

Univerzita Karlova 1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicině

Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Renáta Šenkeříková

Genetická predispozice ke komplikacím jaterní cirhózy

Genetic background of liver cirrhosis complications

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: Prof. MUDr. Julius Špičák, CSc.

Konzultant: Doc. MUDr. Jan Šperl, CSc.

Praha, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28. září 2023

Renáta Šenkeříková

Identifikační záznam:

ŠENKEŘÍKOVÁ, Renáta. *Genetická predispozice ke komplikacím jaterní cirhózy. [Genetic background of liver cirrhosis complications]*. Praha, 2023. 104 s., 5 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika hepatogastroenterologie, Institut klinické a experimentální medicíny. Vedoucí práce Špičák, Julius.

Poděkování

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Juliu Špičákovi, CSc. za jeho odborné vedení, podporu a neocenitelné rady v průběhu celého Ph.D. studia a za vytvoření optimálních podmínek pro mou klinickou práci i pro účast ve výzkumných projektech. Děkuji doc. MUDr. Janu Šperlovi, CSc., svému školiteli – konzultantovi, za odborné vedení v klinické práci od počátku mého působení v IKEM a za možnost spolupracovat na grantu IGA MZ NT/11235-5 a AZV ČR 16-27546A, za jejichž podpory vznikaly publikace použité k sestavení disertační práce. Velké poděkování patří i MUDr. Soně Fraňkové, Ph.D., za pomoc se zpracováním dat, statistikou a zejména s přípravou mé disertační práce. Poděkování patří i prof. MUDr. et Mgr. Milanu Jirsovi, CSc. a celému kolektivu Laboratoře experimentální hepatologie IKEM za vynikající laboratorní práci a za mé vedení při práci v laboratoři. Děkuji i pacientům, kteří poskytli svůj biologický materiál k vyšetření v rámci grantových studií.

Ráda bych věnovala své poděkování také mým nejbližším, zejména svému manželovi, našim dětem a mým úžasným rodičům za podporu a pomoc po celou dobu mého Ph.D. studia.

Obsah

Souhrn	9
Abstract	10
Seznam zkratek	11
1 Úvod	13
1.1 Jaterní cirhóza	14
1.1.1 Definice	14
1.1.2 Patogeneze	14
1.1.3 Epidemiologie	15
1.1.4 Etiologie	15
1.1.5 Diagnostika	16
1.1.6 Léčba	22
1.1.7 Regrese fibrózy	22
1.2 Portální hypertenze	23
1.2.1 Definice	23
1.2.2 Patogeneze a patofyziologie portální hypertenze a jejích komplikací	24
1.2.3 Mezní hodnoty HVPG ve vývoji jaterní cirhózy a jejích komplikací	26
1.2.4 Diagnostika	27
1.3 Bakteriální infekce	31
1.3.1 Bakteriální translokace	32
1.3.2 Syndrom imunitní dysfunkce asociovaný s cirhózou	33
1.3.3 Toll-like receptory	35
1.3.4 Toll-like receptor 4 signální dráha	36
1.3.5 Úloha TNF- α v patogenezi komplikací jaterní cirhózy	37
1.4 Genetické faktory v progresi komplikací jaterní cirhózy	39
1.4.1 Genetická predispozice k bakteriálním infekcím	39
1.4.2 Genetické faktory v léčbě chronické hepatitidy C	40
1.4.3 Genetické faktory progresu jaterní fibrózy	42
2 Cíle práce	46
3 Metody	47
3.1 Izolace DNA	47
3.2 Genotypizace SNP <i>PNPLA3</i> rs738409	47
3.3 Genotypizace SNP <i>IL28B</i> rs12979860	47
3.4 Genotypizace alelických variant TLR4 signální dráhy	47
3.5 Stanovení sérové koncentrace TNF- α	48
3.6 Vyšetření HCV RNA a genotypizace HCV	49
3.7 Izolace PBMC	49
3.8 Izolace mRNA	49
3.9 Analýza genových expresí <i>CXCL9</i> , <i>IFI16</i> , <i>IFI27</i> , <i>IFNG</i> , <i>IFNLR1</i> , <i>ISG15</i> a <i>USP18</i>	49

3.10	ELF test a sérové markery jaterní fibrózy	50
3.11	Měření HVPG	51
3.12	Měření tuhosti jater metodou SWE	51
3.13	Neinvazivní prediktory portální hypertenze	51
3.14	Hodnocení collagen proportionate area (CPA)	52
3.15	Poměr hydroxyprolinu k celkovým aminokyselinám (HP/AA ratio)	52
3.16	Statistická analýza	53
4	Výsledky a komentáře	55
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).....	55
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)	61
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)	65
4.4	Tuhost jater měřená pomocí 2D shear-wave elastografie predikuje i vysoké hodnoty portosystémového gradientu u kandidátů transplantace jater s pokročilou jaterní cirhózou (Příloha 4)	69
4.5	Portální hypertenze jako hlavní faktor způsobující tuhost jater u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou (Příloha 5)	73
5	Obecná diskuze	76
6	Souhrn výsledků.....	81
7	Seznam vybraných publikací a prezentací	82
	Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertační práce.....	82
	Publikace <i>in extenso</i> bez vztahu k tématu disertační práce	83
	Prezentace přímo související s tématem Ph.D.	84
	Ústní sdělení.....	84
	Postery.....	85
	Prezentace přímo nesouvisející s Ph.D.	86
	Ústní sdělení.....	86
	Postery.....	87
	Kapitola v monografii.....	88
8	Přílohy	89
9	Literatura.....	90

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.

Seznam zkratek

AKI	akutní poškození ledvin
ALD	alkoholická choroba jater
ALT	alaninaminotransferáza
APRI	AST to platelet ratio index
ARFI	acoustic radiation force impulse imaging
AST	aspartátaminotransferáza
AUROC	plocha pod ROC křivkou
BMI	body mass index
BPI	baktericidní/permeabilitu zvyšující protein
BT	bakteriální translokace
CAIDS	syndrom imunitní dysfunkce asociovaný s cirhózou
CD14	cluster of differentiation
CGI-58	comparative gene identification-58
CI	konfidenční interval
CLD	chronické onemocnění jater
CLF	chronické selhání jater
CPA	collagen proportionate area
CPS	Child-Pugh skóre
CSPH	klinicky významná portální hypertenze
DAAs	přímo působící antivirotika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EASL	European Association for the Study of the Liver
ELF	enhanced liver fibrosis
ET-1	endotelin-1
FIB-4	fibrosis-4
<i>GCKR</i>	regulátor glukokinázy
HA	kyselina hyaluronová
HBV	virus hepatitidy B
HCC	hepatocelulární karcinom
HCV	virus hepatitidy C
<i>HSD17B13</i>	17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza typu 13
HVPG	portosystémový gradient
IFNG	interferon gama
<i>IFNL4</i>	interferon lambda 4
<i>IFNLR1</i>	interferon lambda receptor 1
<i>IL28B</i>	interleukin 28B
ISG	interferon senzitivní geny
IQR	interkvartilové rozpětí
LBP	lipopolysacharid vázající protein

LPS	lipopolysacharid
LS	tuhost jater
LSPS	liver spleen platelets score
LT	transplantace jater
MELD	Model for End-stage Liver Disease
MMS	monocyto-makrofágový systém
MONICA	MONItoring of trends and determinants in CArdiovascular disease
MR	magnetická rezonance
MRE	elastografie využívající magnetickou rezonanci
NAFLD	nealkoholová tuková choroba jater
NASH	nealkoholická steatohepatitida
NO	oxid dusnatý
NPV	negativní prediktivní hodnota
OR	odds ratio
PBMC	periferní krevní mononukleární buňky
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG-IFN- α	pegylovaný interferon alfa
PH	portální hypertenze
PIIINP	N-terminální propeptid prokolagenu III
<i>PNPLA3</i>	patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PPV	pozitivní prediktivní hodnota
pSWE	bodová shear-wave elastografie
RBV	ribavirin
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
SBP	spontánní bakteriální peritonitida
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SS	tuhost sleziny
SVR	setrvalá virologická odpověď
SWE	shear-wave elastografie
TIMP-1	tkáňový inhibitor metaloproteinázy 1
TLR	toll-like receptor
<i>TM6SF2</i>	transmembrane 6 superfamily 2
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
VCTE	vibracemi kontrolovaná tranzientní elastografie
WL	čekací listina
ZBI	závažné bakteriální infekce

1 Úvod

Jaterní cirhóza představuje konečné stadium většiny chronických jaterních onemocnění (CLD). Její prevalence je celosvětově přibližně 100 nemocných na 100 000 obyvatel, geografické rozdíly jsou především v etiologii cirhózy a nejsou tak velké v její prevalenci. Ročně v České republice umírá na jaterní cirhózu přibližně 2 000 lidí, celosvětově se jedná o 11. nejčastější příčinu úmrtí (Asrani et al., 2019). Jaterní cirhóza je život ohrožující onemocnění s celou řadou komplikací vznikajících nejčastěji v důsledku rozvinuté portální hypertenze (PH) a imunitní dysfunkce. 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. U pacientů s jaterní cirhózou se genetické faktory uplatňují také v rozvoji bakteriálních infekcí.

V České republice je jednou z nejčastějších příčin jaterní cirhózy chronická infekce virem hepatitidy C (HCV). Před érou přímo působících antivirových (direct-acting antivirals, DAAs) byli pacienti s pokročilou jaterní cirhózou při HCV infekci léčení kombinací pegylovaného interferonu alfa (PEG-IFN- α) a ribavirinu (RBV). Protože úspěšnost vyléčení těchto nemocných byla nízká a riziko komplikací spojených s léčbou vysoké, hledaly se prediktory úspěšné léčby. Z genetických faktorů byl v roce 2009 jako nejsilnější prediktor úspěšné léčby popsán genotyp CC v genu pro *IL28B* (rs12979860).

Terapie jaterních chorob a prognóza pacientů závisí na pokročilosti jaterní fibrózy a rychlosti progresu do jaterní cirhózy. Pacienti s cirhotickou přestavbou jsou zařazeni do pravidelného screeningového programu komplikací jaterní cirhózy a PH: rozvoje jícnových varixů a vzniku hepatocelulárního karcinomu (HCC) (Castera, 2015). Více než sto let byla zlatým standardem v hodnocení pokročilosti jaterní fibrózy jaterní biopsie a histologické hodnocení získaného vzorku jaterní tkáně. Jedná se však o výkon invazivní s možnými komplikacemi. To vedlo v posledních dvaceti letech 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 (CSPH; portosystémový gradient HVPG >10 mm Hg), pro kterou bylo

doposud nutné podstupovat invazivní katetrizaci jaterních žil (Vizzutti et al. 2007, Bureau et al., 2008).

Nové poznatky o průběhu a patofyziologii cirhózy a léčbě jejích komplikací vedly ke zlepšení péče, kvality a délky života pacientů s cirhózou jater, nicméně pro vybranou skupinu pacientů zůstává jedinou léčebnou možností transplantace jater (LT).

1.1 Jaterní cirhóza

1.1.1 Definice

Jaterní cirhóza je morfologicky definována jako difúzní poškození jater s chronickým zánětem, zmnožením vaziva (fibrózou) a tvorbou regeneračních uzlů jako reakcí na dlouhodobé poškození jaterní tkáně. Postupně dochází k úbytku a ztrátě funkce jaterních buněk a k útlaku cévních struktur vazivem s rozvojem PH (Pellicoro et al., 2014). Jaterní cirhóza je částečně reverzibilní proces, ale jen do určitého stupně pokročilosti (Wanless et al., 2000, Desmet a Roskams, 2004).

1.1.2 Patogeneze

Jaterní fibróza je výsledkem hojivé odpovědi na poškození jaterních a/nebo biliárních buněk. Dochází k poruše jinak vyrovnaného procesu jaterní fibrogenese (tvorby mezibuněčné hmoty) a fibrolýzy (odstraňování mezibuněčné hmoty) ve prospěch fibrogenese. Tento proces je velmi uniformní bez ohledu na etiologii jaterního onemocnění, avšak v závislosti na příčině, environmentálních faktorech a faktorech hostitele se mění rychlost postupující fibrózy (Urbánek et al., 2022).

Pokročilým stadiem jaterní fibrózy je cirhóza, která je kromě přítomnosti fibrózy doprovázena ještě vaskulárními a nodulárně regenerativními změnami jaterního parenchymu. Ve zdravém jaterním parenchymu mají jaterní sinusoidy fenestrováný endotel, který ohraničuje z jedné strany Disseho prostor. V něm je fyziologicky jen malé množství mezibuněčné hmoty (matrix) a téměř žádné vazivo, přítomny jsou tam Kupfferovy buňky (fagocyty) a hvězdčovitě jaterní buňky. Druhá strana Disseho prostoru je ohraničena hepatocyty, které vykonávají většinu známých jaterních funkcí (Schuppan a Afdhal, 2008).

U cirhózy 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). Dochází ke vzniku perisinusoidální fibrózy, což má za následek kromě snížené výměny živin, kyslíku a ostatních látek mezi krví v jaterních sinusoidách a sousedními jaterními buňkami, také přeměnu dynamické jaterní cévní rezistence na rezistenci mechanickou a vznik PH (Urbánek et al., 2022).

Za tvorbu extracelulární matrix jsou zodpovědné aktivované hvězdicovité jaterní buňky, jejichž aktivace je spuštěna parakrinně 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 později rozvoj HCC. Poruchy systémové cirkulace u cirhózy (splachnická vazodilatace, vazokonstrikce a hypoperfúze ledvin, retence vody a soli, zvýšený srdeční výdej) jsou kauzálně spojeny s jaterními cévními změnami a výslednou PH (Schuppan a Afdhal, 2008).

1.1.3 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. Na celém světě umírají ročně na onemocnění jater přibližně 2 miliony lidí: 1 milion v důsledku komplikací jaterní cirhózy a 1 milion v důsledku virových hepatitid a HCC. To dělá celosvětově z jaterní cirhózy jedenáctou a u nádorů jater šestnáctou nejčastější příčinu úmrtí; dohromady představují 3,5 % všech úmrtí na celém světě (Asrani et al., 2019). K více než 60 % všech úmrtí souvisejících s onemocněním jater dochází u mužů. V České republice žije 40 000–60 000 pacientů s jaterní cirhózou a ročně jich v jejím důsledku umírá asi 2 000.

1.1.4 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 infekci virem hepatitidy B (HBV). Po objevení viru hepatitidy C v roce 1989 a po definici jednotky nealkoholické steatohepatitidy (NASH) u metabolického syndromu je diagnóza tzv. kryptogenní cirhózy (tj. bez zjevné příčiny) stanovována jen zřídka. Etiologie cirhózy by měla být vždy určena, neboť léčba základní choroby

(abstinence od alkoholu, antivirová léčba...) může zlepšit prognózu pacienta. V případě geneticky podmíněných chorob, jako je hereditární hemochromatóza nebo Wilsonova choroba, je ke zvážení genetické vyšetření i u rodinných příslušníků.

Jak dokládají epidemiologické studie, na rozvoji cirhózy se často podílí více etiologických faktorů. Jako rizikové faktory progresu fibrózy u chronické HCV infekce byly identifikovány pravidelná střední konzumace alkoholu, věk nad 50 let a mužské pohlaví (Poynard et al., 1997, Bellentani et al., 1999). Riziko nealkoholové tukové choroby jater (NAFLD) a alkoholické jaterní choroby (ALD) je naopak spojeno s určitými rizikovými genetickými variantami. Bylo identifikováno několik jednonukleotidových polymorfismů (SNP) (Emdin et al., 2021), kdy největší účinek na zvýšení rizika rozvoje NAFLD, ALD, cirhózy a HCC má varianta Ile148Met *PNPLA3* (rs738409) (Stickel et al., 2017, Carlsson et al., 2020). Naopak varianta v genu *HSD17B13* riziko vzniku NAFLD snižuje. Tato genetická predispozice by mohla částečně vysvětlit rozdíly v individuální náchylnosti k onemocnění jater souvisejícím s alkoholem a obezitou.

1.1.5 Diagnostika

Včasná diagnostika kompenzované jaterní cirhózy je zásadní pro léčbu a sledování pacientů s chronickým onemocněním jater. Po mnoho let byla jaterní biopsie považována za „zlatý standard“ v hodnocení jaterní fibrózy. Jedná se však o invazivní vyšetření s ojedinělými, ale potenciálně život ohrožujícími komplikacemi a s určitou chybovostí danou odběrem vzorku ze subkapsulární části jater. Tyto nevýhody jaterní biopsie spolu s technologickým pokrokem vedly ke snížení počtu prováděných biopsií a k vývoji neinvazivních metod k odhadu stupně jaterní fibrózy, které jsou dnes široce používány a staly se součástí evropských doporučených postupů (European Association for the Study of the Liver. Electronic address, Clinical Practice Guideline et al., 2021).

Neinvazivní testy k určení stupně jaterní fibrózy by měli podstoupit všichni nemocní s chronickou hepatitidou B a C před nasazením protivirové léčby (European Association for the Study of the Liver. Electronic address and European Association for the Study of the 2017, European Association for the Study of the Liver. Electronic address and European Association for the Study of the 2018). Vhodné je také jejich použití u pacientů s podezřením na NAFLD (přítomnost steatózy na ultrazvuku jater, zvýšené jaterní testy u

pacientů s dalšími rizikovými faktory jako je obezita, diabetes mellitus 2. typu nebo metabolický syndrom) (Castera et al., 2019).

V současné době využíváme v neinvazivním hodnocení 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.

1.1.5.1 Sérové markery fibrózy

Mezi sérové markery fibrózy řadíme několik molekul, enzymů a testů, které byly vyvinuty a hodnoceny z hlediska jejich schopnosti detekovat cirhózu u pacientů s chronickým onemocněním jater (Tabulka 1).

Tabulka 1 Sérové markery pro neinvazivní stanovení jaterní cirhózy u pacientů s chronickým onemocněním jater

Název	Obsahuje
Přímé (patentované)	
ELF test	hyaluronová kyselina, PIIINP, TIMP-1
FibroTest	alfa-2-makroglobulin, haptoglobin, gamaglobulin, apolipoprotein A1, GGT, bilirubin, věk, pohlaví
Hepascore	bilirubin, GGT, kyselina hyaluronová, α-2-makroglobulin, věk, pohlaví
Nepřímé (nepatentované)	
APRI	AST, trombocyty
FIB-4	ALT, AST, trombocyty, věk
NAFLD fibróza skóre	ALT, AST, trombocyty, glykémie, albumin, věk, BMI

Upraveno podle (European Association for Study of and Asociacion Latinoamericana para el Estudio del, 2015)

Sérové markery můžeme rozdělit podle několika kritérií. Rozlišujeme sérové markery přímé, které zahrnují molekuly přímo se podílející na procesu fibrotizace. Patří mezi ně molekuly a enzymy účastníci se syntézy nebo degradace kolagenů, glykoproteiny mimobuněčné hmoty, proteoglykany a cytokiny účastníci se regulace fibrogenese. Jedná se např. o kyselinu hyaluronovou (HA), N-terminální propeptid prokolagenu typu III (PIIINP), matrix metaloproteinázy, a další. Tyto molekuly se stanovují patentovanými komerčně dostupnými soupravami, z jejichž kombinace se vypočítává příslušné skóre – ELF skóre (enhanced liver fibrosis score) (Guha et al., 2008) nebo HepaScore (Guechot et al., 2010). Nejrozsáhleji byl studován FibroTest®, především u pacientů s HCV a HBV

infekcí. Validace patentovaných testů srovnáním s výsledky jaterních biopsií není zatím dostatečně spolehlivá a jejich hodnocení vyplývá z metaanalýz metodicky nehomogenních studií (Tabulka 2). Ve srovnání s nepatentovanými testy jsou patentované testy přesnější, jejich široké použití je však omezeno cenou a dostupností.

Druhou skupinu představují sérové markery nepřímé, které jsou odvozeny od standardních laboratorních testů, které bezprostředně s patogenezi fibrózy nesouvisí, ale při fibróze a cirhóze se mění, např. počet trombocytů, AST, sérový albumin. Za účelem detekce a klasifikace fibrózy a cirhózy jsou součástí matematických modelů zahrnujících vždy několik nepřímých markerů. Nejlépe validovány rozsáhlými metaanalýzami jsou AST to platelet ratio index (APRI) a Fibróza-4 (FIB-4) skóre u virových hepatitid a NAFLD; NAFLD fibróza skóre u NAFLD. Metaanalýzy zahrnují několik tisíc pacientů, plochy pod ROC křivkami (AUROC) pro diagnostiku cirhózy se pohybovaly v rozmezí od 0,73 do 0,85 (Tabulka 2).

Tabulka 2 Hodnoty (metaanalýzy) sérových markerů pro diagnostiku cirhózy s využitím jaterní biopsie jako referenční hodnoty

Sérové markery	Etiologie	Pacienti (n)	Cut-offs	AUROC	Sensitivita (%)	Specifická (%)
Nepatentované						
APRI	HBV	8773	1,0-2,0	0,73	66-31	74-89
	HCV	4548	1,0-2,0	0,83	76-46	72-91
	NAFLD	2327	1,0-2,0	0,76	63	78
FIB-4	HBV	6068	1,05-2,65	0,84	87-64	65-86
	NAFLD	1872	3,25	0,85	77	83
NAFLD fibróza skóre	NAFLD	1830	-0,014	0,83	80	81
Patentované						
FibroTest®	HBV	2494	0,74	0,87	62	91

Upraveno podle (European Association for Study of and Asociacion Latinoamericana para el Estudio del, 2015).

Výhodou všech sérových markerů je jejich dobrá reprodukovatelnost, relativní přesnost (95 %), nízká cena a v případě nepatentovaných testů široká dostupnost, takže je lze provádět v primární zdravotní péči. Mezi jejich limitace patří neschopnost rozlišit jednotlivé stupně jaterní fibrózy, které jsou určované v jaterní biopsii, nejčastěji dle Metavir skóre. Jednoznačný výsledek indikující těžkou fibrózu či cirhózu nebo naopak normální nález vykazuje jen 1/3 pacientů, ostatní výsledky jsou v tzv. „šedé zóně“. Využití

komerčních patentovaných testů omezuje jejich nižší dostupnost, falešná pozitivita či negativita v případě přítomnosti další chorobných stavů jako jsou hemolýza, Gilbertův syndrom a/nebo zánětlivá onemocnění. Všechny testy dokáží lépe jaterní cirhózu vyloučit než potvrdit (vyšší specifita než senzitivita), s vysokou negativní prediktivní hodnotou (NPV >90 %).

1.1.5.2 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 (MR). Všechny tyto zobrazovací metody jsou schopny vyhodnotit až pokročilejší morfologické známky jaterní cirhózy a PH jako je zrnitý parenchym jater, uzlovitý (nepravidelný) povrch jater, hypertrofie jaterního segmentu 1 (lobus caudatus) a hypotrofie segmentu 4, zvětšení hilového periportálního prostoru se ztluštěním hilového periportálního tuku, sekundární splenomegalie v důsledku zvýšeného tlaku ve vena lienalis, ascites, ztluštění stěny žlučníku nebo peribiliární cysty a hemodynamické nálezy jako jsou portosystémové kolaterály, dilatace portální žíly, snížená rychlost průtoku krve portální žílou, obrácený tok v jaterních žilách nebo zvýšený arteriální průtok játry. Nejsou-li tyto již pozdní známky pokročilé jaterní cirhózy přítomny, může být méně pokročilá, kompenzovaná jaterní cirhóza při běžném sonografickém vyšetření přehlédnuta až u 30 % pacientů (Colli et al., 2003).

1.1.5.3 Elastografické metody

Novější metodou pro posuzování pokročilosti jaterního onemocnění je elastografie jater. Využíváno je velmi dobré negativní korelace mezi elastograficky měřenou LS a množstvím vaziva v játrech. Vyšší tuhost (nižší elasticita) velmi dobře odpovídá stupni fibrózy jakožto ukazateli pokročilosti CLD i míře rizika komplikací (CSPH, HCC).

Podstatou elastografických metod je vyvolání deformace vyšetřované tkáně pomocí zevního energetického impulzu, který může být buď mechanický impulz (vibracemi kontrolovaná transientní elastografie (VCTE) a elastografie využívající ke zpětné detekci MR (MRE)), nebo silný ultrazvukový impulz, který je fokusován do různé hloubky v tkáni s tvorbou rázové vlny a indukci příčných vln (ARFI zdroj; acoustic radiation force impulse imaging), jak je tomu u bodové (point shear-wave elastografie; pSWE) nebo dvoudimenzionální shear-wave elastografie (2D-SWE) (Castera, 2015). Modulem pro

měření LS jsou v současnosti vybaveny již standardní přístroje pro ultrazvukové vyšetření břicha. Možnost provádění MRE je dána vybavením MR přístroje příslušným softwarem (Tang et al., 2015).

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 VCTE (přístroj Fibroscan[®], výrobce Echosens, Francie). Příkladem pSWE jsou Virtual Touch tissue Quantification[®], Siemens a ElastPQ[®], Philips. Příkladem 2D-SWE je přístroj Aixplorer[®], od výrobce Supersonic Imaging. MRE se do klinické praxe dostala v roce 2007.

Přístroje pro ultrazvukové měření LS jsou dnes široce dostupné a všechny poskytují vynikající diagnostickou přesnost pro určení cirhózy jater, s vysokou senzitivitou i specificitou, s vysokou NPV. Pro různé etiologie jaterního onemocnění jsou stanoveny jiné cut-off hodnoty, jak ukazuje Tabulka 3.

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.

Nespolehlivé mohou být u obézních pacientů a pacientů s úzkými mezižeberními prostory. Měření může být ovlivněno zánětem v jaterní tkáni (aminotransferázy vyšší než 5násobek horní normy), kongescí jater, příjmem potravy a extrahepatální cholestázou. Vyšetření by mělo být prováděno pomocí standardizovaného protokolu u pacientů alespoň 2 hodiny nalačno.

Tabulka 3 Hodnoty (metaanalýzy) jednotlivých elastografických metod pro diagnostiku cirhózy s využitím jaterní biopsie jako referenční hodnoty

Tuhost jater	Etiologie	Pacienti (n)	Cut-offs	AUROC	Sensitivita (%)	Specifická (%)
Ultrazvuková elastografie						
VCTE	HBV	4386	9,0-16,9 kPa	0,93	86	87
	CLD (HCV)	8206	13,0 kPa	0,94	91	89
	NAFLD	1780	10,3-11,3 kPa	0,94	88	86
	ALD	1026	18,6 kPa	0,91	84	85
ARFI	HBV/HCV	2691	2,42 m/sec	0,91	86	84
2D-SWE	HBV	400	11,5 kPa	0,95	80	93
	HCV	379	13,0 kPa	0,93	86	88
	NAFLD	156	13,0 kPa	0,92	75	88
MR elastografie						
MRE	HBV	1470	4,6 kPa	0,97	89	92
	NAFLD	340	4,1-6,7 kPa	0,97	87	93

Upraveno podle (European Association for Study of and Asociacion Latinoamericana para el Estudio del, 2015).

1.1.5.4 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, tedy jako poměr plochy odpovídající barevně vazivové tkáni (kolagenu) a plochy celého zorného pole. Podle recentně publikovaných studií koreluje CPA s pokročilostí jaterní dysfunkce podle Child-Pughovy klasifikace a MELD skóre (Model for End-stage Liver Disease) i s PH. Pomocí CPA dokážeme odlišit CSPH (Nielsen et al., 2014) a predikovat dekompenzaci jaterního onemocnění u pacientů s chronickou hepatitidou C (Calvaruso et al., 2015). Hodnoty CPA korelují také s LS měřenou pomocí VCTE u pacientů s chronickou hepatitidou B a C (Isgro et al., 2013).

