

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci MUDr. Karla Dvořáka

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorský studijní program v biomedicině

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Školitel: Doc.MUDr. Radan Brůha, CSc., IV.interní klinika LF KU a VFN Praha

Název 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.

Charakter tématu a jeho aktuálnost

Asociaci konzumace alkoholu s tukovou jaterní degenerací popsal Thomas Addison již v roce 1836. O nealkoholovém ztučnění jater píše u nás již před 100 lety prof. J. Thomayer v souvislosti s otylostí, když uvádí „.. též mnohá ústrojí jsou přeplněná tukem tj. játra jichž buňky jeví tukový infiltrát, dále mikter a hlavně srdce jež bývá obklopeno mohutnou vrstvou tuku, jeho laločky se derou mezi snopečky vláken svalových“. S. Sherlocková ve své monografii Diseases of the Liver and Biliary System z roku 1955 v souvislosti s další příčinou nealkoholové jaterní steatózy, diabetem, uvádí volně přeloženo „Osoby s insulin-insenzitivním typem diabetu jsou často obézní a tuková degenerace jater koreluje se stupněm nadváhy a je přítomná až u 50 % takových osob“. Později byla jaterní steatóza popisovaná po některých lécích, nicméně stále byla za nejzávažnější příčinu tukové jaterní degenerace považovaná nadměrná konzumace alkoholu. Abstinence vede za 6-8 týdnů k úpravě, zatím co pokračující konzumace vede k steatohepatitidě, fibróze, cirhóze event. HCC. Takový nepříznivý průběh se ale u nealkoholové příčiny steatózy event. i steatohepatitidy spíše nepředpokládal, a to i v případě nedobře léčeného diabetu event. persistující obesity. Badatelský zájem o jaterní steatózu resp. steatohepatitidu nealkoholového původu narostl začátkem 60. let minulého století v souvislosti s tehdy populárními chirurgickými metodami léčby nadměrné, morbidní obesity (jejunokolické shunty, jejunoileální bypassy, enterální výživa). V záplavě studií na toto téma se dominantní stala práce J. Ludwiga a spol. (1980): Non-alcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. V souvislosti s enormním celosvětovým nárůstem nadváhy a diabetu 2. typu a potažmo s „celým“ metabolickým syndromem se NASH resp. NAFL resp. NAFLD dostaly do zcela jiného zorného pole. Dnes se obecně dá o nich říci, že jsou jaterním projevem metabolického syndromu a předpokládá se, že v budoucnu budou hlavní příčinou chronických jaterních chorob včetně indikací k jaterní transplantaci.

Práci ať již původních nebo systematických review na téma NAFLD resp. NASH byly napsány již tisíce. Nicméně v našem odborném písemnictví je původních takových prací málo, a když tak experimentálních hlavně z Ústavu fyziologie LF v Hradci Králové. Je proto záslužné, že autor předložené doktorské disertační práce takové téma zvolil, a že jeho školitelem se stal zkušený a významný náš hepatolog doc. MUDr. Rada Brůha, CSc.

Cíle práce

Jsou rozděleny do dvou projektů.

První, experimentální projekt vychází z hypotézy, že n-3 polynenasycené mastné kyseliny vykazují komplexní metabolické efekty, které ovlivňují vznik NAFLD. Cílem tohoto projektu bylo ověření této hypotézy na zvířecím modelu NAFLD/NASH indukovaném podáváním vysokotukové methionin-cholin deficientní diety myším kmene C57/Bl6.

Druhý projekt, klinický, vychází z poznatku, že prevalence NAFLD u pacientů s diabetem mellitem 2. typu a metabolickým syndromem je sice v České republice obdobná výskytu jinde ve světě a pohybuje se kolem 75 %, a že významná část těchto pacientů může mít pokročilou jaterní fibrózu, kterou lze dnes diagnostikovat pomocí neinvazivních metod. Cílem tohoto druhého, klinického projektu bylo **za prve**: 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 a **za druhé** u skupiny pacientů s NAFLD provést neinvazivní hodnocení stupně jaterní fibrózy a přítomnosti steatohepatitidy, a tam, kde byla provedena jaterní biopsie, korelovat tyto parametry s histologickým nálezem a biochemickými ukazateli.

