

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorský studijní program v biomedicině

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Karel Dvořák

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

Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on development of non-alcoholic fatty liver disease in experiment, prevalence in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome, non-invasive diagnostics.

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Radan Brůha, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval 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, 21.07.2015

KAREL DVOŘÁK

Podpis

Identifikační záznam:

DVOŘÁK, Karel. *Vliv n-3 polynenasycených mastných kyselin na rozvoj nealkoholového jaterního postižení v experimentu, výskyt u pacientů s diabetem mellitem 2. typu a metabolickým syndromem, možnosti neinvazivní diagnostiky. [Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on development of non-alcoholic fatty liver disease in experiment, prevalence in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome, non-invasive diagnostics]*. Praha, 2015. 89s., Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 4. interní klinika. Školitel doc. MUDr. Radan Brůha, CSc.

Abstrakt

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

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

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

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

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

Klíčová slova: n-3 polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), nealkoholové postižení jater (NAFLD), nealkoholová steatohepatitida (NASH), diabetes mellitus 2. typu, metabolický syndrom, prevalence, neinvazivní diagnostika

Abstract

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

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

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

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

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

Key words: n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), non-alcoholic steatohepatitis (NASH), type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome, prevalence, non-invasive diagnostics

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Poděkování	7
Seznam použitých zkratk	8
ÚVOD	10
Definice	10
Epidemiologie.....	11
Přirozený průběh.....	12
Patogeneze	14
Experimentální modely NAFLD	17
n-3 polynenasycené mastné kyseliny a jejich význam pro játra.....	18
Diagnostika	21
Jaterní biopsie	22
Neinvazivní diagnostika NASH.....	22
Neinvazivní diagnostika jaterní fibrózy	23
HYPOTÉZY A CÍLE	25
Experimentální část	25
Klinická část	25
METODY	26
Experimentální část	26
Klinická část	30
Skupina diabetiků 2. typu	30
Skupina pacientů s NAFLD	33
VÝSLEDKY	36
Experimentální část	36
Klinická část	48
Skupina diabetiků 2. typu	48
Skupina pacientů s NAFLD	51
DISKUSE	60
ZÁVĚRY	71
LITERATURA	72

Poděkování

Autor práce by chtěl touto cestou poděkovat v první řadě svému školiteli doc. MUDr. Radanu Brůhovi, CSc. za cenné připomínky a podporu, dále spolupracovníkům ze IV. interní kliniky, jmenovitě přednostovi kliniky panu prof. MUDr. Aleši Žákovi, DrSc., spolupracovníkům z Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky a Ústavu patologie 1. LF UK a VFN, bez jejichž pomoci by nebylo možné práci uskutečnit. Stejně tak by ji nebylo možné uskutečnit bez podpory vedení 1. lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Autor by rád poděkoval také kolektivu spolupracovníků z Ústavu analýzy potravin a výživy VŠCHT v Praze.

Seznam použitých zkratk

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

VEGF vascular endothelial growth factor
VLDL very low density lipoprotein - lipoprotein o velmi nízké hustotě
WHO Světová zdravotnická organizace

ÚVOD

NAFLD (z anglického non-alcoholic fatty liver disease, česky tedy nealkoholové postižení jater při steatóze) zahrnuje spektrum patologických stavů od prosté jaterní steatózy přes nealkoholovou steatohepatitidu (NASH), která se kromě steatózy vyznačuje ještě známkami zánětlivého postižení jaterního parenchymu a eventuálně různým stupněm fibrózy, až po jaterní cirhózu s jejími možnými komplikacemi včetně portální hypertenze a hepatocelulárního karcinomu (Angulo, 2002). Po dlouhou dobu byla steatóza jater považována za benigní nález. V posledních desetiletích se však ukázalo, že NAFLD představuje významný patologický stav, a v současnosti vzbuzuje zájem nejen hepatologů. Nealkoholická steatohepatitida byla jako nosologická jednotka popsána a pojmenována v roce 1980 (Ludwig et al., 1980), předmětem intenzivního studia je až od 90. let 20. století. Nyní je tento stav považován za integrální součást metabolického syndromu a podle současných poznatků se jedná o nejčastější chronické jaterní onemocnění moderního (nejen západního) světa, jehož incidence bude díky vzrůstajícímu výskytu nadváhy nejspíše dále narůstat.

Definice

Definice NAFLD spočívá v průkazu přítomnosti steatózy jater (zobrazovacími metodami nebo histologicky) a ve vyloučení jiných příčin sekundární akumulace tuku v játrech jako jsou – nadměrná konzumace alkoholu, užívání určitých léků, vybrané patologické metabolické stavy (Tabulka 1) a prakticky všechny chronické jaterní choroby (Chalasanani et al., 2012). U většiny pacientů je NAFLD spojeno s výskytem metabolických rizikových faktorů jako obezita, diabetes mellitus 2. typu (DM2) a dyslipidémie. NAFLD můžeme podle histologického nálezu rozdělit na prostou steatózu a nealkoholovou steatohepatitidu (NASH). Steatóza je definována jako přítomnost tukových inkluzí v cytoplazmě hepatocytů u více než 5 % hepatocytů při histologickém vyšetření. U NASH jsou kromě steatózy přítomny ještě zánětlivé změny, známky poškození hepatocytů (tzv. ballooning) a dále může, ale nemusí, být přítomna jaterní fibróza.

Tabulka 1. Sekundární příčiny steatózy jater (Chalasanani et al., 2012) upraveno

Alkohol	více než 40g/den u mužů, 20g/den u žen
Léky	cytostatika (většina) antibiotika (tetracyklíny) amiodaron estrogeny kortikosteroidy tamoxifen
jiné metabolické příčiny	célie malnutrice, rychlý váhový úbytek parenterální výživa syndrom krátkého střeva

Epidemiologie

NAFLD se vyskytuje po celém světě a jeho prevalence odpovídá převážně výskytu obezity a DM2. Prevalence je tak nejvyšší v zemích s nejvyšším výskytem těchto stavů, tedy Spojených státech amerických (34 %) (Browning et al., 2004), nejnižší v zemích, kde jsou obezita a diabetes nejnižší, jako je například venkovské oblasti Indie (9 %) (Das et al., 2010). Epidemiologické studie užívající jako screeningový test zvýšené sérové hodnoty aminotransferáz nacházejí jejich nevysvětlené zvýšení u 3 - 6 % běžné populace. Interpretace těchto údajů je však obtížná, protože většina pacientů s NAFLD má aktivitu aminotransferáz normální. Studie založené na ultrasonografickém vyšetření jater nebo užívající magnetickou rezonanční (MR) spektroskopii, což jsou senzitivnější metody než zvýšené jaterní testy, konzistentně ukazují prevalenci NAFLD mezi 20 a 30 % v západních zemích, na Blízkém východě a v Japonsku (Bedogni et al., 2005, Szczepaniak et al., 2005, Zelber-Sagi et al., 2006).