Další běžně používanou metodou pro kvantifikaci obsahu kolagenu je stanovení obsahu hydroxyprolinu v jaterní tkáni, jako hlavní součásti kolagenu (Woessner, 1961). Obě výše uvedené metody vyžadují získání dostatečně velkého vzorku jaterní tkáně a jsou tak spojeny s nutností jaterní biopsie. Nenachází proto využití v běžné diagnostice, ale jen v oblasti výzkumu.

1.1.6 Léčba

O prognóze pacienta s jakoukoli chronickou jaterní chorobou rozhoduje vznik jaterní cirhózy, která pacientovu prognózu zhoršuje (Niederau et al., 1998, Younossi a Stepanova, 2011). Vývoj jaterní cirhózy trvá desítky let, než dojde k dekompenzaci onemocnění nebo úmrtí pacienta. Snaha o ovlivnění progresu jaterní fibrózy je v průběhu celého vývoje jaterního onemocnění a léčba je specifická podle etiologie. Nejeefektivnější je eliminace vyvolávající příčiny jaterního poškození. U chronické hepatitidy B se podávají léky zastávající replikaci viru, u chronické HCV infekce se podávají DAAs 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 inzulin. K redukci váhy lze přispět farmakologicky a rovněž metodami bariatrické chirurgie. U biliárních cirhóz zprůchodňujeme žlučové cesty a ovlivňujeme cholestázu podáváním ursodeoxycholové kyseliny, která mění vlastnosti žluče a podporuje její odtok do střeva. U střádavých chorob se podávají léky snižující množství střádaného metabolitu – odstraňujeme nadměrné množství železa nebo mědi u pacientů s hereditární hemochromatózou a Wilsonovou chorobou. Dojde-li u jaterní cirhózy k rozvoji komplikací, jsou tyto komplikace uniformní, jejich podkladem je stupeň PH bez ohledu na etiologii jaterního onemocnění. Léčbu chronického jaterního selhání, které nejvíce tendenci k regresi po etiologické léčbě, může v určitých případech představovat LT.

1.1.7 Regrese fibrózy

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. Faktorem významně ovlivňujícím reverzibilitu fibrózy je cross-linking (zasíťování) kolagenu a dále jeho vyzrávání, tloušťka vazivových sept a vznik CSPH. Za hranici ireverzibility lze považovat mikronodulární jaterní cirhózu se zvýšenou tloušťkou sept, s rozvinutou PH a počínajícím jaterním selháním (Bedossa, 2015). Méně pokročilé stavy mohou vykazovat pozoruhodnou reverzibilitu, pokud se odstraní vyvolávající příčina jaterního onemocnění. První zmínky o regresi jaterní fibrózy

popsal Poynard et al. v roce 2002 na skupině pacientů s chronickou hepatitidou C léčených PEG-IFN- α 2b s RBV (Poynard et al., 2002). U 49 % pacientů s jaterní cirhózou došlo k ústupu cirhotické přestavby po léčbě. Tato studie je cenná tím, že je ještě založena na porovnávání párových biopsií jater provedených před léčbou a s odstupem po léčbě. Její výsledky lze tak jen obtížně zpochybnit.

V době DAAs dokážeme více než 95 % pacientů s pokročilou fibrózou jater při HCV infekci vyléčit, což vede ke zlepšení stupně jaterní fibrózy i prognózy pacienta. U pacientů s jaterní cirhózou je dosažení SVR spojeno se snížením HVPG, což vede ke snížení rizika dekompenzace jaterního onemocnění (Mandorfer et al., 2016) a snížení mortality (van der Meer et al., 2012). Dochází i ke zlepšení syntetické jaterní funkce (Foster et al., 2016) a u části pacientů, kteří jsou kandidáty LT, může dojít k jejich vyřazení z čekací listiny (WL) pro zlepšení stavu (Belli et al., 2016).

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), obdobné výsledky byly popsány při léčbě entecavirem (Chang et al., 2010). Jasně důkazy o regresi jaterní fibrózy se začínají objevovat také u pacientů s morbidní obezitou a NASH po redukci hmotnosti po bariatrické operaci (Lassailly et al., 2015).

1.2 Portální hypertenze

Portální hypertenze je hlavním projevem a patogenetickým mechanismem u jaterní cirhózy. Stupeň PH určuje míru rizika vzniku závažných komplikací jaterní cirhózy jako je vznik jícnových a žaludečních varixů a krvácení z nich, rozvoj ascitu nebo hepatorenálního syndromu a další.

1.2.1 Definice

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.

Tlak v portální žíle je podle Ohmova zákona určován průtokem a odporem portálního řečiště. PH je u jaterní cirhózy způsobena zvýšením intrahepatální vaskulární rezistence, která je daná remodelací endotelu v sinusoidech a útlakem cévního zásobení vazivem. Obstrukce ve slezinné, mezenterické nebo portální žíle mohou způsobit prehepatální PH, zatímco obstrukce jaterních žil nebo dolní duté žíly může zhoršit venózní odtok a způsobit posthepatální PH (Bosch et al., 2009).

1.2.2 Patogeneze a patofyziologie portální hypertenze a jejích komplikací

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.

Kontrakce hvězdicových buněk je ovlivňována endotelinem 1 (ET-1), který působí vazokonstrikčně, a vazodilatačně působícím oxidem dusnatým (NO). V cirhotických játrech produkují endotelové buňky jaterních sinusoid méně NO a tato produkce se může dále snižovat např. při infekcích (Wiest a Groszmann, 2002). Relativní nedostatek NO a tedy nadbytek ET-1 je základní patofyziologický mechanismus dynamické složky PH (Rockey, 1997). Dynamická složka představuje na začátku nemoci hlavní příčinu PH, později její podíl na intrahepatální rezistenci klesá a u pokročilé jaterní cirhózy představuje asi 50 %. Zvýšená intrahepatální vaskulární rezistence vede dále ke splachnické a systémové arteriální vazodilataci, hyperkinetické cirkulaci a rozvoji portosystémových kolaterál. Tyto adaptivní změny mohou vést k dalšímu zvýšení portálního tlaku (Berzigotti a Bosch, 2014, McAvoy et al., 2016).

V porovnání s jaterní cirkulací je ve splachnickém oběhu produkce NO endotelovými buňkami zvýšená: zpočátku jako reakce na vaskulární stres a později při zvýšené bakteriální translokaci a trvale zvýšené zánětlivé reakci typické pro pokročilé jaterní onemocnění (Martin et al., 1998, Wiest a Groszmann, 2002, McAvoy et al., 2016, Arroyo et al., 2021).

Vazodilatace ve splachnickém kapilárním řečišti a arteriolách má za následek zvýšení portálního prokrvení, které v kombinaci se zvýšenou intrahepatální vaskulární rezistencí vede ke zvýšení portálního tlaku.

Protože splachnické cévní řečiště tvoří asi 25 % celkové systémové vaskulární rezistence, má progresivní splachnická vazodilatace za následek snížení efektivního objemu arteriální krve, což způsobuje systémovou hypotenzi, nedostatečné arteriální plnění a aktivaci neurohumorálních vazokonstrikčních systémů (tj. renin – angiotensin – aldosteronový systém (RAAS) a neosmotické uvolňování vazopresinu).

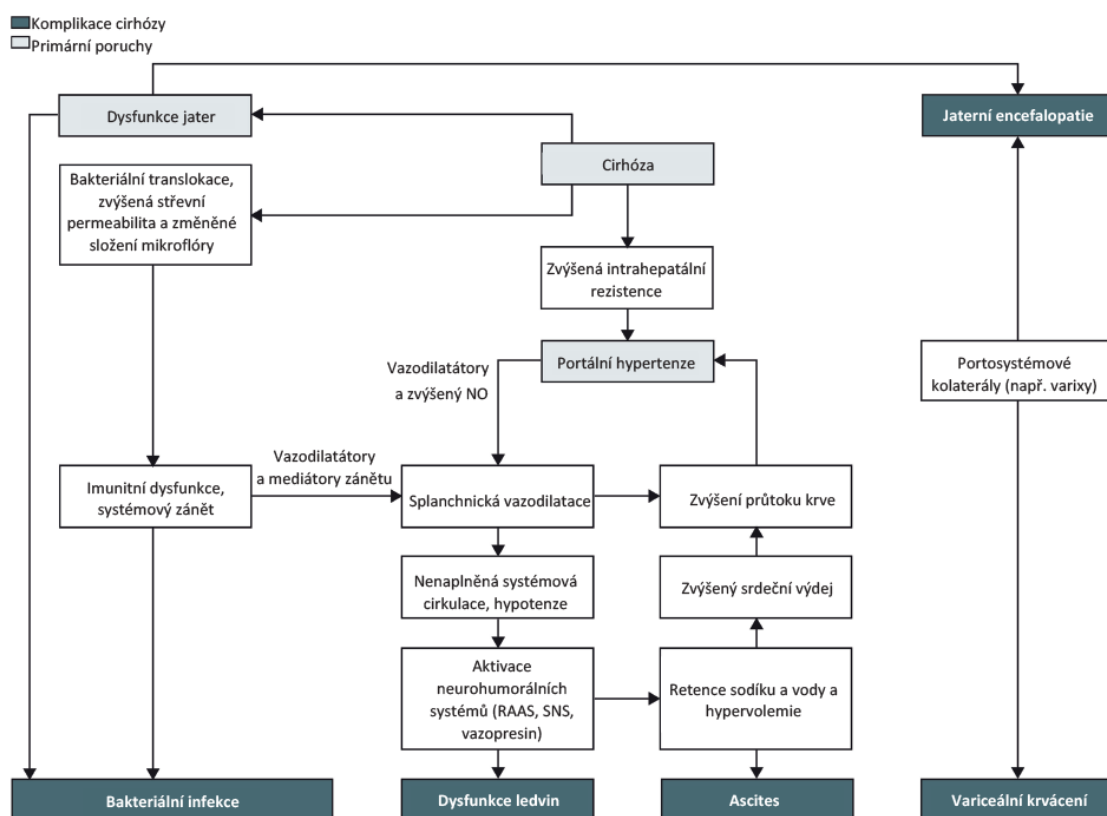
Cílem těchto mechanismů je působit proti vazodilataci a vést k zadržování sodíku a vody, což má za následek zvýšení objemu plazmy. Část nadměrného objemu plazmy je rozdělena do peritoneálního prostoru jako ascites, výsledek PH. S progresí jaterní cirhózy se zhoršuje vazodilatace a progresivně klesá systémový krevní tlak s maximální aktivací vazokonstrikčních faktorů.

Výsledkem je intenzivní vazokonstrikce v renálním oběhu, která vyústí v akutní poškození ledvin (acute kidney injury, AKI) a v hepatorenální syndrom (Gines et al., 2018). Zvětšený objem krve způsobuje zvýšení srdečního výdeje, což vede k hyperdynamické cirkulaci. Ta spolu se splachnickou vazodilatací zvyšuje přítok portální krve a udržuje PH (Obrázek 1).

Zvýšený portální tlak vede k obrácení toku krve a dilataci již preformovaných kolaterál v místech, kde se spojuje systémová a portální cirkulace. Vede také k aktivaci angiogeneze, která podporuje tvorbu nových kolaterál (Fernandez et al., 2009). Klinicky nejvýznamnějšími portosystémovými kolaterálami jsou gastroezofageální varixy. Pokud tlak v těchto varixech překročí elastickou kapacitu cévní stěny, dochází ke krvácení.

Portosystémové kolaterály spolu se zhoršenou syntetickou funkcí jater přispívají k rozvoji jaterní encefalopatie snížením clearance amoniaku pocházejícího ze střeva. Byla prokázána těsná korelace mezi stupněm PH a rizikem komplikací jaterní cirhózy, naopak při snížení portálního tlaku riziko komplikací klesá (Abralde et al., 2003).

Obrázek 1 Patofyziologie komplikací jaterní cirhózy a portální hypertenze



Upraveno podle (Gines et al., 2021).

Farmakologická léčba se zaměřuje na ovlivnění dynamické složky PH podáváním nitrátů či alfa-blokátorů ke snížení vazokonstrikce nebo beta-blokátorů či terlipresinu ke snížení průtoku splanchnickým řečištěm.

1.2.3 Mezní hodnoty HVPG ve vývoji jaterní cirhózy a jejích komplikací

U člověka lze PH změřit přesně pouze invazivně při katetrizaci jaterních žil. Zhoršení PH koreluje s rozvojem klinické dekompenzace jaterního onemocnění (Tabulka 4). 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, zatímco při poklesu HVPG pod tuto hodnotu k variceálnímu krvácení nedochází (Feu et al., 1995).

U pacientů s dekompenzovanou jaterní cirhózou korelují naměřené hodnoty HVPG >16 mm Hg se špatnou prognózou a rizikem úmrtí (Merkel et al., 1992). HVPG >20 mm Hg při krvácení z varixů jícnu identifikuje pacienty s rizikem selhání endoskopické léčby, rizikem opětovného krvácení a úmrtí. U pacientů s akutní alkoholickou hepatitidou je hodnota HVPG >22 mm Hg naměřená časně během hospitalizace spojena s vyšším rizikem úmrtí těchto nemocných (Tabulka 4).

Tabulka 4 Prognostický význam HVPG u pacientů s jaterní cirhózou

HVPG	Klinická korelace
<5 mm Hg	normální portální tlak
5–10 mm Hg	mírná portální
≥10 mm Hg	klinicky významná portální hypertenze riziko rozvoje jícnových varixů vznik ascitu, dekompenzace zvýšené riziko HCC riziko dekompenzace po resekcii jater
≥12 mm Hg	krvácení z jícnových varixů
≥16 mm Hg	vysoká mortalita u dekompenzovaných cirhotiků
≥20 mm Hg	selhání endoskopické léčby krvácení z jícnových varixů
≥22 mm Hg	vysoká mortalita u pacientů a akutní alkoholickou hepatitidou

Upraveno podle (Procopet et al., 2015).

Změny HVPG během sledování vyvolané buď farmakologickou léčbou, nebo v důsledku zlepšení jaterního onemocnění jsou spojeny s lepší prognózou a snížením rizika rozvoje komplikací PH. Snížení HVPG o více než 10 % snižuje riziko vzniku varixů a rozvoje ascitu u pacientů s kompenzovanou cirhózou. U pacientů s varixy jícnu, bez předchozího krvácení, snižuje pokles HVPG o 10 % riziko prvního krvácení z varixů.

Snížení HVPG o 20 % oproti výchozí hodnotě nebo na hodnoty 12 mm Hg znamená snížení rizika opětovného krvácení, snižuje se i riziko dalších komplikací v důsledku PH a zlepšuje se i celkové přežití (D'Amico et al., 2006). Hemodynamická odpověď je nejlepším parametrem úspěšnosti léčby a je tak jejím primárním cílem.

1.2.4 Diagnostika

HVPG, tedy rozdíl mezi tlakem ve volné jaterní žíle a v zaklínění jaterní žíly, představuje zlatý standard k posouzení přítomnosti a závažnosti PH u pacientů s jaterní

cirhózou a je stále 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). Při katetrizaci jaterních žil lze navíc provést také pravostrannou srdeční katetrizaci a doplnit vyšetření i o zhodnocení systémových hemodynamických změn.

Ačkoli je HVPG nejlepším prognostickým markerem u pacientů s cirhózou, je dostupné a/nebo prováděné pouze v několika odborných centrech. V posledních deseti letech proto byla snaha nahradit toto invazivní vyšetření metodami neinvazivními, především elastografickým měřením LS. Většina autorů se zaměřila na predikci hodnot HVPG ≥ 10 mm Hg, tedy o predikci CSPH.

1.2.4.1 Neinvazivní stanovení PH pomocí měření tuhosti jater

Elastografické měření LS nabízí kromě stanovení stadia jaterní fibrózy (množství přítomného kolagenu v játrech) také možnost neinvazivního posouzení stupně PH. Rozsáhlé klinické zkušenosti prokázaly, že LS je složena ze dvou komponent: statické (fibróza) a dynamické (PH). Jaterní fibróza je obecně akceptována jako určující faktor progresu jaterní dysfunkce a PH; dvě studie provedené na lidech prokázaly, že korelace obsahu kolagenu v játrech (hodnoceno jako CPA) s PH (hodnota HVPG) je slabší než korelace LS s HVPG (Calvaruso et al., 2012, Nielsen et al., 2014). Proto se zdá pravděpodobné, že u pacientů s jaterní cirhózou je hlavní komponentou LS portální hypertenze, nikoli obsah kolagenu v játrech (Yin et al., 2013, Yarpuzlu et al., 2014, Yang et al., 2017).

Podle dosavadních zkušeností je VCTE slibnou metodou pro odhalování pacientů s vysokým rizikem rozvoje PH. Bylo publikováno několik studií, ve kterých hodnoty LS u pacientů s pokročilým jaterním onemocněním korelují s HVPG a možností predikovat CSPH (Vizzutti et al., 2007, Bureau et al., 2008). U pacientů s kompenzovanou jaterní cirhózou byly stanoveny dvě cut-off hodnoty pro spolehlivé vyloučení a/nebo určení přítomnosti CSPH, a to 13,6 kPa se sensitivitou 90 % a 21kPa s 90% specificitou (Shi et al., 2013). Výsledkem je snížení počtů invazivních měření HVPG pomocí katetrizace jaterních žil. Uvedených hodnot sensitivity a specificity je dosaženo pouze pro hodnoty HVPG mezi 5 a 12 mm Hg, nad 12 mm Hg přesnost vyšetření významně klesá, protože progresu PH se nad tuto hodnotu stává částečně nezávislou na stupni intrahepatální fibrózy (Millonig et

al., 2010) a důležitou roli zde hrají jiné faktory, jako je hyperkinetická cirkulace a splachnická vazodilatace (Mandorfer et al., 2020). Výsledky jednotlivých autorů (Kim et al., 2019, Marasco et al., 2020) ukazují, že elastografické metody nejsou prozatím vhodné pro monitorování hemodynamické odpovědi na farmakoterapii většinou způsobenou snížením splachnického průtoku krve.

Využití elastografických metod pro predikci přítomnosti nebo velikosti jícnových varixů se zdá být prozatím nedostatečné. V některých studiích tento přístup selhal při hodnotách HVPG >10 mm Hg (Procopet et al., 2015), naopak další autoři prokázali dobrou korelaci mezi LS a HVPG i pro vysoké hodnoty HVPG (Stefanescu et al., 2020). V metaanalýze zahrnující celkem 18 studií s 3 644 pacienty se pohybovaly při použití VCTE hodnoty LS pro predikci jícnových varixů od 13,9 kPa do 48 kPa, s relativně vysokou senzitivitou 56–100 %, ale s nízkou specifitou 32–87 % (Shi et al., 2013). Podle doporučení Baveno VI můžeme jako rizikovou skupinu s CSPH a endoskopickými známkami PH označit pacienty, kteří mají pokročilou, ale kompenzovanou jaterní cirhózu B anebo C, s hodnotami LS >20–25 kPa při použití VCTE. Naopak pacienti s LS <20 kPa a počtem trombocytů >150 x 10⁹/l je riziko jícnových varixů vyžadujících léčbu nízké (de Franchis a Baveno, 2015).

1.2.4.2 Neinvazivní stanovení PH pomocí měření tuhosti sleziny

Tuhost sleziny (spleen stiffness; SS) byla v posledních letech studována jako nový parametr, který by mohl lépe než LS odrážet výši portálního tlaku. Ukázalo se, že se korelace mezi SS a stupněm PH zvyšuje při kombinaci měření SS a LS pomocí 2D-SWE (Jansen et al., 2016, Jansen et al., 2017). Tyto výsledky byly následně validovány dalšími autory (Elkrief et al., 2015, Elkrief et al., 2018). Pro měření SS je vhodnější VCTE kombinovaná s ultrazvukem v B-módu nebo pSWE, nikoli však 2D-SWE (Mandorfer et al., 2020).

1.2.4.3 Jiné potenciální neinvazivní prediktory

MELD skóre

MELD skóre je kombinovaný parametr vyjadřující stupeň jaterní dysfunkce a dobře predikuje přežití pacientů s jaterní cirhózou. Vypočítává se z hodnot celkového sérového bilirubinu, sérového kreatininu a protrombinového času.

MELD skóre bylo nejprve používáno k predikci časně mortality pacientů s dekompenzovanou cirhózou (Kamath et al., 2007), v současnosti je používáno k alokaci orgánů pro pacienty na WL k LT (Wiesner et al., 2001, Wiesner et al., 2003, Kamath et al., 2007). MELD skóre dobře koreluje s přítomností varixů jícnu a mortalitou pacientů při variceálním krvácení (Conejo et al., 2018, Hoffman et al., 2020).

Liver spleen platelets score (LSPS)

LSPS je prediktor kombinující LS, počet trombocytů a průměr sleziny. Toto skóre bylo přesnější pro identifikaci pacientů s CSPH než samotná LS, ale prediktivní hodnota LSPS pro vyšší hodnoty HVPG nebyla studována (Berzigotti et al., 2013). Skupina autorů zařadila do studie zejména cirhotiky s funkční pokročilostí Child-Pugh A, pouze několik nemocných s Child-Pugh B a žádného se skóre Child-Pugh C.

Krevní markery portální hypertenze

V poslední době je snahou identifikovat krevní markery jako neinvazivní markery PH, které by mohly sloužit jako rychlé diagnostické testy. Jejich diagnostická výpovědní hodnota je však nižší ve srovnání s LS, a proto je v tomto ohledu třeba dalšího výzkumu (Bruha et al., 2016, Simbrunner et al., 2020). Dobrou korelaci mezi krevními markery zánětu a HVPG popsali autoři Buck et al. a navrhli diagnostický test založený na čtyřech biomarkerech (IL-6, IL1-Ra/IL-1-F3, a VCAM-1), který dokázal identifikovat 86 % kompenzovaných cirhotiků s HVPG < 12 mm Hg (Buck et al., 2014).

Enhanced liver fibrosis score (ELF)

ELF skóre bylo původně navrženo jako neinvazivní prediktor stadia jaterní fibrózy u pacientů s CLD, bez jaterní cirhózy (Miele et al., 2017, Jabor et al., 2018). Autoři Simbrunner et al. prokázali dobrou korelaci mezi ELF skóre a HVPG (Simbrunner et al., 2020). Většina pacientů však byla funkční klasifikace Child-Pugh A a signifikantní korelace mezi ELF skóre a HVPG bylo dosaženo pouze v této skupině pacientů, nikoli ve skupině s vyšší pokročilostí jaterního onemocnění – Child-Pugh B a C. Autoři také prokázali, že síla korelace mezi ELF skóre a HVPG klesá s vyššími hodnotami HVPG. Výsledky naznačují, že ELF skóre může být užitečným nástrojem neinvazivní predikace HVPG, ale s významně lepší spolehlivostí ve skupině méně pokročilých cirhotiků.

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). Mortalita z důvodu infekčních komplikací je u pacientů s jaterní cirhózou čtyřikrát vyšší než v běžné populaci (Arvaniti et al., 2010). Příčinou je několik faktorů, zejména přítomnost syndromu imunitní dysfunkce asociovaného s cirhózou (cirrhosis-associated immune dysfunction syndrome, CAIDS), zvýšenou střevní propustností, kvantitativními a kvalitativními změnami střevní mikroflóry, které přispívají k patologické bakteriální translokaci ze střeva do systémového oběhu a genetická predispozice (Piano et al., 2018). Prevalence bakteriálních infekcí u hospitalizovaných pacientů s cirhózou se pohybuje mezi 25–50 % (Fasolato et al., 2007, Moreau et al., 2013).

Rozvoj bakteriálních infekcí u pacientů s cirhózou je spojen s výskytem závažných komplikací, jako AKI, jaterní encefalopatie nebo selhání orgánů, což má za následek vysokou krátkodobou mortalitu (Moreau et al., 2013). Bakteriální infekce zvyšují riziko úmrtí v jakémkoli stadiu onemocnění jater, od kompenzované až po dekompenzovanou cirhózu, a také při akutním selhání jater nasedajícím na chronické onemocnění jater (tzv. acute-on-chronic liver disease, ACLF). Stěžejní je včasné zahájení antibiotické terapie a tím snížení mortality na tyto infekční komplikace. Až jedna třetina pacientů se spontánní bakteriální peritonitidou (SBP) nebo jinými bakteriálními infekcemi může být zcela asymptomatická nebo se může projevit rozvojem jaterní encefalopatií a/nebo renální dysfunkcí.

K nejčastějším infekčním komplikacím u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou patří SBP, infekce močových cest, respirační infekce, bakteriémie a infekce kůže a měkkých tkání. SBP se vyskytuje u přibližně 25 % pacientů, nejčastějšími původci jsou gramnegativní bakterie běžně přítomné ve střevě nebo grampozitivní koky. Infekcemi močových cest trpí cca 12–29 % nemocných, hlavními vyvolavateli jsou gramnegativní bakterie (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp.) (Navasa a Rodes, 2004). Respirační infekce se vyskytují v cca 15 % případů (Preda et al., 2011), primární bakteriémie ve 12 % případů a infekce kůže a měkkých tkání u 11 % (Horowitz et al., 2004).

Nejlépe definovanou a popsanou skupinou cirhotiků jsou pacienti čekající na transplantaci jater. Mortalita pacientů na WL k LT dosahuje v USA necelých 25 %,

v evropských registrech je mortalita nižší kolem 10 % (San Juan a Cortes, 2011), v České republice pak kolem 5 % (nepublikovaná data). Popsané rozdíly v mortalitě pacientů čekajících na LT jsou vysvětlitelné rozdílnou nabídkou dárců v daných zemích, a tím i rozdílnou délkou průměrné čekací doby. Závažné bakteriální infekce (ZBI) jsou uváděny na druhém místě v příčinách mortality pacientů na WL k LT. Je však nutno vzít v úvahu, že selhání jater uváděné jako první příčina se často rozvíjí na podkladě závažné infekční komplikace (Arvaniti et al., 2010, Fernandez a Gustot, 2012).

K vysoké mortalitě na bakteriální infekce přispívá několik faktorů: snížená syntetická funkce jater, pokročilost jaterního onemocnění, přítomnost PH, bakteriální translokace ze střeva spolu se změněnou funkcí buněk imunitního systému a genetické faktory (Lin et al., 1995, Opal a Esmon, 2003, Navasa a Rodes, 2004, Arvaniti et al., 2010, Fernandez a Gustot, 2012, Jalan et al., 2014).

