s IF

Waidmann O, Pleli T, **Dvorak K**, Baehr C, Mondorf U, Plotz G, Biondi RM, Zeuzem S, Piiper A. Inhibition of the equilibrative nucleoside transporter 1 and activation of A2A adenosine receptors by 8-(4-chlorophenylthio)-modified cAMP analogs and their hydrolytic products. J Biol Chem. 2009 Nov 20;284(47):32256-63. **IF 5,58**

Petrtyl, J., **Dvorak, K**., Jachymova, M., Vitek, L., Lenicek, M., Urbanek, P., Linhart, A., Jansa, P., Bruha, R. Functional variants of eNOS and iNOS genes have no relationship to the portal hypertension in patients with liver cirrhosis
(2013) Scandinavian Journal of Gastroenterology, 48 (5), pp. 592-601. **IF 2,156**

b) bez IF

Bruha R., **Dvořák K.**, Petrtýl J. Alcoholic liver disease. 2012 World J Hepatol 4(3):81-9

Dvořák K.: Patologické tzv. jaterní testy, hepatopatie a jejich diagnostika a léčba. Medicína po promoci 2009;10(Suppl. 1): 32-36.

Dvořák K.: Abnormální "jaterní testy". Lékařské listy 2011;č. 7-Speciál (Gastroenterologie), s. 5-7.