Struktura a stratifikace práce

Je členěna klasickým způsobem tj. na přehled současného stavu problematiky, vlastní práci a diskusi. Rozsah jednotlivých částí je vyvážený a odpovídá běžným požadavkům na doktorskou disertační práci. Text je psán kultivovaným čtivým jazykem. Zvláště je třeba ocenit, s jakou jazykovou lehkostí a edukační kvalitou je napsaná část o současném stavu problematiky, když uvážíme nejednotnost výsledků a názorů, publikovaných v podstatě jen v zahraničních pracích. Navíc MUDr. Karel Dvořák prokázal vysokou odbornou erudici v experimentální i klinické oblasti studované problematiky a taková duplicita je u nás spíše řídkým jevem.

Diskuze je napsaná na 10 stranách. Autor kriticky hodnotí vlastní výsledky z nejvýznamnějšími studii cizími s poukazem na originalitu výsledků vlastních (ať již souhlasných či diskrepantních).

Celá práce je napsaná na 89 stranách textu, včetně literatury. Literárních odkazů, řazených abecedně, je 169 a prakticky všechny jsou na zahraniční práce. To také ukazuje, jak málo je u

nás původních prací na téma NAFLD/NASH, a jak bylo správné projekt doktorské disertační práce otevřít. Tabulek je 13, obrázků 19 (většinou grafy). Všechny instruktivně doplňují text a zhodnocují kvalitu práce.

Metodika, soubory a výsledky

První, experimentální část práce: Dvě experimentální skupiny myši (po 11) u kterých byla NASH vyvolaná krměním vysokotukovou methionin-cholin deficientní (HFMCD) dietou po dobu 6 týdnů byla u jedné z nich podávána směs n-3 polynenasycených mastných kyselin (PUFA) a u druhé jen FR, byly v různých parametrech srovnány s dvěma stejně velikými skupinami myši, u kterých nebyla NASH vyvolaná, a které byly krmeny buď jen FR nebo n-3 PUFA. Podávání HFMCD vedlo k vzestupu hmotnosti jater a celkové hmotnosti myši, k zvýšení sérové hladiny ALT a cholesterolu, v histologii jater k rozšíření plochy steatózy (která často měla fokální charakter) a zvýšení NAS skóre, ke zvýšení sérové hladiny cytokinů IL 2, IL6, TNF alfa. Podávání n-3 PUFA vedlo k signifikantnímu poklesu celkové hmotnosti myši a jejich jater u kontrol, tak u myši krmených HFMCD. Ke stejné statisticky významné úpravě došlo po n-3 PUFA i u jiných výše popsanych parametrů včetně parametrů steatózy s výjimkou adipokininu. Pozoruhodné jsou výsledky z vyšetření sérových mastných kyselin a jejich spektra a analýzy TG v jaterní tkáni.

Druhá klinická část projektu je rozdělena do dvou částí.

První část. V průběhu roku 2012 bylo ambulantně vyšetřeno 180 pacientů s DM 2. typu dispenzarizovaných na IV. interní klinice VFN a 1. LF UK, věk $64,2 \pm 9,3$ roků, muži/ženy 113/67, v první řadě za účelem zjištění prevalence NAFLD a souvisejících parametrů. U všech byly stanoveny jaterní testy (bilirubin, ALT, AST, GGT, ALP), koncentrace cholesterolu, triacylglycerolů, kyseliny močové a dále parametry diabetu (glykémie a glykovaný hemoglobin). Dále byly zjišťovány základní antropometrické údaje (výška, tělesná hmotnost, BMI a obvod pasu). Metabolický syndrom byl diagnostikován na základě diagnostických kritérií konsenzu AHA resp. IDF resp. původních kritérií IDF ev. WHO kritérií. Kompenzace diabetu byla hodnocena podle hodnoty glykémie na lačno a glykovaného hemoglobinu. Diagnóza NAFLD byla založena na známkách jaterní steatózy podle zobrazovacích metod nebo histologie a vyloučením jiných příčin akumulace tuku v játrech zejména v důsledku pití alkoholu. Všichni měli negativní anamnézu abúzu alkoholu, tedy < 210 g týdně u mužů resp. 140 g u žen, ověření při pravidelném sledování, dotazník, příbuzní, makrocytóza, CDT, ethylglukuronid v moči ev. náhodné stanovování alkoholémie. Anamnesticky bylo hodnoceno užívání léků, které mohou významně zvyšovat jaterní testy, cholestáza byla vyloučena USG a stanovením ALP, u všech pacientů byla vyloučena infekce viry hepatitid, dále ELFO ev. přítomnost autoprotilátek. Tumory a ložiskové procesy v játrech byly vyloučeny ultrazvukovým vyšetřením.