1.3.1 Bakteriální translokace

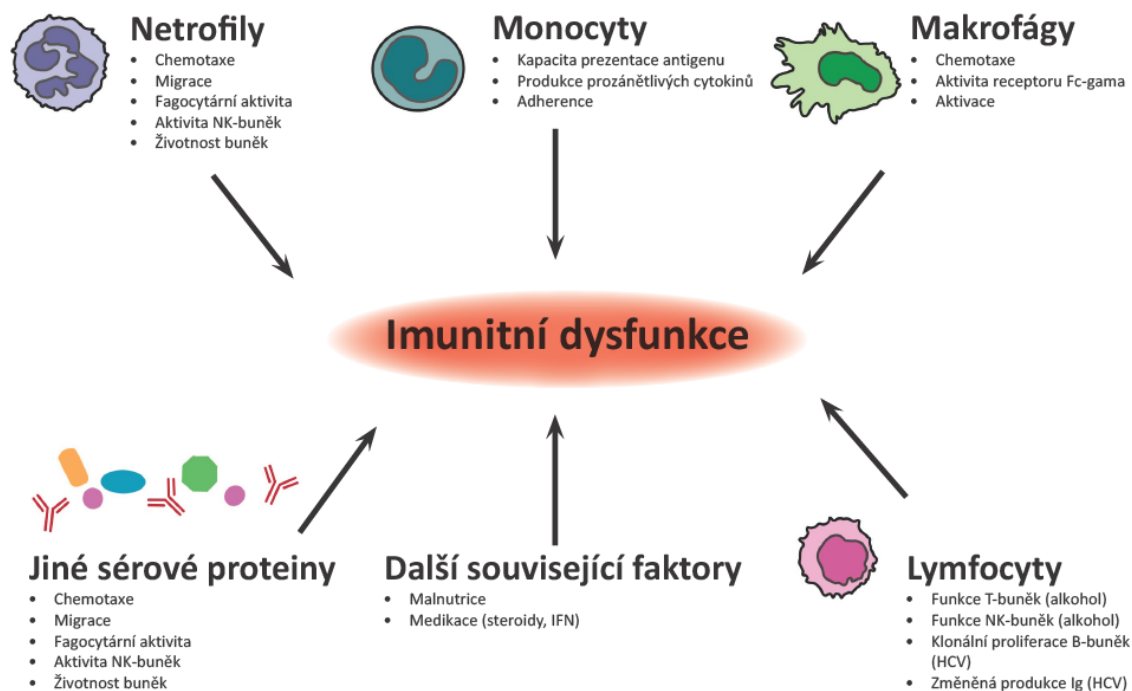
Klíčovým patofyziologickým mechanismem v rozvoji bakteriálních infekcí je bakteriální translokace (BT), kterou definujeme jako přechod potencionálně patogenních bakterií či jejich produktů (lipopolysacharid (LPS), endotoxin) extraluminálně střevní stěnou. BT je spojena s vyšší endotoxémií (Wiest et al., 2014), která koreluje s pokročilostí jaterní dysfunkce a též se stupněm PH (Lin et al., 1995). Tyto stavy pak přispívají k rozvoji infekce obecně, především jsou pak hlavním predisponujícím faktorem SBP (Ramachandran a Balasubramanian, 2001). BT je u cirhotiků usnadněna díky zpomalené střevní motilitě vedoucí k přerůstání střevní mikroflóry (Perez-Paramo et al., 2000, Lata et al., 2009), zvýšené permeabilitě střevní stěny při PH a zánětlivým změnám ve střevní stěně (Guarner a Soriano, 1997). Nově jsou popisovány i změny ve složení a funkci střevní mikroflóry (Acharya a Bajaj, 2021, Sole et al., 2021), kdy dochází především ke ztrátě jejich genetické rozmanitosti, poklesu autochtonních druhů a zvýšení výskytu neobvyklých střevních bakterií, jako je *Enterococcus* spp. Tyto změny korelují s pokročilostí jaterního onemocnění (Sole et al., 2021). Jedna z hypotéz uvádí, že změny ve složení mikrobioty mohou být spojeny s poškozením jejich funkce, což vede ke střevnímu zánětu, narušení střevní bariéry a k její zvýšené propustnosti, což zhoršuje již existující BT. Výskyt patogenních druhů může rovněž přispět ke zvýšení endotoxémie a k rozvoji systémového zánětu (Bajaj et al., 2014).

Translokující bakterie jsou za normální situace zachyceny v mezenteriálních uzlinách, avšak u nemocných s cirhózou (především při jaterní dysfunkci stupně C dle Childovy-Pughovy klasifikace) se infekce v uzlinách nachází ve větším procentu v porovnání s kontrolami (Cirera et al., 2001). Bakterie se mohou přes lymfatický systém dostat do systémové cirkulace a způsobit bakteriémií. Na vzniku bakteriémie se spoluúčastní změněné obranné mechanismy při CAIDS. Za normálních podmínek se BT vyskytuje i u zdravých jedinců, jde však o malé množství endogenních bakterií, které jsou pohotově ničeny imunitním systémem v Peyerských placích a buňkami monocytomakrofágového systému (MMS).

1.3.2 Syndrom imunitní dysfunkce asociovaný s cirhózou

Jaterní cirhóza je spojena s různým stupněm systémové imunitní dysfunkce, která je nazývána syndrom imunitní dysfunkce asociovaný s cirhózou (CAIDS). Jedná se o vícestupňový stav, který zahrnuje dysfunkci přirozené (nespecifické), buněčné i humorální imunity, sníženou schopnost opsonizace a „paralýzu“ imunitního systému v důsledku zvýšené BT (Obrázek 2) (Bonnell et al., 2011).

Obrázek 2 Syndrom imunitní dysfunkce asociovaný s cirhózou (cirrhosis-associated immune dysfunction syndrome – CAIDS).



Upraveno podle (Bonnell et al., 2011).

1.3.2.1 Přirozená imunita

Pro pacienty s pokročilou jaterní cirhózou je typický značný útlum aktivity MMS, který je hlavním mechanismem obrany proti bakteriálním i jiným infekcím, které se šíří hematogenní cestou. V jaterním parenchymu je obsaženo asi 90 % tohoto ochranného systému (Ghassemi a Garcia-Tsao, 2007). Jeho hlavní součástí jsou právě Kupfferovy a endotelové buňky jaterních sinusoidů, které hrají klíčovou roli ve vychytávání bakterií. Důsledkem portosystémového shuntu je vyřazena větší část buněk MMS v sinusoidech (Ghassemi a Garcia-Tsao, 2007, Tandon a Garcia-Tsao, 2008). Uvažuje se i o přítomnosti vnitřního defektu buněk MMS, a to vzhledem ke zjištěnému poklesu fagocytární schopnosti monocytů, které jsou považovány za prekurzory Kupfferových buněk. Dalšími faktory, které mohou ovlivnit funkčnost MMS, jsou malnutrice nebo alkoholismus.

1.3.2.2 Porucha buněčné a humorální imunity

U jaterní cirhózy se vyskytuje útlum nespecifické humorální i buněčné imunity, čímž je snížena schopnost ničit patogenní mikroorganismy. Je snížena proliferace a aktivace T lymfocytů, snížen je i počet naivních pomocných (T_H , CD4+) a cytotoxických (T_C , CD8+) T buněk a CD27+ paměťových B buněk, NK (natural killer) buňky mají utlumenou cytotoxickou aktivitu (Tritto et al., 2011, Doi et al., 2012, Tian et al., 2013). Významnou roli při rozvoji infekcí hraje snížená mobilizace, snížená opsonizační a fagocytární schopnost neutrofilů (Tritto et al., 2011), dochází také k poklesu jejich absolutního počtu (Kusaba et al., 1998). Neutropenie, jako běžný důsledek hypersplenismu při jaterní cirhóze, je navíc zhoršována kratším přežíváním neutrofilů při urychlené apoptóze (Kusaba et al., 1998).

1.3.2.3 Komplement

Pacienti s jaterní cirhózou mají sníženou opsonizační a fagocytární kapacitu a tím je snížena i baktericidní schopnost buněk přirozené imunity. Při jaterní cirhóze byla prokázána signifikantně nižší koncentrace C3 a C4 složek i funkční aktivita komplementu jak v séru, tak v ascitu, což vede ke snížené baktericidní kapacitě (Runyon et al., 1985, Ono et al., 2004).

1.3.2.4 „Paralýza“ imunitního systému

U pacientů s jaterní cirhózou, s pokročilou dysfunkcí jater a ascitem byly popsány kvantitativní změny ve střevní mikroflóře – střevní bakteriální přerůstání i kvalitativní

změny – dysbióza. Bakteriální přerůstání, zvýšená střevní propustnost při PH zvyšuje u cirhotických pacientů BT spojenou s vyšší endotoxémií (Wiest et al., 2014) a může tak přispívat k rozvoji infekce obecně, především je pak hlavním predisponujícím faktorem SBP (Ramachandran a Balasubramanian, 2001). Za hlavní příčiny střevního bakteriálního přerůstání u cirhotiků je považována achylie, pokles sekrece IgA, snížená střevní motilita a malnutrice způsobená jaterní dysfunkcí případně alkoholismem.

Imunitní stav se u cirhotických pacientů v průběhu doby mění. Rozsah získané snížené imunity závisí na pokročilosti a etiologii jaterního onemocnění. S pokročilostí jaterního onemocnění se prohlubuje i imunitní dysfunkce (Tandon a Garcia-Tsao, 2008) a u alkoholového postižení jater můžeme očekávat výraznější dysfunkci imunitního systému (Duddempudi, 2012).

1.3.3 Toll-like receptory

Toll-like receptory (TLR) byly poprvé nalezeny a popsány u octomilky *Drosophila melanogaster* a teprve poté byly identifikovány u člověka. Představují klíčové receptory v přirozené imunitě k rozpoznávání širokého spektra mikrobiálních komponent, tzv. s patogeny asociované molekulární vzory (Pathogen-associated Molecular Patterns, PAMPs) a patří do skupiny receptorů tyto molekulární vzory rozpoznávající (Pattern Recognition Receptors, PRRs). Jedná se o skupinu bílkovinných receptorů na povrchu cytoplazmatických membrán (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 a TLR6) rozpoznávající zejména mikrobiální membránové komponenty jako jsou lipidy, lipoproteiny a proteiny, a o skupinu receptorů exprimovaných v intracelulárních membránách endoplasmatického retikula, lysozomů, endosomů, lysoendosomů (TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9), kde rozpoznávají mikrobiální nukleové kyseliny. TLR se vyskytují zejména u buněk imunitního systému (monocyty, makrofágy, dendritické buňky), ale např. i na buňkách střevního, ledvinového, plicního epitelu i na povrchu rohovky. Toll-like receptory jsou součástí obrany proti patogenům. Navázání cizorodé molekuly na Toll-like receptor spouští složitou signální kaskádu, na jejímž konci dochází zejména k produkci cytokinů a chemokinů, jež vyprovokují B-lymfocyty a T-lymfocyty k akci (Schroder a Schumann, 2005, Mencin et al., 2009, Kawai a Akira, 2010, Yamamoto a Takeda, 2010). U člověka je každý TLR specializován na určitou cizorodou molekulu (antigen) či skupinu cizorodých molekul

(Tabulka 5). Dosud bylo objeveno 10 Toll-like receptorů lidských a 12 myších. Pro správnou funkci TLR jsou důležité také specifické adaptorové proteiny (Seki a Brenner, 2008).

Tabulka 5 Toll-like receptory a jejich ligandy

PRR	Lokalizace	Ligand	Původ ligandu
TLR1	Cytoplasmatická membrána	Triacyl lipoprotein	Bakterie
TLR2	Cytoplasmatická membrána	Lipoprotein, lipoteichová kyselina, zymosan	Bakterie G-, G+, houby
TLR3	Endolysosom	Dvouvláknová RNA	Viry
TLR4	Cytoplasmatická membrána	Lipopolysacharid	Bakterie
TLR5	Cytoplasmatická membrána	Flagelin	Bakterie
TLR6	Cytoplasmatická membrána	Diacyl lipoprotein, lipoteichová kyselina	Bakterie, viry
TLR7	Endolysosom	Jednovláknová RNA	Viry
TLR8	Endolysosom	Jednovláknová RNA	Viry
TLR9	Endolysosom	demetylovaná sekvence CpG-DNA	Viry, bakterie, protozoa
TLR10	Endolysosom	Neznámý	Neznámý

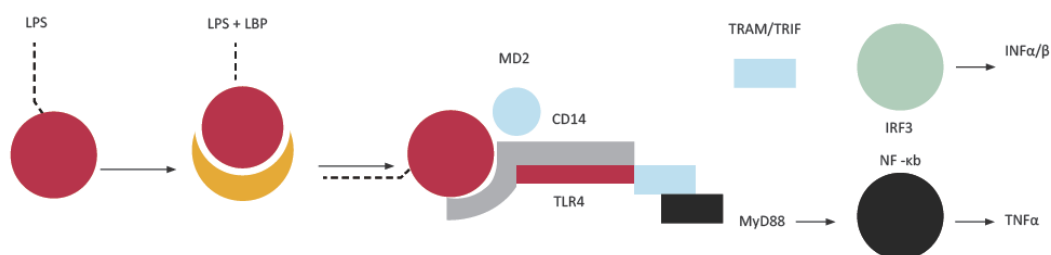
Upraveno podle (Seki a Brenner, 2008).

1.3.4 Toll-like receptor 4 signální dráha

V přirozené imunitě proti gramnegativním bakteriím hraje klíčovou roli TLR4 signální dráha. TLR4, člen rodiny TLR, je transmembránový receptor, který je u lidí a savců exprimován na Kupfferových buňkách, hepatocytech, hvězdicovitých buňkách, dendritických buňkách a NK buňkách (Akira et al., 2001). TLR4 reaguje na bakteriální LPS, složku vnější membrány gramnegativních bakterií, které ve zvýšené míře pronikají do portální krve následkem zvýšené střevní permeability (Crews et al., 2006). Aktivace Kupfferových buněk je vyvolána interakcí LPS s transportními proteiny a buněčnými receptory, které zahrnují LPS vázající protein (lipopolysaccharide binding protein, LBP), baktericidní/permeabilitu zvyšující protein (bactericidal/permeability increasing protein, BPI), endotoxinový receptor CD14 (cluster of differentiation) a TLR4 (toll-like receptor 4) (Wheeler et al., 2001). Důsledkem aktivace Kupfferových buněk je zvýšená produkce nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B), který aktivuje syntézu řady cytokinů, z nichž nejvýznamnější roli hraje tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α). LBP je rozpustný plazmatický protein, produkováný v hepatocytech, který váže a transportuje LPS. Tento

komplex (LPS-LBP) zvyšuje cytotoxický efekt LPS (Schumann, 1992), neboť je monocyty rozpoznán v řádově nižších koncentracích v porovnání s vazebnou afinitou volného LPS k CD14/TLR4, ale zároveň umožňuje reagovat organismu na probíhající infekci včas, kdy je snáze zvládnutelná. Cytotoxický efekt LPS může být snížen vazbou s BPI (Flegel et al., 1989), který je syntetizovaný polymorfonukleárními leukocyty. Tento protein soutěží s LBP o vazbu s LPS a blokuje tak vytvoření komplexu LBP/LPS. Předpokládá se, že vazba BPI/LPS rovněž umožňuje katabolismus endotoxinů (např. jejich transport na lipoproteiny) a jejich následné vyloučení z organismu. BPI je tedy důležitý pro ochranu organismu proti bakteriální infekci a neutralizaci LPS (Hubacek et al., 1997). Vazba endotoxinů na LBP a následná kompletace komplexu LBP/LPS se systémem receptorů TLR4/CD14 pak hraje důležitou roli v aktivaci buněk během probíhající infekce. Po navázání ligandu na TLR4 je signál dále veden přes MyD88 (myeloid differentiation factor)-dependentní dráhu nebo MyD88 independentní dráhu (= TRIF-dependentní dráhu). Následně jsou aktivovány transkripční faktory AP-1, NF- κ B a IRF3 a dochází k produkci prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18), protizánětlivých faktorů (IL-10) a interferonů typu I (Obrázek 3) (Opal a Esmon, 2003, Schroder a Schumann, 2005). U pacientů s pokročilejší jaterní cirhózou, při chronické stimulaci imunitního systému LPS, je TLR4 zvýšeně exprimován v porovnání s kontrolami (Stadlbauer et al., 2008).

Obrázek 3 Toll-like receptor 4 signální dráha



Upraveno podle (Schroder a Schumann, 2005).

1.3.5 Úloha TNF- α v patogenezi komplikací jaterní cirhózy

Již z 90. let 20. století je známo, že pacienti s jaterní cirhózou mají vysoké hladiny TNF- α v důsledku PH, která zvyšuje propustnost střevní stěny pro endotoxin/LPS, a tím spouští výše popsanou TLR4 signální dráhu (Chu et al., 1997). Hladina endotoxémie koreluje také s pokročilostí jaterní dysfunkce a stupněm PH (Lin et al., 1995). Nadprodukce

TNF- α a dalších prozánětlivých cytokinů se podílí jak na rozvoji ZBI a jiných systémových komplikací, tak na zvyšování zánětlivé reakce v játrech a tím na progresi jaterní cirhózy. Excesivní nadprodukce TNF- α se podílí též na patogenezi hyperkinetické cirkulace (Vallance a Moncada, 1991), hepatorenálního (Uchihara et al., 1992) a hepatopulmonálního syndromu (Rolla, 2003). V rozvoji hyperkinetické cirkulace a hepatopulmonálního syndromu se předpokládá nadměrná endogenní produkce NO způsobující vasodilataci, což je vyvoláno dvěma cestami: makrofágy produkovaný NO, kdy makrofágy jsou stimulovány zvýšenou koncentrací TNF- α v důsledku zvýšené endotoxémie u cirhotických pacientů (Uchihara et al., 1992, Beshay et al., 2001), a cévními endotelovými buňkami produkovaný NO vyvolaný zvýšenou koncentrací ET-1 u cirhotických pacientů, který působí přes endotelový receptor-B (Uchihara et al., 1992, Luo et al., 2003). Podání pentoxifylinu, nescifického inhibitoru fosfodiesterázy, který blokuje syntézu TNF- α a tím i produkci NO, vede u cirhotických myši k ochraně před rozvojem hyperkinetické cirkulace a hepatopulmonálního syndromu (Sztrymf et al., 2005).

U hepatorenálního syndromu u pacientů s jaterní cirhózou a PH je zvýšeně produkován ET-1 (Kawamura et al., 1995), jehož vasokonstrikční účinek je zvyšován TNF- α (Wen et al., 2003).

V monocytech zdravých jedinců existuje několik mechanismů, které brání excesivní nadprodukci TNF- α při stimulaci TLR4 navázáním LPS. Navázáním LPS na TLR4 monocytů se současně aktivuje IL-1 receptor asociovaná kináza (IRAK) a dochází k produkci IRAK-M (indukovatelný supresor excesivního zánětu), dále se aktivuje dráha fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K/Akt) označovaná jako konstitutivní supresor excesivního zánětu. Tazi et al. prokázali, že v monocytech pacientů s pokročilou jaterní cirhózou jsou obě dráhy omezující excesivní nadprodukci TNF- α suprimovány (Tazi et al., 2006). 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 déletrvající endotoxémie, vede k exhausci imunitního systému a ke snížení opsonizační a fagocytární kapacity neutrofilů (Tritto et al., 2011, Jalan et al., 2014). Tuto skutečnost potvrzuje i práce autorů Ono et al., kteří zjistili necitlivost neutrofilů k TNF- α a LPS po déletrvající stimulaci (Ono et al., 2004). Tento stav vedl k dysfunkci opsonizační a fagocytární schopnosti

neutrofilů. Stadlbauer et al. demonstrovali úpravu fagocytární schopnosti neutrofilů u pacientů s ALD poté, co došlo ke snížení endotoxémie a produkce TNF- α podáním probiotik (Stadlbauer et al., 2008). Dalším faktorem ovlivňujícím fagocytární aktivitu neutrofilů je hyperamonémie (Shawcross et al., 2008). U pacientů s pokročilou jaterní cirhózou je v důsledku chronické stimulace imunitního systému endotoxinem zvýšeně exprimován TLR4 v porovnání s kontrolami (Stadlbauer et al., 2008).

Dle Teixeira et al. mohou na druhou stranu vysoké koncentrace TNF- α působit i protektivně na lokální úrovni v játrech ve smyslu snižování rizika vzniku HCC v cirhóze (Teixeira et al., 2013).

1.4 Genetické faktory v progresi komplikací jaterní cirhózy

1.4.1 Genetická predispozice k bakteriálním infekcím

Publikované studie poukazují na souvislost mezi genetickými variantami v genech TLR4 signální dráhy a rozvojem ZBI (Arnalich et al., 2002, Gibot et al., 2002, Appenrodt et al., 2010, Guarner-Argente et al., 2010). Studie však byly provedeny pouze na limitovaném počtu pacientů bez jaterní cirhózy a výsledky nebyly dále validovány. Klinický dopad funkčních variant genů vrozené imunity může být u pacientů s jaterní cirhózou více vyjádřen z důvodu již preexistující imunitní dysfunkce a omezením kompenzatorních mechanismů.

Varianty v genech pro TLR4, ale i v genech pro adaptorové proteiny, mohou způsobit defektní či abnormální aktivaci genů důležitých v imunitní odpovědi. V genech pro LBP, BPI, CD14, TLR4, TNF- α , IL-1 β , IL-1ra byly popsány polymorfismy, které ovlivní *in vitro* expresi genu nebo funkci výsledného proteinu.

V genu pro LBP byla popsána varianta Pro436/Leu, která odpovídá záměně *LBP* c.+1306C/T. SNP *BPI* c.+645A/G způsobí záměnu aminokyseliny Glu216/Lys. Tyto polymorfismy ovlivňují vazbu proteinů na LPS a jejich význam pro funkci byl popsán u septických pacientů (Hubáček et al., 1997). Plasmatická koncentrace CD14 je ovlivňována promotorovým polymorfismem *CD14* c.–159C/T (rs2569190) (Baldini et al., 1999), který ovlivňuje expresi proteinu (Lin et al., 2009) a riziko úmrtí u pacientů se sepsí (Gibot et al., 2002). Varianta TLR4 receptoru Thr399/Ile, která odpovídá záměně nukleotidu *TLR4* c.+1196C/T (rs4986791), mění vazebné místo receptoru pro ligand (Rallabhandi et al.,

2006) a ve španělské retrospektivní studii s limitovaným počtem pacientů zvyšovala riziko infekce u cirhotiků (Guarner-Argente et al., 2010). Vyřazení genu pro CD14 receptor nebo TLR4 chrání knockoutované myši před jaterní lézí vyvolanou alkoholem (Uesugi et al., 2001, Yin et al., 2001). V genech pro TNF- α a IL-1 β byly popsány polymorfismy ovlivňující jejich expresi *in vitro*. SNP v pozici c.-863 (rs1800630) a c.-238 (rs361525) promotoru *TNFA* nezávisle ovlivňují transkripci tohoto genu (Kaluza et al., 2000, Udalova et al., 2000, Simpson et al., 2012). Genový cluster interleukinu 1 na chromosomu 2 obsahuje geny *IL-1B* a *IL1-RA*, které kódují prozánětlivý IL-1 β a protizánětlivý receptorový antagonistu IL-1ra (Dinarello, 1996). Varianta c.-31T (rs1143627) v promotoru *IL-1B* zvyšuje transkripci genu (El-Omar et al., 2000). Druhý intron *IL1-RA* obsahuje variabilní počet tandemových repetitiv (VNTR) délky 86-bp. Alela 2 (*IL-1RA*2*) zvyšuje koncentraci IL-1 β *in vitro* (Santtila et al., 1998) a zvyšuje mortalitu u septických pacientů (Arnalich et al., 2002).

1.4.2 Genetické faktory v léčbě chronické hepatitidy C

Chronická HCV infekce patří v České republice k jedné z nejčastějších příčin jaterní cirhózy po ALD a NASH. Před érou DAAs, která inhibují přímo virové enzymy klíčové pro replikaci viru, byla léčba pokročilých cirhotiků založena na terapii PEG-IFN- α v kombinaci s RBV, využívalo se jejich nespecifického imunomodulačního efektu na eliminaci viru.

Úspěšnost léčby je definována jako dosažení SVR, tedy negativní HCV RNA 12 nebo 24 týdnů po léčbě. Úspěšnost léčby byla při použití dvojkombinace PEG-IFN- α a RBV nízká. Proto byla snaha o identifikaci faktorů viru HCV a hostitele, které by dokázaly předpovědět úspěšnost podávané léčby ještě před jejím zahájením. Úspěšnost léčby závisela na genotypu viru (vyšší u genotypu 2 a 3), sérové koncentraci HCV RNA před léčbou, byla vyšší u pacientů pod 40 let, byla též úměrná stupni jaterní fibrózy v jaterní biopsii, léčba byla účinnější u žen (Poynard et al., 1998). Nejhůře léčitelnou skupinou byli pokročilí cirhotici s genotypem 1, ti dosahovali SVR jen asi v 10 % případů (Poynard et al., 2009).

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. Funkce genu *IL28B* není dosud plně objasněna. Jeho asociace s výsledkem léčby HCV je způsobena skutečností, že je v silné genové vazbě s později popsaným genem pro interferon lambda 4 (*IFNL4*), který kóduje interferon lambda 4. V roce 2013 Prokunina-Olsson et al. popsala variantu v genu *IFNL4* ss469415590 (TT/ Δ G),

kteřá je lokalizovaná v blízkosti genu *IL28B* (367bp směrem k 5' konci) a téměř dokonale koreluje s variantou *IL28B* rs12979860 v evropské a asijské populaci. *IFNL4* ss469415590 Δ G způsobuje posun otevřeného čtecího rámce a namísto tvorby předčasného stopkodonu při nosičství genotypu TT, umožňuje expresi proteinu IFNL4 (Prokunina-Olsson et al., 2013). Nosiči této varianty tak mají vyšší bazální hladiny IFN a při podání PEG-IFN- α již nejsou k této látce vnímaví a nedochází tak k eliminaci virus HCV.

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). Ti měli signifikantně nižší bazální aktivitu ISG ve srovnání s nonrespondenty (Chen et al., 2005, Asselah et al., 2008, Hou et al., 2014). Holandští autoři byli schopni na podkladě stanovení aktivity 18 vybraných ISG v krvi predikovat dosažení SVR s 94 % pravděpodobností (Hou et al., 2014). Záleží ale na typu buněk, ve kterých se bazální exprese ISG stanovuje. Chen et al. popsali u nonrespondentů zvýšenou expresi ISG v hepatocytech, ale naopak sníženou v jaterních makrofázích oproti respondentům k léčbě PEG-IFN- α s RBV (Chen et al., 2010).

Z klinické praxe a výše uvedených prací lze usuzovat, že s dobou trvání chronické HCV infekce dochází u nonrespondentů k upregulaci ISG a tito nemocní pak nejsou schopni po zahájení léčby adekvátně reagovat na stimulaci PEG-IFN- α (Sarasin-Filipowicz et al., 2008).

Stanovení exprese ISG se provádí v hepatocytech nebo PBMC. U pacientů s pokročilou jaterní cirhózou je získávání hepatocytů při jaterní biopsii vysoce rizikové, exprese se proto stanovuje v buňkách z periferní krve, které lze odebrat opakovaně. Zatímco výsledky rozdílné upregulace ISG u respondentů a nonrespondentů na léčbu PEG-IFN- α s RBV je v hepatocytech napříč pracemi konzistentní, výsledky upregulace v PBMC zůstávají u těchto nemocných kontroverzní (Taylor et al., 2008, Hou et al., 2014).

1.4.3 Genetické faktory progresu jaterní fibrózy

Průběh jaterních onemocnění je ovlivňován tzv. modifikujícími geny, které se spolu s jinými příčinami podílejí na vzniku neočekávaného fenotypu dané nemoci. Tyto geny mohou proces rozvoje onemocnění nebo jeho projevů zpomalovat (supresory) nebo urychlovat (enhancery), ale samostatně obvykle patogenně nepůsobí. Doposud bylo na základě celogenomových asociačních studií popsáno několik kandidátních genů, jejichž varianty jsou asociovány s rizikem vzniku steatózy jater, NASH, vzniku fibrózy a progresu do cirhózy (Eslam et al., 2018), nebo se naopak popisuje jejich protektivní účinek (Abul-Husn et al., 2018).

