

Univerzita Karlova 1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Genetická predispozice ke komplikacím jaterní cirhózy

Genetic background of liver cirrhosis complications

MUDr. Renáta Šenkeříková

Praha, 2023

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

- Obor:** Fyziologie a patofyziologie člověka
- Předseda oborové rady:** Prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc.
- Školící pracoviště:** Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM)
Klinika hepatogastroenterologie a Laboratoř experimentální hepatologie, Praha, Česká republika
- Školitel:** Prof. MUDr. Julius Špičák, SCs.
IKEM, Klinika hepatogastroenterologie, Praha, Česká republika
- Konzultant:** doc. Jan Šperl, CSc.
IKEM, Klinika hepatogastroenterologie, Praha, Česká republika

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.

Obsah

Souhrn	4
Abstract	5
1 Úvod	6
1.1 Jaterní cirhóza	6
Patogeneze	6
Epidemiologie	6
Etiologie.....	6
Diagnostika	6
Léčba a regrese fibrózy.....	7
1.2 Portální hypertenze	8
1.3 Bakteriální infekce	8
Toll-like receptor 4 signální dráha	8
1.4 Genetické faktory v progresi komplikací jaterní cirhózy	9
Genetická predispozice k bakteriálním infekcím	9
Genetické faktory v léčbě chronické hepatitidy C	9
Genetické faktory progresu jaterní fibrózy	9
2 Cíle práce	9
3 Metody	10
4 Výsledky a komentáře	11
4.1 Genetická varianta <i>TNFA</i> c.–238A snižuje riziko závažných bakteriálních infekcí u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou čekajících na transplantaci jater (Příloha 1).....	11
4.2 Nosiči alely G <i>PNPLA3</i> rs738409 s HCV cirhózou a genotypem 1b mají nižší virémii, ale vyvinou jaterní selhání v mladším věku (Příloha 2)	13
4.3 Downregulace exprese <i>USP18</i> v mononukleárech periferní krve predikuje nulovou odpověď na trojkombinační terapii PEG-IFN- α , RBV a proteázovým inhibitorem u pacientů s chronickou hepatitidou C, genotyp 1: pilotní studie (Příloha 3)	14
4.4 Tuhost jater měřená pomocí 2D shear-wave elastografie predikuje i vysoké hodnoty portosystémového gradientu u kandidátů transplantace jater s pokročilou cirhózou jater (Příloha 4).....	15
4.5 Portální hypertenze jako hlavní faktor způsobující tuhost jater u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou (Příloha 5).....	17
5 Obecná diskuze	19
6 Souhrn výsledků	20
7 Literatura	20
8 Seznam publikací	22
Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertační práce	22
Publikace <i>in extenso</i> bez vztahu k tématu disertační práce	23
Kapitola v monografii.....	23

Souhrn

Jaterní cirhóza představuje konečné stadium většiny chronických jaterních chorob. Průběh onemocnění a jeho komplikace může být zásadně ovlivněn genetickými faktory hostitele a závažností portální hypertenze (PH).

Cílem práce bylo popsat roli genetických faktorů ovlivňujících progresi a komplikace jaterního onemocnění a určit roli neinvazivního hodnocení stupně jaterní fibrózy a tíže PH a jejich korelaci s měřením portosystémového gradientu (HVPG). Nejprve jsme se zaměřili na roli alelických variant v genech TLR4 signální dráhy na rozvoj závažných bakteriálních infekcí u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou, kandidátů transplantace jater (LT). Zjistili jsme, že promotorová varianta *TNFA* c.-238G/A významně snižuje riziko bakteriálních infekcí a mortalitu s nimi spojenou. Dále jsme ověřovali roli variantní alely G v genu *PNPLA3* v progresi chronického jaterního selhání a nutnosti LT u pacientů s jaterní cirhózou při HCV infekci. Výsledkem práce bylo zjištění, že nosičství variantní alely G vedlo k rychlejší progresi chronického jaterního selhání a nutnosti LT v mladším věku. Za třetí jsme se zabývali otázkou, zda účinnost trojkombinační léčby HCV infekce pomocí pegylovaného interferonu alfa, ribavirinu a proteázového inhibitoru první generace závisí na expresním profilu interferon-senzitivních genů před léčbou. Prokázali jsme, že jediným faktorem, který predikoval vyléčení, byla exprese *USP18* jak před zahájením protivirové léčby, tak v její časné fázi. Dále jsme se zaměřili na neinvazivní hodnocení tuhosti jater (LS) pomocí 2D shear-wave elastografie (SWE) u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou a její korelaci se stanovením stupně PH pomocí měření HVPG. Prokázali jsme silnou korelaci mezi měřením LS pomocí 2D-SWE a HVPG v širokém rozmezí hodnot. Ze sérových markerů byl nejpřesnějším ukazatelem tíže PH osteopontin. Nakonec jsme se snažili objasnit podíl statické a dynamické složky na měřenou hodnotu LS u dříve popsaného souboru pacientů. Zjistili jsme, že LS je u pacientů s pokročilou cirhózou jater určována především hodnotou HVPG, zatímco přínos obsahu kolagenu v jaterním parenchymu je relativně nízký.

Klíčová slova: Jaterní cirhóza, portální hypertenze, bakteriální infekce, genetické faktory, *PNPLA3*, tuhost jater, HCV infekce.

Abstract

Liver cirrhosis represents the end stage of most chronic liver diseases. The course of the disease and its complications can be significantly influenced by host genetic factors and the severity of portal hypertension (PH).

The aim of the study was to describe the role of genetic factors influencing the progression and complications of liver disease and to determine the role of non-invasive assessment of the stage of liver fibrosis and severity of PH and their correlation with portosystemic gradient (HVPG) measurements. We first focused on the role of allelic variants in TLR4 signalling pathway genes in the risk of occurrence of severe bacterial infections in patients with advanced liver cirrhosis, liver transplant (LT) candidates. We found that the *TNFA* c.-238G/A promoter variant significantly reduced the risk of bacterial infections and was associated with a decreased mortality rate. We further investigated the role of the variant G allele in *PNPLA3* gene in the progression of chronic liver failure and the need for LT in patients with liver cirrhosis due to HCV infection. As a result, we found that the carriage of the variant G allele led to a faster progression of chronic liver failure and the need for LT at a younger age. Third, we investigated whether the efficacy of triple combination treatment of HCV infection with pegylated interferon-alpha, ribavirin and a first generation protease inhibitor depends on the pre-treatment interferon-sensitive genes expression profile. We demonstrated that the only factor that predicted cure was the expression of *USP18* both before and in the early phase of antiviral treatment. We further investigated the non-invasive assessment of liver stiffness (LS) by 2D shear-wave elastography (SWE) in patients with advanced liver cirrhosis and its correlation with the degree of PH assessed as HVPG measurement. We demonstrated a strong correlation between LS using 2D-SWE and HVPG across a wide range of values. When assessing serum markers of PH, osteopontin was the most accurate indicator of its severity. Finally, we sought to elucidate the contribution of static and dynamic components of the LS measurement in the previously described cohort of patients. We found that LS in patients with advanced liver cirrhosis is determined primarily by the HVPG value, whereas the contribution of collagen content in the liver is relatively low.

Keywords: Liver cirrhosis, portal hypertension, bacterial infection, genetic factors, *PNPLA3*, liver stiffness, HCV infection.

1 Úvod

Jaterní cirhóza představuje konečné stadium většiny chronických jaterních onemocnění (CLD). V rozvoji CLD sehrávají důležitou roli také genetické faktory. V posledních letech bylo popsáno několik genů, jejichž varianty modifikují průběh CLD a jejichž nosičství může ovlivnit rychlost progresu a závažnost CLD různé etiologie, genetické faktory se uplatňují také v rozvoji bakteriálních infekcí u cirhotických pacientů. Terapie jaterních chorob a prognóza pacientů závisí na pokročilosti jaterní fibrózy a rychlosti progresu do jaterní cirhózy. Zlatým standardem v hodnocení pokročilosti jaterní fibrózy byla více než sto let jaterní biopsie a histologické hodnocení získaného vzorku jaterní tkáně. Jedná se však o výkon invazivní s možnými komplikacemi. To vedlo k vyvinutí neinvazivních metod na principu stanovení krevních biomarkerů nebo elastografických metod založených na měření tuhosti jaterní tkáně (liver stiffness, LS). Elastografické metody jsou také slibnou metodou pro odhalování pacientů s vysokým rizikem přítomnosti tzv. klinicky významné portální hypertenze.

1.1 Jaterní cirhóza

Jaterní cirhóza je morfologicky definována jako difúzní poškození jater s chronickým zánětem, množením vaziva (fibrózou) a tvorbou regeneračních uzlů jako reakcí na dlouhodobé poškození jaterní tkáně. Dochází k úbytku a ztrátě funkce jaterních buněk a k útlaku cévních struktur vazivem s rozvojem portální hypertenze (PH) (Pellicoro et al., 2014). Jaterní cirhóza je částečně reverzibilní proces, ale jen do určitého stupně pokročilosti (Desmet a Roskams, 2004).

Patogeneze

Jaterní fibróza je výsledkem hojivé odpovědi na poškození jaterních a/nebo biliárních buněk. Dochází k poruše jinak vyrovnaného procesu jaterní fibrogenese a fibrolýzy ve prospěch fibrogenese. Tento proces je velmi uniformní bez ohledu na etiologii jaterního onemocnění (Urbánek et al., 2022). Pokročilým stadiem jaterní fibrózy je cirhóza, kdy dochází k tzv. kapilarizaci jaterních sinusoidů, tedy k nadměrné tvorbě a ukládání vazivové hmoty v Disseho prostoru a k zániku fenestrací endotelu (Schaffner a Poper, 1963). Za tvorbu extracelulární matrix jsou zodpovědné aktivované hvězdicovité jaterní buňky, jejichž aktivace je spuštěna parakrině uvolňovanými mediátory z poškozených hepatocytů, z aktivovaných Kupfferových buněk a buněk imunitního systému. Dochází k jejich přeměně na myofibroblasty, které se mohou také kontrahovat a omezovat tak průtok krve sinusoidami a přispívat k rozvoji PH. Hlavními klinickými důsledky cirhózy je dysfunkce hepatocytů, zvýšená intrahepatální rezistence (vznik PH) a rozvoj HCC.

Epidemiologie

Jaterní cirhóza je celosvětově rozšířené onemocnění, vyskytuje se jak v zemích s nízkými příjmy, tak ve středně i vysoce příjmových zemích, ve všech etnických skupinách, a je spojena s vysokou morbiditou a mortalitou. Postižení jsou více muži. V České republice žije 40 000–60 000 pacientů s jaterní cirhózou a ročně jich v jejím důsledku umírá asi 2 000.

Etiologie

V západních zemích je nejčastější příčinou jaterní cirhózy nadměrná konzumace alkoholu a chronická HCV infekce, zatímco ve většině zemí Asie a subsaharské Afriky se jedná o chronickou hepatitidu B (HBV). Po objevení viru hepatitidy C v roce 1989 a definici jednotky nealkoholické steatohepatitidy (NASH) u metabolického syndromu je diagnóza tzv. kryptogenní cirhózy (tj. bez zjevné příčiny) stanovována jen zřídka.

Diagnostika

Po mnoho let se k hodnocení jaterní fibrózy využívalo jaterní biopsie. Dnes se ke stanovení jaterní pokročilosti využívají tzv. neinvazivní testy, existují dva odlišné přístupy: 1) „biologický“ přístup založený na stanovení sérových markerů fibrózy (nejsou striktně specifické pro jaterní parenchym); a 2) „fyzikální“ přístup, který je založen na měření tuhosti jaterní tkáně na základě hodnocení rychlosti šíření vibrací v jaterní tkáni.

- **Sérové markery fibrózy**

Sérové markery můžeme rozdělit podle několika kritérií. Rozlišujeme sérové markery přímé, které zahrnují molekuly přímo se podílející na procesu fibrotizace (např. kyselina hyaluronová (HA), N-terminální propeptid prokolagenu typu III (PIIINP), matrix metaloproteinázy...). Tyto molekuly se stanovují patentovanými komerčně dostupnými soupravami (ELF skóre, Fibrotest). Druhou skupinu představují sérové markery nepřímé, které jsou odvozeny od standardních laboratorních testů, které bezprostředně s patogenezí fibrózy nesouvisí, ale při fibróze a cirhóze se mění, nejlépe validovány jsou AST to Platelet Ratio Index (APRI) a Fibróza-4 (FIB-4) skóre u virových hepatitid a NAFLD anebo NAFLD fibróza skóre u NAFLD.