Metabolický syndrom na základě IDF kritérií byl prokázán u 93 % pacientů s DM 2. typu, resp. 96 % podle kritérií AHA/IDF resp. 96 % podle WHO. Četnost výskytu NAFLD byla zjišťovaná na skupině 122 nemocných (z celkových 180) u kterých bylo provedeno USG jater. Znamky NAFLD byly přítomny u 79 % pacientů. Ze zbylých pacientů bez dostupného ultrazvukového vyšetření mělo 10 resp. 8 vyšší ALT a GGT resp. jen GGT. Tito pacienti byli také považováni za pacienty se suspektním jaterním postižením. Nejčastějším ultrazvukovým nálezem byla steatóza jater. Fibróza ev. již cirhóza byly u 9 resp. 4 %. Mezi skupinou pacientů s NAFLD a skupinou bez NAFLD nebyly nalezeny signifikantní rozdíly ve věku ani pohlaví. Stejně tak nebyly nalezeny rozdíly v parametrech kompenzace diabetu. Pacienti s NAFLD však měli signifikantně vyšší tělesnou hmotnost, BMI, obvod pasu a hladinu triglyceridů v séru. Téměř všichni všichni pacienti s NAFLD (98 %) podle AHA/IDF kritérií měli metabolický syndrom. Statiny bylo léčeno 79 %, fibráty 34 %, hypotenzivy 82 %, hyperurikemie byla léčena u 32 %. Léčba DM: 4 % na dietě, 61 % PAD, 36 % PAD + insulin a 9% jen insulin. Ze všech zkoumaných parametrů byly užitím lineární regrese prokázány za nejtěsnější rizikové faktory pro přítomnost NAFLD tělesná hmotnost, BMI a obvod pasu. Nikoliv ostatní parametry, včetně kompenzace diabetu.

Druhá část. Do prospektivního sledování bylo zařazeno 112 pacientů (muži 79) vyšetřovaných v letech 2010-2013 na 4. interní klinice VFN, u kterých byla stanovena diagnóza NAFLD. Hlavním cílem této bylo rozlišení NASH a prosté steatózy a za druhé rozlišení stupně jaterní fibrózy. Histologické známky NASH byly přítomny u 38/56 pacientů, prostá steatóza u zbylých 18 pacientů. Pacienti s NASH měli signifikantně vyšší GGT, AST a triglyceridy a měli také pokročilejší stupeň jaterní fibrózy. Ta však v pokročilém stadiu byla i ve skupině bez NASH. Nejvíce signifikantním sérovým parametrem NASH byla koncentrace fragmentu M65 cytokeratinu 18 M65 (senzitivita 80 %, specificita 82 %, pro cut-off hodnotu 750 U/l, AUROC M65 0). Žádný další parametr neměl obdobnou sensitivitu ev. specificitu.

Rozlišení pokročilosti jaterní fibrózy. Pacientů s jaterními biopsiemi byli rozděleni podle stupňů pokročilosti jaterní fibrózy F0 – F2 (39 pacientů), F3 – F4 (17 pacientů). Pacienti s jaterní cirhózou (F4) byli ve srovnání s ostatními pacienty signifikantně starší. Stupeň jaterní fibrózy jednoznačně koreloval se sérovou koncentrací hyaluronové kyseliny (senzitivita 80%, specificita 91% , AUROC 0.94). Obdobně i když s menší statistickou významností korelovaly se stupněm fibrózy skórovací systémy: poměr AST/ALT, APRI skóre, NAFLD Fibrosis Score FIB 4 skóre a BARD skóre. Naopak se stupněm pokročilosti jaterní fibrózy nekorelovaly parametry související s apoptózou a nekrózou hepatocytů – fragmenty cytokeratinu 18 M30 a M65.