Jedná se především o geny s vlivem na metabolismus tuků v játrech. Řadíme sem patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (*PNPLA3*) a transmembránový protein 6 superfamily 2 (*TM6SF2*). Dalšími zkoumanými geny jsou *GCKR*, *HSD17B13* a další.

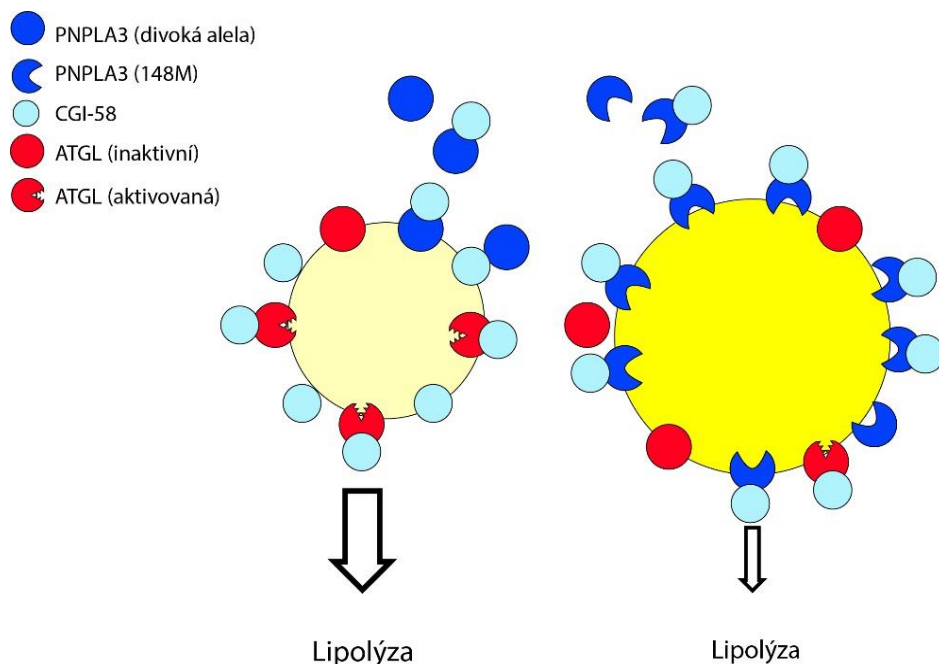
1.4.3.1 *PNPLA3*

V posledních 15 letech je nejvíce studovaným genem *PNPLA3* (patatin like phospholipase domain containing 3), který je umístěn na dlouhém raménku chromozomu 22. Jedná se o gen kódující fosfolipázu, jejíž funkcí je nejspíše směna pro buňku cennějších nenasycených mastných kyselin za nasycené. Gen je exprimovaný především v hepatocytech a adipocytech, protein *PNPLA3* se intracelulárně nachází na membránách tukových kapének.

Varianta *PNPLA3* (rs738409 C>G, p.I148M) je transverzní mutace nukleotidu cytosinu za guanin na pozici 148, která způsobuje záměnu izoleucinu na methionin (Anstee et al., 2016).

Mechanismus účinku variantního proteinu *PNPLA3* se vysvětluje tím, že vychytává a snižuje dostupnost kofaktoru CGI-58 (comparative gene identification-58) potřebného pro funkci hlavní fosfolipázy ATGL (adipose triglyceride lipase, = *PNPLA2*). Dochází také k jeho akumulaci na povrchu tukových kapének a ke snížení místa pro působení ATGL. Následně snížená aktivita ATGL vede ke snížení hydrolýzy triglyceridů (lipolýzy) a k jejich akumulaci v hepatocytech (Obrázek 4) (Wang et al., 2019).

Obrázek 4 Mechanismus účinku variantního proteinu PNPLA3 na membráně tukových kapének v hepatocytech



Upraveno podle (Wang et al., 2019).

V roce 2008 byla poprvé popsána asociace mezi variantní alelou G v genu *PNPLA3* rs738409 a přítomností steatózy a zánětu jater (Romeo et al., 2008). Autoři provedli celogenomovou asociační studii, ve které hledali vztah mezi 9229 kódujícími SNPs a obsahem tuku v játrech, hodnoceným pomocí MR spektroskopie. Obsah tuku v jaterní tkáni byl více než dvakrát vyšší u homozygotů *PNPLA3* rs738409 [G] než u jedinců, u kterých varianta nebyla prokázána. V následujících letech byla asociace mezi výše zmíněnou variantou a vyšším rizikem rozvoje steatózy, NASH a cirhózy potvrzena mnoha studiemi i metaanalýzami (Sookoian et al., 2009, Rotman et al., 2010, Trepo et al., 2016). Zároveň se prokázalo, že u nosičů variantní alely je NAFLD nezávislá na přítomnosti diabetu mellitu, inzulinové rezistenci nebo obezity (Romeo et al., 2008, Sookoian et al., 2009, Lallukka et al., 2013). Vliv byl prokázán i na pokročilost jaterního onemocnění u konzumentů alkoholu (Tian et al., 2010, Stickel et al., 2011) nebo u pacientů s chronickou hepatitidou C (Cai et al., 2011, Muller et al., 2011). U chronické hepatitidy B je asociace s *PNPLA3* pouze s rozvojem steatózy a zánětu, zatímco k urychlení fibrózy pravděpodobně nedochází (Brouwer et al., 2015, Zampino et al., 2015). Práce autorů Stender et al. popisuje význam počtu alel G v genu *PNPLA3* na obsah tuku v játrech a sérovou aktivitu

ALT, zároveň popisuje synergický efekt genových variant *PNPLA3* a *GCKR* na oba zmíněné parametry (Stender et al., 2017).

Nosičství variantní alely G je spojeno také se zvýšeným rizikem rozvoje HCC především u pacientů s NASH (Burza et al., 2012, Liu et al., 2014) a ALD (Falleti et al., 2011, Friedrich et al., 2014, Trepo et al., 2014). Na podkladě metaanalýzy, do které bylo zahrnuto celkem 24 studií s 9 915 pacienty, byla variantní alela spojena s vyšším rizikem progresu jaterní fibrózy u všech etiologií a 9 studií (n = 2937) prokázalo zvýšené riziko rozvoje HCC u nemocných s cirhózou na podkladě NASH a ALD, nikoli jiné etiologie (Singal et al., 2014).

1.4.3.2 *TM6SF2*

Dalším kandidátním genem v rozvoji NAFLD je gen *TM6SF2* (transmembrane 6 superfamily 2) umístěný na chromozomu 19. Jeho exprese probíhá převážně v jaterních a střevních buňkách a jeho protein je umístěný v endoplasmatickém retikulu a v menší míře v Golgiho aparátu. Správná funkce genu je důležitá pro sekreci VLDL částic z hepatocytů (Kawaguchi et al., 2012). Nosičství variantní alely snižuje sekreci triacylglyceridů ve VLDL částicích, čímž dochází k akumulaci triglyceridů v hepatocytech a snížené sekreci VLDL částic z hepatocytů (Holmen et al., 2014, Surakka et al., 2015). Je tak usnadněný rozvoj jaterní steatózy, progresu do NASH, fibrózy až cirhózy (Kozlitina et al., 2014, Liu et al., 2014) a rozvoj HCC (Yang et al., 2019). Změny se týkají také složení lipidů v plazmě; díky sníženým hladinám VLDL částic mají nosiči variantní alely nižší riziko kardiovaskulárních chorob – rozvoje aterosklerózy či infarktu myokardu (Dongiovanni et al., 2015). Vliv této varianty, i když nikoli tak silný jako u genu *PNPLA3*, byl popsán také u ALD, s vlivem na progresi jaterního onemocnění (Buch et al., 2015, Mancina et al., 2019) a rozvoj HCC (Yang et al., 2019).

1.4.3.3 *GCKR*

GCKR (glukokinase regulator gene) je gen kódující protein regulující glukokinázu, jejíž funkcí je fosforylace molekul glukózy za vzniku glukóza-6-fosfátu. Hodnoty glykémie jsou regulovány pomocí inhibice glukokinázy v hepatocytech a buňkách Langerhansových ostrůvků. U nosičů variantních alel rs780094 nebo rs126036 v genu pro *GCKR* dochází ke snížení inhibičního působení *GCKR* na glukokinázu, což vede ke zvýšení její aktivity a ke zvýšenému přesunu glukózy do hepatocytů. Tím je ovlivněna lipogeneze a dochází ke

zvýšenému obsahu triglyceridů v hepatocytech (Anstee et al., 2016) a rozvoji NAFLD (Speliotes et al., 2011, Santoro et al., 2012). Popsán je i vliv této varianty na rozvoj fibrózy u pacientů s NAFLD (Petta et al., 2014).

1.4.3.4 HSD17B13

HSD17B13 je gen lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu 4, který kóduje hydroxysteroid 17- β dehydrogenázu 13. Jeho exprese probíhá výhradně v játrech, specificky v hepatocytech a protein je lokalizovaný na povrchu tukových kapének. Jeho přesná funkce není dosud zcela objasněna. Variantní alela rs72613567 vede ke ztrátě funkce proteinu, a tím ke snížení rizika rozvoje NASH a s ní asociované cirhózy jater, snížené riziko bylo popsáno i u ALD (Abul-Husn et al., 2018). Nosičství tohoto polymorfismu je tedy protektivním faktorem vzniku a progresu jaterního onemocnění.

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 inhibitorem 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

3.1 Izolace DNA

DNA byla ve všech projektech izolována z periferní krve pacientů pomocí Qiagen QIAamp kitu (Qiagen, Hilden, Germany) dle protokolu doporučeného výrobcem.

3.2 Genotypizace SNP *PNPLA3* rs738409

Genotypizace SNP *PNPLA3* rs738409 c.444C>G byla provedena pomocí TaqMan SNP genotyping eseje 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).

3.3 Genotypizace SNP *IL28B* rs12979860

SNP *IL28B* rs12979860 C>T byl genotypován pomocí PCR a metody RFLP, jak bylo dříve popsáno Fabrisem et al. (Fabris et al., 2011), za použití primerů 5'-GCTTATCGCATACGGCTAGG-3'(Forward) a 5'-AGGCTCAGGGTCAATCACAG-3' (Reverse). PCR produkt o délce 242 bp byl následně štěpen enzymem *Bsh1236I*. Délka vzniklých restričních fragmentů byla stanovena pomocí agarové elektroforézy.

3.4 Genotypizace alelických variant *TLR4* signální dráhy

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 délky restričních fragmentů (RFLP), jak je popsáno v dříve publikované práci Petráška et al. (Petrasek et al., 2009). Použité primery a podmínky polymerázové řetězové reakce (PCR) jsou uvedeny v Tabulka 6. Z důvodu minimalizace chyby byly na destičkách ponechány prázdné jamky a výsledný genotyp byl určen dvěma nezávislými pracovníky.

Tabulka 6 Genotypované lokusy v genech *CD14*, *TLR4*, *TNFA*, *IL1B* a *IL1RN*

Varianta Reference SNP ^a	Přední (forward) primer Zadní (reverse) primer	T _m , °C Čas [s]	RFLP	
			Restrikční enzym	Délka fragmentů RFLP (bp)
<i>CD14</i> c.-159C/T rs2569190	5'-TTGGTGCCAACAGATGAGGTTAC-3' 5'-TTCTTTCTACACAGCGGCACCC-3'	60°C 30 s	<i>HaeIII</i>	204,201,156
<i>TLR4</i> c.+1196C/T rs4986791	5'-GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTGGGAGAA-3' 5'-ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT-3'	55°C 40 s	<i>HinfI</i>	378, 29
<i>TNFA</i> c.-238G/A rs361525	5'-GCCCTCCCAGTTCTAGTTC-3' 5'-CTCACACTCCCATCCTCCCGGATC-3'	62°C 30 s	<i>BamHI</i>	185, 26
<i>TNFA</i> c.-863C/A rs1800630	5'- GGCTCTGAGGAATGGGTTAC-3' 5'- CTACATGGCCCTGTCTTCGTTACG-3'	63°C 30s	<i>TaqI</i>	125, 104, 21
<i>IL1B</i> c.-31C/T rs1143627	5'-CCCTTCCATGAACCAGAGAA-3' 5'-GCTGAAGAGAATCCCAGAGC-3'	60°C 30 s	<i>AluI</i>	97, 87, 54
<i>IL1RN</i> VNTR 156109 ^b	5'-CCCCTCAGCAACTCC-3' 5'-GGTCAGAAGGGCAGAGA-3'	64°C 30 s	N.A.	2 repetic 270 3 repetic 356 4 repetic 442 5 repetic 528 6 repetic 614

aSNP database of genetic variation, www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP, bSTS database of unified sequence tagged sites, www.ncbi.nih.gov/genome/STS, T_m, melting temperature (teplota tání), VNTR, variable number of tandem repeats (polymorfismus v počtu tandemových repetič).

3.5 Stanovení sérové koncentrace TNF-α

Sérové koncentrace TNF-α byly měřeny z krevních vzorků odebraných pacientům bezprostředně před transplantací jater, byly tedy vyloučeny infekce. Sérum bylo ihned po separaci zmrazeno a skladováno po celou dobu při teplotě -80 °C. Koncentrace TNF-α byla stanovena pomocí Quantikine HS ELISA human TNF-α immunoeseje (R&D Systems, Abingdon, UK). Všechny standardy, kontroly i vzorky byly analyzovány v duplikátech, a byly vypočteny průměrné hodnoty. Duplikáty s koeficientem variability větším než 50 % byly vyřazeny z hodnocení.

3.6 Vyšetření HCV RNA a genotypizace HCV

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 (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ). Genotypizace HCV byla provedena pomocí eseje LiPA Versant® HCV Genotype 2.0 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY).

3.7 Izolace PBMC

Periferní žilní krev byla odebrána do devítimililitrových 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.

3.8 Izolace mRNA

RNA byla extrahována ze získaných PBMC za pomoci RNeasy Mini Kitu (Quiagen, Valencia, CA) dle protokolu výrobce. Čistota a koncentrace RNA byly zhodnoceny spektrofotometricky. Získaná mRNA byla reverzně transkribována do ss-cDNA za pomoci RevertAid Premium First Strand cDNA synthesis kitu (Thermo Scientific, Waltham, MA).

3.9 Analýza genových expresí *CXCL9*, *IFI16*, *IFI27*, *IFNG*, *IFNLR1*, *ISG15* a *USP18*

K provedení real-time PCR byly použity mikrofluidní karty TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Karty byly navrženy pomocí Custom TaqMan array konfigurátoru. Real-time PCR byla provedena na přístroji 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ve shodě s doporučením výrobce, za následujících podmínek: 50 °C 2 minuty a 95 °C 20 sekund v iniciálním cyklu a 95 °C 1 sekundu a 60 °C 20 sekund pro následujících 40 cyklů. Všechny vzorky byly analyzovány v kvadruplikátech, cDNA byla připravena ze 400 ng celkové RNA, pro každou esej byl použit TaqMan Fast Advanced Master Mix (4444963, Applied Biosystems). Získaná data byla analyzována SDS 2.2

softwarem. Každá 384jamková destička obsahovala sadu kontrolních reakcí kvantifikujících expresi tří housekeeping genů, *HPRT1*, *ACTB* a *GAPDH*. 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.

3.10 ELF test a sérové markery jaterní fibrózy

Odběr venózní krve byl proveden ráno nalačno, z periferní žíly do devítimililitrových zkumavek s EDTA k separaci plazmy a osmimililitrových zkumavek s aktivátorem srážení k separaci séra. Alikvóty plazmy i séra byly připraveny vždy do 60 minut od odběru krve, uchovány v CryoKing zkumavkách a skladovány až do zpracování při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Koncentrace HA, PIIINP a tkáňového inhibitoru matrixové metaloproteinázy 1 (TIMP-1) byly měřeny pomocí ADVIA Centaur® HA eseje, ADVIA Centaur® PIIINP eseje a TIMP-1 eseje (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany). Ke kalibraci byl použit kalibrátor ADVIA Centaur ELF dodaný výrobcem, opakovatelnost měření byla stanovena dle doporučení výrobce a byla dána jako $< 5,6\%$ pro HA, $< 4,2\%$ pro PIIINP a $< 3,3\%$ TIMP-1. Rozmezí měření byla následující: 1,6–1 000 ng/ml pro HA, 0,5–150 ng/ml pro PIIINP 3,5–1 300 ng/ml pro TIMP-1. Limity detekce byly 1,6, 0,5 a 3,5 ng/ml pro HA, PIIINP a TIMP-1. Všechna měření byla provedena najednou a jedním laborantem za použití analyzátoru Centaur CP (Siemens Healthineers). ELF skóre bylo vypočteno podle vzorce (Centaur CP formula) = $0,846 \times \ln(\text{HA}) + 0,735 \times \ln(\text{PIIINP}) + 0,391 \times \ln(\text{TIMP-1}) + 2,494$.

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 za použití esejí č. HS600B, DVC00, DRA00B, DOST00 a HSTA00E (R&D Systems, Minneapolis, MN). Absorbance byla měřena na přístroji Synergy™ 2 Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT).

3.11 Měření HVPG

Měření HVPG bylo provedeno cestou katetrizace jaterních žil transjugulárně za pomoci 5F multifunkčního angiografického katetru „open-end zero-side holes“ (Cordis, Santa Clara, CA), který byl zavedený přes 6F sheath (Super Arrow-Flex Percutaneous Sheath Introducer Set, Arrow International brand of Teleflex, Wayne, PA). Pozice katetru v zaklínění byla ověřena skiaskopicky po aplikaci jodové kontrastní látky do pravé a střední jaterní žíly. Tlak byl změřen pětikrát za účelem adekvátní reprodukovatelnosti výsledků a byla použita průměrná hodnota z těchto měření. HVPG byl vypočítán z rozdílu tlaku v zaklínění a tlaku změřeného ve volné jaterní žíle. Radiolog, který vyšetření prováděl, nebyl obeznámen s hodnotami LS před měřením HVPG.

3.12 Měření tuhosti jater metodou SWE

LS 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) dle doporučení výrobce. Vyšetření prováděli tři vybraní zkušení sonografisté, nejdéle 7 dní před nebo po měření HVPG. Vyšetřující neznal hodnoty HVPG, pokud toto vyšetření bylo provedeno dříve. Všechna měření byla provedena v pravém laloku jater přes mezižebří, u pacienta v poloze vleže na zádech, s pravou horní končetinou v maximální abdukci.

Měření bylo provedeno v oblasti (boxu) o velikosti 3,5 x 2,5 cm umístěným více než 2 cm pod jaterním pouzdrem, mimo velké cévy, při zadržení dechu. Po dosažení stabilního a homogenního elastogramu uvnitř boxu byl zaměřen tzv. region of interest (ROI) pomocí Q-boxu a umístěn do nejhomogennějšího místa, následně byl změřen a zaznamenán průměr hodnoty LS v ROI. Průměr Q-boxu byl stanoven na >15 mm. U všech pacientů byly zaznamenány tři elastogramy ze tří různých míst jater a k dalším výpočtům byl použit průměr z těchto měření.

3.13 Neinvazivní prediktory portální hypertenze

MELD skóre (Model for End-stage Liver Disease) je kompozitní prediktor krátkodobého přežití pacientů s jaterní cirhózou (Kamath et al., 2007) vypočtený podle

vzorci zahrnujícího sérový bilirubin, kreatinin a hodnotu protrombinového času vyjádřenou jako INR (international normalized ratio):

$$\text{MELD} = 9,6 \times \ln(\text{kreatinin, mg/dl}) + 3,8 \times \ln(\text{bilirubin, mg/dl}) + 11,2 \times \ln(\text{INR}) + 6,4.$$

LSPS (liver spleen platelets score) je rovněž kompozitní prediktor kombinující hodnotu LS, počet destiček a průměr sleziny (Berzigotti et al., 2013), vypočtený podle vzorce: $[\text{LS (kPa)} \times \text{průměr sleziny (cm)}] / \text{počet destiček (} \times 10^9 / \text{l)}$.

3.14 Hodnocení collagen proportionate area (CPA)

Z každého explantátu jater 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 μm silné řezy, které byly obarveny technikou Picro-Sirius Red (PSR) k vizualizaci kolagenu. Zhodnocení CPA bylo provedeno histomorfometricky za pomoci 3DHistech Panoramic Desk II DW digitálního skeneru (3DHistech Kft., Budapest, Hungary) a morfometrického programu (Nikon NIS-Elements AR 3.2 Nikon, Tokyo, Japan). Celé řezy byly skenovány při šedesátinásobném zvětšení. Po určení celkové plochy tkáně byla stanovena plocha obarvená PSR, odpovídající kolagenu, pomocí Red, Green a Blue (RGB) thresholdingu. CPA byla následně vyjádřena jako poměr kolagenní plochy nabarvené PSR k celkové ploše tkáně na řezu.

3.15 Poměr hydroxyprolinu k celkovým aminokyselinám (HP/AA ratio)

Kolorimetrická hydroxyprolinová esej detekující 3-hydroxy, 4-hydroxy a 5-hydroxyprolinové zbytky byla provedena podle dříve publikované práce Lunové et al. (Lunova et al., 2014). Přibližně 1 g jaterní tkáně byl zbaven parafínu a mechanicky homogenizován na prášek. Padesát mg získaného prášku bylo následně hydrolyzováno v 6 N HCl při 110 °C 18 hodin, následně byla provedena filtrace k odstranění nečistot a 50 μl z každého vzorku bylo odpařeno rychlostní vakuovou centrifugací. Pelety i standardy (trans-4-hydroxy-L-prolin, Sigma) byly rozpuštěny v 50 μl destilované vody, smíchány s 56 mM chloramin T trihydrátem (Sigma, Saint Louis, MO) v acetátovocitrátovém pufru (pH = 6,5) a inkubovány 25 min. při pokojové teplotě. Poté byl přidán Ehrlichův roztok (Sigma) tak, aby vznikl požadovaný chromofor při 30minutové inkubaci při teplotě 65 °C.

Absorbance byla změřena při vlnové délce 570 nm přístrojem Synergy™ 2 Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT).

Ke stanovení celkového obsahu aminokyselin ve vzorcích jaterní tkáně byla použita Ninhydrinová reakce za dodržení pokynů výrobce. Padesátimikrolitrové alikvóty přefiltrovaných a hydrolyzovaných vzorků jaterní tkáně byly vysušeny vakuovou centrifugací a poté rozpuštěny v destilované vodě. Vzorky nebo 40–1400 nM aminokyselin (AA-S-18, Sigma) byly smíchány s Ninhydrinovým roztokem (Sigma) v poměru 2:1 a inkubovány po dobu 10 min při 100 °C. Poté byly vzorky i standardy přeneseny do pokojové teploty a smíchány s 95% ethanolem (Sigma) v poměru 3:5. Poté byla změřena absorbance při vlnové délce 570 nm pomocí Synergy™ 2 Multi-Detection Microplate Reader (BioTek).

3.16 Statistická analýza

Statistická analýza jednotlivých projektů byla provedena pomocí programů SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA), SPSS Statistics 13.0 (IBM Corp., SPSS Statistics | IBM), JMP verze 9.0.0 a 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) a R programming language v. 3.2.0 (www.r-project.org).

Všechna provedená statistická hodnocení byla dvoustranná s hodnotou $p < 0,05$ považovanou jako statisticky signifikantní.

Výsledky ve všech publikacích jsou prezentovány jako mediány a rozsahy hodnot nebo průměry se směrodatnými odchylkami. Studentův t-test, Mann-Whitneyho test, ANOVA a Kruskal Wallisův test jsou použity pro srovnání mediánů kvantitativních dat, chí-kvadrát test a Fischerův exaktní test pro porovnání četností kvalitativních dat. Ke zhodnocení normálního rozložení dat byl použit Shapiro-Wilkův test.

V alelické asociační studii (Příloha 1), vzhledem k testování několika statistických hypotéz, jsme použili v identifikační kohortě Bonferroniho korekci, rozložení frekvence genotypů bylo testováno v souladu s Hardy-Weinbergovým ekvilibriem.

Coxova regresní analýza byla použita k výpočtu poměru rizik (HR, hazard ratio) a 95% konfidenčního intervalu (CI), rizikové faktory byly stanoveny pomocí multivariátní logistické regresní analýzy, Waldova statistika byla použita v regresním modelu k hodnocení příspěvku jednotlivých proměnných na riziko vzniku ZBI. Kaplan-Meierova analýza a log-rank test byly použity k hodnocení přežití jednotlivých skupin pacientů.

V práci zaměřené na PH (Příloha 5) byl použit Spearmanův test ke zhodnocení korelací mezi kontinuálními proměnnými. Diagnostická přesnost každého z neinvazivních parametrů byla stanovena pomocí analýzy ROC (receiver operating characteristic) křivek. Optimální cut-off hodnoty byly vypočteny za pomoci Youdenova indexu. Schopnost testovaných neinvazivních parametrů predikovat různé stupně PH byly stanoveny pomocí výpočtu poměru správně klasifikovaných pacientů, spolu se senzitivitou, specificitou, pozitivní prediktivní hodnotou (PPV), negativní prediktivní hodnotou a poměrem věrohodnosti (likelihood ratio, LR).

Ve studii o ISG (Příloha 3) byla ke stanovení signifikantních prediktorů dosažení SVR použita metoda logistické regrese.

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)

Úvod

Závažné bakteriální infekce představují druhou nejčastější příčinu úmrtí u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou zařazených na WL k LT. V přirozené imunitě hraje klíčovou roli TLR4 signální dráha zodpovědná za reakci organismu proti bakteriální infekci.

Cílem naší práce bylo zjistit úlohu variant v genech TLR4 signální dráhy na rozvoj ZBI u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou zařazených na WL k LT.

Metodika

V pilotním českém a validačním nizozemském souboru jsme retrospektivně zhodnotili výskyt ZBI vyžadujících hospitalizaci a i. v. antibiotickou terapii u kandidátů LT.

Český soubor zahrnoval celkem 336 a nizozemský 332 dospělých pacientů s pokročilou jaterní cirhózou klasifikace Child-Pugh B a C zařazených na WL k LT v letech 1995 až 2010 v Institutu klinické a experimentální medicíny a v letech 1995 až 2011 v Erasmus MC-University Medical Centre, Rotterdam, Nizozemsko.

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.