Za posledních několik desetiletí v souvislosti s nárůstem obezity a diabetu stoupá i prevalence NAFLD. To ukazuje například práce z Japonska dokumentující nárůst steatózy jater z 12,6 % v roce 1989 na 28,4 % v roce 2000 (Okanoue et al., 2011). V rozvojových zemích je zatím prevalence nižší, ale díky socioekonomickým změnám, zejména změnám životního stylu a přechodu na západní způsob stravování se prevalence NAFLD zvyšuje i tam. Například dvě práce ze Srí Lanky ukazují prakticky dvojnásobný výskyt NAFLD v tamější městské populaci ve srovnání s venkovem (32,6 % vs 17,9 %) (Dassanayake et al., 2009, Pinidiyapathirage et al., 2011) .

Určit přesnou prevalenci jednotlivých subtypů NAFLD je obtížné, protože stále chybí dostatečně senzitivní a specifické diagnostické markery jednotlivých subtypů této choroby. Bývá uváděno, že pacienti s NASH tvoří přibližně 30 % pacientů s NAFLD (Ekstedt et al., 2006). Diagnóza NASH či kvantifikace jaterní fibrózy vyžaduje, nebo alespoň do nedávna vyžadovala, jaterní biopsii. Autoptická studie publikovaná v roce 1990 udává prevalenci NASH 2,7 % u štíhlých jedinců, u obézních byla prevalence NASH 19% a cirhózy 1,8 % (Wanless, Lentz, 1990). Ve skupině žijících potenciálních dárců jaterních štěpů se prevalence NASH a jaterní cirhózy pohybovala kolem 20 % respektive 2 % (Minervini et al., 2009).

U rizikových skupin pacientů je však prevalence NAFLD výrazně vyšší. Mezi dobře dokumentované rizikové faktory NAFLD patří akumulace viscerálního tuku a obezita. U pacientů s těžkou obezitou podstupujících bariatrický výkon se NAFLD vyskytuje ve více než 90 % a až 5 % těchto pacientů má neočekávanou cirhózu (Machado et al., 2006). Velmi vysoká prevalence NAFLD je rovněž přítomna u pacientů s DM2, kde se podle různých prací vyskytuje ve více než 80 % (Leite et al., 2009). Další skupinu pacientů s vysokým výskytem NAFLD představují pacienti s dyslipidemií, zejména s hypertriglyceridemií a nízkým HDL-cholesterolem. U těchto pacientů se NAFLD vyskytuje cca v 50 % (Assy et al., 2000).

Více než jedna miliarda lidí na světě má nadváhu, kolem 300 milionů lidí bylo obézních dle údajů WHO z roku 2000, na rok 2015 se předpokládá až 700 miliónů osob ve věku nad 15 let. Narůstající prevalence obezity dosahuje i v Evropě epidemických rozměrů, a je nejvyšší právě v zemích střední a východní Evropy. V České republice nadváhou trpí 64 % mužů a 49 % žen, obezních je 23 % mužů, 21 % žen. S obezitou souvisí i narůstající prevalence s ní spjatých komplikací. Prevalence diabetu mellitu se v České republice pohybuje kolem 8 % (Kunesova, 2011).

Přirozený průběh

NAFLD začíná akumulací tuku v játrech a ta je rizikovým faktorem pro další progresi choroby. Ačkoli jsou rizikové faktory pro akumulaci tuku a fibrózy v játrech u NAFLD známy (věk > 50 let, obezita, inzulínová rezistence, DM2, zvýšená hladina ferritinu, spekuluje se o významu polymorfizmů pentatin-like phospholipase domain-containing proteinu 3 (PNPLA3), patofyziologické mechanismy, kterými tyto rizikové faktory způsobují progresi

NAFLD, jsou známy méně. Vznik jaterní fibrózy je udáván u 40 - 50 % pacientů s NASH a současné odhady udávají vznik NASH u 30 – 40 % pacientů s NAFLD (Ekstedt et al., 2006). Z metaanalýzy 40 studií vyplývá, že NASH zvyšuje riziko jaterní mortality 5 - 10x (zejména v závislosti na pokročilosti jaterní fibrózy)(Musso et al., 2011). Spojitost mezi obezitou, DM2 a vyšším rizikem hepatocelulárního karcinomu (HCC) je známa dlouho (de Marco et al., 1999). Její podstata však zatím čeká na vysvětlení. NASH je prokázaným rizikovým faktorem HCC a to i u pacientů bez jaterní cirhózy. Rizikovost prosté steatózy ve vztahu k HCC je zatím nejasná (Starley et al., 2010). Diagnóza HCC může být u pacientů s NAFLD závažně zpožděna, protože pacienti jsou většinou asymptomatictí a nebývají sledováni v rámci dispenzarizačních programů obvyklých pro pacienty s chronickým jaterním onemocněním. Dále je známo, že pacienti s DM2 mají vyšší riziko úmrtí na jaterní choroby. Na základě analýzy příčin úmrtí téměř 170 tisíc pacientů v jednom celém italském regionu bylo zjištěno, že diabetici mají přibližně trojnásobné riziko úmrtí na jaterní choroby, které nejsou způsobené alkoholem nebo virovými hepatitidami (Zoppini et al., 2014).