- **Zobrazovací metody**

Ačkoli definice cirhózy je založena na histologickém vyšetření, k diagnostice se často používají zobrazovací metody jako je břišní sonografie, počítačová tomografie nebo magnetická rezonance. Všechny tyto zobrazovací metody jsou schopny vyhodnotit až pokročilejší morfologické známky jaterní cirhózy a PH.

- **Elastografické metody**

Novější metodou pro posuzování pokročilosti jaterního onemocnění je elastografie jater (SWE). Využíváno je velmi dobré negativní korelace mezi elastograficky měřenou LS a množstvím vaziva v játrech. K hodnocení LS využíváme měření rychlosti šíření tzv. shear-wave neboli příčných vln. Rychlost příčné vlny úměrně koreluje s LS podle Youngova modulu pružnosti $E = 3\rho V_s^2$ (E = elasticita (tuhost) jaterní tkáně, ρ = hustota tkáně, V_s = rychlost šíření příčné vlny); s narůstající LS stoupá rychlost šíření vln (Shiina et al., 2015).

První komerčně dostupnou elastografickou metodou vyvinutou pro měření LS byla v roce 2003 vibracemi kontrolovaná transienční elastografie (VCTE), příkladem 2D-SWE je přístroj Aixplorer®, od výrobce Supersonic Imaging. Podle konsenzu Baveno VI z roku 2015 je při použití VCTE možné diagnostikovat jaterní cirhózu u asymptomatických pacientů, pokud je při dodržení standardních podmínek alespoň ve dvou dnech naměřena hodnota LS vyšší než 15 kPa (de Franchis a Baveno, 2015). Elastografické metody jsou vhodné k průběžnému sledování vývoje jaterního onemocnění – progresu či regrese jaterní fibrózy v čase a screeningu jaterní cirhózy.

- **Kvantitativní stanovení obsahu kolagenu v játrech**

Pro subklasifikaci jaterní cirhózy a určení její prognózy bylo v roce 2009 popsáno kvantitativní stanovení obsahu kolagenu v játrech pomocí počítačem asistované obrazové analýzy (Calvaruso et al., 2009). Obsah kolagenu je vyjádřen jako procentuální zastoupení kolagenizované plochy (collagen proportionate area, CPA) v jaterní biopsii nebo v explantátu jater. Další běžně používanou metodou pro kvantifikaci obsahu kolagenu je stanovení obsahu hydroxyprolinu v jaterní tkáni, jako hlavní součásti kolagenu (Woessner, 1961).

Léčba a regrese fibrózy

Léčba pacientů s jaterní cirhózou je specifická podle její etiologie. Nejefektivnější je eliminace vyvolávající příčiny. U chronické hepatitidy B se podávají léky zastavující replikaci viru, u chronické HCV infekce se podávají přímo působící antivirotika (DAA) vedoucí k eradikaci viru a dosažení tzv. setrvalé virologické odpovědi (sustained virological response, SVR). U ALD je nutná úplná a doživotní abstinence od alkoholu, u pacientů s NASH jsou to dietní a režimová opatření, která vedou ke snížení obsahu tuku v játrech i v periférii a k obnovení citlivosti tkání na inzulín. K redukci váhy lze přispět farmakologicky a rovněž metodami bariatrické chirurgie.

Dříve se předpokládalo, že proces fibrotizace jater je zcela nevratný. V dnešní době již existuje mnoho experimentálních i klinických důkazů o tom, že pokročilá fibróza a dokonce i časná stadia jaterní cirhózy mohou být reverzibilní. Přesná hranice, kdy se fibróza stane nevratnou, není zcela jasná. Za hranici ireverzibility lze považovat mikronodulární jaterní cirhózu se zvýšenou tloušťkou sept, s rozvinutou PH a počínajícím jaterním selháním (Bedossa, 2015).

V době DAA dokážeme více než 95 % pacientů s pokročilou fibrózou jater při HCV infekci vyléčit, což vede ke zlepšení stupně jaterní fibrózy i prognózy pacienta. Zlepšení jaterní fibrózy během

pětiletého sledování bylo popsáno i u více než 70 % pacientů s chronickou hepatitidou B ve stadiu jaterní cirhózy, u kterých se podařilo při terapii adefovirem docílit suprese replikace viru (Marcellin et al., 2013).

1.2 Portální hypertenze

PH definujeme jako patologické zvýšení tlaku v portální žíle a jejím řečišti. Za normálních okolností se tlakový gradient mezi portální žílou a dolní dutou žílou (tzv. portosystémový gradient, HVPG) pohybuje od 1 do 5 mm Hg. PH znamená zvýšení tohoto gradientu nad 5 mm Hg a při hodnotách nad 10 mm Hg mluvíme o klinicky signifikantní portální hypertenzi (CSPH). U jaterní cirhózy je počátečním mechanismem vedoucím k PH zvýšení intrahepatální vaskulární rezistence. Na jejím zvýšení se podílí složka pasivní (statická), která je dána změnami struktury jater (fibróza, uzlovitá přestavba jaterní tkáně při cirhóze, kolagenizace Disseho prostoru aj.), a složka aktivní (dynamická), která je podmíněna dysfunkcí endotelových buněk jaterních sinusoid a kontrakcí hvězdicových buněk. U člověka lze PH změřit přesně pouze invazivně při katetrizaci jaterních žil.

Zhoršení PH koreluje s rozvojem klinické dekompenzace jaterního onemocnění. Při hodnotách HVPG >10 mm Hg dochází k rozvoji varixů (Garcia-Tsao et al., 1985) a tato hodnota představuje nejlepší prediktor dekompenzace jaterního onemocnění a rizika rozvoje HCC (Ripoll et al., 2009). Proto je hodnota HVPG >10 mm Hg u pacientů s kompenzovanou jaterní cirhózou považována za mezník zvyšující riziko dekompenzace onemocnění, nad tuto hodnotu se jedná o CSPH. Při hodnotách HVPG >12 mm Hg se zvyšuje riziko krvácení z jícnových varixů.

Měření HVPG představuje stále zlatý standard k posouzení přítomnosti a závažnosti PH u pacientů s jaterní cirhózou a je považován za referenční vyšetření ke stanovení tíže PH (de Franchis a Baveno, 2015). HVPG je rovněž nejlépe validovanou metodou k posouzení rizika závažných komplikací jaterní cirhózy a PH (Bosch et al., 2009). V dnešní době je snaha nahradit toto invazivní vyšetření neinvazivními metodami, především elastografickým měřením LS.

Podle dosavadních zkušeností je VCTE slibnou metodou pro odhalování pacientů s vysokým rizikem rozvoje PH. Byly publikovány studie, ve kterých hodnoty LS u pacientů s pokročilým jaterním onemocněním korelují s HVPG a možností predikovat CSPH (Vizzutti et al., 2007). Dalšími potencionálními neinvazivními parametry, ze kterých lze určit stupeň PH je MELD (Model for End-stage Liver Disease) skóre, kombinovaný parametr vyjadřující stupeň jaterní dysfunkce a dobře predikující přežití pacientů s jaterní cirhózou a LSPS (Liver Spleen Platelets Score), prediktor kombinující LS, počet trombocytů a průměr sleziny. Toto skóre bylo přesnější pro identifikaci pacientů s CSPH než samotná LS (Berzigotti et al., 2013). V poslední době je snahou identifikovat krevní markery jako neinvazivní ukazatele PH. Jejich diagnostická výpovědní hodnota je však nižší ve srovnání s LS. Enhanced Liver Fibrosis skóre (ELF) bylo původně navrženo jako neinvazivní prediktor stadia jaterní fibrózy u pacientů s CLD, bez jaterní cirhózy. Autoři Simbrunner et al. prokázali dobrou korelaci mezi ELF skóre a HVPG (Simbrunner et al., 2020).

1.3 Bakteriální infekce

Jaterní cirhóza představuje jeden z imunokompromitujících stavů, který může vést k rozvoji infekčních komplikací s mortalitou okolo 30 % (Tandon a Garcia-Tsao, 2008). Příčinou je několik faktorů, zejména přítomnost syndromu imunitní dysfunkce asociovaného s cirhózou (CAIDS), kdy je změněná funkce buněk imunitního systému, snížená syntetická funkce jater daná pokročilostí jaterního onemocnění, přítomnost PH se zvýšenou střevní propustností, kvantitativními a kvalitativními změnami střevní mikroflóry, které přispívají k patologické bakteriální translokaci (BT) ze střeva do systémového oběhu a genetické faktory. Prevalence bakteriálních infekcí u hospitalizovaných pacientů s cirhózou se pohybuje mezi 25–50 % (Moreau et al., 2013). K nejčastějším infekčním komplikacím u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou patří spontánní bakteriální peritonitida (SBP), infekce močových cest (UTI), respirační infekce, bakteriémie a infekce kůže a měkkých tkání.

Toll-like receptor 4 signální dráha

V přirozené imunitě proti gramnegativním bakteriím hraje klíčovou roli TLR4 signální dráha. TLR4 reaguje na bakteriální lipopolysacharid (LPS, endotoxin), složku vnější membrány

gramnegativních bakterií, které ve zvýšené míře pronikají do portální krve následkem zvýšené střevní permeability při PH. Aktivace Kupfferových buněk je vyvolána interakcí LPS s transportními proteiny a buněčnými receptory. Důsledkem aktivace Kupfferových buněk je zvýšená produkce řady cytokinů, z nichž nejvýznamnější roli hraje tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α). Hladina endotoxémie koreluje s pokročilostí jaterní dysfunkce a stupněm PH (Lin et al., 1995). Nadprodukce TNF- α a dalších prozánětlivých cytokinů se podílí jak na rozvoji závažných bakteriálních infekcí (ZBI) a jiných systémových komplikací, tak na zvyšování zánětlivé reakce v játrech a tím na progresi jaterní cirhózy. Tritto et al. uvádí, že pacienti s pokročilejší jaterní cirhózou, Child-Pugh B a C mají vyšší sérové koncentrace TNF- α a signifikantně sníženou fagocytární schopnost neutrofilů ve srovnání s cirhotiky Child-Pugh A a zdravou populací (Tritto et al., 2011). Z této práce lze usuzovat, že chronicky zvýšená sérová koncentrace TNF- α , vzniklá v důsledku déletrvajících endotoxémie, vede k exhausci imunitního systému a ke snížení opsonizační a fagocytární kapacity neutrofilů.

1.4 Genetické faktory v progresi komplikací jaterní cirhózy

Genetická predispozice k bakteriálním infekcím

Publikované studie poukazují na souvislost mezi genetickými variantami v genech TLR4 signální dráhy a rozvojem ZBI (Guarner-Argente et al., 2010), jedná se o varianty *LBP* c.+1306C/T, *BPI* c.+645A/G, *CD14* c.-159C/T, *TLR4* c.+1196C/T, *TNFA* c.-238 a c. -863, *IL-1B* c.-31C/T, *IL-1RA* VNTR. Tyto varianty ovlivňují *in vitro* expresi genu nebo funkci výsledného proteinu.

Genetické faktory v léčbě chronické hepatitidy C

Před érou DAA byla léčba pokročilých cirhotiků založena na terapii pegylovaného interferonu alfa (PEG-IFN- α) v kombinaci s ribavirinem (RBV). V roce 2009 byl popsán gen *IL28B* (rs12979860) a jeho vliv na predikci úspěšnosti léčby HCV. Nosičství genotypu CC v tomto genu predikovalo vyšší úspěšnost léčby ve srovnání s genotypy CT a TT. Dalším z možných faktorů vysvětlujícím nízkou úspěšnost léčby pomocí terapie PEG-IFN- α a RBV je rozdílná aktivace tzv. interferon-senzitivních genů (ISG) v hepatocytech a periferních polymorfonukleárních buňkách (PBMC). Virus HCV zvyšuje bazální expresi ISG v hepatocytech a PBMC ve srovnání se zdravými jedinci (Bolen et al., 2013). Rozdílná bazální exprese ISG je popsána i mezi skupinami HCV nemocných; mezi pacienty nereagujícími na léčbu PEG-IFN- α a RBV (tzv. nonrespondenti) ve srovnání s těmi, kteří dosáhli eliminace viru (respondenti).

Genetické faktory progresu jaterní fibrózy

Průběh jaterních onemocnění je ovlivňován především geny s vlivem na metabolismus tuků v játrech. Nejstudovanější a nejlépe popsanou variantou s dopadem na progresi jaterní fibrózy je SNP *PNPLA3* rs738409 c.444C>G. Tento SNP je rizikovým faktorem i rozvoje NASH, jaterní cirhózy u NASH, u ALD nebo u nemocných s HCV (Trepo et al., 2016). Představuje také rizikový faktor HCC u ALD, nikoli však u NASH jater nebo virových hepatitid B a C (Singal et al., 2014). Jedná se o gen kódující fosfolipázu, jejíž funkcí je nejspíše směna pro buňku cennějších nenasycených mastných kyselin za nasycené.