Výsledky

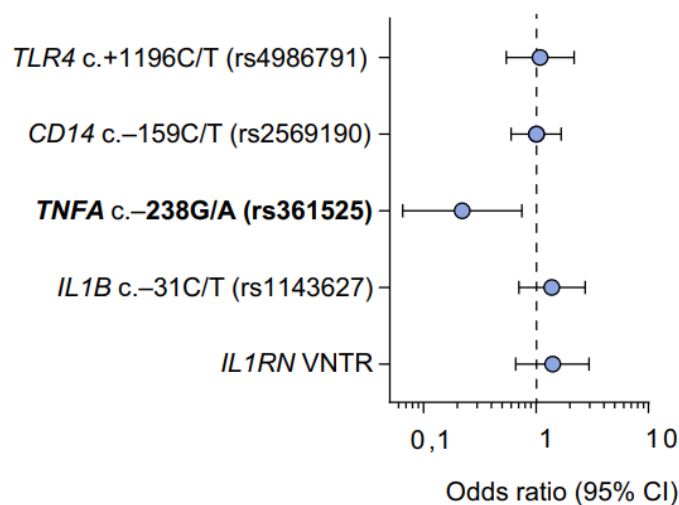
V pilotním souboru vyvinulo ZBI 115/336 (34,2 %) pacientů. Riziko vzniku ZBI bylo signifikantně vyšší u žen a u pacientů s vyšším Child-Pugh a MELD skóre. Ve validačním souboru vyvinulo ZBI 133/332 (40,1 %) nemocných, riziko vzniku ZBI bylo i v tomto souboru vyšší u pokročilejších pacientů podle Child-Pugh 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

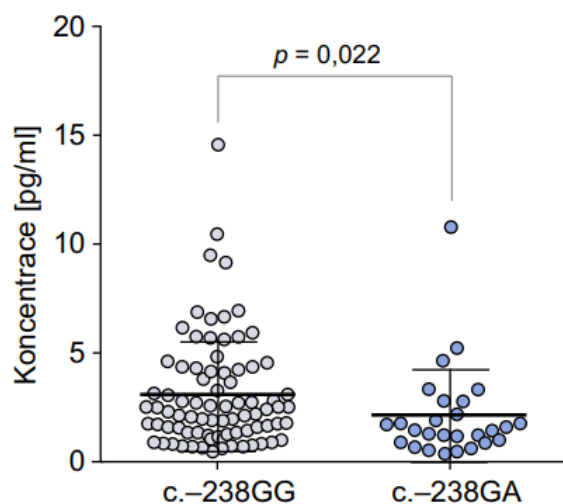
Nosiči variantní alely *TNFA* c.–238A měli signifikantně nižší riziko vzniku ZBI (OR 0,22, 95% CI 0,07–0,75, $p = 0,008$) ve srovnání s homozygoty pro ancestrální alelu *TNFA* c.–238G. Bonferroniho korekce na mnohočetné testování v 5 lokusech zvýšila hodnotu p na $p_{\text{corr}} = 0,042$. V ostatních studovaných lokusech nebyla asociace se ZBI prokázána (Obrázek 5). 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 5 Riziko bakteriální infekce podle alelické varianty ve vybraných genech



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 6). 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, $p = 0,006$).

Obrázek 6 Snížená 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 odchytky (tenké čáry).

Nezávislými prediktory ZBI byli genotyp *TNFA* c.-238 a vyšší Child-Pugh a MELD skóre. Konkrétně pokročilost jaterního onemocnění Child-Pugh C vs. B zvyšovala riziko ZBI 1,5krát a každé zvýšení MELD skóre o 1 bod zvyšovalo riziko ZBI přibližně o 7 %. Oproti tomu nosičství variantní alely *TNFA* c.-238A snižovalo riziko ZBI téměř 2,5krát.

Při použití Waldovy statistiky k hodnocení relativního příspěvku těchto veličin na rozvoj ZBI 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 variantní 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).

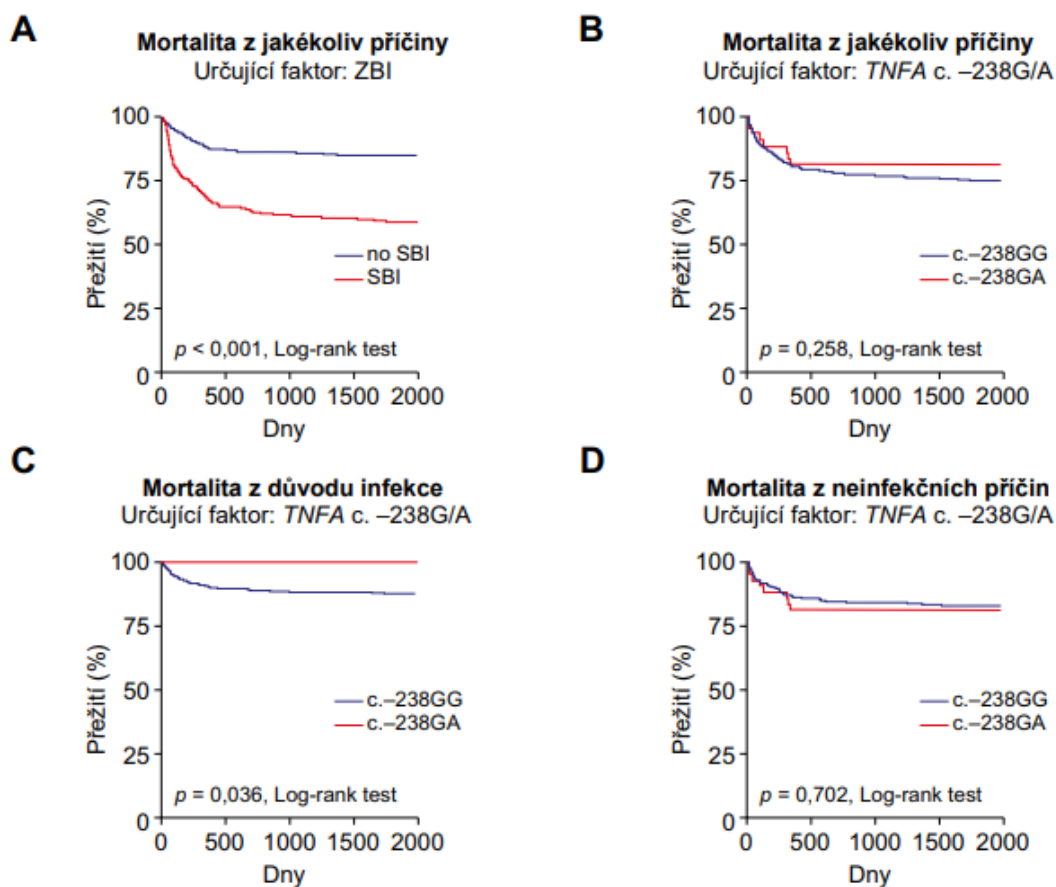
Ochrana před rozvojem ZBI byla v celém souboru díky přítomnosti *TNFA* c.-238A předpovídána s vysokou PPV (84,4%; 95% CI 72,4–98,0%) a s vysokou specificitou (89,8%; 95% CI 86,0–92,5%), zatímco sensitivita (9,3 %) a NPV byly nízké (38,9%). Tyto výsledky ukazují, že nosičství variantní alely *TNFA* c.-238A poskytuje silnou ochranu před rozvojem ZBI u pacientů s pokročilým onemocněním jater.

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

Závažné bakteriální infekce, věk, ženské pohlaví a MELD skóre byly identifikovány jako významné prediktory celkové předtransplantační mortality (Obrázek 7A), naproti tomu genotyp *TNFA* c.-238 nebyl spojen s mortalitou z jakékoliv příčiny (Obrázek 7B).

Na podkladě našich předchozích výsledků, které prokázaly významnou asociaci genotypu *TNFA* c.-238 se vznikem ZBI (Obrázek 5) a kdy ZBI byla silně spojena s mortalitou (Obrázek 7A), 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 7C). 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 7C). Podle očekávání neexistovala žádná souvislost mezi *TNFA* c.-238 a předtransplantační mortalitou z neinfekčních příčin (Obrázek 7D).

Obrázek 7 Nosičství varianty *TNFA* c.–238A je spojeno s významně nižším rizikem úmrtí v důsledku ZBI před LT



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 ($n = 668$).

Závěr

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.

Článek byl publikován v časopise Journal of Hepatology: IF: 11,336

Genetic variation in *TNFA* predicts protection from severe bacterial infections in patients with end-stage liver disease awaiting liver transplantation. *J Hepatol.* 2014 Apr;60(4):773-81.

Kompletní znění článku je přiloženo v anglickém jazyce.

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)

Úvod

Významným prognostickým faktorem u pacientů s chronickým jaterním onemocněním je pokročilost jaterní fibrózy. V případě rozvoje jaterní cirhózy a jejích komplikací může být jedinou léčebnou možností LT.

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).

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.

Metodika

Do studie bylo celkem zařazeno 172 dospělých pacientů s HCV cirhózou s genotypem 1b, kteří podstoupili LT v IKEM od ledna 1995 do srpna 2018. Sto pacientů bylo transplantováno pro chronické jaterní selhání (CLF, chronic liver failure; skupina CLF) podle Child-Pugh a MELD skóre a 72 pacientů bylo transplantováno pro jaterní cirhózu s malým HCC, tito pacienti neměli známky jaterní dysfunkce (skupina HCC). Zastoupení genotypů *PNPLA3* bylo srovnáváno s jedinci (n = 647) z epidemiologické studie MONICA (MONItoring of trends and determinants in CARdiovascular disease) (Cífková et al., 2010), genotypizační data byla převzata z práce autorů Trunečka et al. (Trunečka et al., 2018).

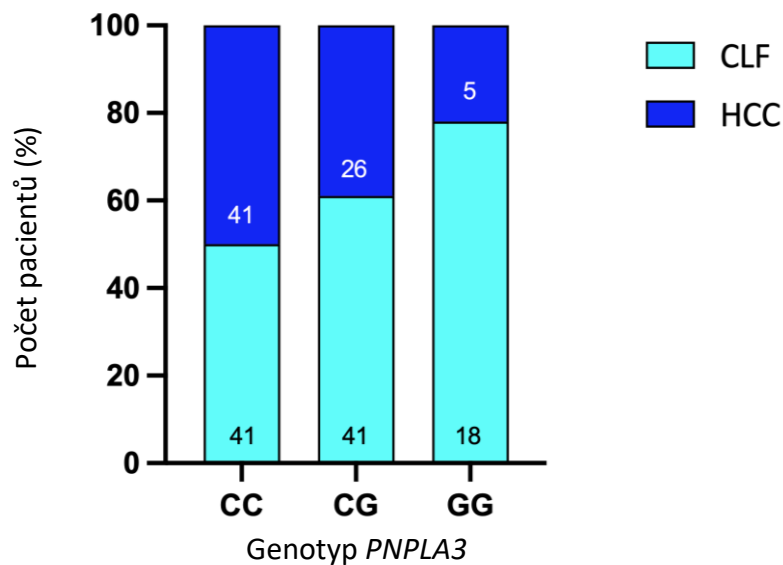
Výsledky

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-Pughovy klasifikace $9,1 \pm 1,8$ 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, $p = 0,042$). 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 (Obrázek 8). Naproti tomu frekvence genotypů ve skupině HCC se od frekvence genotypů ve studii MONICA signifikantně nelišily.

Obrázek 8 Vliv genotypu *PNPLA3* na indikaci k LT

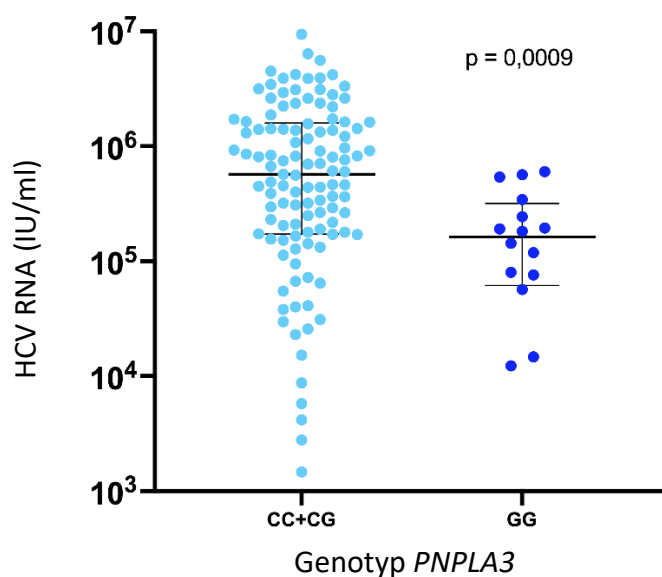


CLF – chronické jaterní selhání, HCC – hepatocelulární karcinom

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 9). 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, $p = 0,008$).

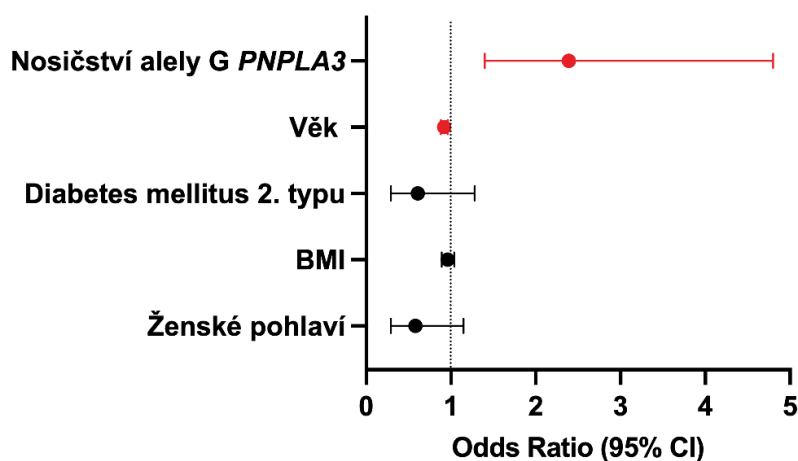
Obrázek 9 Genotypy *PNPLA3* rs738409 C>G a předtransplantační virémie (HCV RNA)



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 (Obrázek 10).

Obrázek 10 Faktory predikující LT: multivariantní analýza



Závěr

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

Článek byl publikován v časopise PLoS One. IF: 2,740

PNPLA3 rs738409 G allele carriers with genotype 1b HCV cirrhosis have lower viral load but develop liver failure at younger age. *PLoS One*. 2019 Sep 17;14(9):e0222609.

Kompletní znění článku je přiloženo v anglickém jazyce.

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)

Úvod

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 přímo působící antivirotika 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.

Metodika

Do studie bylo zahrnuto celkem 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.

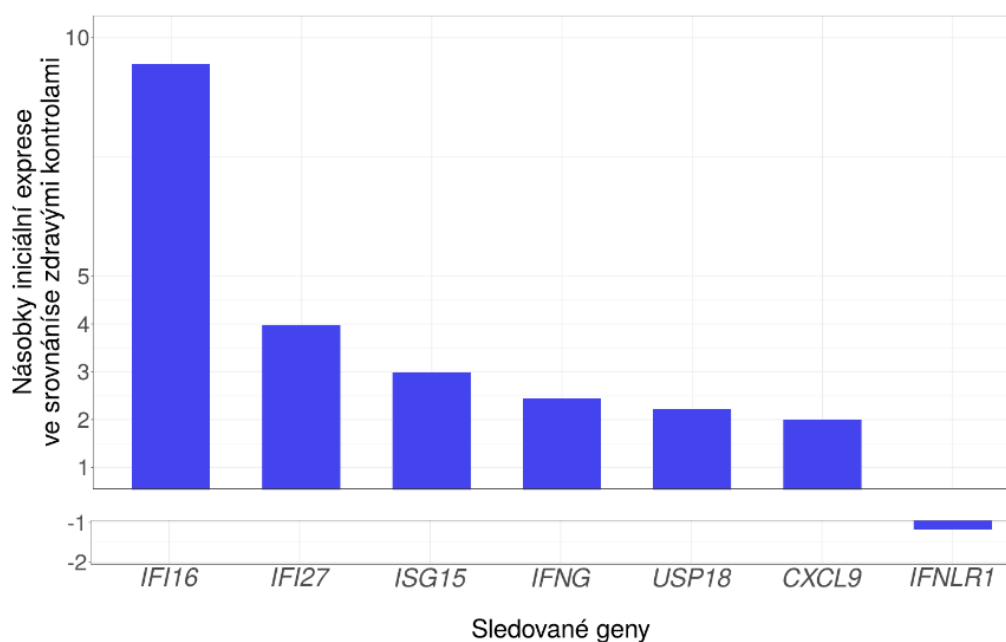
Výsledky

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 %).

Expresse zkoumaných genů před léčbou

Iniciální exprese *IFNLR1* byla ve srovnání se skupinou zdravých dobrovolníků snížena, naopak exprese zbývajících 6 genů byla ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků lehce zvýšená (Obrázek 11).

Obrázek 11 Iniciální exprese ISG, *IFNG* a *IFNLR1*. Násobky exprese ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků

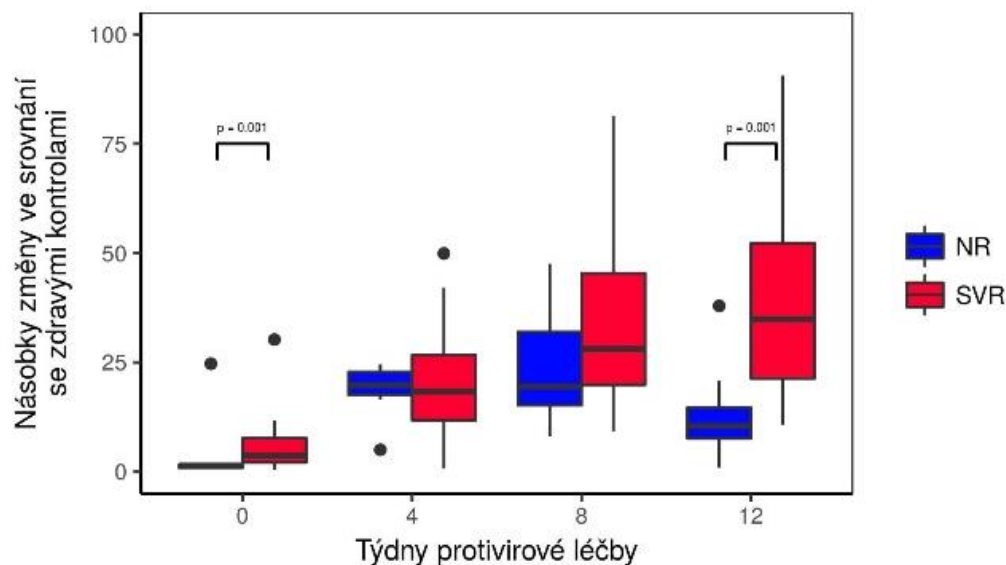


Iniciální exprese *IFI27* (2,2x, IQR: 1,7–3,1 vs. 8,3x, IQR: 3,5–43,5; $p = 0,02$) a *USP18* (1,4x, IQR: 0,9–1,8 vs. 6,5x, IQR: 2,4–9,7; $p = 0,005$) byla výrazně nižší u pacientů s genotypem *IL28B* TT (8/26) než u pacientů s genotypem *IL28B* CT (16/26). Při srovnání skupin pacientů se SVR a bez SVR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

Průběh aktivace ISG

Expresse 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 12). Expresse zkoumaných genů v různých časových obdobích léčby nekoreloval s koncentrací HCV RNA.

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



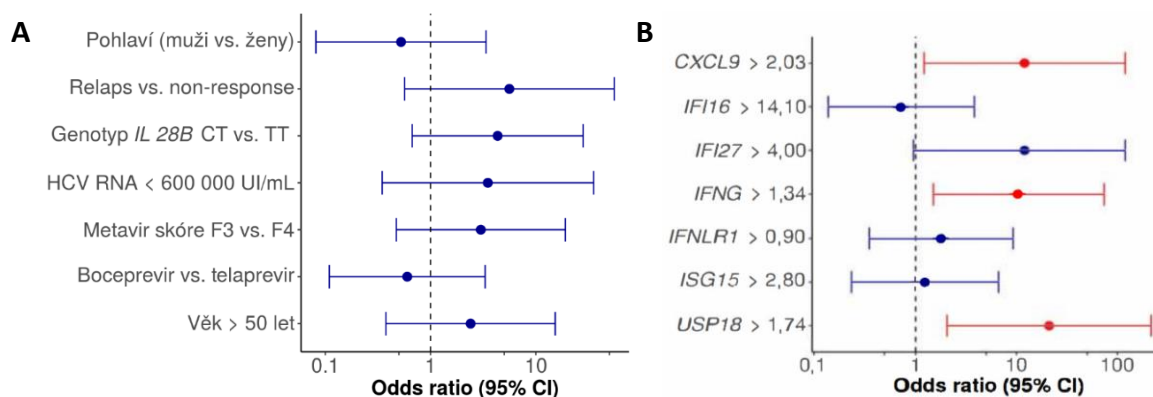
SVR, setrvalá virologická odpověď; NR, nedosažení setrvalé virologické odpovědi

Predikce SVR

Žádný ze standardních klinických prediktorů dosažení SVR před léčbou neměl v naší skupině pacientů prediktivní hodnotu (Obrázek 13A).

V univariantsní analýze byla identifikována iniciální exprese tří (*USP18*, *IFNG* a *CXCL9*) ze sedmi genů jako prediktor dosažení SVR (Obrázek 13B). V multivariantsní analýze byla iniciální exprese *USP18* identifikována jako prediktor SVR ($p = 0,047$).

Obrázek 13 (A) Faktory před léčbou predikující dosažení SVR (univariantsní analýza). **(B)** Prediktivní hodnota iniciální genové exprese pro dosažení SVR, vztaženo ke skupině zdravých dobrovolníků (univariantsní analýza).



Závěr

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. Iniciální exprese *USP18* a exprese ve 12. týdnu léčby představovaly nejlepší prediktor dosažení SVR před zahájením protivirové léčby.

Článek byl publikován v časopise Therapeutics and Clinical Risk Management. IF: 1,903

USP18 downregulation in peripheral blood mononuclear cells predicts nonresponse to interferon-based triple therapy in patients with chronic hepatitis C, genotype 1: a pilot study. *Ther Clin Risk Manag.* 2015 Dec 17;11:1853-61.

Kompletní znění článku je přiloženo v anglickém jazyce.

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

Úvod

Zlatým standardem v hodnocení portální hypertenze je měření HVPG (Bosch et al., 2009). Toto invazivní vyšetření je nahrazováno neinvazivními metodami odhadu HVPG jako je měření LS pomocí elastografických metod nebo stanovení krevních biomarkerů. Naším cílem bylo zjistit, zda LS a některé dříve publikované neinvazivní krevní biomarkery mohou předpovídat vyšší prahové hodnoty HVPG u kandidátů LT.

Metodika

Do studie bylo zařazeno celkem 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.

Výsledky

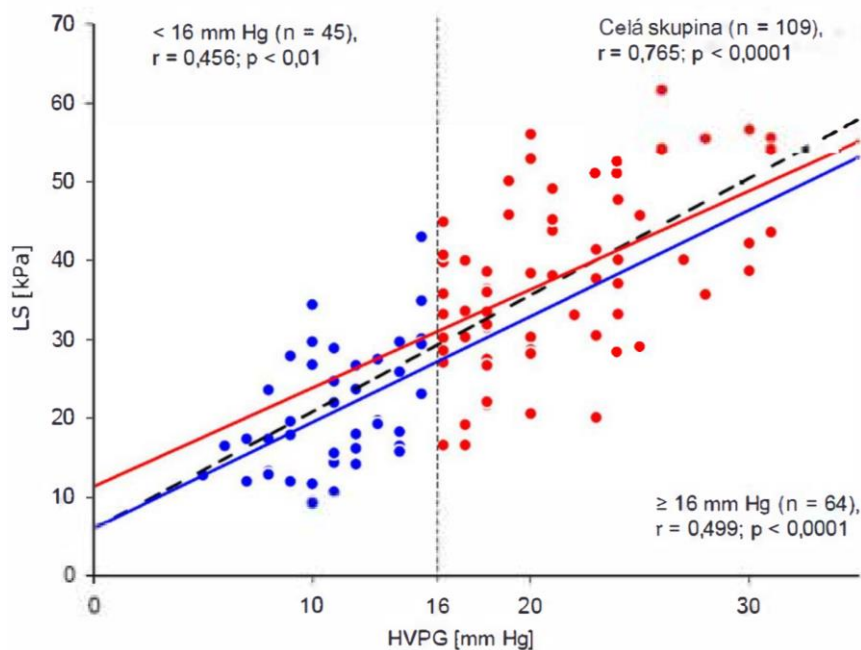
Pacienti byli pro další hodnocení rozděleni do dvou skupin na základě pokročilosti jaterního onemocnění podle Child-Pughovy klasifikace (CPS): skupina CPS-A zahrnující pacienty s Child-Pugh A (30/109, 27,5 %) a skupina CPS-B/C zahrnující nemocné s Child-Pugh B nebo C (79/109, 72,5 %). Získané hodnoty 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 14).

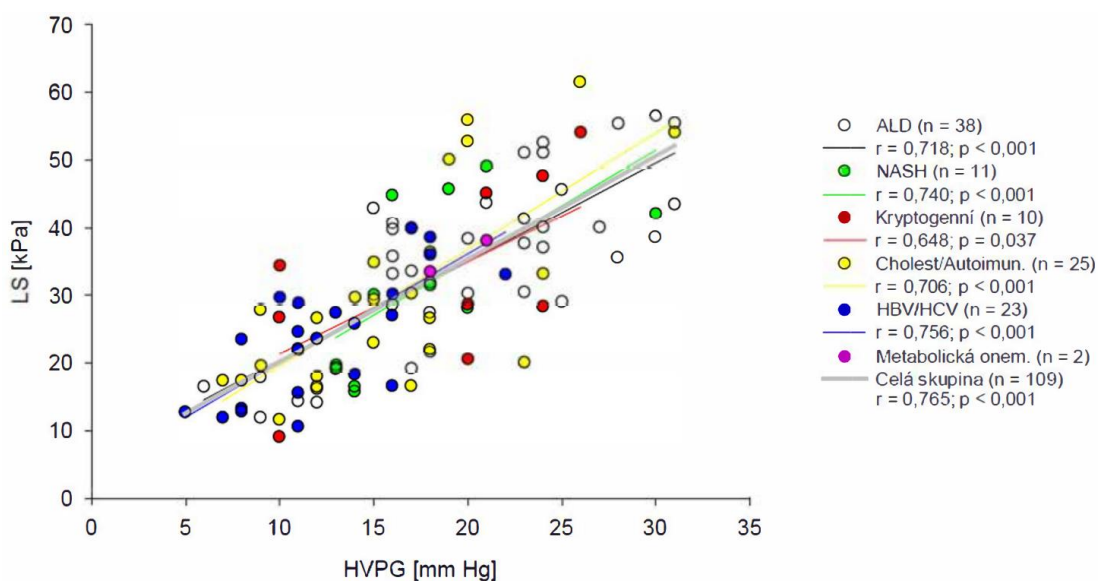
Obrázek 14 Korelace mezi LS a HVPG



Modrá čára představuje regresní přímku vypočtenou pro pacienty s HVPG nižším než 16 mm Hg (modré tečky), červená čára ukazuje totéž pro pacienty s HVPG rovným nebo vyšším než 16 mm Hg (červené tečky). Přerušovaná černá čára ukazuje regresní přímku vypočítanou pro všechny pacienty dohromady. Všichni pacienti: $\beta = 1,52$, 95% CI = (1,27–1,77), $p < 0,001$; LS [kPa] = $4,9 + 1,5 \times \text{HVPG [mm Hg]}$. <16 mm Hg: $\beta = 1,34$, 95% CI = (0,59–2,10), $p = 0,001$; LS [kPa] = $6,0 + 1,3 \times \text{HVPG [mm Hg]}$. ≥16 mm Hg: $\beta = 1,25$, 95% CI = (0,73–1,77), $p < 0,001$; LS [kPa] = $11,4 + 1,2 \times \text{HVPG [mm Hg]}$.

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 15).

Obrázek 15 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.

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. $r = 0,5086$, $p < 0,0001$). Zbývající krevní 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 ($r = 0,308$, $p = 0,006$, $n = 78$).

Neinvazivní markery jako prediktory mezních hodnot HVPG

Pro všechny testované neinvazivní 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 (Tabulka 7), 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.