Ačkoli je NAFLD silně asociováno s obezitou, inzulínovou rezistencí a DM2, mnoho pacientů s NAFLD není obézních ani nemá DM2. Vliv přítomnosti těchto rizikových faktorů byl studován na 12000 korejských pacientech během 5letého sledování. Ukázalo se, že tři rizikové faktory (steatóza jater, obezita a inzulínová rezistence) byly nezávisle spjaty se zvýšeným rizikem DM2, a že každý z těchto faktorů nezávisle přibližně zdvojnásoboval riziko DM2. Při přítomnosti všech 3 rizikových faktorů u jednoho jedince (což bylo asi 50 % pacientů s objevením se DM2 v průběhu sledování) bylo riziko DM2 zvýšeno 14krát. U pacientů, u kterých vymizela steatóza v průběhu sledování, se riziko vzniku diabetu snížilo na stejnou úroveň jako u pacientů, kteří steatózu nikdy neměli (Sung et al., 2013). Jen zřídka byl vztah NAFLD a možnosti vzniku DM2 studován na skupině pacientů s histologicky verifikovaným NAFLD. V roce 2006 však vyšla práce sledující skupinu 129 NAFLD pacientů po dobu téměř 14 let. Ze 42 pacientů s NASH diagnostikovaným na začátku sledování, se u 30 (71 %) z nich vyvinul během této doby DM2. U pacientů s prostou steatózou na začátku to bylo pouze ve 46 % ($p=0,01$). To naznačuje, že pacienti s NASH mají vyšší riziko vzniku DM2 než pacienti s prostou steatózou.

NAFLD se stává jednou z nejčastějších jaterních chorob na světě a je nyní hlavní příčinou s játry spojené morbiditoy a mortality. Paradoxně však pacienti s NAFLD umírají v první řadě na kardiovaskulární choroby a také nádorová onemocnění. Jaterní komplikace tvoří až třetí

nejčastější příčinu úmrtí. Pro prognózu pacienta je klíčová přítomnost nealkoholické steatohepatitidy. Retrospektivními studiemi bylo prokázáno, že cca 25 - 30 % pacientů se steatohepatitidou má pokročilou fibrózu již v době diagnózy, 10 - 15 % z nich má již dokonce jaterní cirhózu (Adams et al., 2005). Jaterní cirhóza dříve označovaná jako kryptogenní souvisí z větší části právě s NASH. Tato kauzální souvislost je hůře prokazatelná díky faktu, že původní steatóza regreduje, jakmile se pacienti dostanou do katabolizmu díky vzniklé jaterní cirhóze. Pro souvislost kryptogenní jaterní cirhózy a NASH například svědčí i fakt, že u velké části těchto pacientů nalzáme mnohé komponenty metabolického syndromu (Caldwell et al., 1999).

Patogeneze

Přesný patofyziologický mechanismus vedoucí ke vzniku NAFLD a k následující progresi choroby není zcela objasněn. Účastní se ho genetické a epigenetické faktory, faktory zevního prostředí, vysoký kalorický příjem, nevhodné složení stravy a nízká fyzická aktivita. Podle současných poznatků je patogeneze NAFLD komplexní. Původně navrhovaná teorie dvou zásahů („two hits theory“) předpokládala, že ke vzniku choroby je potřeba dvou následných „zásahů“. Prvním byla akumulace tuku v játrech (vznik NAFLD) a druhým například endotoxin pocházející ze střeva vedoucí ke vzniku NASH (Day, James, 1998). Tato teorie je v současnosti nahrazena hypotézami zahrnujícími daleko širší spektrum paralelních inzultů, které ve svém důsledku vedou ke vzniku NAFLD a NASH (Tilg, Moschen, 2010, Schuppan, Schattenberg, 2013).

Pokud nastane nerovnováha příjmu a výdeje energie, nebo pokud nastane problém s ukládáním nadbytečné energie ve formě triacylglycerolů v tukové tkáni, dojde k ektopické akumulaci tuku, tzn. ukládání lipidů v orgánech, které k tomu nejsou uzpůsobeny (játra, kosterní svalstvo, omentum, pankreas). Klíčovou roli v patogenezi NAFLD však jistě představuje: 1/ zvýšená nabídka volných mastných kyselin (FFA – free fatty acids) při zvýšené lipolýze (podkožního/ viscerálního tuku) a/nebo zvýšený dietní příjem tuku; 2/ snížená oxidace mastných kyselin; 3/ zvýšená de novo lipogeneze v játrech; 4/ snížená sekrece VLDL z jater (Fabbrini et al., 2008). Téměř dvě třetiny akumulovaných tuků v játrech pochází z FFA dodaných do jater (Donnelly et al., 2005). Zdrojem FFA je zejména tuková tkáň (dysfunkční a inzulin-rezistentní adipocyty) (Barrows, Parks, 2006).

Normální funkce adipocytů je závislá na mnoha faktorech zahrnujících jejich počet, velikost, hormonální vlivy, interakce s ostatními buňkami v tukové tkáni (Lefterova, Lazar, 2009). Při nadměrném přísunu energie je tuková tkáň schopna do jisté míry reagovat hypertrofií a hyperplázií adipocytů a chránit tak ostatní tkáně před nežádoucími účinky mastných kyselin (lipotoxicitou). Další akumulace lipidů v tukové tkáni vede ke zvětšení objemu adipocytů, jejich dysfunkci a subklinickému (low-grade) zánětu tukové tkáně. Subklinický zánět tukové tkáně potencuje lipolýzu a inzulinorezistenci tukové tkáně (Cusi, 2012). To následně vede k uvolnění nadbytečných FFA do cirkulace a jejich ektopické akumulaci. Kupfferovy buňky jsou jaterní obdobou makrofágů v tukové tkáni. Jsou hlavním zdrojem zánětlivých cytokinů v játrech a hrají obdobnou roli při vzniku inzulinové rezistence, zánětu a apoptóze. Experimentální odstranění těchto buněk zabránilo steatóze a zánětlivým změnám u krys krmených vysokotukovou nebo vysokofruktózovou dietou (Huang et al., 2010).

Tuková tkáň je rovněž zdrojem velkého množství hormonů, cytokinů (interleukinů, TNF α a dalších), chemokinů a adipokinů. Mezi adipokiny patří růstové faktory jako IGF-1, TGF β , VEGF. Protože tuková tkáň musí zajistit nepřetržitý přísun energie podle aktuálních metabolických potřeb, tak adipocyty secernují rovněž celou řadu látek ovlivňujících glukózový a lipidový metabolismus (glukokortikoidy, estrogeny, leptin, rezistin, PPAR, RBP-4, visfatin, angiotenzin II). Snížená sekrece adiponektinu při obezitě mění lipidový metabolismus a inzulinovou senzitivitu v játrech a podání rekombinantního adiponektinu adiponektin-deficientním obézním myším krmeným vysokotukovou dietou dramaticky zlepšuje hepatomegalii, steatózu a zánětlivé změny v játrech (Xu et al., 2003). Snížená sekrece adiponektinu dysfunkčními adipocyty přispívá ke steatohepatitidě a fibróze při NASH i u lidí (Polyzos et al., 2010).