2 Cíle práce

Cílem práce bylo popsat roli genetických faktorů ovlivňujících progresi a komplikace jaterního onemocnění a určit roli neinvazivních metod v hodnocení stupně jaterní fibrózy a tíže portální hypertenze, a to zejména:

1. Objasnit úlohu variant v genech TLR4 signální dráhy na rozvoj závažných bakteriálních infekcí u pacientů s pokročilou cirhózou jater zařazených na čekací listině k transplantaci jater.
2. Ověřit roli variantní alely G v genu *PNPLA3* na progresi chronického jaterní selhání a načasování transplantace jater.
3. Objasnit, zda je účinnost trojkombinační léčby peginterferonem alfa, ribavirinem a proteázovým inhibítorem první generace u pacientů s pokročilým onemocněním jater při HCV infekci ovlivněna expresním profilem interferon-senzitivních genů před léčbou, a definovat potenciální genetické prediktory dosažení setrvalé virologické odpovědi.

4. Stanovit roli měření tuhosti jater pomocí 2D shear-wave elastografie a stanovení vybraných krevních markerů v hodnocení závažnosti portální hypertenze u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou.
5. Zjistit podíl statické a dynamické složky na měřenou hodnotu tuhosti jater u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou zařazených na čekací listině k transplantaci jater.

3 Metody

Genotypizace SNP *PNPLA3* rs738409 c.444C>G byla provedena pomocí TaqMan SNP genotyping esejí č. C_7241_10 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Genotypizace probíhala podle protokolu dodaného výrobcem metodou real-time PCR za použití přístroje Applied Biosystems ABI 7300 Real-Time PCR (Thermo Fischer Scientific).

SNP *IL28B* rs12979860 C>T byl genotypován pomocí PCR a metody RFLP, jak bylo dříve popsáno Fabrisem et al. (Fabris et al., 2011). PCR produkt o délce 242 bp byl následně štěpen enzymem *Bsh1236I*. Délka vzniklých restrikčních fragmentů byla stanovena pomocí agarové elektroforézy.

Genotypizace alelických variant *TLR4* c.+1196C/T, *CD14* c.–159C/T, *TNFA* c.–238G/A, *TNFA* c.–863C/A, *IL1B* c.–31C/T a *IL1RN* VNTR (UniSTS:156109) byla provedena metodou analýzy polymorfismu délký restrikčních fragmentů (RFLP), jak je popsáno v dříve (Petrasek, Hubacek et al. 2009).

Sérové koncentrace TNF- α byly měřeny z krevních vzorků odebraných pacientům bezprostředně před transplantací jater. Koncentrace TNF- α byla stanovena pomocí Quantikine HS ELISA human TNF- α imunoeseje (R&D Systems, Abingdon, UK).

Vyšetření koncentrace HCV RNA v plazmě byla provedena metodou Roche AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test v1.0 a v2.0 dle období, kdy byl pacient léčen.

Izolace PBMC byla provedena z periferní žilní krve odebrané do EDTA zkumavek. Následně byla krev naředěna 9 ml 1% roztoku PBS (phosphate buffered saline) a navrstvena v další zkumavce na 9 ml Lymphoprep gradientu (Axis-Shield, Oslo, Norway). Zkumavky byly centrifugovány rychlostí 1 400 rpm po dobu 30 minut při teplotě 10 °C. Buffy-coat byl poté přenesen do 15 ml RNase-free zkumavek, naředěn PBS a centrifugován rychlostí 1 000 rpm při 10 °C. Po odstranění supernatantu byly PBMC připraveny k izolaci RNA, která byla provedena za pomoci RNeasy Mini Kitu (Quiagen, Valencia, CA). Získaná mRNA byla reverzně transkribována do ss-cDNA za pomoci RevertAid Premium First Strand cDNA synthesis kitu (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Analýza genových expresí *CXCL9*, *IFI16*, *IFI27*, *IFNG*, *IFNLR1*, *ISG15* a *USP18* byla provedena metodou real-time PCR za použití mikrofluidních karet TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Hodnoty genových expresí (Ct) byly vztaženy k expresím analyzovaných housekeeping genů v kartě ($2^{-\Delta Ct}$). Relativní hodnota genové exprese byla stanovena metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Konečné výsledky byly vyjádřeny jako násobky mediánů exprese v porovnání s hodnotou exprese vyšetřovaných genů ve skupině 7 zdravých dobrovolníků. *GAPDH* byl použit jako housekeeping gen ve statistické analýze.

ELF test byl proveden pomocí analyzátoru Centaur CP (Siemens Healthineers). ELF skóre bylo vypočteno podle vzorce (Centaur CP formula) = 0,846 x ln (HA) + 0,735 x ln (PIIINP) + 0,391 x ln (TIMP-1) + 2,494. Další sérové markery, jako koncentrace interleukinu-6 (IL-6), Vascular Cell Adhesion Moleculy 1 (VCAM-1), antagonisty interleukin-1 receptoru (IL-1ra/IL-1F3), osteopontinu a TNF- α byly stanoveny ze vzorků plazmy dle doporučení výrobce.

Měření HVPG bylo provedeno cestou katetrizace jaterních žil transjugulárně.

Tuhost jater byla měřena pomocí 2D-SWE na přístroji Aixplorer® ultrasound system (Supersonic Imagine S.A., Aix-en-Provence, France), za použití 3,5 MHz konvexní sondy (SC6-1).

Hodnocení CPA bylo provedeno z explantátu jater, kdy byly připraveny 4 bločky tkáně o velikosti 15 x 15 x 2 mm k rutinnímu histologickému vyšetření. Z každého parafínového bločku byly získány dva 4 μ m silné řezy, které byly obarveny technikou Picro-Sirius Red (PSR) k vizualizaci kolagenu. Zhodnocení CPA bylo provedeno histomorfometricky za pomoci 3DHitech Panoramic Desk II DW digitálního skeneru (3DHitech Kft., Budapest, Hungary) a morfometrického programu (Nikon NIS-Elements AR 3.2 Nikon, Tokyo, Japan).

Poměr hydroxyprolinu k celkovým aminokyselinám (HP/AA ratio) byl stanoven kolorimetrickou hydroxyprolinovou esejí detekující 3-hydroxy, 4-hydroxy a 5-hydroxyprolinové zbytky.

4 Výsledky a komentáře

4.1 Genetická varianta *TNFA* c.-238A snižuje riziko závažných bakteriálních infekcí u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou čekajících na transplantaci jater (Příloha 1)

Cílem naší práce bylo zjistit úlohu variant v genech TLR4 signální dráhy na rozvoj závažných bakteriálních infekcí (ZBI) u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou zařazených na čekací listině (WL) k transplantaci jater (LT).

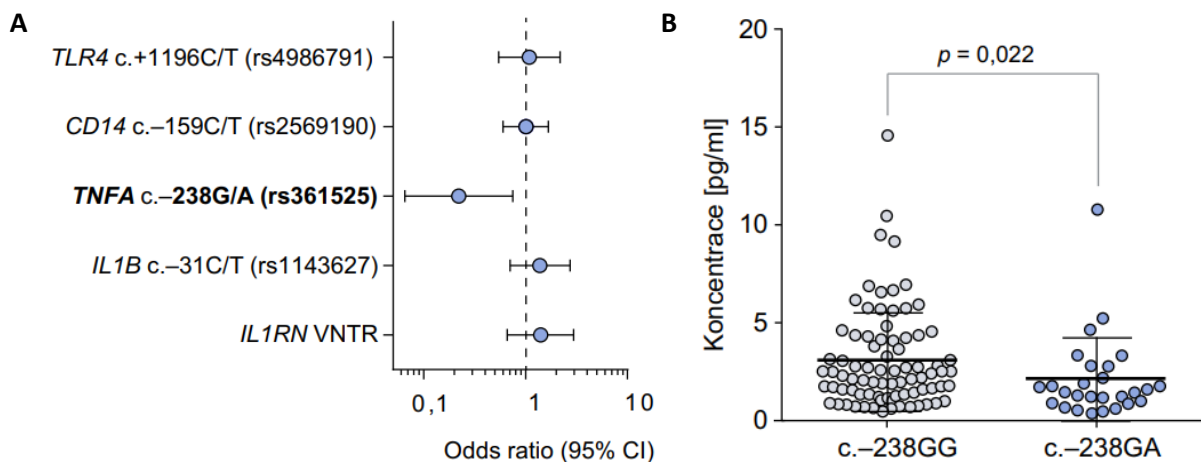
Retrospektivně jsme zhodnotili výskyt ZBI vyžadujících hospitalizaci a i.v. ATB terapii u kandidátů LT. Český (pilotní) soubor zahrnoval 336 a nizozemský (validační) 332 dospělých pacientů s pokročilou jaterní cirhózou Child-Pugh B a C zařazených na WL k LT v IKEM, Praha, Česká republika a v Erasmus MC-University Medical Centre, Rotterdam, Nizozemsko v letech 1995 až 2010. U pacientů v pilotním souboru byla provedena genotypizace lokusů *TLR4* c.+1196C/T, *CD14* c.-159C/T, *TNFA* c.-238G/A, *IL-1B* c.-31C/T a *IL-1RA* VNTR. Ve validačním souboru byl cíleně genotypován lokus *TNFA* c.-238G/A. Sérové koncentrace TNF- α byly stanoveny v krevních vzorcích odebraných pacientům těsně před LT. Koncentrace TNF- α byla stanovena v krevních vzorcích 27 heterozygotů (*TNFA* c.-238G/A) a u 81 homozygotů (*TNFA* c.-238G/G) srovnatelných věkem, pohlavím a etiologií základního onemocnění.

V pilotním souboru vyvinulo ZBI 115/336 (34,2 %) pacientů. Riziko vzniku ZBI bylo signifikantně vyšší u žen a u pacientů s vyšším Child-Pugh a MELD skóre. Ve validačním souboru vyvinulo ZBI 133/332 (40,1 %) nemocných, riziko vzniku ZBI bylo i v tomto souboru vyšší u pokročilejších pacientů podle Child-Pugh a MELD skóre, asociace s ženským pohlavím signifikantní nebyla. Frekvence většiny ZBI byla v pilotní i validační kohortě podobná (pneumonie 10/130 vs. 20/170, $p = 0,244$, infekce močových cest 21/130 vs. 25/170, $p = 0,730$ a infekce kůže a měkkých tkání 8/130 vs. 10/170, $p = 0,922$). SBP byla signifikantně častější v pilotním souboru (84/130 vs. 90/170, $p = 0,042$), zatímco ve validačním souboru byl častější výskyt infekce z neznámého zdroje (7/130 vs. 25/170, $p = 0,001$).

Genetická asociace se závažnou bakteriální infekcí

Nosiči variantní alely *TNFA* c.-238A měli signifikantně nižší riziko vzniku ZBI (OR 0,22, 95% CI 0,07–0,75, $p = 0,008$) ve srovnání s homozygoty pro ancestrální alelu *TNFA* c.-238G. Bonferroniho korekce na mnohočetné testování v 5 lokusech zvýšila hodnotu p na $p_{\text{corr}} = 0,042$. V ostatních studovaných lokusech nebyla asociace se ZBI prokázána (Obrázek 1A). Ve validačním souboru byla asociace mezi alelou *TNFA* c.-238A a nižším výskytem ZBI u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou potvrzena (OR 0,37, 95% CI 0,14–1,02, $p = 0,046$) a nebyla závislá na etiologii ZBI.

Obrázek 1 (A) Riziko bakteriální infekce podle alelické varianty ve vybraných genech. **(B)** Snižená sérová koncentrace TNF- α u nosičů alely *TNFA* c.-238A



Data od 81 homozygotů (*TNFA* c.-238GG) a 27 heterozygů (*TNFA* c.-238GA) jsou znázorněna jako jednotlivé body. Vodorovné čáry označují průměr (tlustá čára) a směrodatné odchylky (tenké čáry).

Nosičství variantní alely *TNFA* c.–238A vede ke snížení transkripční aktivity genu *TNFA*, a tím ke snížené produkci TNF- α . Prokázali jsme, že 27 heterozygotů pro *TNFA* c.–238A vykazovalo významně nižší sérové koncentrace TNF- α ve srovnání s 81 homozygoty odpovídajícími věkem, pohlavím a diagnózou pro ancestrální alelu *TNFA* c.–238G ($2,13 \pm 2,11$ pg/ml vs. $3,11 \pm 2,52$ pg/ml, $p = 0,022$) (Obrázek 1B). Rozdíl mezi 27 heterozygoty a všemi 188 homozygoty byl ještě výraznější ($2,13 \pm 2,11$ pg/ml vs. $3,52 \pm 3,27$ pg/ml, $p = 0,006$).