Tabulka 7 Diagnostická přesnost LS predikovat HVPG nad 16 mmHg a 20 mmHg

HVPG [mm Hg]	16	20
AUROC	0,90243	0,86824
OR (95% CI)	1,21484 (1,1396–1,3174)	1,157 (1,101–1,231)
Cut-off [kPa]	30,2	37,1
Senzitivita	0,7656	0,7027
Specifická	0,9333	0,8750
PPV	94,23 %	74,29 %
NPV	73,68 %	84,00 %
LR+	11,47	5,62
LR–	0,25	0,34
Diagnostická přesnost	83,5 % (91/109)	81,7 % (89/109)
McNemarův test	p > 0,05	

PPV, pozitivní prediktivní hodnota; NPV, negativní prediktivní hodnota; LR, likelihood ratio, poměr věrohodnosti

Závěr

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 neinvazivního hodnocení steatózy a fibrózy jater bude invazivní měření HVPG plně nahrazeno měřením LS, i v hodnocení rizik spojených s pokročilostí jaterního onemocnění.

Článek byl publikován v časopise PLoS One. IF: 3,752

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*. 2021 Jan 7;16(1):e0244934.

Kompletní znění článku je přiloženo v anglickém jazyce.

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

Úvod

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.

Metodika

Do studie bylo zahrnuto celkem 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).

Výsledky

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.

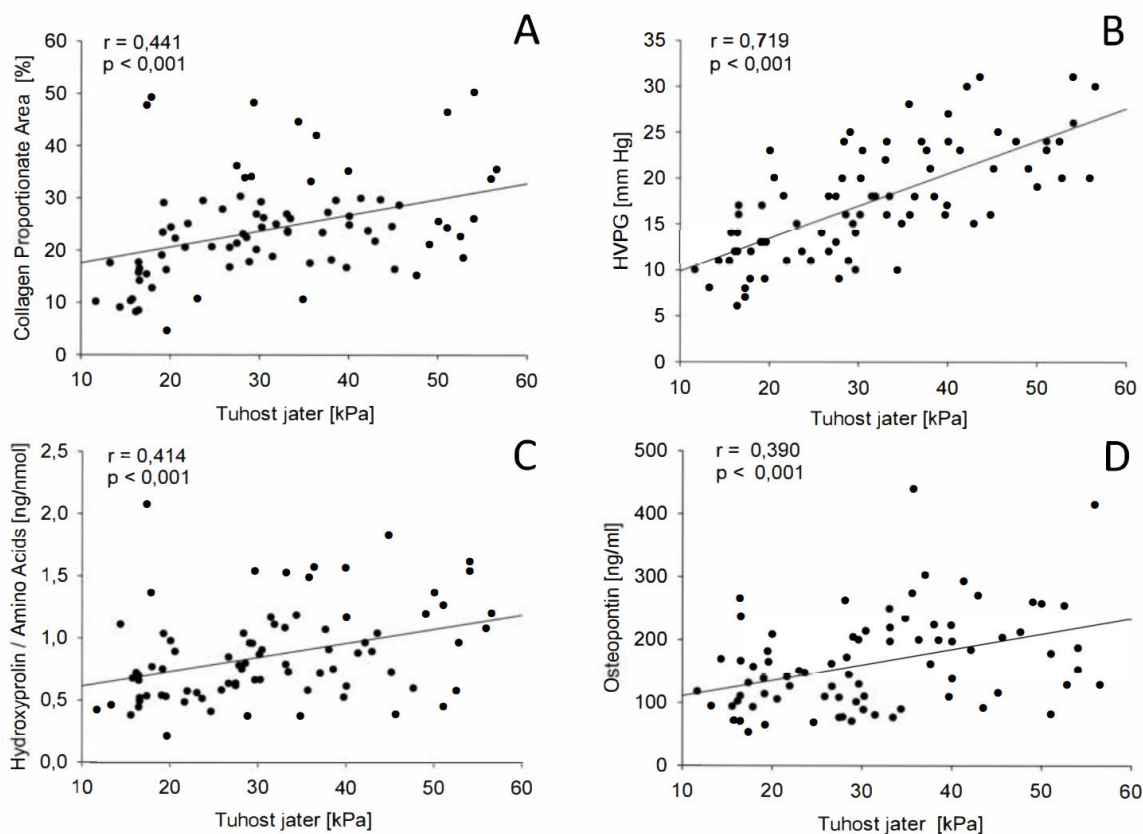
Korelace HVPG a obsahu kolagenu s krevními markery fibrózy a PH

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 16. 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.

Obrázek 16 Regresní křivky zobrazující vztah mezi LS a CPA **(A)**, HVPG **(B)**, HP/ AA **(C)** a osteopontinem **(D)**.



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:

$$LS = -0,41 + (1,19 \times \text{HVPG}) + (0,26 \times \text{CPA}) + (0,03 \times \text{osteopontin})$$

nebo po odebrání hodnoty osteopontinu, jehož vliv na LS je nízký:

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

Závěr

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.

Článek byl publikován v časopise *Physiological Research*. IF: 2,139

Portal hypertension is the main driver of liver stiffness in advanced liver cirrhosis. *Physiol Res.* 2021 Aug 31;70(4):563-577.

Kompletní znění článku je přiloženo v anglickém jazyce.

5 Obecná diskuze

V práci *Genetic variation in TNFA predicts protection from severe bacterial infections in patients with end-stage liver disease awaiting liver transplantation (Journal of Hepatology, 2014)* 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 ZBI 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 . V době vzniku naší publikace byla již známá data o 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).

Publikovány byly již i práce popisující snížení sérové koncentrace TNF- α a zlepšení funkce neutrofilních leukocytů po podávání antibiotik účinných proti gramnegativním bakteriím. U nosičů variantní alely *TNFA* c.–238A je trvale snížena produkce TNF- α v játrech vlivem zvýšeného vstřebávání LSP při PH (Lin et al., 1995), LPS je rozpadovým produktem střevních gramnegativních bakterií. Z tohoto pohledu naše práce definitivně potvrdila význam trvalé aktivace dráhy TLR4 jako patogenetického mechanismu zúčastněného ve zvýšení rizika ZBI u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou. Přestože současný pohled na mechanismus imunitní dysfunkce u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou staví do popředí proteino-energetickou malnutrici, naše data svědčí pro zásadní význam aktivace dráhy TLR4. Metodicky se jednalo o rozsáhlou alelickou asociační studii, studovanou skupinou byli pacienti čekající na LT v Praze, validační skupinou byli pacienti čekající na transplantaci jater v transplantačním centru v Rotterdamu. Studie byla provedena retrospektivně za použití vzorků biologického materiálu, který byl shromažďován mnoho roků. Pacienti, kteří poskytli genetický vzorek pro zmíněnou studii,

byli v době provádění studie po LT, nebylo jim proto možno již vyšetřit fagocytární funkci neutrofilních leukocytů. To by bylo muselo být provedeno v době, kdy trpěli pokročilou jaterní cirhózou.

V práci *PNPLA3 rs738409 G allele carriers with genotype 1b HCV cirrhosis have lower viral load but develop liver failure at younger age. (PLoS ONE, 2019)* 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. Nejsilnějším rizikovým faktorem vzniku HCC v cirhóze C je totiž věk.

V době, kdy naše studie probíhala, byla již známa řada publikací jiných autorů dokládající souvislost mezi nosičstvím *PNPLA3 rs738409 G* alely a zvýšeným rizikem steatózy jater, NASH, fibrózy i cirhózy jater. Nosičství *PNPLA3 rs738409 G* alely bylo v té době též známo jako rizikový faktor rozvoje jaterní cirhózy u pacientů s abúzem alkoholu. Předpokládáme proto, že nosiči *PNPLA3 rs738409 G* alely trpěli kromě infekce virem hepatitidy C i těžkou steatózou či NASH, 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 non-alkoholické 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).

U homozygotů GG *PNPLA3 rs738409* jsme též prokázali signifikantně nižší koncentraci HCV RNA v krvi než u heterozygotů CC a CG. HCV partikule opouští jaterní buňku s tukovými kapénkami, jejichž obrát je snížen u nosičů *PNPLA3 rs738409 G* alely. Nižší koncentrace HCV RNA v krvi pacientů s rychleji progredujícím chronickým selháním jater působí na první pohled nelogicky. Přihlédneme-li však ke skutečnosti, že vysvětlením je snížené exkrece virových partikulí extracelulárně a nikoliv nižší úroveň replikace viru intracelulárně, pak by se mohlo jednat i další mechanismus přispívající k rychlejší progresi chronického selhání jater. Nelze vyloučit, že virové partikule se v hepatocytech nosičů *PNPLA3 rs738409 G* alely díky sníženému transportu extracelulárně kumulují a tím napomáhají rychlejší progresi chronického selhání jater.

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 *USP18 downregulation in peripheral blood mononuclear cells predicts nonresponse to interferon-based triple therapy in patients with chronic hepatitis C, genotype 1: a pilot study (Therapeutics and clinical risk management, 2015)* 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. Tehdejší přístup k léčbě chronické HCV infekce předkládal opakování léčby založené na PEG-IFN- α jen u pacientů s dobrou šancí na vyléčení.

Prokázali jsme, že iniciální exprese (downregulace) *USP18* v PBMC predikovala nedosažení SVR při léčbě trojkombinací PEG-IFN- α , RBV a proteázovým inhibitorem první generace, boceprevirem nebo telaprevirem. Narůstající exprese *USP18* v PBMC během prvních 12 týdnů léčby pak naopak predikovala dosažení SVR. V době provádění studie bylo již známo, že homozygoti CC *IL28B* rs12979860 mají nejvyšší šanci na dosažení SVR (eliminaci viru). Rozhodující pro dosažení SVR byla exprese některých ISG v hepatocytech (Chen et al., 2005, Chen et al., 2010, Asselah et al., 2008). U heterozygotů CT *IL28B* rs12979860 byla iniciální exprese ISG v hepatocytech nízká a po podání PEG-IFN- α rychle narůstala, zatímco u nosičů alely T *IL28B* rs12979860 byla iniciální exprese ISG vysoká, ale refrakterní k podání interferonu α , již se nezvyšovala. Za příčinu trvalé, ale refrakterní aktivace u nosičů alely T *IL28B* rs12979860 ISG byla považována intracelulární a intercelulární signalizace interferonem λ , ta měla u nosičů alely C být oslabena. Mechanismus, kterým léčba interferonem α vedla k eliminaci chronické HCV infekce, nebyl ovšem nikdy spolehlivě objasněn. Dalším faktorem, který činil expresi ISG refrakterní k podání interferonu α , byl stupeň fibrózy jater. 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.

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 diskutovanou prací je *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, 2021)* jsme prokázali, že hodnota LS dobře a lineárně koreluje s hodnotou HVPG u pacientů s velmi pokročilou jaterní cirhózou, kandidátů LT, 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 další práce, dokládající, že steatóza jater je spojena s nadhodnoceným měřením LS (Semmler et al., 2019). Hodnota HVPG je považována za nejlepší prediktivní faktor z hlediska prognózy pacienta s jaterní cirhózou. Na druhou stranu přímé měření HVPG je vždy invazivním postupem spojeným s rizikem komplikací, byť velmi nízkým. Možnost spolehlivě odhadovat hodnotu HVPG pomocí neinvazivního změření LS je lákavým postupem pro běžnou klinickou praxi i výzkumné projekty. V této práci nebyla prováděna žádná 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 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.

Studie se dále zabývala hodnocením odhadu vysokých hodnot HVPG podle koncentrace biomarkerů portální hypertenze a fibrózy jater. Zjistili jsme, že žádný z biomarkerů nemá lepší prediktivní hodnotu než LS a ani kombinací biomarkerů s LS nelze dosáhnout lepší predikce než dle samotné hodnoty LS. Naše výsledky byly v tomto směru kompatibilní s výsledky jiných autorů, kdy klinický přínos biomarkerů v predikci HVPG je v rozhodování o přítomnosti CSPH, nikoliv v predikci hodnoty HVPG v intervalu nad 12 mm Hg (Simbrunner et al., 2020). Jednalo se o prospektivní studii podporovanou grantem AZV ČR, do které byli zařazováni kandidáti LT s pokročilou jaterní cirhózou. Díky tomu bylo do studie zařazeno málo pacientů s HVPG pod 12 mm Hg, v čemž lze spatřovat určitý

nedostatek, nicméně celkový počet zařazených pacientů dostačoval pro statistické hodnocení.

V poslední práci *Portal Hypertension Is the Main Driver of Liver Stiffness in Advanced Liver Cirrhosis (Physiological Research, 2021)* jsme prokázali, že na tvorbě aktuální hodnoty tuhosti jater se podílí jak HVPJ, tak obsah kolagenu v játrech. Obsah kolagenu v játrech byl v této studii vyjadřován jako CPA i jako obsah hydroxyprolinu v jaterní tkáni. Nejlépe korelovala s HVPJ 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. U pacientů s CSPH se na tvorbě hodnoty LS podílí významně i PH.

Naše výsledky byly kompatibilní s publikovanými zvířecími modely (Yang et al., 2017, Yarpuzlu et al., 2014). Na druhou stranu ukládání kolagenu v játrech stojí na počátku mechanismu vzniku PH, není však faktorem jediným, významnou úlohu má i remodelace jaterních sinusoid. Metodicky se jednalo o další část prospektivní studie podporované grantem AZV ČR. Měření LS je v současné době důležitým klinickým parametrem při určování pokročilosti chronické choroby jater a v řadě případů vstupuje i do algoritmu rozhodujícím o léčbě. Považovali jsme proto za důležité ukázat, které patogenetické mechanismy se podílí na tvorbě hodnoty LS. Stejně jako předchozí práce má i tato poslední přispět k snadnější a přesnější definici fenotypu pacienta pro další genetické studie.

Závěrem lze říci, že již současná znalost genetických faktorů, které ovlivňují progresi a komplikace chronických chorob jater, změnila náš 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 transplantací jater. 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 Seznam vybraných publikací a prezentací

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, Praktijnjo 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, Brol 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, 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.
4. 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**.
5. 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**.
6. Šenkeříková R, Fraňková S, Šperl J, Špičák J. **Spontánní bakteriální peritonitida.** Vnitřní lékařství. 2015, 61(2), 134-140.
7. 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**.
8. 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.
9. 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**.

Prezentace přímo související s tématem Ph.D.

Ústní sdělení

1. Šenkeříková R, Fraňková S, Jirsa M, Kreidlová M, Merta D, Neřoldová M, Chmelová K, Šperl J. **Nosiči *PNPLA3* rs 738409 G alely infikovaní genotypem 1 viru hepatitidy C mají nižší virémii, ale vyšší riziko chronického selhání jater.** Pražské podzimní gastroenterologické dny. Praha, CZ. 26.09.2019 - 27.09.2019.
2. Šenkeříková R, Mazanko M, Gottfriedová H, Kováč J, Fraňková S, Jirsa M, Lunova M, Urbánek P, Šperl J. **Neinvazivní odhad portohepatálního gradientu u kandidátů transplantace jater.** XLVI. májové hepatologické dny. České Budějovice, CZ, 16.05.2018 - 18.05.2018.
3. Šenkeříková R, Gottfriedová H, Fraňková S, Lunova M, Sticová E, Merta D, Honsová E, Trunečka P, Špičák J, Jirsa M, Šperl J. **Význam shear-wave elastografie u cirhotiků jater pro predikci klinických projevů portální hypertenze.** XLV. májové hepatologické dny. Olomouc, CZ, 10.05.2017 - 12.05.2017.
4. Šenkeříková R, Fraňková S, Merta D, Sticová E, Trunečka P, Špičák J, Jirsa M, Šperl J. **Varianta genu *PNPLA3* (rs738409 C>G) snižuje virémii a riziko HCC u pacientů s cirhózou infikovaných HCV genotypem 1b.** 14. vzdělávací a diskuzní gastroenterologické dny. Karlovy Vary, CZ. 08.12.2016 - 10.12.2016.
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. **Geneticky podmíněná snížená exprese TNF-alfa snižuje riziko závažných bakteriálních infekcí u pacientů s pokročilou cirhózou jater.** 15. Studentská vědecká konference. Praha, CZ. 21.05.2016.
6. Šenkeříková R, Fraňková S, Jirsa M, Špičák J, Trunečka P, Šperl J. **Úloha TNF alfa v patogenezi komplikací jaterní cirhózy.** I. kongres Společnosti pro orgánové transplantace ČLS JEP. Špindlerův Mlýn, CZ. 30.03.2016 - 02.04.2016.
7. Šenkeříková R, Gottfriedová H, Sticová E, Fraňková S, Froněk J, Trunečka P, Špičák J, Šperl J. **Assessment of liver stiffness by shear wave elastography in liver transplant recipients.** Gastro Update Europe 2015. Budapest, HU. 12.06.2015 - 13.06.2015.
8. Šenkeříková R, Gottfriedová H, Fraňková S, Lunova M, Sticová E, Trunečka P, Špičák J, Jirsa M, Šperl J. **Shear wave elastografie a její využití při hodnocení pokročilosti jaterní cirhózy a známek portální hypertenze u pacientů čekajících na transplantaci jater.** XLIII. májové hepatologické dny. Karlovy Vary, CZ, 27.05.2015 - 29.05.2015.
9. Šenkeříková R, de Mare-Bredemeijer E, Fraňková S, Roelen D, Visseren T, Trunečka P, Špičák J, Metselaar H, Jirsa M, Kwekkeboom J, Šperl J. **Alela *TNFA* c.238A snižuje riziko rozvoje závažných bakteriálních infekcí u pacientů s pokročilou jaterní cirhózou zařazených na čekací listině k transplantaci jater.** XLI. májové hepatologické dny. Karlovy Vary, CZ, 15.05.2013 - 17.05.2013.
10. Šenkeříková R, de Mare-Bredemeijer E, Fraňková S, Roelen D, Visseren T, Trunečka P, Špičák J, Metselaar H, Jirsa M, Kwekkeboom J, Šperl J. **The TNF-alpha -238 G-**

allele predisposes to severe bacterial infection in patients with end-stage liver disease enlisted for liver transplantation. International Liver Congress™ 2013 - 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Amsterdam, NL, 24.04.2013 - 28.04.2013.

11. Bartáková R, Fraňková S, Šperl J, Lánská V, Trunečka P, Jirsa M, Špičák J. **Vliv polymorfismu *TNFA* c.–238 G/A na rozvoj závažných bakteriálních infekcí u pacientů s chronickým onemocněním jater.** 13. studentská vědecká konference. Praha, CZ. 10.05.2012 - 10.05.2012.
12. Bartáková R, Fraňková S, Šperl J, Jirsa M, Trunečka P, Špičák J. **Genetic variants in *TNFA* c.– 238 G/A predispose to severe bacterial infections in patients with end stage liver disease enlisted for liver transplantation.** Bridging Meeting and EAGE Postgraduate Course 2011. Berlín, DE. 10.11.2011 - 12.11.2011.

Postery

1. Šenkeříková R, Fraňková S, Merta D, Sticová E, Trunečka P, Špičák J, Jirsa M, Šperl J. ***PNPLA3* (rs738409 C > G) contributes to low viral load and decreased risk of hepatocellular carcinoma in HCV genotype 1b cirrhotic patients.** 67th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Boston, US, 11.11.2016 - 15.11.2016.
2. Šenkeříková R, Fraňková S, Jirsa M, Merta D, Sticová E, Oliverius M, Trunečka P, Špičák J, Šperl J. ***PNPLA3* genotype affects viral load and a risk of HCC in HCV genotype 1b cirrhosis.** I. národní kongres gastrointestinální onkologie. Praha, CZ. 03.11.2016 - 05.11.2016.
3. Šenkeříková R, Gottfriedová H, Fraňková S, Sticová E, Trunečka P, Špičák J, Jirsa M, Šperl J. **Liver stiffness assessed by SWE strongly correlates with liver dysfunction and clinical signs of portal hypertension in cirrhotic patients.** 66th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). San Francisco, US, 13.11.2015 - 17.11.2015.
4. Šenkeříková R, Gottfriedová H, Sticová E, Fraňková S, Froněk J, Trunečka P, Špičák J, Šperl J. **Assessment of liver stiffness by shear wave elastography in liver transplant recipients.** DDW 2015. Digestive Disease Week. Washington, US, 17.05.2015 - 19.05.2015.
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.** 8th ELITA-ELTR. Prague, CZ, 18.09.2014 - 19.09.2014.
6. Šenkeříková R, de Mare-Bredemeijer E, Fraňková S, Roelen D, Visseren T, Trunečka P, Špičák J, Metselaar H, Jirsa M, Kwekkeboom J, Šperl J. **Geneticky podmíněná snížená exprese TNF-A snižuje riziko bakteriálních infekcí u pacientů s pokročilou cirhózou jater.** V. česko-slovenský transplantační kongres. Olomouc, CZ. 02.10.2014 - 04.10.2014.

7. Šenkeříková R, de Mare-Bredemeijer E, Fraňková S, Roelen D, Visseren T, Trunečka P, Špičák J, Metselaar H, Jirsa M, Kwekkeboom J, Šperl J. **The *TNFA-238A* allele prevents severe bacterial infection in patients with end-stage liver disease awaiting liver transplantation.** Bacterial Infections in Cirrhosis. Barcelona, ES. 24.05.2013 - 25.05.2013.

Prezentace přímo nesouvisející s Ph.D.

Ústní sdělení

1. Šenkeříková R. **Specifické mechanismy toxicity léčiv u jaterní cirhózy.** XLVI. májové hepatologické dny. České Budějovice, CZ, 16.05.2018 - 18.05.2018.
2. Šenkeříková R. **Transplantace jater: od cirhózy k HCC.** Edukační seminář klinická hepatologie. Praha, CZ. 08.03.2018 - 09.03.2018.
3. Šenkeříková R. **Infekce u cirhotiků a SPB.** Klinická hepatologie 2017. Praha, CZ. 02.02.2017 - 03.02.2017.
4. Šenkeříková R. **Hepatorenální syndrom a SPB.** Akademie České hepatologické společnosti ČLS JEP 2017. Praha, CZ. 22.09.2017 - 23.09.2017.
5. Šenkeříková R. **De novo malignity po transplantaci jater.** XLIV. májové hepatologické dny. Karlovy Vary, CZ. 25.05.2016 - 27.05.2016.
6. Šenkeříková R, Fraňková S, Oliverius M, Kieslichová E, Sticová E, Trunečka P, Špičák J, Jirsa M, Šperl J. **Genetické faktory vzniku hepatocelulárního karcinomu v jaterní cirhóze.** XLIV. májové hepatologické dny. Karlovy Vary, CZ, 25.05.2016 - 27.05.2016.
7. Šenkeříková R **Riziko nádorových onemocnění po transplantacích orgánů.** 1. kongres Společnosti pro orgánové transplantace. Špindlerův Mlýn, CZ. 31.03.2016 - 02.04.2016.
8. Šenkeříková R, Gottfriedová H, Fraňková S, Lunova M, Sticová E, Lavříková P, Merta D, Honsová E, Franeková J, Trunečka P, Špičák J, Jirsa M, Šperl J. **Současný přínos elastografie jater.** Podzimní pracovní den ČHS ČLS JEP 2015. Praha, CZ. 28.11.2015.
9. Šenkeříková R. **Nové neinvazivní vyšetřovací metody – Shear-Wave Elastografie.** Vybrané kapitoly z infekce a vakcinologie. Mělník, CZ. 15.10.2015.
10. Šenkeříková R. **Infekční komplikace u transplantovaných.** 13. vzdělávací a diskuzní gastroenterologické dny. Karlovy Vary, CZ. 04.12.2014 - 06.12.2014.
11. Šenkeříková R, Fraňková S, Šperl J, Oliverius M, Kieslichová E, Kautznerová D, Honsová E, Trunečka P, Špičák J. **Incidental hepatocellular carcinoma: Risk factors and long-term outcome after liver transplantation.** Central European Gastroenterology Meeting (CEURGEM). Gdansk, PL. 30.08.2014 - 31.08.2014.
12. Bartáková R, Fraňková S, Oliverius M, Šperl J, Kostolná E, Kautznerová D, Lánská V, Trunečka P, Špičák J. **Význam incidentálních HCC na prognózu pacientů po transplantaci jater.** XXXIII. slovenský a český gastroenterologický kongres. Slovenský a český endoskopický deň. Bratislava, SK. 06.06.2013 - 08.06.2013.

13. Bartáková R, Fraňková S, Oliverius M, Šperl J, Honsová E, Kautznerová D, Lánská V, Trunečka P, Špičák J. **Incidentally found HCC vs. primarily diagnosed HCC: Analysis of liver transplantation outcomes.** European Bridging Meeting in Gastroenterology and EAGEN Postgraduate Course. Berlin, DE. 09.11.2012 - 10.11.2012.
14. Bartáková R, Fraňková S, Oliverius M, Šperl J, Honsová E, Kautznerová D, Lánská V, Trunečka P, Špičák J. **Hepatocelulární karcinom jako indikace k ortotopické transplantaci jater.** 13. studentská vědecká konference. Praha, CZ. 10.05.2012 - 10.05.2012.
15. Bartáková R, Fraňková S, Šperl J, Trunečka P, Adamec M, Špičák J. **"De novo" malignity po ortotopické transplantaci jater – analýza 15 let trvání programu.** 12. studentská vědecká konference. Praha, CZ. 24.05.2011.

Postery

1. Šenkeříková R, Chmelová K, Fraňková S, Lunova M, Trunečka P, Špičák J, Jirsa M, Šperl J. **Genetické faktory u alkoholické nemoci jater.** I. kongres Společnosti pro orgánové transplantace ČLS JEP. Špindlerův Mlýn, CZ. 30.03.2016 - 02.04.2016.
2. Šenkeříková R, Gottfriedová H, Fraňková S, Lunova M, Sticová E, Merta D, Honsová E, Trunečka P, Špičák J, Jirsa M, Šperl J. **Přínos kvantitativního hodnocení fibrózy jater u kandidátů transplantace jater.** I. kongres Společnosti pro orgánové transplantace ČLS JEP. Špindlerův Mlýn, CZ. 30.03.2016 - 02.04.2016.
3. 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.** 8th ELITA-ELTR. Prague, CZ, 18.09.2014 - 19.09.2014.
4. Šenkeříková R, Fraňková S, Šperl J, Oliverius M, Froněk J, Kieslichová E, Filipová H, Kautznerová D, Honsová E, Trunečka P, Špičák J. **Incidental hepatocellular carcinoma: A hidden foe for liver transplant recipients?** ESMO 16th World Congress on Gastrointestinal Cancer. Barcelona, ES, 25.06.2014 - 28.06.2014.
5. Šenkeříková R, Fraňková S, Šperl J, Oliverius M, Kieslichová E, Filipová H, Kautznerová D, Honsová E, Trunečka P, Špičák J. **Risk factors of incidental hepatocellular carcinoma occurrence: Single-center experience.** Digestive Disease Week 2014. Chicago, US. 04.05.2014 - 06.05.2014.
6. Bartáková R, Fraňková S, Oliverius M, Kautznerová D, Šperl J, Honsová E, Trunečka P, Špičák J. **Incidental hepatocellular carcinoma: Analysis of tumor characteristics and liver transplantation outcomes.** Digestive Disease Week 2013. Orlando, US. 18.05.2013 - 21.05.2013.
7. Fraňková S, Bartáková R, Jirsa M, Hejda V, Urbánek P, Merta D, Špičák J, Trunečka P, Šperl J. **CC genotype of rs12979860 IL28B moderates progression of liver fibrosis in HCV-infected patients.** International Liver Congress™ 2013 - 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Amsterdam, NL, 24.04.2013 - 28.04.2013.