Mezi tukovou tkání a játry je u lidí těsný vztah, jak již bylo uvedeno výše, 2/3 mastných kyselin pro syntézu triacylglycerolů v játrech pochází z tukové tkáně. Inzulinovou rezistenci v játrech lze u hubených osob rychle vyvolat infuzí lipidů (za 2-4 hodiny) (Belfort et al., 2005), což vede k ovlivnění jak glukoneogeneze (Roden et al., 2000), tak glykogenolýzy (Boden et al., 2002). Zvýšená glukoneogeneze v játrech byla pozorována i u pacientů s NAFLD (Gastaldelli et al., 2007). Farmakologické snížení hladin FFA inzulinovou senzitivitu obnovuje (Santomauro et al., 1999). Excesivní množství FFA vede také k poruše inzulinové clearance (Kashyap et al., 2003), což pak vede k hyperinzulinémii, stavu, který je

pro pacienty s NAFLD a inzulínovou rezistencí typický. U pacientů s NAFLD je pokles inzulínové clearance úměrný množství tuku v játrech (Kotronen et al., 2007). V situaci zvýšeného influxu FFA do jater vede hyperinzulinémie ke stimulaci SREBP-1c a je spojena se zvýšenou jaterní de novo lipogenezí a zvýšenou sekrecí VLDL (Adiels et al., 2008). U lidí se míra sekrece VLDL lineárně zvyšuje spolu s narůstající akumulací triacylglycerolů v játrech. Tento mechanismus však u pacientů s NAFLD k normalizaci triglyceridů v játrech nestačí (Fabbrini et al., 2008). Nízká hladina adiponektinu přispívá ke steatóze, dysregulaci VLDL a následně nekroinflamatorním změnám. Léčba thiazolidinediony vede k vzestupu hladiny adiponektinu, zlepšení histologického nálezu v játrech ve smyslu zlepšení steatózy i nekroinflamatorních změn a inzulínové senzitivity (snížením syntézy triglyceridů a VLDL sekrece játry) (Baranova et al., 2006, Gastaldelli et al., 2010).

V rozvoji NAFLD a NASH hrají roli rovněž genetické faktory. Uvažuje se o genech ovlivňujících oxidační stres, metabolismus triacylglycerolů a mastných kyselin, syntézu a degradaci extracelulární matrix, endotoxinové kaskády (TLR-4), produkci cytokinů makrofágy a tukovou tkání (Day, 2010). Progrese choroby z „prosté“ steatózy do NASH souvisí s mitochondriální dysfunkcí, stresem endoplazmatického retikula, vznikem reaktivních forem kyslíku a oxidativním stresem a aktivací zánětlivých kaskád toxickými lipidovými metabolity (Gentile, Pagliassotti, 2008).

S progresí onemocnění a vznikem NASH hrají roli i další mechanismy. V poslední době je velká pozornost věnována souvislosti mezi gastrointestinálním ekosystémem (střevním mikrobiomem), NAFLD, obezitou a inzulínovou rezistencí vůbec. Játra jsou díky portální cirkulaci v blízkém anatomickém a funkčním spojení se střevem, což umožňuje jejich vzájemné ovlivňování (tzv. „osa střevo-játra“). V současnosti jsou již k dispozici přesvědčivé důkazy spojující střevní mikrobiom a integritu střevní slizniční bariéry s NAFLD. Dietní faktory, jako jsou strava bohatá na tuky a fruktózu, mohou vést ke změnám střevního mikrobiomu a také střevní slizniční bariéry. Rozvíjí se tzv. metabolická endotoxémie a prozánětlivý stav, který přispívá ke vzniku obezity a NAFLD (Kirpich et al., 2015).

Role střevního mikrobiomu v patogenezi NAFLD jsou komplexní. Zahrnují ovlivnění energetické homeostázy zvýšenou fermentací mastných kyselin s krátkým řetězcem s následnou stimulací de novo lipogeneze v játrech (Hoverstad, Midtvedt, 1986), dále modulaci endokanabinoidního systému (Muccioli et al., 2010), metabolismu cholinu (Wang et

al., 2011) a homeostázy žlučových kyselin (Jiang et al., 2015). Dále souvisí s produkcí endogenního etanolu (Zhu et al., 2013) a lipopolysacharidu (LPS) (Cani et al., 2007), které mohou aktivovat Kupfferovy buňky a tím stimulovat zánětlivé změny v játrech. Střevní mikrobiom může rovněž přispívat k jaterní fibróze cestou stimulace Toll-like receptor (TLR-9)-dependentní profibrotické kaskády v játrech (Miura et al., 2010).

V nedávné době byla objasněna spjitost mezi střevním mikrobiomem a tukovou tkání. LPS totiž funguje jako „hlavní vypínač“ kontroly metabolismu tukové tkáně – blokuje adipogenezi řízenou kanabinoidním systémem (Muccioli et al., 2010). Dále LPS inhibuje sekreci adipokinů, zejména adiponektinu, z viscerální tukové tkáně (Taira et al., 2015). Dále bylo prokázáno, že snížená produkce N-acetyletanolaminů v tukové tkáni (důležitých mediátorů v oblasti metabolické homeostázy a zánětu) indukuje dysfunkci střevní slizniční bariéry a dysbiózu střevního mikrobiomu a tím se podílí na změnách v tukové tkáni (Geurts et al., 2015).

Experimentální modely NAFLD

Ideální zvířecí model NAFLD by měl reflektovat všechny aspekty jeho patogeneze, typický histologický nález v jednotlivých fázích choroby a také metabolické změny, které jsou s NAFLD spjaty. Toto v současnosti nespĺňuje žádný z dostupných modelů. Nejčastěji užívanými jsou modely na myších a krysách. Existují modely genetické a modely vyvolané dietou (Schattenberg, Galle, 2010). Mezi nejpoužívanější patří methionin – cholin deficientní nebo vysokotuková dieta. Většina modelů úspěšně simuluje histologický obraz NAFLD/NASH, ale nezřídka jim schází metabolický nebo genetický kontext vývoje NASH u lidí (obezita, inzulinová rezistence, hyperglykémie, hyperinzulinémie, dyslipidémie, nerovnováha cytokinů a adipokinů) (Larter, Yeh, 2008). Vzhledem k patogenezi a přirozenému vývoji NAFLD (pomalý vývoj a progresse, multifaktoriální patogeneze) může ideální model tohoto stavu těžko existovat. Jako patofyziologicky nejbližší se jeví modely spočívající v nadměrném příjmu kalorií se spontánní progresí steatózy do steatohepatitidy (Schattenberg, Galle, 2010).