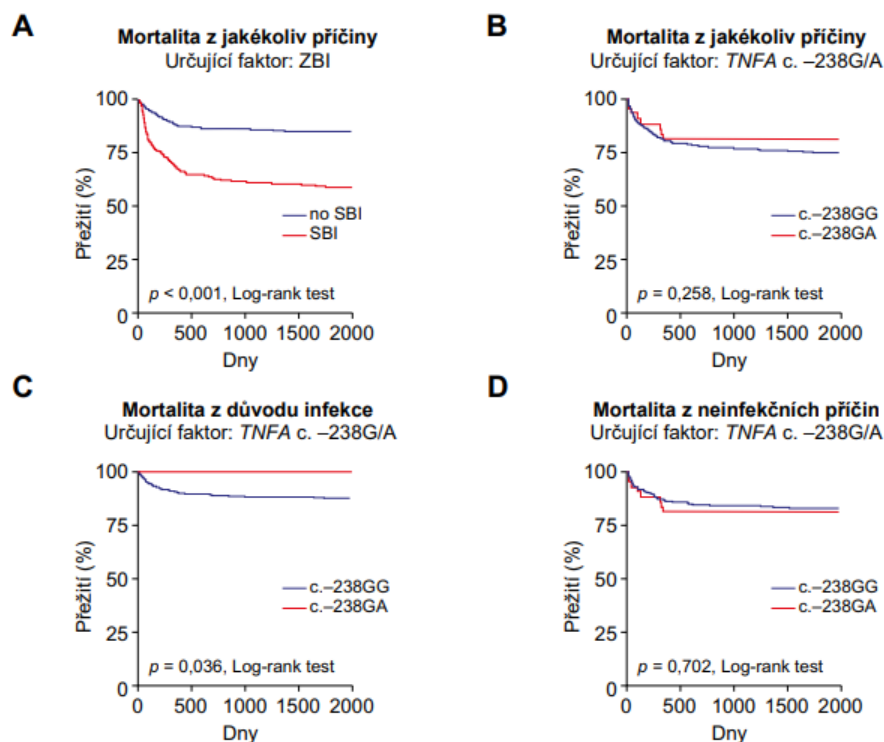
Nezávislémi prediktory ZBI byli genotyp *TNFA* c.–238 a vyšší Child-Pugh a MELD skóre. Při použití Waldovy statistiky jsme zjistili, že nosičství variantní alely *TNFA* c.–238A snižovalo pravděpodobnost vzniku ZBI v důsledku pokročilé jaterní dysfunkce Child-Pugh C o 76 % (5,044/6,61). Následné výpočty ukázaly, že přítomnost alely *TNFA* c.–238A zabránila v celém souboru rozvoji 7,2 % (95% CI 3,7–8,8 %) ZBI (preventabilní frakce v populaci). U pacientů, u kterých došlo k rozvoji ZBI, by 70,6 % (95 % CI 36,7–86,4 %) těchto případů bylo možné hypoteticky předejít přítomností variantní alely *TNFA* c.–238A (preventabilní frakce mezi exponovanými).

Přítomnost alely *TNFA* c.–238A jako prediktor mortality

ZBI, věk, ženské pohlaví a MELD skóre byly identifikovány jako významné prediktory celkové předtransplantační mortality (Obrázek 2A), naproti tomu genotyp *TNFA* c.–238 nebyl spojen s mortalitou z jakékoliv příčiny (Obrázek 2B).

Na podkladě našich předchozích výsledků, které prokázaly významnou asociaci genotypu *TNFA* c.–238 se vznikem ZBI (Obrázek 1A) a kdy ZBI byla silně spojená s mortalitou (Obrázek 2A), jsme se domnívali, že genotyp *TNFA* c.–238 by mohl být podmíněným prediktorem mortality na základě infekčního stavu hostitele. Provedli jsme proto analýzu podskupin a zjistili jsme, že pacienti nesoucí alelu *TNFA* c.–238A měli významně snížené riziko úmrtí na ZBI ve srovnání s homozygoty *TNFA* c.–238GG (Obrázek 2C). Nikdo z nosičů variantní alely *TNFA* c.–238A, u kterých se vyvinula ZBI v předtransplantačním období, nezemřel, zatímco mortalita související se ZBI u homozygotů pro ancestrální alelu *TNFA* c.–238G dosáhla 12 % (Obrázek 2C). Podle očekávání neexistovala žádná souvislost mezi *TNFA* c.–238 a předtransplantační mortalitou z neinfekčních příčin (Obrázek 2D).

Obrázek 2 Vliv ZBI (A) a genotypu *TNFA* c.–238GA (B) na celkovou mortalitu před LT a souvislost genotypu *TNFA* c.–238GA s úmrtím v důsledku ZBI (C) nebo z neinfekčních příčin (D) byl hodnocen ve sloučeném souboru pacientů ($n = 668$).



V naší studii jsme ukázali, že přítomnost alely *TNFA* c.-238A u pacientů s pokročilým onemocněním jater prakticky vylučuje pravděpodobnost vzniku ZBI nebo úmrtí v důsledku ZBI u pacientů čekajících na LT. Významný přínos této alely je podpořen tím, že TNF zprostředkovaná desenzibilizace vrozených imunitních buněk vede u pacientů s pokročilým onemocněním jater ke zvýšené náchylnosti k bakteriálním infekcím. Naše výsledky naznačují možné využití genotypizace *TNFA* rs361525 při hodnocení individuálního rizika rozvoje ZBI u čekatelů na LT.

4.2 Nosiči alely G *PNPLA3* rs738409 s HCV cirhózou a genotypem 1b mají nižší virémii, ale vyvinou jaterní selhání v mladším věku (Příloha 2)

V této studii jsme se zaměřili na zkoumání vlivu genotypu *PNPLA3* na riziko chronického jaterního selhání u homogenní skupiny pacientů s HCV cirhózou, s genotypem 1b.

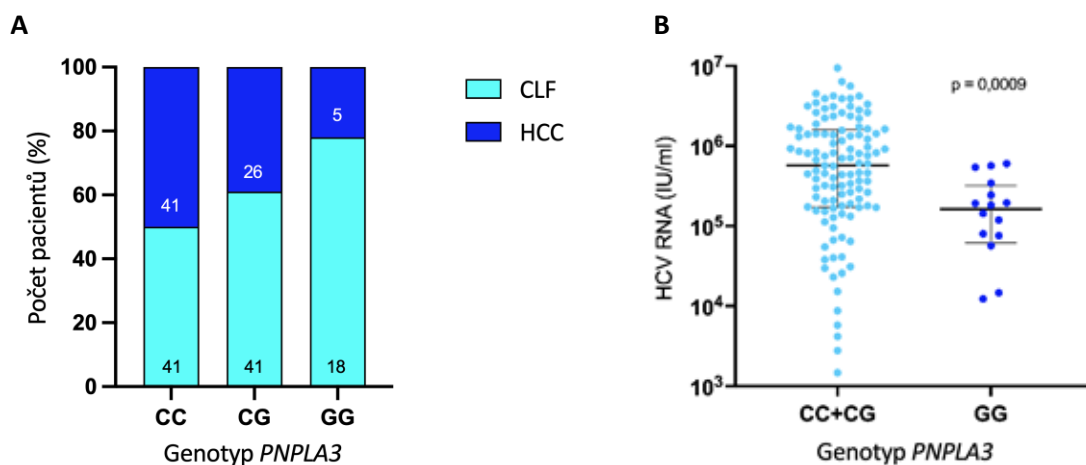
Do studie bylo zařazeno 172 dospělých pacientů s HCV cirhózou s genotypem 1b, kteří podstoupili LT v IKEM v letech 1995 až 2018. Sto pacientů bylo transplantováno pro chronické jaterní selhání (skupina CLF) podle Child-Pugh a MELD skóre a 72 pacientů bylo transplantováno pro jaterní cirhózu s malým hepatocelulárním karcinomem (HCC), tito pacienti neměli známky jaterní dysfunkce (skupina HCC). Zastoupení genotypů *PNPLA3* bylo srovnáváno s jedinci (n = 647) z epidemiologické studie MONICA (Cífková et al., 2010), genotypizační data byla převzata (Trunečka et al., 2018).

Pacienti, kteří podstoupili LT pro CLF, byli v porovnání s nemocnými s HCC mladší $53,5 \pm 7,2$ vs. $59,6 \pm 6,6$, $p < 0,001$, měli pokročilejší jaterní onemocnění podle Child-Pugh skóre $9,1 \pm 1,8$ vs. $7,1 \pm 1,9$, $p < 0,001$ a MELD skóre $14,1 \pm 3,9$ vs. $11,1 \pm 3,7$, $p < 0,001$. Ve skupině CLF bylo v porovnání se skupinou HCC významně vyšší zastoupení nepříznivé alely *PNPLA3* G jak v alelickém, tak recesivním modelu (CG + GG vs. CC: OR, 1,90; 95% CI, 1,017–3,472, $p = 0,045$ a GG vs. CC + CG: OR, 2,94 95% CI, 1,032–7,513, $p = 0,042$) (Obrázek 3A). Frekvence genotypů se lišila i mezi skupinou CLF a studií MONICA, a to v alelickém i recesivním modelu (OR 1,87, 95% CI 1,222–2,875, $p = 0,004$; OR 3,33, 95% CI, 1,82, $p < 0,001$). Skoro dvojnásobné hodnoty OR v recesivním modelu svědčí pro aditivní účinek každé alely G. Naopak frekvence genotypů ve skupině HCC a ve studii MONICA signifikantně nelišily.

Vliv genotypu *PNPLA3* na předtransplantační virémii

HCV RNA byla stanovena před LT u 127 ze 172 pacientů (65 ve skupině CLF a 62 ve skupině HCC). Virémie byla u genotypu GG významně nižší než u genotypů CC + CG (medián, IQR; 162 500 (61 550–319 000) IU/ml vs. 570 000 (172 000–1 595 000) IU/ml, $p < 0,0009$) (Obrázek 3B). Virémie se významně lišila i mezi skupinami CLF a HCC (CLF: medián, IQR; 344 000 (116 000–846 368) IU/ml vs. HCC: 823 500 (259 750–1 760 000) IU/ml, $p = 0,008$).

Obrázek 3 (A) Vliv genotypu *PNPLA3* na indikaci k LT. **(B)** Genotypy *PNPLA3* rs738409 C>G a předtransplantační virémie (HCV RNA).



CLF – chronické jaterní selhání, HCC – hepatocelulární karcinom

Faktory predikující LT

V multivariantní analýze byl identifikován jako rizikový faktor rozvoje CLF, a tím potřeby LT, mladší věk ($p < 0,001$) a nosičství variantní alely G v genu *PNPLA3* ($p < 0,05$), které zvyšovalo riziko nutnosti LT pro CLF 2,4x.

Naše výsledky ukazují, že nosičství variantní alely G v genu *PNPLA3* rs738409 u pacientů s HCV cirhózou a genotypem 1b je rizikovým faktorem rychlé progresy chronického jaterního selhání s potřebou LT v mladším věku.

4.3 Downregulace exprese *USP18* v mononukleárech periferní krve predikuje nulovou odpověď na trojkombinační terapii PEG-IFN- α , RBV a proteázovým inhibitorem u pacientů s chronickou hepatitidou C, genotyp 1: pilotní studie (Příloha 3)

Léčba pacientů s pokročilou fibrózou jater na podkladě chronické HCV infekce, s genotypem 1, zůstávala i po přidání proteázového inhibitoru první generace (boceprevir nebo telaprevir) k PEG-IFN- α a RBV obtížná, zejména pro závažné nežádoucí účinky a nízkou účinnost. Z tohoto důvodu měli být léčeni pouze pacienti, kteří měli vysokou šanci na vyléčení. V době, kdy nebyla k dispozici DAA k léčbě HCV bylo cílem naší studie objasnit, je-li možné predikovat dosažení SVR na podkladě různé úrovně exprese ISG, *IFNG* a *IFNL1* před léčbou nebo na základě změny exprese těchto genů během prvních 12 týdnů terapie.