8. Bartáková R, Fraňková S, Oliverius M, Šperl J, Honsová E, Kautznerová D, Lánská V, Trunečka P, Špičák J. **Incidentally found HCC vs. primarily diagnosed HCC: analysis of liver transplantation outcomes.** 20th UEG Week 2012. Amsterdam, NL, 20.10.2012 - 24.10.2012.
9. Fraňková S, Bartáková R, Hejda V, Urbánek P, Hubáček J, Lánská V, Trunečka P, Špičák J, Jirsa M, Šperl J. **CC genotype in rs12979860 IL28B polymorphism can prevent progression of liver fibrosis in HCV-infected patients.** Prague Hepatology Meeting 2012. Prague, CZ. 20.09.2012 - 22.09.2012.

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.

8 Přílohy

1. 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.** J Hepatol. 2014 Apr;60(4):773-81. doi: 10.1016/j.jhep.2013.12.011. Epub 2013 Dec 18. PMID: 24361409.
2. 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. 2019 Sep 17;14(9):e0222609. doi: 10.1371/journal.pone.0222609. PMID: 31527889; PMCID: PMC6748417.
3. 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 1: a pilot study.** Ther Clin Risk Manag. 2015 Dec 17;11:1853-61. doi: 10.2147/TCRM.S94010. PMID: 26719699; PMCID: PMC4687952.
4. 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. 2021 Jan 7;16(1):e0244934. doi: 10.1371/journal.pone.0244934. PMID: 33411729; PMCID: PMC7790429.
5. 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.** Physiol Res. 2021 Aug 31;70(4):563-577. doi: 10.33549/physiolres.934626. Epub 2021 Jun 1. PMID: 34062072; PMCID: PMC8820545.

9 Literatura

- Abraldes, J. G., I. Tarantino, J. Turnes, J. C. Garcia-Pagan, J. Rodes and J. Bosch (2003). "Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long-term prognosis of cirrhosis." *Hepatology* **37**(4): 902-908.
- Abul-Husn, N. S., X. Cheng, A. H. Li, Y. Xin, C. Schurmann, P. Stevis, Y. Liu, J. Kozlitina, S. Stender, G. C. Wood, A. N. Stepanchick, M. D. Still, S. McCarthy, C. O'Dushlaine, J. S. Packer, S. Balasubramanian, N. Gosalia, D. Esopi, S. Y. Kim, S. Mukherjee, A. E. Lopez, E. D. Fuller, J. Penn, X. Chu, J. Z. Luo, U. L. Mirshahi, D. J. Carey, C. D. Still, M. D. Feldman, A. Small, S. M. Damrauer, D. J. Rader, B. Zambrowicz, W. Olson, A. J. Murphy, I. B. Borecki, A. R. Shuldiner, J. G. Reid, J. D. Overton, G. D. Yancopoulos, H. H. Hobbs, J. C. Cohen, O. Gottesman, T. M. Teslovich, A. Baras, T. Mirshahi, J. Gromada and F. E. Dewey (2018). "A Protein-Truncating HSD17B13 Variant and Protection from Chronic Liver Disease." *N Engl J Med* **378**(12): 1096-1106.
- Acharya, C. and J. S. Bajaj (2021). "Chronic Liver Diseases and the Microbiome-Translating Our Knowledge of Gut Microbiota to Management of Chronic Liver Disease." *Gastroenterology* **160**(2): 556-572.
- Akira, S., K. Takeda and T. Kaisho (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." *Nat Immunol* **2**(8): 675-680.
- Anstee, Q. M., D. Seth and C. P. Day (2016). "Genetic Factors That Affect Risk of Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Gastroenterology* **150**(8): 1728-1744 e1727.
- Appenrodt, B., F. Grunhage, M. G. Gentemann, L. Thyssen, T. Sauerbruch and F. Lammert (2010). "Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis." *Hepatology* **51**(4): 1327-1333.
- Arnalich, F., D. Lopez-Maderuelo, R. Codoceo, J. Lopez, L. M. Solis-Garrido, C. Capiscol, C. Fernandez-Capitan, R. Madero and C. Montiel (2002). "Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and mortality in patients with severe sepsis." *Clin Exp Immunol* **127**(2): 331-336.
- Arroyo, V., P. Angeli, R. Moreau, R. Jalan, J. Claria, J. Trebicka, J. Fernandez, T. Gustot, P. Caraceni, M. Bernardi, G. C. investigators from the Easl-Clif Consortium and F. European Foundation for the Study of Chronic Liver (2021). "The systemic inflammation hypothesis: Towards a new paradigm of acute decompensation and multiorgan failure in cirrhosis." *J Hepatol* **74**(3): 670-685.
- Arvaniti, V., G. D'Amico, G. Fede, P. Manousou, E. Tsochatzis, M. Pleguezuelo and A. K. Burroughs (2010). "Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis." *Gastroenterology* **139**(4): 1246-1256, 1256 e1241-1245.
- Asrani, S. K., H. Devarbhavi, J. Eaton and P. S. Kamath (2019). "Burden of liver diseases in the world." *J Hepatol* **70**(1): 151-171.
- 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.
- Bajaj, J. S., D. M. Heuman, P. B. Hylemon, A. J. Sanyal, M. B. White, P. Monteith, N. A. Noble, A. B. Unser, K. Daita, A. R. Fisher, M. Sikaroodi and P. M. Gillevet (2014). "Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications." *J Hepatol* **60**(5): 940-947.
- Baldini, M., I. C. Lohman, M. Halonen, R. P. Erickson, P. G. Holt and F. D. Martinez (1999). "A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating

- soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E." *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**(5): 976-983.
- Bedossa, P. (2015). "Reversibility of hepatitis B virus cirrhosis after therapy: who and why?" *Liver Int* **35 Suppl 1**: 78-81.
- Bellentani, S., G. Pozzato, G. Saccoccio, M. Crovatto, L. S. Croce, L. Mazzoran, F. Masutti, G. Cristianini and C. Tiribelli (1999). "Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: report from the Dionysos study." *Gut* **44**(6): 874-880.
- Belli, L. S., M. Berenguer, P. A. Cortesi, M. Strazzabosco, S. R. Rockenschaub, S. Martini, C. Morelli, F. Donato, R. Volpes, G. P. Pageaux, A. Coilly, S. Fagioli, G. Amaddeo, G. Perricone, C. Vinaixa, G. Berlakovich, R. Facchetti, W. Polak, P. Muiesan, C. Duvoux, L. European and A. Intestine (2016). "Delisting of liver transplant candidates with chronic hepatitis C after viral eradication: A European study." *J Hepatol* **65**(3): 524-531.
- Berzigotti, A. and J. Bosch (2014). "Pharmacologic management of portal hypertension." *Clin Liver Dis* **18**(2): 303-317.
- 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.
- Beshay, E., F. Croze and G. J. Prud'homme (2001). "The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram suppress macrophage activation and nitric oxide production in vitro and in vivo." *Clin Immunol* **98**(2): 272-279.
- 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.
- Bonnel, A. R., C. Bunchorntavakul and K. R. Reddy (2011). "Immune dysfunction and infections in patients with cirrhosis." *Clin Gastroenterol Hepatol* **9**(9): 727-738.
- 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.
- Brouwer, W. P., A. J. van der Meer, A. Boonstra, S. D. Pas, R. J. de Knegt, R. A. de Man, B. E. Hansen, F. J. ten Kate and H. L. Janssen (2015). "The impact of PNPLA3 (rs738409 C>G) polymorphisms on liver histology and long-term clinical outcome in chronic hepatitis B patients." *Liver Int* **35**(2): 438-447.
- Bruha, R., M. Jachymova, J. Petrtyl, K. Dvorak, M. Lenicek, P. Urbanek, T. Svestka and L. Vitek (2016). "Osteopontin: A non-invasive parameter of portal hypertension and prognostic marker of cirrhosis." *World J Gastroenterol* **22**(12): 3441-3450.
- Buck, M., G. Garcia-Tsao, R. J. Groszmann, C. Stalling, N. D. Grace, A. K. Burroughs, D. Patch, D. S. Matloff, P. Clopton and M. Chojkier (2014). "Novel inflammatory biomarkers of portal pressure in compensated cirrhosis patients." *Hepatology* **59**(3): 1052-1059.
- Buch, S., F. Stickel, E. Trepo, M. Way, A. Herrmann, H. D. Nischalke, M. Brosch, J. Rosendahl, T. Berg, M. Ridinger, M. Rietschel, A. McQuillin, J. Frank, F. Kiefer, S. Schreiber, W. Lieb, M. Soyka, N. Semmo, E. Aigner, C. Datz, R. Schmelz, S. Bruckner, S. Zeissig, A. M. Stephan, N. Wodarz, J. Deviere, N. Clumeck, C. Sarrazin, F. Lammert, T. Gustot, P. Deltenre, H. Volzke, M. M. Lerch, J. Mayerle, F. Eyer, C. Schafmayer, S. Cichon, M. M. Nothen, M. Nothnagel, D. Ellinghaus, K. Huse, A. Franke, S. Zopf, C. Hellerbrand, C. Moreno, D. Franchimont, M. Y. Morgan and J. Hampe (2015). "A genome-wide association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol-related cirrhosis." *Nat Genet* **47**(12): 1443-1448.
- Bureau, C., S. Metivier, J. M. Peron, J. Selves, M. A. Robic, P. A. Gourraud, O. Rouquet, E. Dupuis, L. Alric and J. P. Vinel (2008). "Transient elastography accurately predicts presence of

- significant portal hypertension in patients with chronic liver disease." *Aliment Pharmacol Ther* **27**(12): 1261-1268.
- Burza, M. A., C. Pirazzi, C. Maglio, K. Sjolholm, R. M. Mancina, P. A. Svensson, P. Jacobson, M. Adiels, M. G. Baroni, J. Boren, S. Ginanni Corradini, T. Montalcini, L. Sjolstrom, L. M. Carlsson and S. Romeo (2012). "PNPLA3 I148M (rs738409) genetic variant is associated with hepatocellular carcinoma in obese individuals." *Dig Liver Dis* **44**(12): 1037-1041.
- Cai, T., J. F. Dufour, B. Muellhaupt, T. Gerlach, M. Heim, D. Moradpour, A. Cerny, R. Malinverni, V. Kaddai, M. Bochud, F. Negro and P. Y. Bochud (2011). "Viral genotype-specific role of PNPLA3, PPARG, MTP, and IL28B in hepatitis C virus-associated steatosis." *J Hepatol* **55**(3): 529-535.
- 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.
- Calvaruso, V., A. P. Dhillon, E. Tsochatzis, P. Manousou, F. Grillo, G. Germani, D. Patch, J. O'Beirne and A. K. Burroughs (2012). "Liver collagen proportionate area predicts decompensation in patients with recurrent hepatitis C virus cirrhosis after liver transplantation." *J Gastroenterol Hepatol* **27**(7): 1227-1232.
- Calvaruso, V., V. Di Marco, M. G. Bavetta, D. Cabibi, E. Conte, F. Bronte, F. Simone, A. K. Burroughs and A. Craxi (2015). "Quantification of fibrosis by collagen proportionate area predicts hepatic decompensation in hepatitis C cirrhosis." *Aliment Pharmacol Ther* **41**(5): 477-486.
- Carlsson, B., D. Linden, G. Brolen, M. Liljeblad, M. Bjursell, S. Romeo and R. Loomba (2020). "Review article: the emerging role of genetics in precision medicine for patients with non-alcoholic steatohepatitis." *Aliment Pharmacol Ther* **51**(12): 1305-1320.
- Castera, L. (2015). "Noninvasive Assessment of Liver Fibrosis." *Dig Dis* **33**(4): 498-503.
- Castera, L., M. Friedrich-Rust and R. Loomba (2019). "Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Gastroenterology* **156**(5): 1264-1281 e1264.
- 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.
- Cirera, I., T. M. Bauer, M. Navasa, J. Vila, L. Grande, P. Taura, J. Fuster, J. C. Garcia-Valdecasas, A. Lacy, M. J. Suarez, A. Rimola and J. Rodes (2001). "Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis." *J Hepatol* **34**(1): 32-37.
- Colli, A., M. Fraquelli, M. Andreoletti, B. Marino, E. Zuccoli and D. Conte (2003). "Severe liver fibrosis or cirrhosis: accuracy of US for detection--analysis of 300 cases." *Radiology* **227**(1): 89-94.
- Conejo, I., M. A. Guardascione, P. Tandon, A. Cachero, J. Castellote, J. G. Abraldes, L. Amitrano, J. Genesca and S. Augustin (2018). "Multicenter External Validation of Risk Stratification Criteria for Patients With Variceal Bleeding." *Clin Gastroenterol Hepatol* **16**(1): 132-139 e138.
- Crews, F. T., R. Bechara, L. A. Brown, D. M. Guidot, P. Mandrekar, S. Oak, L. Qin, G. Szabo, M. Wheeler and J. Zou (2006). "Cytokines and alcohol." *Alcohol Clin Exp Res* **30**(4): 720-730.
- D'Amico, G., J. C. Garcia-Pagan, A. Luca and J. Bosch (2006). "Hepatic vein pressure gradient reduction and prevention of variceal bleeding in cirrhosis: a systematic review." *Gastroenterology* **131**(5): 1611-1624.

- 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.
- Dinarello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." *Blood* **87**(6): 2095-2147.
- Doi, H., T. K. Iyer, E. Carpenter, H. Li, K. M. Chang, R. H. Vonderheide and D. E. Kaplan (2012). "Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-positive B-cell population." *Hepatology* **55**(3): 709-719.
- Dongiovanni, P., S. Petta, C. Maglio, A. L. Fracanzani, R. Pipitone, E. Mozzi, B. M. Motta, D. Kaminska, R. Rametta, S. Grimaudo, S. Pelusi, T. Montalcini, A. Alisi, M. Maggioni, V. Karja, J. Boren, P. Kakela, V. Di Marco, C. Xing, V. Nobili, B. Dallapiccola, A. Craxi, J. Pihlajamaki, S. Fargion, L. Sjostrom, L. M. Carlsson, S. Romeo and L. Valenti (2015). "Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease." *Hepatology* **61**(2): 506-514.
- Duddempudi, A. T. (2012). "Immunology in alcoholic liver disease." *Clin Liver Dis* **16**(4): 687-698.
- El-Omar, E. M., M. Carrington, W. H. Chow, K. E. McColl, J. H. Bream, H. A. Young, J. Herrera, J. Lissowska, C. C. Yuan, N. Rothman, G. Lanyon, M. Martin, J. F. Fraumeni, Jr. and C. S. Rabkin (2000). "Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer." *Nature* **404**(6776): 398-402.
- Elkrief, L., P. E. Rautou, M. Ronot, S. Lambert, M. Dioguardi Burgio, C. Francoz, A. Plessier, F. Durand, D. Valla, D. Lebrech, V. Vilgrain and L. Castera (2015). "Prospective comparison of spleen and liver stiffness by using shear-wave and transient elastography for detection of portal hypertension in cirrhosis." *Radiology* **275**(2): 589-598.
- Elkrief, L., M. Ronot, F. Andrade, M. Dioguardi Burgio, T. Issoufaly, M. Zappa, O. Roux, J. Bissonnette, A. Payance, D. Lebrech, C. Francoz, O. Soubrane, D. Valla, F. Durand, V. Vilgrain, L. Castera and P. E. Rautou (2018). "Non-invasive evaluation of portal hypertension using shear-wave elastography: analysis of two algorithms combining liver and spleen stiffness in 191 patients with cirrhosis." *Aliment Pharmacol Ther* **47**(5): 621-630.
- Emdin, C. A., M. Haas, V. Ajmera, T. G. Simon, J. Homburger, C. Neben, L. Jiang, W. Q. Wei, Q. Feng, A. Zhou, J. Denny, K. Corey, R. Loomba, S. Kathiresan and A. V. Khera (2021). "Association of Genetic Variation With Cirrhosis: A Multi-Trait Genome-Wide Association and Gene-Environment Interaction Study." *Gastroenterology* **160**(5): 1620-1633 e1613.
- Eslam, M., L. Valenti and S. Romeo (2018). "Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact." *J Hepatol* **68**(2): 268-279.
- European Association for Study of, L. and H. Asociacion Latinoamericana para el Estudio del (2015). "EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis." *J Hepatol* **63**(1): 237-264.
- European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e. e. e., P. Clinical Practice Guideline, Chair, E. G. B. representative and m. Panel (2021). "EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis - 2021 update." *J Hepatol* **75**(3): 659-689.
- European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e. e. e. and L. European Association for the Study of the (2017). "EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection." *J Hepatol* **67**(2): 370-398.
- European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e. e. e. and L. European Association for the Study of the (2018). "EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018." *J Hepatol* **69**(2): 461-511.

- 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.
- Falletti, E., C. Fabris, S. Cmet, A. Cussigh, D. Bitetto, E. Fontanini, E. Fornasiere, S. Bignulin, E. Fumolo, E. Bignulin, M. Pirisi and P. Toniutto (2011). "PNPLA3 rs738409C/G polymorphism in cirrhosis: relationship with the aetiology of liver disease and hepatocellular carcinoma occurrence." *Liver Int* **31**(8): 1137-1143.
- Fasolato, S., P. Angeli, L. Dallagnese, G. Maresio, E. Zola, E. Mazza, F. Salinas, S. Dona, S. Faggioli, A. Sticca, G. Zanusi, U. Cillo, I. Frasson, C. Destro and A. Gatta (2007). "Renal failure and bacterial infections in patients with cirrhosis: epidemiology and clinical features." *Hepatology* **45**(1): 223-229.
- Fernandez, J. and T. Gustot (2012). "Management of bacterial infections in cirrhosis." *J Hepatol* **56** Suppl 1: S1-12.
- Fernandez, M., D. Semela, J. Bruix, I. Colle, M. Pinzani and J. Bosch (2009). "Angiogenesis in liver disease." *J Hepatol* **50**(3): 604-620.
- Feu, F., J. C. Garcia-Pagan, J. Bosch, A. Luca, J. Teres, A. Escorsell and J. Rodes (1995). "Relation between portal pressure response to pharmacotherapy and risk of recurrent variceal haemorrhage in patients with cirrhosis." *Lancet* **346**(8982): 1056-1059.
- Flegel, W. A., A. Wolpl, D. N. Mannel and H. Northoff (1989). "Inhibition of endotoxin-induced activation of human monocytes by human lipoproteins." *Infect Immun* **57**(7): 2237-2245.
- Foster, G. R., W. L. Irving, M. C. Cheung, A. J. Walker, B. E. Hudson, S. Verma, J. McLauchlan, D. J. Mutimer, A. Brown, W. T. Gelson, D. C. MacDonald, K. Agarwal and U. K. Hcv Research (2016). "Impact of direct acting antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C and decompensated cirrhosis." *J Hepatol* **64**(6): 1224-1231.
- Friedrich, K., A. Wannhoff, S. Kattner, M. Brune, J. R. Hov, K. H. Weiss, C. Antoni, M. Dollinger, C. Neumann-Haefelin, T. Seufferlein, P. Schemmer, P. Schirmacher, W. Stremmel and D. N. Gotthardt (2014). "PNPLA3 in end-stage liver disease: alcohol consumption, hepatocellular carcinoma development, and transplantation-free survival." *J Gastroenterol Hepatol* **29**(7): 1477-1484.
- 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.
- Ghassemi, S. and G. Garcia-Tsao (2007). "Prevention and treatment of infections in patients with cirrhosis." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **21**(1): 77-93.
- Gibot, S., A. Cariou, L. Drouet, M. Rossignol and L. Ripoll (2002). "Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate." *Crit Care Med* **30**(5): 969-973.
- Gines, P., A. Krag, J. G. Abraldes, E. Sola, N. Fabrellas and P. S. Kamath (2021). "Liver cirrhosis." *Lancet* **398**(10308): 1359-1376.
- Gines, P., E. Sola, P. Angeli, F. Wong, M. K. Nadim and P. S. Kamath (2018). "Hepatorenal syndrome." *Nat Rev Dis Primers* **4**(1): 23.
- 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.
- Guarner, C. and G. Soriano (1997). "Spontaneous bacterial peritonitis." *Semin Liver Dis* **17**(3): 203-217.

- Guechot, J., E. Lasnier, N. Sturm, A. Paris, J. P. Zarski and A. H. E. F. s. group (2010). "Automation of the Hepascore and validation as a biochemical index of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C from the ANRS HC EP 23 Fibrostar cohort." *Clin Chim Acta* **411**(1-2): 86-91.
- Guha, I. N., J. Parkes, P. Roderick, D. Chattopadhyay, R. Cross, S. Harris, P. Kaye, A. D. Burt, S. D. Ryder, G. P. Aithal, C. P. Day and W. M. Rosenberg (2008). "Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers." *Hepatology* **47**(2): 455-460.
- Hoffman, D. H., A. Ayoola, D. Nickel, F. Han, H. Chandarana, J. Babb and K. P. Shanbhogue (2020). "MR elastography, T1 and T2 relaxometry of liver: role in noninvasive assessment of liver function and portal hypertension." *Abdom Radiol (NY)* **45**(9): 2680-2687.
- Holmen, O. L., H. Zhang, Y. Fan, D. H. Hovelson, E. M. Schmidt, W. Zhou, Y. Guo, J. Zhang, A. Langhammer, M. L. Lochen, S. K. Ganesh, L. Vatten, F. Skorpen, H. Dalen, J. Zhang, S. Pennathur, J. Chen, C. Platou, E. B. Mathiesen, T. Wilsgaard, I. Njolstad, M. Boehnke, Y. E. Chen, G. R. Abecasis, K. Hveem and C. J. Willer (2014). "Systematic evaluation of coding variation identifies a candidate causal variant in TM6SF2 influencing total cholesterol and myocardial infarction risk." *Nat Genet* **46**(4): 345-351.
- Horowitz, Y., A. D. Sperber and Y. Almog (2004). "Gram-negative cellulitis complicating cirrhosis." *Mayo Clin Proc* **79**(2): 247-250.
- Hou, J., G. van Oord, Z. M. Groothuisink, M. A. Claassen, K. Kreefft, F. Zaaraoui-Boutahar, I. W. F. van, A. D. Osterhaus, H. L. Janssen, A. C. Andeweg, R. J. de Knecht and A. Boonstra (2014). "Gene expression profiling to predict and assess the consequences of therapy-induced virus eradication in chronic hepatitis C virus infection." *J Virol* **88**(21): 12254-12264.
- Hubacek, J. A., C. Buchler, C. Aslanidis and G. Schmitz (1997). "The genomic organization of the genes for human lipopolysaccharide binding protein (LBP) and bactericidal permeability increasing protein (BPI) is highly conserved." *Biochem Biophys Res Commun* **236**(2): 427-430.
- Chang, T. T., Y. F. Liaw, S. S. Wu, E. Schiff, K. H. Han, C. L. Lai, R. Safadi, S. S. Lee, W. Halota, Z. Goodman, Y. C. Chi, H. Zhang, R. Hindes, U. Iloeje, S. Beebe and B. Kreter (2010). "Long-term entecavir therapy results in the reversal of fibrosis/cirrhosis and continued histological improvement in patients with chronic hepatitis B." *Hepatology* **52**(3): 886-893.
- 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.
- Chu, C. J., F. Y. Lee, S. S. Wang, R. H. Lu, Y. T. Tsai, H. C. Lin, M. C. Hou, C. C. Chan and S. D. Lee (1997). "Hyperdynamic circulation of cirrhotic rats with ascites: role of endotoxin, tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide." *Clin Sci (Lond)* **93**(3): 219-225.
- Isgro, G., V. Calvaruso, L. Andreana, T. V. Luong, M. Garcovich, P. Manousou, A. Alibrandi, S. Maimone, L. Marelli, N. Davies, D. Patch, A. P. Dhillon and A. K. Burroughs (2013). "The relationship between transient elastography and histological collagen proportionate area for assessing fibrosis in chronic viral hepatitis." *J Gastroenterol* **48**(8): 921-929.
- Jabor, A., Z. Kubicek, S. Frankova, R. Senkerikova and J. Franekova (2018). "Enhanced liver fibrosis (ELF) score: Reference ranges, biological variation in healthy subjects, and analytical considerations." *Clin Chim Acta* **483**: 291-295.
- Jalan, R., J. Fernandez, R. Wiest, B. Schnabl, R. Moreau, P. Angeli, V. Stadlbauer, T. Gustot, M. Bernardi, R. Canton, A. Albillos, F. Lammert, A. Wilmer, R. Mookerjee, J. Vila, R. Garcia-

- Martinez, J. Wendon, J. Such, J. Cordoba, A. Sanyal, G. Garcia-Tsao, V. Arroyo, A. Burroughs and P. Gines (2014). "Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference 2013." *J Hepatol* **60**(6): 1310-1324.
- Jansen, C., C. Bogs, W. Verlinden, M. Thiele, P. Moller, J. Gortzen, J. Lehmann, M. Praktijnjo, J. Chang, A. Krag, C. P. Strassburg, S. Francque and J. Trebicka (2016). "Algorithm to rule out clinically significant portal hypertension combining Shear-wave elastography of liver and spleen: a prospective multicentre study." *Gut* **65**(6): 1057-1058.
- Jansen, C., C. Bogs, W. Verlinden, M. Thiele, P. Moller, J. Gortzen, J. Lehmann, T. Vanwollegem, L. Vonghia, M. Praktijnjo, J. Chang, A. Krag, C. P. Strassburg, S. Francque and J. Trebicka (2017). "Shear-wave elastography of the liver and spleen identifies clinically significant portal hypertension: A prospective multicentre study." *Liver Int* **37**(3): 396-405.
- Kaluza, W., E. Reuss, S. Grossmann, R. Hug, R. E. Schopf, P. R. Galle, E. Maerker-Hermann and T. Hoehler (2000). "Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism." *J Invest Dermatol* **114**(6): 1180-1183.
- Kamath, P. S., W. R. Kim and G. Advanced Liver Disease Study (2007). "The model for end-stage liver disease (MELD)." *Hepatology* **45**(3): 797-805.
- Kawaguchi, T., Y. Sumida, A. Umemura, K. Matsuo, M. Takahashi, T. Takamura, K. Yasui, T. Saibara, E. Hashimoto, M. Kawanaka, S. Watanabe, S. Kawata, Y. Imai, M. Kokubo, T. Shima, H. Park, H. Tanaka, K. Tajima, R. Yamada, F. Matsuda, T. Okanoue and D. Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver (2012). "Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese." *PLoS One* **7**(6): e38322.
- Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* **11**(5): 373-384.
- Kawamura, E., N. Yamanaka, E. Okamoto, F. Tomoda and K. Furukawa (1995). "Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury." *Hepatology* **21**(4): 1138-1143.
- Kim, H. Y., Y. H. So, W. Kim, D. W. Ahn, Y. J. Jung, H. Woo, D. Kim, M. Y. Kim and S. K. Baik (2019). "Non-invasive response prediction in prophylactic carvedilol therapy for cirrhotic patients with esophageal varices." *J Hepatol* **70**(3): 412-422.
- Kozlitina, J., E. Smagris, S. Stender, B. G. Nordestgaard, H. H. Zhou, A. Tybjaerg-Hansen, T. F. Vogt, H. H. Hobbs and J. C. Cohen (2014). "Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease." *Nat Genet* **46**(4): 352-356.
- Kusaba, N., R. Kumashiro, H. Ogata, M. Sata and K. Tanikawa (1998). "In vitro study of neutrophil apoptosis in liver cirrhosis." *Intern Med* **37**(1): 11-17.
- Lallukka, S., K. Sevastianova, J. Perttila, A. Hakkarainen, M. Orho-Melander, N. Lundbom, V. M. Oikkinen and H. Yki-Jarvinen (2013). "Adipose tissue is inflamed in NAFLD due to obesity but not in NAFLD due to genetic variation in PNPLA3." *Diabetologia* **56**(4): 886-892.
- Lassailly, G., R. Caiazzo, D. Buob, M. Pigeyre, H. Verkindt, J. Labreuche, V. Raverdy, E. Leteurtre, S. Dharancy, A. Louvet, M. Romon, A. Duhamel, F. Pattou and P. Mathurin (2015). "Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients." *Gastroenterology* **149**(2): 379-388; quiz e315-376.
- Lata, J., O. Stiburek and M. Kopacova (2009). "Spontaneous bacterial peritonitis: a severe complication of liver cirrhosis." *World J Gastroenterol* **15**(44): 5505-5510.