Jedním z nejčastěji užívaných modelů NAFLD/NASH je indukce NAFLD pomocí methionin – cholin deficientní diety (MCD). Cholin je esenciální ve vodě rozpustná látka, která se

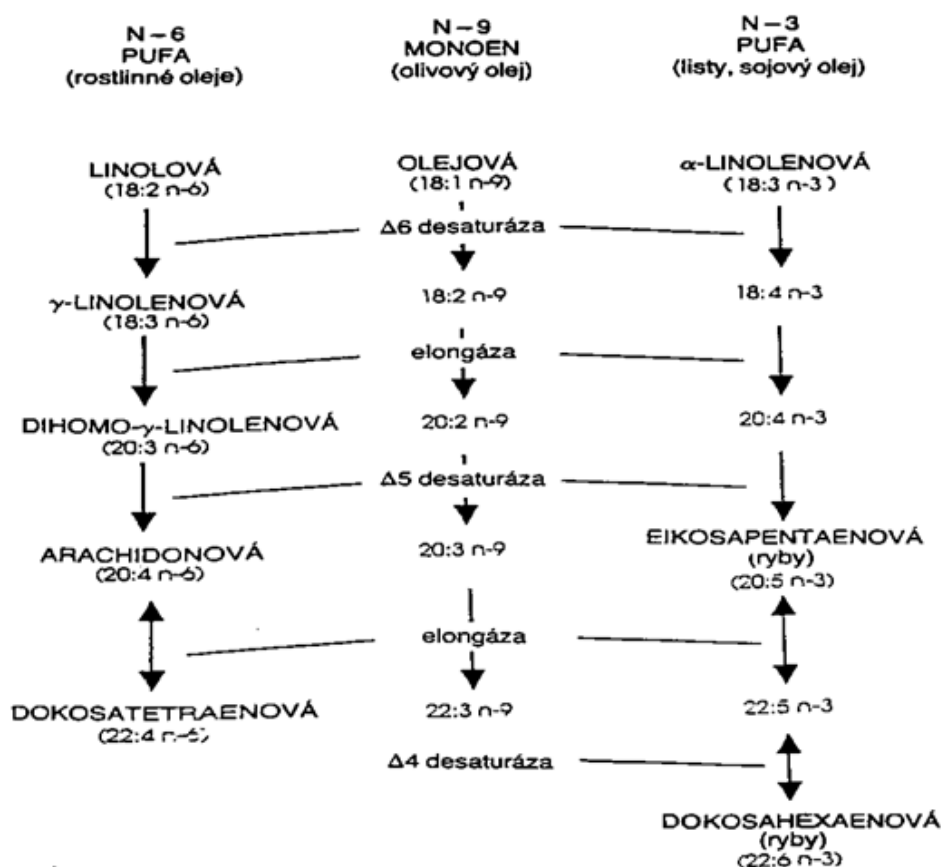
účastní mnoha metabolických procesů. Je součástí řady biologicky významných látek jako jsou fosfatidylcholin (lecitin), sfingomyelin, acetylcholin (Lombardi et al., 1968). Lecitin je součástí prakticky všech buněčných membrán. U lidí se deficiencie cholinu objevuje při malnutrici, abúzu alkoholu nebo v těhotenství a při laktaci a může vést ke vzniku steatózy jater. Při nedostatku cholinu může být k jeho syntéze použit methionin. Absence obou vede k narušení syntézy fosfatidylcholinu, který je mimo jiné zásadní pro vznik VLDL částic a jejich sekreci z jater (Ghoshal, 1995). MCD vede u hlodavců k akumulaci triglyceridů v játrech s následnou steatohepatitidou a fibrogenezí (Kucera, Cervinkova, 2014), histologické změny charakteru steatohepatitidy se u myši vyvíjejí rychleji než u krys (Kirsch et al., 2003). Samci myši C57/Bl6 krmení MCD dietou vykazují největší nekroinflatorní změny ve srovnání s krysami Wistar (Kirsch et al., 2003). Všechna zvířata krmená dietou s absolutním nedostatkem cholinu a methioninu obvykle ztrácí na váze, což je jeden z faktů, který je tomuto modelu často vytýkán, protože neodráží reálnou situaci u pacientů s NAFLD, kteří trpí naopak nadváhou (Larter, 2007). Model indukovaný podáváním striktní MCD diety tak simuluje zejména histopatologické rysy NASH, ale nekoresponduje s hlavními etiopatogenetickými faktory tohoto postižení u lidí (Kucera, Cervinkova, 2014).

Model založený na vysokotukové dietě se více blíží patogenezi NAFLD u lidí. Podávání vysokotukové diety vede ke vzniku steatózy u všech druhů laboratorních hlodavců (Tschop, Heiman, 2001). Vysokotuková dieta nebývá užívána pouze k indukci steatózy jater, ale rovněž u experimentálních modelů metabolického syndromu, obezity a inzulínové rezistence, což jsou významné prvky vzniku NAFLD, a tak tyto modely více odpovídají patogenezi než modely genetické, nebo založené na nutriční deficienci (Kucera, Cervinkova, 2014).

n-3 polynenasycené mastné kyseliny a jejich význam pro játra

Tuk v potravě může ovlivnit řadu fyziologických procesů v těle, což může mít dopad na patofyziologii různých chorob (Lee et al., 2007). Kyseliny linolová (LA, 18:2 n-6) a α -linolenová (ALA, 18:3 n-3) jsou mateřské esenciální mastné kyseliny, které si savčí buňky nedokáží syntetizovat a musí je přijímat v potravě. Metabolická dráha nenasycených mastných kyselin je schématicky znázorněna na Obr.1 Hlavními zdroji linolové kyseliny jsou cereálie, vejce, živočišný tuk, celozrnné pečivo, slunečnicový a sojový olej. α -linolenová kyselina je obsažena ve lněném a řepkovém oleji, listové zelenině a vlašských ořeších. LA a