Do studie bylo zahrnuto 26 pacientů s chronickou hepatitidou C, kteří byli v minulosti alespoň jednou neúspěšně léčeni pomocí dvojkombinace PEG-IFN- α a RBV. Všichni tito pacienti měli pokročilou fibrózu nebo cirhózu jater. Kohorta zahrnovala 17 mužů a 9 žen, výsledky byly porovnávány s výsledky sedmi zdravých dobrovolníků. Čtrnáct pacientů bylo léčeno PEG-IFN- α 2b, RBV a boceprevirem (BOC) a 12 pacientů bylo léčeno PEG-IFN- α 2b, RBV a telaprevirem (TVR).

Expres *IFNG*, *IFNL1* a interferon-senzitivních genů *CXCL9*, *IFI16*, *IFI27*, *ISG15* a *USP18* v PBMC byla posuzována v den 0 a v léčebných týdnech 4, 8 a 12, a to u obou skupin.

Celkem 18 z 26 (69 %) pacientů dosáhlo SVR, 64 % (9/14) ve skupině BOC a 75 % (9/12) ve skupině TVR. Z 26 pacientů jich 8 SVR nedosáhlo (skupina bez SVR). Hodnoty SVR podle genotypů *IL28B* byly následující: CC 1/2 (50 %), CT 13/16 (81 %), TT 4/8 (50 %).

Expres zkoumaných genů před léčbou

Iniciální expres *IFNL1* byla ve srovnání se skupinou zdravých dobrovolníků snížena, naopak expres zbývajících 6 genů byla ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků lehce zvýšená.

Iniciální expres *IFI27* (2,2x, IQR: 1,7–3,1 vs. 8,3x, IQR: 3,5–43,5; $p = 0,02$) a *USP18* (1,4x, IQR: 0,9–1,8 vs. 6,5x, IQR: 2,4–9,7; $p = 0,005$) byla výrazně nižší u pacientů s genotypem *IL28B* TT (8/26) než u pacientů s genotypem *IL28B* CT (16/26). Při srovnání skupin pacientů se SVR a bez SVR byl nalezen významný rozdíl v iniciální expresi *CXCL9*, *IFNG* a *USP18*.

Průběh aktivace ISG

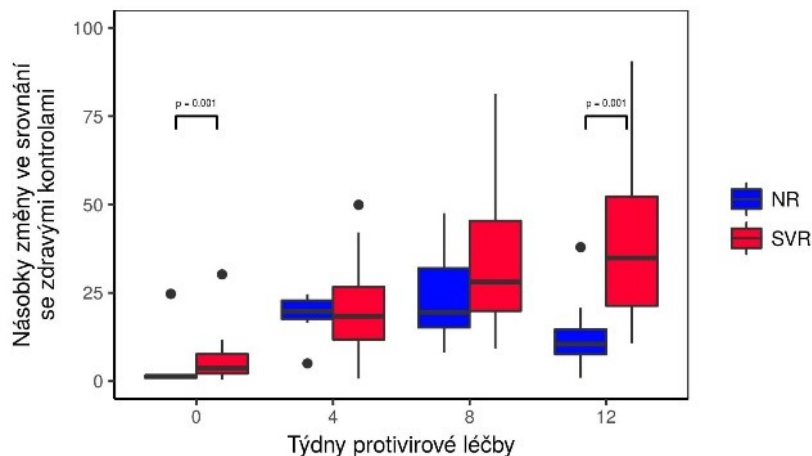
Expres všech analyzovaných genů stoupala během prvních 12 týdnů terapie, ale významný rozdíl mezi skupinou se SVR a bez SVR byl nalezen pouze ve 12. týdnu u exprese *USP18* ($p = 0,001$) (Obrázek 4). Expres zkoumaných genů v různých časových obdobích léčby nekoreloval s koncentrací HCV RNA.

Predikce SVR

Žádný ze standardních klinických prediktorů dosažení SVR před léčbou neměl v naší skupině pacientů prediktivní hodnotu (Obrázek 5A).

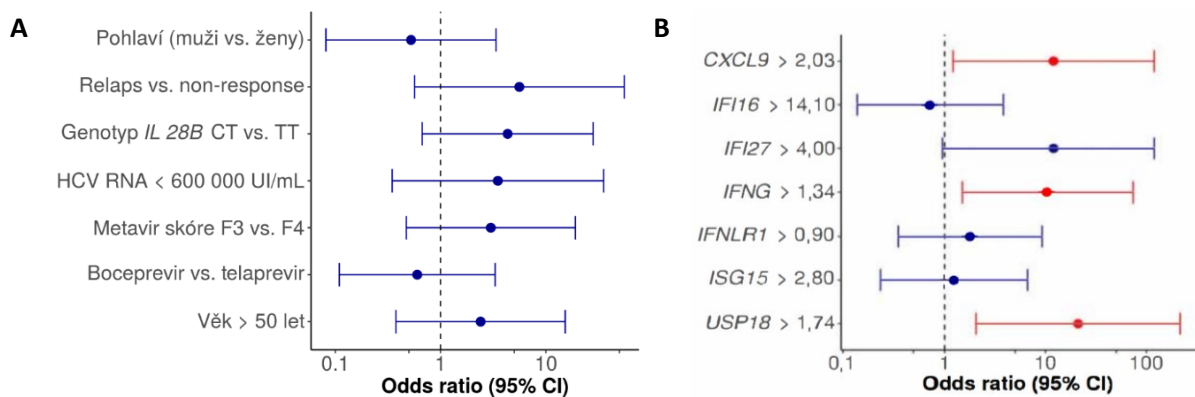
V univariantní analýze byla identifikována iniciální expres tří (*USP18*, *IFNG* a *CXCL9*) ze sedmi genů jako prediktor dosažení SVR (Obrázek 5B). V multivariantní analýze byla iniciální expres *USP18* identifikována jako prediktor SVR ($p = 0,047$).

Obrázek 4 Exprese *USP18* během prvních 12 týdnů terapie. Násobky exprese ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků



SVR, setrvalá virologická odpověď; NR, nedosažení setrvalé virologické odpovědi

Obrázek 5 (A) Faktory před léčbou predikující dosažení SVR (univariantní analýza). **(B)** Prediktivní hodnota iniciální genové exprese pro dosažení SVR, vztaheno ke skupině zdravých dobrovolníků (univariantní analýza).



Prokázali jsme, že exprese interferon-senzitivních genů *CXCL9*, *USP18* a *IFNG* u pacientů s pokročilým jaterním onemocněním při HCV infekci, s genotypem 1, je iniciálně zvýšená a určuje schopnost dosažení SVR při léčbě kombinací PEG-IFN- α , RBV a proteázového inhibitoru 1. generace. Iničiální exprese *USP18* a exprese ve 12. týdnu léčby představovaly nejlepší prediktor dosažení SVR před zahájením protiviřové léčby.

4.4 Tuhost jater měřená pomocí 2D shear-wave elastografie predikuje i vysoké hodnoty portosystémového gradientu u kandidátů transplantace jater s pokročilou cirhózou jater (Příloha 4)

Naším cílem bylo zjistit, zda LS a některé dříve publikované neinvazivní krevní biomarkery mohou předpovídat vyšší prahové hodnoty HVPG u kandidátů LT.

Do studie bylo zařazeno 109 kandidátů LT s jaterní cirhózou. U všech bylo v rámci předtransplantačních vyšetření provedeno invazivní měření HVPG, změřena LS pomocí 2D shear-wave elastografie (přístroj Aixplorer® od firmy SuperSonic Imagine, Francie) a byla odebrána krev na stanovení sérových markerů k výpočtu ELF testu a plazmatických markerů PH: interleukin-6 (IL-6), molekula adheze cévních buněk 1 (VCAM-1), antagonist receptoru interleukinu-1 (IL-1ra/IL-1F3), osteopontin a TNF α . Z ostatních potencionálních neinvazivních prediktorů PH se spočítalo MELD a LSPS skóre.

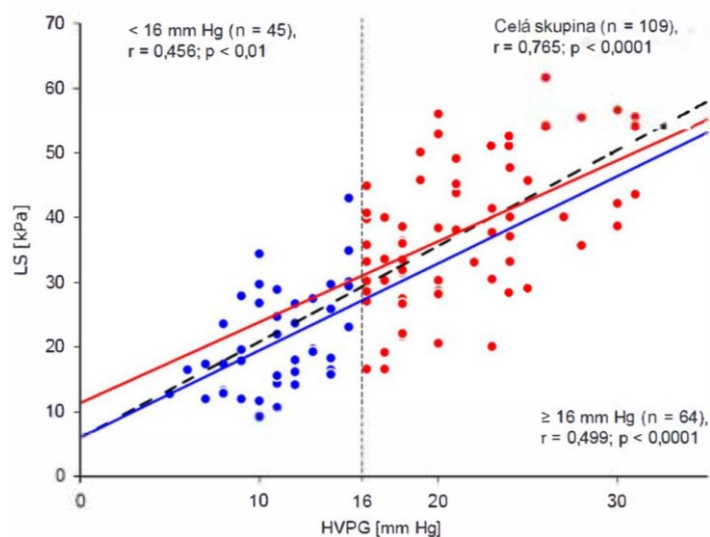
Pacienti byli pro další hodnocení rozděleni do dvou skupin na základě pokročilosti jaterního onemocnění podle Child-Pughovy klasifikace (CPS): skupina CPS-A zahrnující pacienty s Child-Pugh A (30/109, 27,5 %) a skupina CPS-B/C zahrnující nemocné s Child-Pugh B nebo C (79/109, 72,5 %). Získané hodnoty HVPG se pohybovaly od 5 do 31 mm Hg. Pouze 12/109 (11,0 %) pacientů mělo HVPG nižší než 10 mm Hg; zbývajících 97/109 (91 %) pacientů mělo CSPH.

Korelace mezi HVPG, LS a vybranými neinvazivními krevními prediktory PH

Při porovnání hodnot HVPG a LS podle etiologie jaterní cirhózy byly hodnoty HVPG významně vyšší u pacientů s ALD ve srovnání s pacienty s jaterní cirhózou virové etiologie, $19,97 \pm 6,58$ vs. $12,78 \pm 4,24$ mm Hg, $p < 0,001$. Podobně významný rozdíl byl nalezen i v hodnotách LS; LS byla vyšší u pacientů s ALD ve srovnání s pacienty s jaterní cirhózou virové etiologie ($34,93 \pm 12,37$ vs. $24,49 \pm 9,32$ kPa, $p = 0,005$).

Po vypočtení Spearmanových neparametrických korelačních koeficientů mezi HVPG, LS a neinvazivními krevními prediktory PH byla nalezena nejsilnější korelace s HVPG u LS ($r = 0,765$, $p < 0,0001$, Obrázek 6).

Obrázek 6 Korelace mezi LS a HVPG

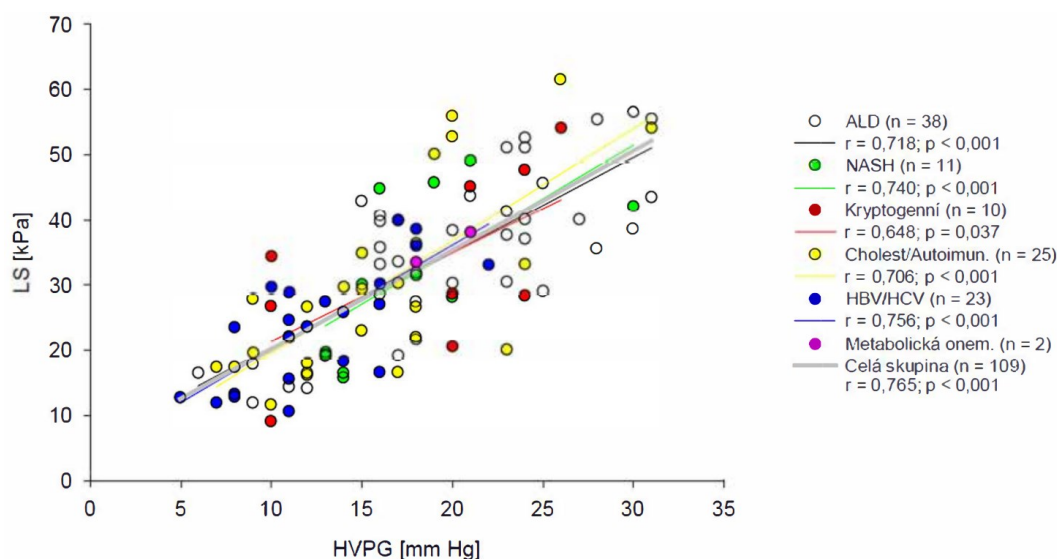


Modrá čára představuje regresní přímku vypočtenou pro pacienty s HVPG nižším než 16 mm Hg, červená čára ukazuje totéž pro pacienty s HVPG rovným nebo vyšším než 16 mm Hg. Přerušovaná černá čára ukazuje regresní přímku vypočítanou pro všechny pacienty dohromady.