Porovávání skupin pacientů s a bez jaterní biopsie. Byly porovnány klinické a laboratorní parametry. Na základě neinvazivního parametru tj. fragmentu M65 cytokeratinu 18 měli pacienti indikovaní k jaterní biopsii častěji steatohepatitidu než pacienti, kteří k jaterní biopsii

indikováni nebyli (68 % vs. 16 %). Při hodnocení jaterní fibrózy (HA) by přibližně stejná část pacientů měla významnou fibrózu (35 % vs 29 % u bioptovaných).

Statistické metody

V různých ohledech byly užity tyto statistické metody: t-test - případně Mann-Whitney test, χ^2 test, Pearsonův či Spearmanův korelační koeficient, analýzy ROC křivek. Statistické analýzy byly provedeny pomocí BMDP Statistical Software verze 8.1 a programu STATISTICA CZ v. 8 (StatSoft, Praha, ČR).

Stanovisko oponenta

1. Jde o nadstandardně kvalitní doktorskou disertační práci.
2. Její autor MUDr. Karel Dvořák splnil všechny cíle doktorské disertační práce zaměřené na aktuální témata současné hepatologie.
3. Výsledky experimentální tak i klinické části práce jsou v soulase se studii zahraničními, nicméně u nás jsou originální a obohacují nejen naši hepatologii, případně jiné obory, včetně s teoretickým zaměřením. Zvláště je třeba vyzvednout experimentální a klinický pohled na zkoumanou problematiku.
4. Z výsledku vyjímám: Podávání vysokotukové methionin-cholin deficientní diety myším vedlo k jaternímu poškození s laboratorními i histologickými znaky charakteristickými pro NAFLD. Podávání n-3 PUFA vykazovalo příznivé účinky na všechny sledované parametry. 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) tak přítomnosti steatohepatitidy (fragmenty cytokeratinu 18: M30, M65 v séru).

Dotazy a připomínky

- a. Zdá se mi, že jedna třetina nemocných s DM 2. typu bez provedeného USG je dost. Jaký byl důvod, že vyšetření nebylo provedené. Za druhé jaká hepatologická vyšetření by měla být standardem u DM 2. typu (jako např. oční pozadí, neurologické vyšetření atd.) a v jaké frekvenci.
- b. Ve 13 případech byla jaterní biopsie provedena transjugulárně. O jaké onemocnění jater šlo, a jaký byl vztah tohoto onemocnění k NAFLD (kryptogenní cirhóza?).
- c. Na straně 22 má být 1/500 000 (a ne 50 000) a dále 11 portálních polí je dost, stačí 4-5, navíc ve vzorku 2.5-3 cm jedenáct portálních polí ani není.

- d. Až v 10 % se NAFLD vyskytuje u osob s BMI pod 25 i méně. Autor doktorské práce o tom píše v úvodních kapitolách. Nicméně, jaké preventivní vyšetření by doporučoval u těchto asymptomatických osob.
- e. Říká se, že steatóza ev. i steatohepatitida u osob po parenterální výživě ev. zkratovém výkonu na GIT pro nadváhu je přechodná. Je to pravda?

Závěr

Jde o nadstandardní doktorskou disertační práci, kterou MUDr. Karel Dvořák prokázal schopnost samostatné a tvůrčí vědecké práce. **Doporučuji** proto aby po jejím obhájení před komisí doktorského studijního programu 1. LF UK byla MUDr. Karlu Dvořákovi udělena vědecká hodnost Ph.D.

V Olomouci dne 10.8.2015



Prof. MUDr. Jiří Ehrmann, CSc.,

II. interní klinika – gastro - enterologická a hepatologická

LF UP a FN Olomouc