ALA jsou pomocí desaturáz a elongáz přeměněny na mastné kyseliny s vyšším počtem atomů uhlíku a dvojných vazeb až na kyselinu eikosapentaenovou (EPA, 20:5 n-3), dokosahexaenovou (DHA, 22:6 n-3) u řady n-3 a arachidonovou (AA, 20:4n-6) u řady n-6 (Tvrzicka et al., 2011). Při fyziologickém poměru n-6/n-3 1-4:1 mají desaturázy a elongázy vyšší afinitu k metabolizování n-3 PUFA (Simopoulos, 2003). U tzv. „západní“ diety (Western diet) je poměr n-3/n-6 až 16:1. Přítomnost nadbytku n-6 PUFA vede k tvorbě eikosanoidů z arachidonové kyseliny, které mají prozánětlivé účinky (Simopoulos, 2003). Vysoký příjem n-6 PUFA vede k prozánětlivému a protrombotickému stavu se zvýšenou krevní viskozitou, vasospazmy a vasokonstrikcí. Naopak vyšší příjem n-3 PUFA má protizánětlivý, antitrombotický, vasodilatační a hypolipidemický efekt (Das, 2006, Jump, 2008).



Obrázek 1 Metabolická dráha nenasycených mastných kyselin a jejich zdroje (laskavě poskytl prof. MUDr. Aleš Žák, DrSc.)

Esenciální mastné kyseliny tvoří důležité komponenty buněčných membrán a ovlivňují jejich fluiditu a vlastnosti membránově vázaných enzymů a receptorů (Das, 2006). n-3 PUFA

(obzvláště EPA a DHA) významně ovlivňují klíčové dráhy metabolismu lipidů v játrech regulací transkripčních faktorů (PPAR α , PPAR γ , SREBP-1, ChREBP) (Marx et al., 2004, Jump, 2008). n-3 PUFA jsou významným aktivátorem PPAR α , který aktivuje geny účastnící se β -oxidace mastných kyselin (Pawar, Jump, 2003). Dále se podílejí na down-regulaci genů prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF α a IL-6 (Stienstra et al., 2007) a aktivují PPAR γ , čímž zvyšují oxidaci tuků a zlepšují inzulínovou senzitivitu. Kromě zvýšení β -oxidace mastných kyselin n-3 PUFA snižují rovněž endogenní produkci lipidů díky inhibici exprese a následného zpracování SREBP-1 (Xu et al., 1999) a také supresí aktivity ChREBP, což vede k inhibici glykolýzy a lipogeneze v játrech (Dentin et al., 2005).

Tyto předpoklady byly ověřeny na zvířecích modelech. Bylo prokázáno, že deplece n-3 PUFA vede ke steatóze a inzulínové rezistenci u hlodavců. U myši C57/Bl6 vedla dieta s nízkým obsahem n-3 PUFA za 3 měsíce k výraznému poklesu n-3 PUFA (Pachikian et al., 2011). Tato zvířata vykazovala inzulínovou rezistenci a steatózu jater, která byla spojena s poklesem oxidace mastných kyselin. Ve srovnání s kontrolami krmenými normální dietou, která se lišila pouze přítomností n-3 PUFA, prokázala analýza jaterní tkáně vyšší expresi všech enzymů zapojených v lipogenezi a také zvýšenou expresi a aktivaci SREBP-1. Suplementace diety n-3 PUFA vývoji steatózy zabránila, nebo vedla k její regresi. V jiné práci byly krysy krmené vysokotukovou dietou s nebo bez suplementace n-3 PUFA. n-3 PUFA v dietě vedlo k ochraně proti vzniku těžké steatózy jater, skupina bez této suplementace vykazovala navíc známky zvýšené peroxidace lipidů (Oliveira et al., 2006). Tento efekt byl potvrzen i u obézních leptin-deficientních myši (Alwayn et al., 2005) a myši krmených vysokosacharidovou dietou (Alwayn et al., 2005). Dieta obohacená o n-3 PUFA zlepšovala inzulínovou senzitivitu, snižovala obsah triglyceridů v játrech a histologický obraz steatohepatitidy jak u myši (Sekiya et al., 2003), tak u krys (Levy et al., 2004). Myši modely NAFLD rovněž prokazují protizánětlivý efekt n-3 PUFA ovlivněním produkce eikosanoidů (Broughton, Wade, 2002). V této souvislosti je rovněž pravděpodobný význam dokosanoidů (protektinů, resolvinů, maresinů) – lipidových mediátorů odvozených od DHA, které vykazují významné funkce v ukončování zánětlivé kaskády – např. ukončení pronikání polymorfonukleárů do tkáně a kontraregulační účinky k prozánětlivým cytokinům (Serhan, Chiang, 2013).

Diagnostika

Nejběžnější diagnostickou metodou steatózy jater je ultrazvukové vyšetření. Za steatotická jsou považována taková játra, jejichž parenchym je více echogenní (světlejší) než je parenchym kůry sousedící pravé ledviny. Senzitivita a specifická ultrasonografie pro steatózu jater je přes 90 %, pokud je steatózou postiženo přes 30 % hepatocytů (Hernaes et al., 2011). Dalším kritériem je rozmazání okrajů větších jaterních cév (tzv. vessel blurring) a dorzální oslabení akustického signálu. Běžné ultrazvukové vyšetření jater není ani při kombinaci různých kritérií schopno predikovat přítomnost NASH nebo fibrózy s dostatečnou přesností.

Ostatní zobrazovací metody jako jsou CT nebo MR nepřinášejí další diagnostický benefit a jsou zatíženy buď zbytečnou radiační zátěží nebo vyšší cenou a horší dostupností. MR spektroskopie je schopna určit koncentraci lipidů v játrech s vysokou přesností, ale pro běžnou klinickou praxi je nedostupná.

Diagnostika NASH je zatím výhradně histologická. Kromě zmíněné steatózy se zde navíc vyskytují známky poškození hepatocytů a zánětlivá infiltrace. Možný je různý stupeň depozice kolagenu - fibróza, která však není k diagnóze NASH nutná. Dále můžeme nalézt i další změny jako např. Malloryho – Denkova tělíčka (hyalin), která byla v minulosti chybně považována za histologický znak specifický pouze pro abúzus alkoholu. Ve stádiu jaterní cirhózy však mohou histologické známky NASH i jaterní steatózy vymizet (Caldwell et al., 2009).