Mezi oběma veličinami byl nalezen lineární vztah v celém rozsahu hodnot HVPG až do 30 mm Hg. Regresní křivky měly navíc podobné β hodnoty u pacientů s HVPG pod i nad 16 mm Hg ($p > 0,05$). Korelace u pacientů s HVPG < 16 mm Hg ($r = 0,456$, $p = 0,01$) byla podobná jako u pacientů s HVPG ≥ 16 mm Hg ($r = 0,499$, $p < 0,0001$). Etiologie cirhózy neměla na vztah mezi LS a HVPG žádný vliv (Obrázek 7).

Markerem nejlépe korelujícím s HVPG i LS byl osteopontin a jeho korelační koeficienty byly u HVPG i LS podobné ($r = 0,5143$, $p < 0,0001$; resp. $r = 0,5086$, $p < 0,0001$). Zbývajících krevních prediktory PH korelovaly lépe s LS než s HVPG; jejich korelace však byly u LS i HVPG slabší než u osteopontinu. Byly také vypočteny korelace ELF skóre a LSPS s HVPG pro skupiny pacientů s CPS-A a CPS-B/C, kdy ELF skóre nekorelovalo s HVPG v žádné ze skupin, zatímco korelace LSPS s HVPG byla silnější ve skupině CPS-A ($r = 0,528$, $p = 0,006$, $n = 26$) než ve skupině CPS-B/C ($r = 0,308$, $p = 0,006$, $n = 78$).

Obrázek 7 Korelace LS a HVPG podle etiologie jaterního onemocnění



Barevné čáry představují regresní přímky pro pacienty s ALD, NASH, kryptogenní, cholestatickou/autoimunitní a virovou (HBV a HCV) cirhózou. Šedá čára ukazuje regresní přímku vypočtenou pro všechny pacienty dohromady.

Neinvasivní markery jako prediktory mezních hodnot HVPG

Pro všechny testované neinvasivní prediktory HVPG byly vypočteny plochy pod ROC křivkou (AUROC, area under receiver operating characteristic curve) ve dvou hraničních hodnotách – 16 mm Hg a 20 mm Hg. Zatímco AUROC u LS pro predikci obou mezních hodnot HVPG jsou vyšší než 0,8, AUROC všech ostatních testovaných markerů nepřesáhly 0,8, a proto nejsou tyto markery vhodné pro klinické použití. Hodnoty AUROC nebyly vypočteny pro prahovou hodnotu 10 mm Hg, protože pouze 12/109 pacientů mělo HVPG nižší než 10 mm Hg. Diagnostická přesnost LS pro predikci HVPG nad 16 mm Hg a 20 mm Hg byla 83,5 a 81,7 %. Přidání některého z testovaných krevních biomarkerů do složeného prediktivního modelu nevedlo ke zlepšení predikce HVPG než samotná LS.

HVPG je v současné době nejlépe validovanou metodou pro posuzování prognózy pacientů s jaterní cirhózou. V naší studii jsme prokázali silnou korelaci mezi LS a HVPG v širokém rozmezí hodnot HVPG, korelace zůstala lineární i v rozmezí hodnot od 16 do 30 mm Hg HVPG. Předpokládáme, že s dalším rozvojem neinvasivního hodnocení steatózy a fibrózy jater bude invazivní měření HVPG plně nahrazeno měřením LS, i v hodnocení rizik spojených s pokročilostí jaterního onemocnění.

4.5 Portální hypertenze jako hlavní faktor způsobující tuhost jater u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou (Příloha 5)

Progrese jaterní fibrózy je spojena se zvýšenou tuhostí jater, která je způsobena ukládáním kolagenu a narušením architektury jaterní tkáně. Naším cílem bylo zhodnotit, jakou mírou přispívá k tuhosti jater u pacientů s pokročilou cirhózou jaterní fibróza a jakou portální hypertenze.

Do studie bylo zahrnuto 81 pacientů, kteří podstoupili LT pro jaterní cirhózu. U všech bylo provedeno před zařazením do WL měření LS na 2D shear-wave elastografu (Aixplorer Multiwave, Supersonic Imagine, France), přímé měření HVPG a odběr krve ke stanovení a hodnocení krevních biomarkerů. Po LT byl ve všech 81 explantovaných játrech stanoven obsah kolagenu jako collagen proportionate area (CPA) a poměr hydroxyprolinu k celkovému množství aminokyselin (HP/AA).

Pacienti (n = 81) byli pro další hodnocení rozděleni do dvou skupin na podkladě pokročilosti jaterní dysfunkce podle Child-Pughovy klasifikace. Soubor zahrnoval především pacienty s pokročilou jaterní dysfunkcí Child-Pugh B a C (63/81, 77,8 %), menší část pacientů byla Child-Pugh A (18/81, 22,2 %). Naměřené hodnoty HVPG se pohybovaly v rozmezí od 6 až 31 mm Hg. Pouze 7 (8,6 %) pacientů mělo HVPG nižší než 10 mm Hg; zbývajících 74 (91,4 %) pacientů mělo CSPH, tj. HVPG \geq 10 mm Hg.

Korelace HVPG a obsahu kolagenu s krevními markery fibrózy a PH

Byla provedena korelace mezi LS, HVPG, obsahem kolagenu v játrech (vyjádřeno jako CPA nebo HP/AA) a neinvazivními krevními markery jaterní fibrózy a PH. Nejsilnější korelace s LS byla dosažena u HVPG ($r = 0,719$, $p < 0,001$), korelace s CPA ($r = 0,441$, $p < 0,001$), HP/AA ($r = 0,414$, $p < 0,001$) a osteopontinem ($r = 0,390$, $p < 0,001$) byly slabší, regresní přímky pro tyto korelace zobrazuje Obrázek 8. Korelace LS s CPA nebo HP/AA byla téměř identická, obě proměnné totiž měří obsah kolagenu v játrech, proto byla jejich vzájemná korelace taktéž dobrá ($r = 0,574$; $p < 0,001$).

Z námi testovaných krevních markerů se jeví nejvíce specifickým biomarkerem PH osteopontin, který dobře koreloval s LS a HVPG, ale hůře s CPA a HP/AA. Podobně LSPS lépe koreloval s LS a HVPG než s CPA.

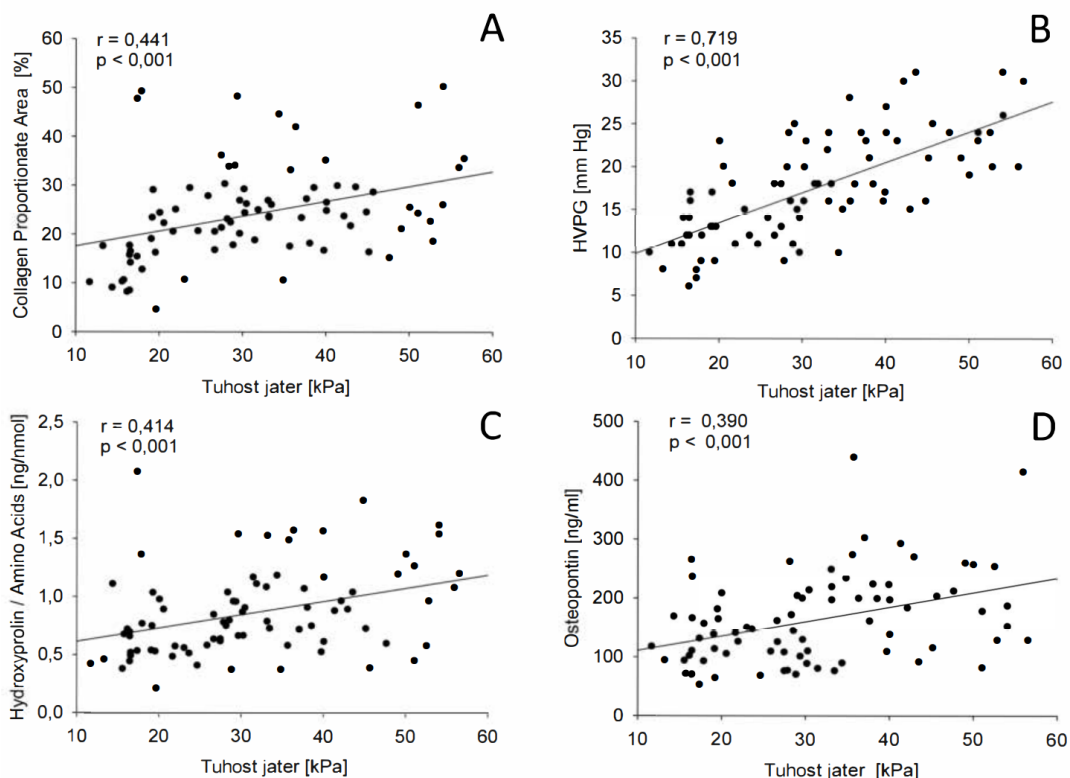
Modelování kompozitního prediktivního faktoru

LS, která je považována za závislou proměnnou, a HVPG, CPA, HP/AA společně s dalšími studovanými neinvazivními prediktory, považované za nezávislé proměnné, byly analyzovány vícenásobnou lineární regresí. Nejsilnější asociace byla nalezena mezi LS a HVPG ($p < 0,0001$), slabší mezi LS a CPA ($p = 0,0188$) a nejslabší mezi LS a osteopontinem ($p = 0,0241$). Metodou postupného modelování byl prokázán jen minimální nárůst u r^2 po přidání CPA k HVPG (0,5073 vs. 0,5513) a další přidání osteopontinu zvýšilo r^2 pouze na 0,5795; hlavní podíl na hodnotě LS měla výše HVPG, zatímco přínos CPA a osteopontinu byl minimální.

Odvozený vzorec vyjadřující hodnotu LS je následující: $LS = -0,41 + (1,19 \times HVPG) + (0,26 \times CPA) + (0,03 \times \text{osteopontin})$ nebo po odebrání hodnoty osteopontinu, jehož vliv na LS je nízký:

$LS = 2,48 + (1,29 \times HVPG) + (0,26 \times CPA)$.

Obrázek 8 Regresní křivky zobrazující vztah mezi LS a CPA (A), HVPG (B), HP/ AA (C) a osteopontinem (D).



LS je u pacientů s pokročilou cirhózou jater určována především hodnotou HVPG, zatímco přínos obsahu kolagenu v jaterním parenchymu měřený pomocí CPA nebo HP/AA je relativně nízký.

5 Obecná diskuze

V práci publikované v *Journal of Hepatology*, 2014 (**Příloha 1**) se nám podařilo prokázat, že pacienti s pokročilou jaterní cirhózou, nosiči variantní alely *TNFA* c.–238A, mají nižší riziko rozvoje ZBI v době čekání na LT. Nosičství variantní alely *TNFA* c.–238A snižovalo i riziko úmrtí na ZBI, to znamená, že tyto infekce měly u nosičů variantní alely lehčí průběh. Nosičství variantní alely *TNFA* c.–238A prakticky zabránilo vzniku SBP, která je považovaná za velmi závažnou komplikaci jaterní cirhózy s vysokou mortalitou. Podařilo se nám i jednoznačně potvrdit, že variantní alela *TNFA* c.–238A je nízkosekreční, nosiči variantní alely měli signifikantně nižší koncentraci TNF- α v séru. Tím jsme potvrdili i mechanismus, kterým nosičství variantní alely *TNFA* c.–238A ovlivňuje riziko rozvoje ZBI u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou, kterým je exhausce funkce neutrofilních leukocytů vlivem vysokých sérových hladin TNF- α , naše zjištění byla kompatibilní i daty dříve publikovanými jinými autory souvislosti poruchy fagocytární funkce neutrofilních leukocytů s koncentrací TNF- α v séru u pacientů pokročilou jaterní cirhózou a s CSPH (Ono et al., 2004, Tritto et al., 2011, Lin et al., 1995). Metodicky se jednalo o rozsáhlou alelickou asociační studii, studovanou skupinou byl soubor český, validační skupinou byl soubor holandský. Studie byla provedena retrospektivně, všichni pacienti byli v době provádění studie po LT, proto již nebylo možno jim vyšetřit fagocytární funkci neutrofilních leukocytů.