- Lin, J., Y. M. Yao, N. Dong, J. K. Chai, Y. Yu, X. X. Hou, J. M. Zhu and Z. Y. Sheng (2009). "Influence of CD14 polymorphism on CD14 expression in patients with extensive burns." *Burns* **35**(3): 365-371.
- 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.
- Liu, Y. L., G. L. Patman, J. B. Leathart, A. C. Piguet, A. D. Burt, J. F. Dufour, C. P. Day, A. K. Daly, H. L. Reeves and Q. M. Anstee (2014). "Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma." *J Hepatol* **61**(1): 75-81.
- Liu, Y. L., H. L. Reeves, A. D. Burt, D. Tiniakos, S. McPherson, J. B. Leathart, M. E. Allison, G. J. Alexander, A. C. Piguet, R. Anty, P. Donaldson, G. P. Aithal, S. Francque, L. Van Gaal, K. Clement, V. Ratziu, J. F. Dufour, C. P. Day, A. K. Daly and Q. M. Anstee (2014). "TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease." *Nat Commun* **5**: 4309.
- Lunova, M., C. Goehring, D. Kuscuglu, K. Mueller, Y. Chen, P. Walther, J. C. Deschemin, S. Vaulont, J. Haybaeck, C. Lackner, C. Trautwein and P. Strnad (2014). "Hepcidin knockout mice fed with iron-rich diet develop chronic liver injury and liver fibrosis due to lysosomal iron overload." *J Hepatol* **61**(3): 633-641.
- Luo, B., L. Liu, L. Tang, J. Zhang, C. R. Stockard, W. E. Grizzle and M. B. Fallon (2003). "Increased pulmonary vascular endothelin B receptor expression and responsiveness to endothelin-1 in cirrhotic and portal hypertensive rats: a potential mechanism in experimental hepatopulmonary syndrome." *J Hepatol* **38**(5): 556-563.
- 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.
- Mancina, R. M., F. Ferri, A. Farcomeni, A. Molinaro, A. Maffongelli, M. Mischitelli, E. Poli, L. Parlati, M. A. Burza, A. De Santis, F. Attilia, C. Rotondo, M. M. Rando, M. L. Attilia, M. Ceccanti and S. Ginanni Corradini (2019). "A two gene-based risk score predicts alcoholic cirrhosis development in males with at-risk alcohol consumption." *Appl Clin Genet* **12**: 1-10.
- Mandorfer, M., V. Hernandez-Gea, J. C. Garcia-Pagan and T. Reiberger (2020). "Noninvasive Diagnostics for Portal Hypertension: A Comprehensive Review." *Semin Liver Dis* **40**(3): 240-255.
- Mandorfer, M., K. Kozbial, P. Schwabl, C. Freissmuth, R. Schwarzer, R. Stern, D. Chromy, A. F. Stattermayer, T. Reiberger, S. Beinhardt, W. Sieghart, M. Trauner, H. Hofer, A. Ferlitsch, P. Ferenci and M. Peck-Radosavljevic (2016). "Sustained virologic response to interferon-free therapies ameliorates HCV-induced portal hypertension." *J Hepatol* **65**(4): 692-699.
- Marasco, G., E. Dajti, F. Ravaioli, L. V. Alemanni, F. Capuano, K. Gjini, L. Colecchia, G. Puppini, C. Cusumano, M. Renzulli, R. Golfieri, D. Festi and A. Colecchia (2020). "Spleen stiffness measurement for assessing the response to beta-blockers therapy for high-risk esophageal varices patients." *Hepatol Int* **14**(5): 850-857.
- 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.

- Martin, P. Y., P. Gines and R. W. Schrier (1998). "Nitric oxide as a mediator of hemodynamic abnormalities and sodium and water retention in cirrhosis." *N Engl J Med* **339**(8): 533-541.
- McAvoy, N. C., S. Semple, J. M. Richards, A. J. Robson, D. Patel, A. G. Jardine, K. Leyland, A. S. Cooper, D. E. Newby and P. C. Hayes (2016). "Differential visceral blood flow in the hyperdynamic circulation of patients with liver cirrhosis." *Aliment Pharmacol Ther* **43**(9): 947-954.
- Mencin, A., J. Kluwe and R. F. Schwabe (2009). "Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases." *Gut* **58**(5): 704-720.
- Merkel, C., M. Bolognesi, S. Bellon, R. Zuin, F. Noventa, G. Finucci, D. Sacerdoti, P. Angeli and A. Gatta (1992). "Prognostic usefulness of hepatic vein catheterization in patients with cirrhosis and esophageal varices." *Gastroenterology* **102**(3): 973-979.
- Miele, L., T. De Michele, G. Marrone, M. Antonietta Isgro, U. Basile, C. Cefalo, M. Biolato, F. Maria Vecchio, G. Lodovico Rapaccini, A. Gasbarrini, C. Zuppi and A. Grieco (2017). "Enhanced liver fibrosis test as a reliable tool for assessing fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease in a clinical setting." *Int J Biol Markers* **32**(4): e397-e402.
- Millonig, G., S. Friedrich, S. Adolf, H. Fonouni, M. Golriz, A. Mehrabi, P. Stiefel, G. Poschl, M. W. Buchler, H. K. Seitz and S. Mueller (2010). "Liver stiffness is directly influenced by central venous pressure." *J Hepatol* **52**(2): 206-210.
- 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.
- Muller, T., S. Buch, T. Berg, J. Hampe and F. Stickel (2011). "Distinct, alcohol-modulated effects of PNPLA3 genotype on progression of chronic hepatitis C." *J Hepatol* **55**(3): 732-733.
- Navasa, M. and J. Rodes (2004). "Bacterial infections in cirrhosis." *Liver Int* **24**(4): 277-280.
- Niederau, C., S. Lange, T. Heintges, A. Erhardt, M. Buschkamp, D. Hurter, M. Nawrocki, L. Kruska, F. Hensel, W. Petry and D. Haussinger (1998). "Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study." *Hepatology* **28**(6): 1687-1695.
- Nielsen, K., J. O. Clemmesen, E. Vassiliadis and B. Vainer (2014). "Liver collagen in cirrhosis correlates with portal hypertension and liver dysfunction." *APMIS* **122**(12): 1213-1222.
- 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.
- Opal, S. M. and C. T. Esmon (2003). "Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis." *Crit Care* **7**(1): 23-38.
- 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.
- Perez-Paramo, M., J. Munoz, A. Albillos, I. Freile, F. Portero, M. Santos and J. Ortiz-Berrocal (2000). "Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites." *Hepatology* **31**(1): 43-48.
- 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.
- Petta, S., L. Miele, E. Bugianesi, C. Camma, C. Rosso, S. Boccia, D. Cabibi, V. Di Marco, S. Grimaudo, A. Grieco, R. M. Pipitone, G. Marchesini and A. Craxi (2014). "Glucokinase regulatory protein

- gene polymorphism affects liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease." *PLoS One* **9**(2): e87523.
- Piano, S., A. Brocca, S. Mareso and P. Angeli (2018). "Infections complicating cirrhosis." *Liver Int* **38 Suppl 1**: 126-133.
- 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.
- Poynard, T., P. Bedossa and P. Opolon (1997). "Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups." *Lancet* **349**(9055): 825-832.
- Poynard, T., M. Colombo, J. Bruix, E. Schiff, R. Terg, S. Flamm, R. Moreno-Otero, F. Carrilho, W. Schmidt, T. Berg, T. McGarrity, E. J. Heathcote, F. Goncales, M. Diago, A. Craxi, M. Silva, P. Bedossa, P. Mukhopadhyay, L. Griffel, M. Burroughs, C. Brass, J. Albrecht and G. Epic Study (2009). "Peginterferon alfa-2b and ribavirin: effective in patients with hepatitis C who failed interferon alfa/ribavirin therapy." *Gastroenterology* **136**(5): 1618-1628 e1612.
- Poynard, T., P. Marcellin, S. S. Lee, C. Niederau, G. S. Minuk, G. Ideo, V. Bain, J. Heathcote, S. Zeuzem, C. Trepo and J. Albrecht (1998). "Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT)." *Lancet* **352**(9138): 1426-1432.
- Poynard, T., J. McHutchison, M. Manns, C. Trepo, K. Lindsay, Z. Goodman, M. H. Ling and J. Albrecht (2002). "Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C." *Gastroenterology* **122**(5): 1303-1313.
- Preda, C. M., R. Ghita, C. Ghita, C. Mindru, L. Vlaicu, A. Andrei, S. Andrei and M. Diculescu (2011). "A retrospective study of bacterial infections in cirrhosis." *Maedica (Bucur)* **6**(3): 185-192.
- 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.
- Prokunina-Olsson, L., B. Muchmore, W. Tang, R. M. Pfeiffer, H. Park, H. Dickensheets, D. Hergott, P. Porter-Gill, A. Mumy, I. Kohaar, S. Chen, N. Brand, M. Tarway, L. Liu, F. Sheikh, J. Astemborski, H. L. Bonkovsky, B. R. Edlin, C. D. Howell, T. R. Morgan, D. L. Thomas, B. Rehermann, R. P. Donnelly and T. R. O'Brien (2013). "A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus." *Nat Genet* **45**(2): 164-171.
- Rallabhandi, P., J. Bell, M. S. Boukhvalova, A. Medvedev, E. Lorenz, M. Ardit, V. G. Hemming, J. C. Blanco, D. M. Segal and S. N. Vogel (2006). "Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling." *J Immunol* **177**(1): 322-332.
- Ramachandran, A. and K. A. Balasubramanian (2001). "Intestinal dysfunction in liver cirrhosis: Its role in spontaneous bacterial peritonitis." *J Gastroenterol Hepatol* **16**(6): 607-612.
- 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.
- Rockey, D. (1997). "The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide." *Hepatology* **25**(1): 2-5.
- Rolla, G. (2003). "Is nitric oxide the ultimate mediator in hepatopulmonary syndrome?" *J Hepatol* **38**(5): 668-670.

- Romeo, S., J. Kozlitina, C. Xing, A. Pertsemlidis, D. Cox, L. A. Pennacchio, E. Boerwinkle, J. C. Cohen and H. H. Hobbs (2008). "Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease." *Nat Genet* **40**(12): 1461-1465.
- Rotman, Y., C. Koh, J. M. Zmuda, D. E. Kleiner, T. J. Liang and C. R. N. Nash (2010). "The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* **52**(3): 894-903.
- Runyon, B. A., R. L. Morrissey, J. C. Hoefs and F. A. Wyle (1985). "Opsonic activity of human ascitic fluid: a potentially important protective mechanism against spontaneous bacterial peritonitis." *Hepatology* **5**(4): 634-637.
- San Juan, F. and M. Cortes (2011). "Mortality on the waiting list for liver transplantation: management and prioritization criteria." *Transplant Proc* **43**(3): 687-689.
- Santoro, N., C. K. Zhang, H. Zhao, A. J. Pakstis, G. Kim, R. Kursawe, D. J. Dykas, A. E. Bale, C. Giannini, B. Pierpont, M. M. Shaw, L. Groop and S. Caprio (2012). "Variant in the glucokinase regulatory protein (GCKR) gene is associated with fatty liver in obese children and adolescents." *Hepatology* **55**(3): 781-789.
- Santtila, S., K. Savinainen and M. Hurme (1998). "Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro." *Scand J Immunol* **47**(3): 195-198.
- Sarasin-Filipowicz, M., E. J. Oakeley, F. H. Duong, V. Christen, L. Terracciano, W. Filipowicz and M. H. Heim (2008). "Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(19): 7034-7039.
- Seki, E. and D. A. Brenner (2008). "Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update." *Hepatology* **48**(1): 322-335.
- Semmler, G., B. Scheiner, P. Schwabl, T. Bucsecs, R. Paternostro, D. Chromy, A. F. Stattermayer, M. Trauner, M. Mandorfer, A. Ferlitsch and T. Reiberger (2019). "The impact of hepatic steatosis on portal hypertension." *PLoS One* **14**(11): e0224506.
- Shawcross, D. L., G. A. Wright, V. Stadlbauer, S. J. Hodges, N. A. Davies, C. Wheeler-Jones, A. A. Pitsillides and R. Jalan (2008). "Ammonia impairs neutrophil phagocytic function in liver disease." *Hepatology* **48**(4): 1202-1212.
- Shi, K. Q., Y. C. Fan, Z. Z. Pan, X. F. Lin, W. Y. Liu, Y. P. Chen and M. H. Zheng (2013). "Transient elastography: a meta-analysis of diagnostic accuracy in evaluation of portal hypertension in chronic liver disease." *Liver Int* **33**(1): 62-71.
- 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.
- Schroder, N. W. and R. R. Schumann (2005). "Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease." *Lancet Infect Dis* **5**(3): 156-164.
- Schumann, R. R. (1992). "Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review." *Res Immunol* **143**(1): 11-15.
- Schuppan, D. and N. H. Afdhal (2008). "Liver cirrhosis." *Lancet* **371**(9615): 838-851.
- Simbrunner, B., R. Marculescu, B. Scheiner, P. Schwabl, T. Bucsecs, A. Stadlmann, D. J. M. Bauer, R. Paternostro, E. Eigenbauer, M. Pinter, A. F. Stattermayer, 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.

- Simpson, P. D., E. Moysi, K. Wicks, K. Sudan, S. L. Rowland-Jones, A. J. McMichael, J. Knight and G. M. Gillespie (2012). "Functional differences exist between TNF α promoters encoding the common -237G SNP and the rarer HLA-B*5701-linked A variant." *PLoS One* **7**(7): e40100.
- 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.
- Sole, C., S. Guilly, K. Da Silva, M. Llopis, E. Le-Chatelier, P. Huelin, M. Carol, R. Moreira, N. Fabrellas, G. De Prada, L. Napoleone, I. Graupera, E. Pose, A. Juanola, N. Borrueal, M. Berland, D. Toapanta, F. Casellas, F. Guarner, J. Dore, E. Sola, S. D. Ehrlich and P. Gines (2021). "Alterations in Gut Microbiome in Cirrhosis as Assessed by Quantitative Metagenomics: Relationship With Acute-on-Chronic Liver Failure and Prognosis." *Gastroenterology* **160**(1): 206-218 e213.
- Sookoian, S., G. O. Castano, A. L. Burgueno, T. F. Gianotti, M. S. Rosselli and C. J. Pirola (2009). "A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity." *J Lipid Res* **50**(10): 2111-2116.
- Speliotes, E. K., L. M. Yerges-Armstrong, J. Wu, R. Hernaez, L. J. Kim, C. D. Palmer, V. Gudnason, G. Eiriksdottir, M. E. Garcia, L. J. Launer, M. A. Nalls, J. M. Clark, B. D. Mitchell, A. R. Shuldiner, J. L. Butler, M. Tomas, U. Hoffmann, S. J. Hwang, J. M. Massaro, C. J. O'Donnell, D. V. Sahani, V. Salomaa, E. E. Schadt, S. M. Schwartz, D. S. Siscovick, C. R. N. Nash, G. Consortium, M. Investigators, B. F. Voight, J. J. Carr, M. F. Feitosa, T. B. Harris, C. S. Fox, A. V. Smith, W. H. Kao, J. N. Hirschhorn, I. B. Borecki and G. Consortium (2011). "Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits." *PLoS Genet* **7**(3): e1001324.
- Stadlbauer, V., R. P. Mookerjee, S. Hodges, G. A. Wright, N. A. Davies and R. Jalan (2008). "Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis." *J Hepatol* **48**(6): 945-951.
- Stefanescu, H., C. Rusu, M. Lupsor-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.
- Stender, S., J. Kozlitina, B. G. Nordestgaard, A. Tybjaerg-Hansen, H. H. Hobbs and J. C. Cohen (2017). "Adiposity amplifies the genetic risk of fatty liver disease conferred by multiple loci." *Nat Genet* **49**(6): 842-847.
- Stickel, F., S. Buch, K. Lau, H. Meyer zu Schwabedissen, T. Berg, M. Ridinger, M. Rietschel, C. Schafmayer, F. Braun, H. Hinrichsen, R. Gunther, A. Arlt, M. Seeger, S. Muller, H. K. Seitz, M. Soyka, M. Lerch, F. Lammert, C. Sarrazin, R. Kubitz, D. Haussinger, C. Hellerbrand, D. Broring, S. Schreiber, F. Kiefer, R. Spanagel, K. Mann, C. Datz, M. Krawczak, N. Wodarz, H. Volzke and J. Hampe (2011). "Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians." *Hepatology* **53**(1): 86-95.
- Stickel, F., C. Moreno, J. Hampe and M. Y. Morgan (2017). "The genetics of alcohol dependence and alcohol-related liver disease." *J Hepatol* **66**(1): 195-211.
- Surakka, I., M. Horikoshi, R. Magi, A. P. Sarin, A. Mahajan, V. Lagou, L. Marullo, T. Ferreira, B. Miraglio, S. Timonen, J. Kettunen, M. Pirinen, J. Karjalainen, G. Thorleifsson, S. Hagg, J. J. Hottenga, A. Isaacs, C. Ladenvall, M. Beekman, T. Esko, J. S. Ried, C. P. Nelson, C. Willenborg, S. Gustafsson, H. J. Westra, M. Blades, A. J. de Craen, E. J. de Geus, J. Deelen, H. Grallert, A. Hamsten, A. S. Havulinna, C. Hengstenberg, J. J. Houwing-Duistermaat, E. Hypponen, L. C. Karssen, T. Lehtimaki, V. Lyssenko, P. K. Magnusson, E. Mihailov, M. Muller-Nurasyid, J. P. Mpindi, N. L. Pedersen, B. W. Penninx, M. Perola, T. H. Pers, A. Peters, J. Rung, J. H. Smit, V.

- Steinthorsdottir, M. D. Tobin, N. Tsernikova, E. M. van Leeuwen, J. S. Viikari, S. M. Willems, G. Willemsen, H. Schunkert, J. Erdmann, N. J. Samani, J. Kaprio, L. Lind, C. Gieger, A. Metspalu, P. E. Slagboom, L. Groop, C. M. van Duijn, J. G. Eriksson, A. Jula, V. Salomaa, D. I. Boomsma, C. Power, O. T. Raitakari, E. Ingelsson, M. R. Jarvelin, U. Thorsteinsdottir, L. Franke, E. Ikonen, O. Kallioniemi, V. Pietiainen, C. M. Lindgren, K. Stefansson, A. Palotie, M. I. McCarthy, A. P. Morris, I. Prokopenko, S. Ripatti and E. Consortium (2015). "The impact of low-frequency and rare variants on lipid levels." *Nat Genet* **47**(6): 589-597.
- Sztrymf, B., J. M. Libert, C. Mougeot, D. Lebec, M. Mazmanian, M. Humbert and P. Herve (2005). "Cirrhotic rats with bacterial translocation have higher incidence and severity of hepatopulmonary syndrome." *J Gastroenterol Hepatol* **20**(10): 1538-1544.
- Tandon, P. and G. Garcia-Tsao (2008). "Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis." *Semin Liver Dis* **28**(1): 26-42.
- Tang, A., G. Cloutier, N. M. Szeverenyi and C. B. Sirlin (2015). "Ultrasound Elastography and MR Elastography for Assessing Liver Fibrosis: Part 1, Principles and Techniques." *AJR Am J Roentgenol* **205**(1): 22-32.
- Taylor, M. W., T. Tsukahara, J. N. McClintick, H. J. Edenberg and P. Kwo (2008). "Cyclic changes in gene expression induced by Peg-interferon alfa-2b plus ribavirin in peripheral blood monocytes (PBMC) of hepatitis C patients during the first 10 weeks of treatment." *J Transl Med* **6**: 66.
- Tazi, K. A., J. J. Quioc, V. Saada, A. Bezeaud, D. Lebec and R. Moreau (2006). "Upregulation of TNF-alpha production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: possible role of Akt and IRAK-M." *J Hepatol* **45**(2): 280-289.
- Teixeira, A. C., C. T. Mendes, Jr., L. A. Marano, N. H. Deghaide, M. Secaf, J. Elias, Jr., V. Muglia, E. A. Donadi and A. L. Martinelli (2013). "Alleles and genotypes of polymorphisms of IL-18, TNF-alpha and IFN-gamma are associated with a higher risk and severity of hepatocellular carcinoma (HCC) in Brazil." *Hum Immunol* **74**(8): 1024-1029.
- Tian, C., R. P. Stokowski, D. Kershenovich, D. G. Ballinger and D. A. Hinds (2010). "Variant in PNPLA3 is associated with alcoholic liver disease." *Nat Genet* **42**(1): 21-23.
- Tian, Z., Y. Chen and B. Gao (2013). "Natural killer cells in liver disease." *Hepatology* **57**(4): 1654-1662.
- Trepo, E., P. Nahon, G. Bontempi, L. Valenti, E. Falletti, H. D. Nischalke, S. Hamza, S. G. Corradini, M. A. Burza, E. Guyot, B. Donati, U. Spengler, P. Hillon, P. Toniutto, J. Henrion, D. Franchimont, J. Deviere, P. Mathurin, C. Moreno, S. Romeo and P. Deltenre (2014). "Association between the PNPLA3 (rs738409 C>G) variant and hepatocellular carcinoma: Evidence from a meta-analysis of individual participant data." *Hepatology* **59**(6): 2170-2177.
- 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.
- Udalova, I. A., A. Richardson, A. Denys, C. Smith, H. Ackerman, B. Foxwell and D. Kwiatkowski (2000). "Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region." *Mol Cell Biol* **20**(24): 9113-9119.

- Uesugi, T., M. Froh, G. E. Arteel, B. U. Bradford and R. G. Thurman (2001). "Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice." *Hepatology* **34**(1): 101-108.
- Uchihara, M., N. Izumi, C. Sato and F. Marumo (1992). "Clinical significance of elevated plasma endothelin concentration in patients with cirrhosis." *Hepatology* **16**(1): 95-99.
- Urbánek, P., R. Brůha and kolektiv. (2022). *Hepatologie*. Praha, Grada Publishing a.s.
- Vallance, P. and S. Moncada (1991). "Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide?" *Lancet* **337**(8744): 776-778.
- van der Meer, A. J., B. J. Veldt, J. J. Feld, H. Wedemeyer, J. F. Dufour, F. Lammert, A. Duarte-Rojo, E. J. Heathcote, M. P. Manns, L. Kuske, S. Zeuzem, W. P. Hofmann, R. J. de Knegt, B. E. Hansen and H. L. Janssen (2012). "Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis." *JAMA* **308**(24): 2584-2593.
- 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.
- Wang, Y., N. Kory, S. BasuRay, J. C. Cohen and H. H. Hobbs (2019). "PNPLA3, CGI-58, and Inhibition of Hepatic Triglyceride Hydrolysis in Mice." *Hepatology* **69**(6): 2427-2441.
- Wanless, I. R., E. Nakashima and M. Sherman (2000). "Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis." *Arch Pathol Lab Med* **124**(11): 1599-1607.
- Wen, Y., J. Y. Wang and P. Liu (2003). "[Tumor necrosis factor-alpha enhances the effect of endothelin on renal vasoconstriction in isolated perfused rat kidney]." *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* **11**(10): 583-585.
- Wheeler, M. D., H. Kono, M. Yin, M. Nakagami, T. Uesugi, G. E. Arteel, E. Gabele, I. Rusyn, S. Yamashina, M. Froh, Y. Adachi, Y. Iimuro, B. U. Bradford, O. M. Smutney, H. D. Connor, R. P. Mason, S. M. Goyert, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, R. J. Samulski and R. G. Thurman (2001). "The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease." *Free Radic Biol Med* **31**(12): 1544-1549.
- Wiesner, R., E. Edwards, R. Freeman, A. Harper, R. Kim, P. Kamath, W. Kremers, J. Lake, T. Howard, R. M. Merion, R. A. Wolfe, R. Krom and C. United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score (2003). "Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers." *Gastroenterology* **124**(1): 91-96.
- Wiesner, R. H., S. V. McDiarmid, P. S. Kamath, E. B. Edwards, M. Malinchoc, W. K. Kremers, R. A. Krom and W. R. Kim (2001). "MELD and PELD: application of survival models to liver allocation." *Liver Transpl* **7**(7): 567-580.
- Wiest, R. and R. J. Groszmann (2002). "The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough." *Hepatology* **35**(2): 478-491.
- Wiest, R., M. Lawson and M. Geuking (2014). "Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis." *J Hepatol* **60**(1): 197-209.
- 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.
- Yamamoto, M. and K. Takeda (2010). "Current views of toll-like receptor signaling pathways." *Gastroenterol Res Pract* **2010**: 240365.
- Yang, C., M. Yin, K. J. Glaser, X. Zhu, K. Xu, R. L. Ehman and J. Chen (2017). "Static and dynamic liver stiffness: An ex vivo porcine liver study using MR elastography." *Magn Reson Imaging* **44**: 92-95.

- Yang, J., E. Trepo, P. Nahon, Q. Cao, C. Moreno, E. Letouze, S. Imbeaud, T. Gustot, J. Deviere, S. DeBette, P. Amouyel, P. Bioulac-Sage, J. Calderaro, N. Ganne-Carrie, A. Laurent, J. F. Blanc, E. Guyot, A. Sutton, M. Ziol, J. Zucman-Rossi and J. C. Nault (2019). "PNPLA3 and TM6SF2 variants as risk factors of hepatocellular carcinoma across various etiologies and severity of underlying liver diseases." *Int J Cancer* **144**(3): 533-544.
- Yarpuzlu, B., M. Ayyildiz, O. E. Tok, R. G. Aktas and C. Basdogan (2014). "Correlation between the mechanical and histological properties of liver tissue." *J Mech Behav Biomed Mater* **29**: 403-416.
- Yin, M., B. U. Bradford, M. D. Wheeler, T. Uesugi, M. Froh, S. M. Goyert and R. G. Thurman (2001). "Reduced early alcohol-induced liver injury in CD14-deficient mice." *J Immunol* **166**(7): 4737-4742.
- Yin, M., A. Kolipaka, D. A. Woodrum, K. J. Glaser, A. J. Romano, A. Manduca, J. A. Talwalkar, P. A. Araoz, K. P. McGee, N. S. Anavekar and R. L. Ehman (2013). "Hepatic and splenic stiffness augmentation assessed with MR elastography in an in vivo porcine portal hypertension model." *J Magn Reson Imaging* **38**(4): 809-815.
- Younossi, Z. M. and M. Stepanova (2011). "Changes in hepatitis A and B vaccination rates in adult patients with chronic liver diseases and diabetes in the U.S. population." *Hepatology* **54**(4): 1167-1178.
- Zampino, R., N. Coppola, G. Cirillo, A. Boemio, A. Grandone, M. Stanzione, N. Capoluongo, A. Marrone, M. Macera, E. Sagnelli, L. E. Adinolfi and E. M. del Giudice (2015). "Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing 3 I148M Variant Is Associated with Liver Steatosis and Fat Distribution in Chronic Hepatitis B." *Dig Dis Sci* **60**(10): 3005-3010.