Většina pacientů, u kterých je v současné době diagnostikováno NAFLD/NASH, má vyšší aktivity jaterních testů. Tito pacienti bývají většinou asymptomatictí. Mají-li nějaké symptomy, pak se jedná nejčastěji o únavu a pocit tlaku nebo dyskomfortu v pravém podžebří. ALT je obvykle vyšší než AST a transaminázy jsou většinou zvýšeny do dvojnásobku normy. Typická je rovněž elevace GGT a je potřeba zdůraznit, že elevace GGT již není považována za specifickou pro poškození alkoholem. U NAFLD je elevace GGT velmi častá a může dosahovat až 10násobku normy. Pro alkoholovou lézi je naopak typické zvýšení AST a poměr $AST/ALT > 2$. Studie navíc ukázaly, že pacienti ve všech stádiích NASH včetně pokročilé fibrózy a cirhózy mohou mít normální jaterní testy. Zhruba 50 % pacientů s NASH má také vyšší koncentrace sérového ferritinu (Vernon et al., 2011).

Jaterní biopsie

Jaterní biopsie představuje zlatý standard v diagnostice NAFLD. Umožňuje nejen diagnostikovat jaterní steatózu, která je charakteristickým znakem a základním předpokladem NAFLD, ale umožňuje také vyloučit jiné jaterní choroby, jako jsou autoimunitní hepatitida, Wilsonova choroba a hemochromatóza. Dále umožňuje hodnotit nekroinflamatorní změny v jaterní tkáni, které jsou typickou známkou nealkoholové steatohepatitidy (NASH). Dalším přínosem jaterní biopsie je možnost hodnocení pokročilosti jaterní fibrózy, jejíž tíže má pro konkrétního pacienta největší prognostický význam.

Základní nevýhodou jaterní biopsie je její invazivní charakter. Přestože je tato metoda obecně bezpečná, existuje zde tak jako u každé invazivní metody riziko komplikací - krvácení, pneumotorax, biliární peritonitida (vyskytují se u cca 3 případů z 1000). Perkutánní biopsie je kontraindikována při poruchách koagulace, ascitu, dilatovaných intrahepatálních žlučovodech nebo při polycystóze jater. Biopsie vyžaduje souhlas pacienta, který bývá k výkonu zpravidla hospitalizován. U výrazně obézních pacientů může být biopsie provedena transjugulární cestou (Rockey et al., 2009).

Jaterní biopsie však i přes dlouhou historii užívání není zdaleka optimálním referenčním standardem. Získaný vzorek jaterní tkáně (ideálně váleček dlouhý 20-25mm, alespoň 11 kompletních portálních polí) představuje pouze 1/50000 objemu jaterní tkáně. Z analýzy jaterních biopsií u více než 8700 pacientů vyplynulo, že tato kritéria nesplňuje ani polovina z nich (Cholongitas et al., 2006). Patologické změny v játrech navíc nejsou rozloženy zcela homogenně, čímž může docházet k dalšímu zkreslení (Ratziu et al., 2005). To je navíc ještě zesíleno výraznou subjektivitou a variabilitou hodnocení patologem. Jaterní biopsie u NAFLD představuje specifickou problematiku, neboť skóre užívaná k hodnocení pokročilosti jaterní fibrózy u pacientů s chronickými virovými hepatitidami se pro NAFLD nehodí. Toto jsou tedy základní důvody potřeby najít neinvazivní metody diagnostiky NAFLD.

Neinvazivní diagnostika NASH

Diagnostikovat NASH není úplně snadné. Souvisí to jak s nutností jaterní biopsie, tak s variabilitou vzorků jaterní tkáně a se subjektivitou jejich hodnocení (Merriman et al., 2006). Právě tyto faktory významně komplikují vývoj, porovnání a validaci neinvazivních metod

(Machado, Cortez-Pinto, 2013). Jednotlivé běžné parametry jako jsou například jaterní testy se k rozlišení pacientů s NAFLD a NASH nehodí. Byly studovány různé postupy neinvazivní diagnostiky NASH. Byly zkoumány koncentrace různých cytokinů, markerů oxidačního stresu či apoptózy, kalkulovány prediktivní modely a skórovací systémy, které by umožnily diagnostikovat NASH bez nutnosti jaterní biopsie. Nejlepší výsledky byly v rozlišení prosté steatózy a NASH dosaženy při hodnocení cytokeratinu 18 v séru (Machado, Cortez-Pinto, 2013).

Cytokeratin 18 je specifická komponenta cytoskeletu pro hepatocyty. Při apoptóze, která je jedním ze základních znaků NASH, vede aktivace kaspáz v buňce ke štěpení jednotlivých substrátů, mezi které patří i cytokeratin 18. Množství fragmentů cytokeratinu 18 je zvýšeno nejen v játrech, ale i v séru u pacientů s NASH. Jako jediný byl tento biomarker validován více než 10 studiemi na více než 1000 pacientech s NAFLD. Podle metaanalýzy z roku 2011 vykazuje AUROC 0,82 s 78% senzitivitou a 86% specificitou v rozlišení NASH a prosté steatózy (Musso et al., 2011).

Neinvazivní diagnostika jaterní fibrózy

Pokročilost jaterní fibrózy je pravděpodobně nejpodstatnější informací týkající se prognózy konkrétního pacienta. Navíc rozpoznání jaterní cirhózy umožňuje zařadit pacienta do ultrazvukového screeningu HCC a screeningu jícnových varixů. Běžné zobrazovací metody jako ultrazvuk, CT a MR dokáží rozpoznat jaterní cirhózu pouze pokud jsou patrná játra s nerovným povrchem, nebo jsou přítomny známky portální hypertenze jako je ascites, dilatace portální žíly, splenomegalie, nebo portosystémové kolaterály.

Samotná aktivita aminotransferáz nevypovídá o pokročilosti jaterní fibrózy a pacient s normálními jaterními testy může mít i jaterní cirhózu (Adams et al., 2005). Větší hodnotu může mít poměr AST/ALT. Jak ukázalo několik studií, poměr AST/ALT větší než 1 může předpovídat pokročilou fibrózu (Angulo et al., 1999).

Komponenty extracelulární matrix - zejména hyaluronová kyselina (HA) jsou specifitější možnostmi. Produkce hyaluronové kyseliny je zvýšena při zvýšené syntéze kolagenu a díky sinusoidální endotelové dysfunkci v pokročilém stádiu jaterních chorob je snížena i její clearance. Existují práce dokumentující predikci pokročilé fibrózy s dobrou přesností (Suzuki et al., 2005).