V práci publikované v *PLoS ONE*, 2019 (**Příloha 2**) jsme prokázali u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou při chronické HCV infekci genotypem 1b, že nosičství variantní alely G genu *PNPLA3* je rizikovým faktorem rychlé progresi chronického selhání jater s potřebou LT v mladším věku. Naopak nosiči „wild type“ alely C žili se svou chorobou déle, a proto se častěji dočkali vzniku HCC v cirhotických játrech. Předpokládáme proto, že nosiči *PNPLA3* rs738409 G alely trpěli kromě HCV i těžkou steatózou či steatohepatitidou, a proto rychleji progredovalo jejich chronické selhání jater. V žádných z explantovaných jater účastníků studie nebyla sice steatóza prokázána, to však nelze považovat za vyvrácení naší hypotézy o synergii virové infekce a steatózy jater v progresi chronického jaterního selhání. Steatóza jater je totiž pravidelným histologickým nálezem u NASH i ALD v necirhotickém stadiu vývoje. Po přechodu v cirhózu steatóza mizí, zřejmě v důsledku proteino-energetické malnutrice při chronickém selhání jater (Powell et al., 1990, Caldwell et al., 2009). Metodicky se opět jednalo o alelickou asociační studii provedenou retrospektivně, ovšem na relativně malém souboru pacientů. Výhodou byla homogenita souboru z hlediska pokročilosti jaterní choroby, absence významného abúzu alkoholu a infekce stejným genotypem i subtypem viru u všech účastníků studie.

V práci publikované v *Therapeutics and clinical risk management*, 2015 (**Příloha 3**) jsme se zabývali hledáním spolehlivého genetického prediktoru úspěšné léčby chronické HCV infekce u pacientů s pokročilou fibrózou nebo cirhózou jater na základě exprese vybraných ISG. Jednalo se o pacienty, u kterých dříve selhala léčba PEG-IFN- α a RBV. Prokázali jsme, že iniciační exprese (downregulace) *USP18* v PBMC predikovala nedosažení SVR při léčbě trojkombinací PEG-IFN- α , RBV a proteázovým inhibítorem první generace. Narůstající exprese *USP18* v PBMC během prvních 12 týdnů léčby pak naopak predikovala dosažení SVR. Jiní autoři již dříve prokázali, že rozhodující pro dosažení SVR byla exprese některých ISG v hepatocytech (Chen et al., 2005, Chen et al., 2010, Asselah et al., 2008). Mechanismus, kterým léčba interferonem α a navozená aktivace ISG vedla k eliminaci chronické HCV infekce, nebyl ovšem nikdy spolehlivě objasněn. Exprese ISG v souvislosti s léčbou HCV byla studována i v PBMC (MacParland et al., 2015), které byly pro případnou klinickou praxi lépe dostupné než hepatocyty, ale změny exprese v PBMC nebyly tak významné. Stanovení exprese ISG bylo složité a náročné a nikdy do klinické praxe neproniklo. Navíc byla léčba HCV pomocí režimů založených na interferonu α krátce po skončení naší studie opuštěna a nahrazena vysoce účinnou léčbou DAA. Jednalo se o prospektivní studii.

Další dvě diskutované práce publikované v *PLoS ONE*, 2021 (**Příloha 4**) a v *Physiological Research*, 2021 (**Příloha 5**) se zabývaly neinvazivním odhadem HVPG na základě měření LS. Prokázali jsme, že hodnota LS dobře a lineárně koreluje s hodnotou HVPG u pacientů s velmi pokročilou jaterní cirhózou, kandidátů transplantace jater, i v rozsahu velmi vysokých hodnot, konkrétně mezi 12 a 30 mm Hg. Zřejmě to ale platí jen pro soubor oběhově velmi stabilních pacientů, kteří nepijí alkohol. V publikacích jiných autorů, které se zabývaly hledáním korelace mezi hodnotou LS a HVPG na

neselektovaných souborech pacientů přijímaných k hospitalizaci pro variceální krvácení se totiž korelace mezi oběma veličinami ztrácela při hodnotách HVPG nad 10, resp. 12 mm Hg (Procopet et al., 2015, Stefanescu et al., 2020). Naši hypotézu o ztrátě korelace mezi LS a HVPG díky různému stupni steatózy jater pak potvrdila práce, dokládající, že steatóza jater je spojena s nadhodnoceným měřením LS (Semmler et al., 2019). Dále jsme prokázali, že na tvorbě aktuální hodnoty LS se podílí jak HVPG, tak obsah kolagenu v játrech. Obsah kolagenu v játrech byl v této studii vyjadřován jako CPA i jako obsah hydroxyprolinu v jaterní tkáni. Proto nejlépe korelovala s HVPG hodnota LS, lépe než obě zmíněné hodnoty vyjadřující obsah kolagenu v játrech. Hodnota LS je obecně považována za neinvazivní ukazatel fibrózy jater, naše práce ukázala, že tak lze na hodnotu LS pohlížet jen u pacientů bez CSPH. V obou pracích sice práci nebyla prováděna genetická vyšetření, přesto jsme ji zařadili do seznamu prací, na kterých je postavena disertační práce na téma genetických rizikových faktorů vzniku komplikací jaterní cirhózy. Genetické studie totiž nelze provádět bez spolehlivého určení fenotypu. Právě měření LS je postupem, na jehož základě lze neinvazivně odhadnout HVPG a tím pacienty s jaterní cirhózou stratifikovat dle rizika rozvoje komplikací.

Závěrem lze říci, že již současná znalost genetických faktorů, které ovlivňují progresi a komplikace chronických chorob jater, změnila dosud zažitý pohled na vývoj chronického selhání jater. Pacienti, u kterých se rychle rozvíjí chronické selhání jater, již nejsou paušálně podezříváni z nepřiznaného abúzu alkoholu a není tak nepříznivě ovlivňován jejich přístup k léčbě LT. Předpokládáme, že hodnocení genetických rizik se v budoucnu stane standardní součástí vyšetření pacienta s jaterní cirhózou, a i výsledky našeho výzkumu přispějí k interpretaci výsledků genetických vyšetření.

6 Souhrn výsledků

1. Přítomnost variantní alely *TNFA* c.–238A u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou významně snižuje riziko rozvoje závažných bakteriálních infekcí i úmrtí těchto nemocných na bakteriální infekce během doby na čekací listině k transplantaci jater.
2. Nosičství alely G v genu *PNPLA3* rs738409 je u pacientů s jaterní cirhózou na podkladě chronické HCV infekce s genotypem 1 rizikovým faktorem rychlé progresy chronického jaterního selhání s potřebou transplantace jater v mladším věku.
3. Expresí interferon-senzitivních genů *CXCL9*, *USP18* a *IFNG* u pacientů s pokročilým jaterním onemocněním při HCV infekci je iniciálně zvýšená a určuje schopnost dosažení SVR při léčbě kombinací PEG-IFN- α , RBV a proteázového inhibitoru první generace. Expresí *USP18* představovala nejlepší prediktor dosažení SVR jak před zahájením protivirové léčby, tak v její časné fázi.
4. Tuhost jater měřená pomocí 2D shear-wave elastografie dobře koreluje s HVPG, korelace zůstává lineární i v rozsahu vysokých hodnot HVPG (16–30 mm Hg). Krevním markerem nejlépe korelujícím s hodnotou HVPG i LS je osteopontin. Tuhost jater koreluje s HVPG lépe než osteopontin a další sérové markery portální hypertenze.
5. Hodnota tuhosti jater je u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou určována především hodnotou HVPG, zatímco přínos obsahu kolagenu v jaterním parenchymu je relativně nízký.

7 Literatura

- Asselah, T., I. Bieche, S. Narguet, A. Sabbagh, I. Laurendeau, M. P. Ripault, N. Boyer, M. Martinot-Peignoux, D. Valla, M. Vidaud and P. Marcellin (2008). "Liver gene expression signature to predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C." *Gut* **57**(4): 516-524.
- Berzigotti, A., S. Seijo, U. Arena, J. G. Abraldes, F. Vizzutti, J. C. Garcia-Pagan, M. Pinzani and J. Bosch (2013). "Elastography, spleen size, and platelet count identify portal hypertension in patients with compensated cirrhosis." *Gastroenterology* **144**(1): 102-111 e101.
- Bolen, C. R., M. D. Robek, L. Brodsky, V. Schulz, J. K. Lim, M. W. Taylor and S. H. Kleinstein (2013). "The blood transcriptional signature of chronic hepatitis C virus is consistent with an ongoing interferon-mediated antiviral response." *J Interferon Cytokine Res* **33**(1): 15-23.
- Bosch, J., J. G. Abraldes, A. Berzigotti and J. C. Garcia-Pagan (2009). "The clinical use of HVPG measurements in chronic liver disease." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **6**(10): 573-582.

- Caldwell, S. H., V. D. Lee, D. E. Kleiner, A. M. Al-Osaimi, C. K. Argo, P. G. Northup and C. L. Berg (2009). "NASH and cryptogenic cirrhosis: a histological analysis." *Ann Hepatol* **8**(4): 346–352.
- Calvaruso, V., A. K. Burroughs, R. Standish, P. Manousou, F. Grillo, G. Leandro, S. Maimone, M. Pleguezuelo, I. Xirouchakis, G. P. Guerrini, D. Patch, D. Yu, J. O'Beirne and A. P. Dhillon (2009). "Computer-assisted image analysis of liver collagen: relationship to Ishak scoring and hepatic venous pressure gradient." *Hepatology* **49**(4): 1236-1244.
- Cífková, R., Z. Skodová, J. Bruthans, V. Adámková, M. Jozífová, M. Galovcová, P. Wohlfahrt, A. Krajcoviechová, R. Poledne, P. Stávek and V. Lánská (2010). "Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. Czech MONICA and Czech post-MONICA." *Atherosclerosis* **211**(2):676-81.
- de Franchis, R. and V. I. F. Baveno (2015). "Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension." *J Hepatol* **63**(3): 743-752.
- Desmet, V. J. and T. Roskams (2004). "Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth." *J Hepatol* **40**(5): 860-867.
- Fabris, C., E. Falletti, A. Cussigh, D. Bitetto, E. Fontanini, S. Bignulin, S. Cmet, E. Fornasiere, E. Fumolo, S. Fangazio, A. Cerutti, R. Minisini, M. Pirisi and P. Toniutto (2011). "IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC." *J Hepatol* **54**(4): 716-722.
- Garcia-Tsao, G., R. J. Groszmann, R. L. Fisher, H. O. Conn, C. E. Atterbury and M. Glickman (1985). "Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding." *Hepatology* **5**(3): 419-424.
- Guarner-Argente, C., E. Sanchez, S. Vidal, E. Roman, M. Concepcion, M. Poca, D. Sanchez, C. Juarez, G. Soriano and C. Guarner (2010). "Toll-like receptor 4 D299G polymorphism and the incidence of infections in cirrhotic patients." *Aliment Pharmacol Ther* **31**(11): 1192-1199.
- Chen, L., I. Borozan, J. Feld, J. Sun, L. L. Tannis, C. Coltescu, J. Heathcote, A. M. Edwards and I. D. McGilvray (2005). "Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection." *Gastroenterology* **128**(5): 1437-1444.
- Chen, L., I. Borozan, J. Sun, M. Guindi, S. Fischer, J. Feld, N. Anand, J. Heathcote, A. M. Edwards and I. D. McGilvray (2010). "Cell-type specific gene expression signature in liver underlies response to interferon therapy in chronic hepatitis C infection." *Gastroenterology* **138**(3): 1123-1133 e1121-1123.
- Lin, R. S., F. Y. Lee, S. D. Lee, Y. T. Tsai, H. C. Lin, R. H. Lu, W. C. Hsu, C. C. Huang, S. S. Wang and K. J. Lo (1995). "Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varices, and hyperdynamic circulation." *J Hepatol* **22**(2): 165-172.
- MacParland, S. A., C. P. Corkum, C. Burgess, S. Karwowska, W. Kroll and T. I. Michalak (2015). "Differential expression of interferon alpha inducible genes in peripheral blood mononuclear cells from patients chronically infected with hepatitis C virus and healthy donors." *Int Immunopharmacol* **25**(2): 545-552.
- Marcellin, P., E. Gane, M. Buti, N. Afdhal, W. Sievert, I. M. Jacobson, M. K. Washington, G. Germanidis, J. F. Flaherty, R. Aguilar Schall, J. D. Bornstein, K. M. Kitrinis, G. M. Subramanian, J. G. McHutchison and E. J. Heathcote (2013). "Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study." *Lancet* **381**(9865): 468-475.
- Moreau, R., R. Jalan, P. Gines, M. Pavesi, P. Angeli, J. Cordoba, F. Durand, T. Gustot, F. Saliba, M. Domenicali, A. Gerbes, J. Wendon, C. Alessandria, W. Laleman, S. Zeuzem, J. Trebicka, M. Bernardi, V. Arroyo and C. S. I. o. t. E.-C. Consortium (2013). "Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis." *Gastroenterology* **144**(7): 1426-1437, 1437 e1421-1429.
- Ono, Y., T. Watanabe, K. Matsumoto, T. Ito, O. Kunii and E. Goldstein (2004). "Opsonophagocytic dysfunction in patients with liver cirrhosis and low responses to tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide in patients' blood." *J Infect Chemother* **10**(4): 200-207.
- Pellicoro, A., P. Ramachandran, J. P. Iredale and J. A. Fallowfield (2014). "Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ." *Nat Rev Immunol* **14**(3): 181-194.
- Petrasek, J., J. A. Hubacek, F. Stickel, J. Sperl, T. Berg, E. Ruf, H. E. Wichmann, A. Pfeufer, T. Meitinger, P. Trunecka, J. Spicak and M. Jirsa (2009). "Do common genetic variants in endotoxin signaling pathway contribute to predisposition to alcoholic liver cirrhosis?" *Clin Chem Lab Med* **47**(4): 398-404.
- Powell, E. E., W. G. Cooksley, R. Hanson, J. Searle, J. W. Halliday and L. W. Powell (1990). "The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years." *Hepatology* **11**(1): 74-80.

- Procopet, B., A. Berzigotti, J. G. Abraldes, F. Turon, V. Hernandez-Gea, J. C. Garcia-Pagan and J. Bosch (2015). "Real-time shear-wave elastography: applicability, reliability and accuracy for clinically significant portal hypertension." *J Hepatol* **62**(5): 1068-1075.
- Ripoll, C., R. J. Groszmann, G. Garcia-Tsao, J. Bosch, N. Grace, A. Burroughs, R. Planas, A. Escorsell, J. C. Garcia-Pagan, R. Makuch, D. Patch, D. S. Matloff and G. Portal Hypertension Collaborative (2009). "Hepatic venous pressure gradient predicts development of hepatocellular carcinoma independently of severity of cirrhosis." *J Hepatol* **50**(5): 923-928.
- Semmler, G., B. Scheiner, P. Schwabl, T. Bucsics, R. Paternostro, D. Chromy, A. F. Stattemayer, M. Trauner, M. Mandorfer, A. Ferlitsch and T. Reiberger (2019). "The impact of hepatic steatosis on portal hypertension." *PLoS One* **14**(11): e0224506.
- Shiina, T., K. R. Nightingale, M. L. Palmeri, T. J. Hall, J. C. Bamber, R. G. Barr, L. Castera, B. I. Choi, Y. H. Chou, D. Cosgrove, C. F. Dietrich, H. Ding, D. Amy, A. Farrokh, G. Ferraioli, C. Filice, M. Friedrich-Rust, K. Nakashima, F. Schafer, I. Sporea, S. Suzuki, S. Wilson and M. Kudo (2015). "WFUMB guidelines and recommendations for clinical use of ultrasound elastography: Part 1: basic principles and terminology." *Ultrasound Med Biol* **41**(5): 1126-1147.
- Schaffner, F. and H. Poper (1963). "Capillarization of hepatic sinusoids in man." *Gastroenterology* **44**: 239-242.
- Simbrunner, B., R. Marculescu, B. Scheiner, P. Schwabl, T. Bucsics, A. Stadlmann, D. J. M. Bauer, R. Paternostro, E. Eigenbauer, M. Pinter, A. F. Stattemayer, M. Trauner, M. Mandorfer and T. Reiberger (2020). "Non-invasive detection of portal hypertension by enhanced liver fibrosis score in patients with different aetiologies of advanced chronic liver disease." *Liver Int* **40**(7): 1713-1724.
- Singal, A. G., H. Manjunath, A. C. Yopp, M. S. Beg, J. A. Marrero, P. Gopal and A. K. Waljee (2014). "The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis." *Am J Gastroenterol* **109**(3): 325-334.
- Stefanescu, H., C. Rusu, M. Lupșor-Platon, O. Nicoara Farcau, P. Fischer, C. Grigoras, A. Horhat, O. Stancu, A. Ardelean, M. Tantau, R. Badea and B. Procopet (2020). "Liver Stiffness Assessed by Ultrasound Shear Wave Elastography from General Electric Accurately Predicts Clinically Significant Portal Hypertension in Patients with Advanced Chronic Liver Disease." *Ultraschall Med* **41**(5): 526-533.
- Urbánek, P., R. Brůha and kolektiv (2022). *Hepatologie*. Praha, Grada Publishing a.s.
- Tandon, P. and G. Garcia-Tsao (2008). "Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis." *Semin Liver Dis* **28**(1): 26-42.
- Trepo, E., S. Romeo, J. Zucman-Rossi and P. Nahon (2016). "PNPLA3 gene in liver diseases." *J Hepatol* **65**(2): 399-412.
- Tritto, G., Z. Bechlis, V. Stadlbauer, N. Davies, R. Frances, N. Shah, R. P. Mookerjee, J. Such and R. Jalan (2011). "Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis." *J Hepatol* **55**(3): 574-581.
- Trunečka, P., I. Míková, D. Dlouhá, J.A. Hubáček, E. Honsová, L. Kolesár, V. Lánská, S. Fraňková, J. Šperl, M. Jirsa and R. Poledne (2018). "Donor PNPLA3 rs738409 genotype is a risk factor for graft steatosis. A post-transplant biopsy-based study." *Dig Liver Dis* **50**(5):490-495.
- Urbánek, P., R. Brůha and e. al. (2022). *Hepatologie*. Praha, Grada Publishing a.s.
- Vizzutti, F., U. Arena, R. G. Romanelli, L. Rega, M. Foschi, S. Colagrande, A. Petrarca, S. Moscarella, G. Belli, A. L. Zignego, F. Marra, G. Laffi and M. Pinzani (2007). "Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis." *Hepatology* **45**(5): 1290-1297.
- Woessner, J. F., Jr. (1961). "The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid." *Arch Biochem Biophys* **93**: 440-447.

8 Seznam publikací

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertační práce

1. Fraňková S, Lunova M, Gottfriedová H, Šenkeříková R, Neřoldová M, Kováč J, Kieslichová E, Lánská V, Urbánek P, Špičák J, Jirsa M, Šperl J. **Liver stiffness measured by two-dimensional shear-wave elastography predicts hepatic vein pressure gradient at high values in liver transplant candidates with advanced liver cirrhosis.** PLoS ONE [online]. 2021, 16(1), art. no. e0244934. IF: **3,752, citováno 3x.**
2. Lunova M, Fraňková S, Gottfriedová H, Šenkeříková R, Neřoldová M, Kováč J, Kieslichová E, Lánská V, Sticová E, Špičák J, Jirsa M, Šperl J. **Portal Hypertension Is the Main Driver of Liver Stiffness in Advanced Liver Cirrhosis.** *Physiological research*. 2021, **70**(4), 563-577. ISSN 0862-8408. e-ISSN 1802-9973. IF: **2,139, citováno 7x.**

3. Šenkeříková R, Fraňková S, Jirsa M, Kreidlová M, Merta D, Neřoldová M, Chmelová K, Špičák J, Šperl J. **PNPLA3 rs738409 G allele carriers with genotype 1b HCV cirrhosis have lower viral load but develop liver failure at younger age.** PLoS ONE [online]. 2019, 14(9), e0222609. IF: 2,740, citováno 3x.
4. Fraňková S, Jirsa M, Merta D, Neřoldová M, Urbánek P, Šenkeříková R, Špičák J, Šperl J. **USP18 downregulation in peripheral blood mononuclear cells predicts nonresponse to interferon-based triple therapy in patients with chronic hepatitis C, genotype I: a pilot study.** Therapeutics and clinical risk management. 2015, 11(Nov 23), 1853-1861. IF: 1,903, citováno 2x.
5. Šenkeříková R, de Mare-Bredemeijer E, Fraňková S, Roelen D, Visseren T, Trunečka P, Špičák J, Metselaar H, Jirsa M, Kwekkeboom J, Šperl J. **Genetic variation in TNFA predicts protection from severe bacterial infections in patients with end-stage liver disease awaiting liver transplantation.** Journal of hepatology. 2014, 60(4), 773-781. IF: 11,336, citováno 5x.

Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertační práce

1. Trebicka J, Gu W, de Ledinghen V, Aubé C, Krag A, Praktiknjo M, Castera L, Dumortier J, Bauer DJM, Friedrich-Rust M, Pol S, Grgurevic I, Zheng R, Francque S, Gottfriedová H, Mustapic S, Sporea I, Berzigotti A, Uschner FE, Simbrunner B, Ronot M, Cassinotto C, Kjaergaard M, Andrade F, Schulz M, Semmler G, Drinkovic IT, Chang J, Broil MJ, Rautou PE, Vanwolleghem T, Strassburg CP, Boursier J, Ferstl PG, Rasmussen DN, Reiberger T, Vilgrain V, Guibal A, Guillaud O, Zeuzem S, Vassord C, Lu X, Vonghia L, Šenkeříková R, Popescu A, Margini C, Wang W, Thiele M, Jansen C. **Two-dimensional shear wave elastography predicts survival in advanced chronic liver disease.** Gut. 2022, 71(2), 402-414. IF: 24,5, citováno 21x.
2. Chmelová K, Fraňková S, Jirsa M, Neřoldová M, Sticová E, Merta D, Šenkeříková R, Trunečka P, Špičák J, Šperl J. **IL28B rs12979860 T allele protects against CMV disease in liver transplant recipients in the post-prophylaxis and late period.** Transplant infectious disease. 2019, 21(4), art. no. e13124. IF: 2,071, citováno 4x.
3. Jabor A, Kubíček Z, Fraňková S, Šenkeříková R, Franeková J. **Enhanced liver fibrosis (ELF) score: Reference ranges, biological variation in healthy subjects, and analytical considerations.** Clinica chimica acta. 2018, 483(August), 291-295. IF: 2,735, citováno 7x.
4. Šperl J, Kreidlová M, Merta D, Chmelová K, Šenkeříková R, Fraňková S. **Paritaprevir/Ritonavir/Ombitasvir plus Dasabuvir regimen in the treatment of genotype 1 chronic hepatitis C infection in patients with severe renal impairment and end-stage renal disease: a real-life cohort.** Kidney and blood pressure research. 2018, 43(2), 594-605. IF: 2,123, citováno 21x.
5. Šperl J, Fraňková S, Šenkeříková R, Neřoldová M, Hejda V, Volfová M, Merta D, Viklický O, Špičák J, Jirsa M. **Relevance of low viral load in haemodialysed patients with chronic hepatitis C virus infection.** World journal of gastroenterology. 2015, 21(18), 5496-5504. IF: 2,787, citováno 10x.
6. Šenkeříková R, Fraňková S, Šperl J, Oliverius M, Kieslichová E, Filipová H, Kautznerová D, Honsová E, Trunečka P, Špičák J. **Incidental hepatocellular carcinoma: risk factors and long-term outcome after liver transplantation.** Transplantation proceedings. 2014, 46(5), 1426-1429. IF: 0,982, citováno 20x.
7. Jabor A, Fraňková S, Šenkeříková R, Komrsková J, Labanczová M, Viczénová D, Sečník P, Vacková T, Franeková J. **Volné lehké řetězce a páry těžkých a lehkých řetězců imunoglobulinů ve vztahu k morbiditě pacientů před transplantací jater a v potransplantačním období.** Klinická biochemie a metabolismus. 2018, 26(4), 166-172.
8. Šenkeříková R, Fraňková S, Šperl J, Špičák J. **Spontánní bakteriální peritonitida.** Vnitřní lékařství. 2015, 61(2), 134-140.
9. Šenkeříková R, Fraňková S, Šperl J, Oliverius M, Froněk J, Kieslichová E, Filipová H, Kautznerová D, Honsová E, Trunečka P, Špičák J. **Transplantace jater pro hepatocelulární karcinom, dlouhodobé přežití a faktory ovlivňující rekurenci tumoru (zkušenosti jednoho centra).** Gastroenterologie a hepatologie. 2014, 68(2), 139-145.

Kapitola v monografii

1. Šperl J, Šenkeříková R. **Sepse u cirhózy.** In: Gürlich R. Peritonitis. 1. vydání. Praha: Maxdorf, 2018, s. 234-242.
2. Šenkeříková R. **Elastografie jater.** In: Špičák J. Novinky v gastroenterologii a hepatologii II. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2017, s. 275-286.
3. Špičák J, Bartáková R. **Biliary Complications After Liver Transplantation.** In: H. Abdeldayem N. Allam ed. Liver Transplantation – Technical Issues and Complications. 1. vydání. London: IntechOpen, 2012, s. 191-210.