Další možností jsou četné prediktivní modely a skórovací systémy. Obvykle mají dobrou přesnost pro pokročilou fibrózu, méně přesné jsou pro fibrózu mírnou a středně pokročilou. Ve svém hodnocení zahrnují od několika běžně dostupných parametrů po komplikovanější, běžně nestanovované parametry. Některé testy jsou dostupné pouze komerčně.

The European Liver Fibrosis Study Group vytvořila po zhodnocení skupiny více než 1000 pacientů (Original European Liver Fibrosis) OELF skóre. NAFLD mělo 61 pacientů. Kombinuje věk, HA, hladinu tkáňového inhibitoru metaloproteinázy 1 a N-terminální peptid prokolagenu 3 (NIIITP). Toto skóre vykazuje výborné výsledky u pacientů s NASH a pokročilou fibrózou (AUROC 0,87), ale pro méně pokročilá stádia jsou výsledky nedostatečné (Rosenberg et al., 2004). Zjednodušená formule, kde již není zahrnut věk, ELF skóre, vykazovala na skupině 196 pacientů dokonce lepší výsledky s AUROC 0,9 (Guha et al., 2008).

Nejvíce dat existuje k NAFLD Fibrosis Score (Angulo et al., 2007). Bylo externě validováno 13 studii na více než třech tisících pacientů (Musso et al., 2011). Obsahuje věk, BMI, hodnotu glykémie, počet trombocytů, albumin a poměr AST/ALT. Vykazuje výbornou přesnost v diagnostice pokročilé fibrózy a je považováno za neinvazivní parametr, který může být používán v běžné klinické praxi. Asi čtvrtina pacientů spadne do tzv. šedé zóny mezi mírnou a pokročilou fibrózou.

BARD (BMI-AST/ALT Ratio-Diabetes) skóre obsahuje BMI, poměr AST/ALT a přítomnost diabetu (Harrison et al., 2008) a bylo použito na skupině čítající 136 obézních pacientů s NAFLD. Přítomnost alespoň 2 faktorů zvyšovala riziko pokročilé fibrózy 17násobně s vysokou negativní prediktivní hodnotou. V následných srovnáních fungoval hůře než NAFLD Fibrosis Score, avšak snáze se vypočítává a menší procento pacientů spadá do tzv. šedé zóny jako u NAFLD Fibrosis Score.

FIB-4 test (věk, ALT, AST, počet trombocytů) byl vyvinut k hodnocení pokročilé fibrózy u chronických jaterních chorob obecně. Při srovnání s ostatními skóre vykazuje velmi dobré výsledky s AUROC nad 0,8 (McPherson et al., 2010). Jedná se o slibný test, který vzhledem ke své jednoduchosti může být použit spolu s dalšími skóre.

HYPOTÉZY A CÍLE

Experimentální část

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

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

Klinická část

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

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

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

METODY

Experimentální část

Chemikálie

Paraformaldehyd, hematoxylin-eosin, RNA-later, MgSO₄ p.a. (čistota \geq 99%) od firmy dodány Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA). Deionizovaná voda z Milli-Q® Integral system - Merck (Darmstadt, Německo), HPLC-grade cyclohexan, acetonitril, kyselina mravenčí a ammonium format (čistota \geq 99%), NaCl p.a. (čistota \geq 99%) od Penta (Chrudim, Česká republika).

Total RNA Purification Kit od Norgen Biotek Corporation (Kanada); High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and TaqMan Gene Expression Master Mix od Applied Biosystems (USA). Všechny ostatní chemikálie zakoupeny od firmy Penta (Česká republika). Standardní dieta?

Vysokotuková methionin-cholin deficientní dieta ssniff EF R/M, high fat MCD mod. (Ssniff Spezialdieten, Soest, Německo) obsahující zejména nasycené mastné kyseliny se střední délkou řetězce, 32 kJ% tuky, 56 kJ% sacharidy, 12 kJ% bílkoviny. n-3 PUFA suplement (Farmax, Česká republika) s obsahem DHA 2,4 mg/kg a EPA 3,2 mg/kg.

Zvířata a design experimentu

Všechny experimenty na zvířatech splňovaly požadavky na užití a péči o laboratorní zvířata a byly schváleny Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Samci myši C57/Bl6 (průměrná hmotnost cca 30 g, stáří 3 měsíce), od Anlab (Praha, Česká republika), byli chováni při stabilní kontrolované teplotě 22°C, relativní vlhkost 55±10 % a za přirozeného cyklu světlo – tma 12h/12h. Zvířata měla volný přístup k vodě a potravě.

Indukce NASH

Myši byly rozděleny do 4 skupin. 2 skupiny představovaly model NASH a byly krmeny HFMCDD dietou po dobu 6 týdnů (skupiny M – po 11 zvířatech v každé skupině). Jedné skupině byly podávány n-3 PUFA (skupina MP), druhé fyziologický roztok (skupina M) po

celou dobu experimentu. Myši z kontrolních skupin (skupiny C – po 6 zvířatech v každé skupině) byly krmeny standardní dietou a dostávaly buď n-3 PUFA (skupina CP) nebo fyziologický roztok (skupina C) ve stejných dávkách jako skupiny M (Tabulka 2).

Tabulka 2. Rozdělení experimentálních skupin. HFMCD – vysokotuková methionin-cholin deficientní dieta, FR – fyziologický roztok, n-3 PUFA – směs n-3 polynenasycených mastných kyselin

C	CP	M	MP
standardní dieta	standardní dieta	HFMCD	HFMCD
FR	n-3PUFA	FR	n-3PUFA

Podávání n-3 PUFA

Každé zvíře dostávalo denně buď 0,1 ml směsi DHA a EPA, t.j. 56,25mg EPA + 42,5mg DHA orogastrickou sondou, nebo fyziologický roztok. Dávka zvolena na základě preexperimentu (data neuvedena) jako minimální racionální tolerovatelná dávka n-3 PUFA.

Příprava tkáňových vzorků

Po celkové anestezii intramuskulární aplikací ketaminu (100 mg/kg) and xylazinu (16 mg/kg) byla otevřena dutina břišní. Krev byla odebrána z dolní duté žíly. Odebraná játra byla zvážena a rozdělena na vzorky do formolu, RNA lateru a tekutého dusíku.

Biochemická vyšetření

Biochemická vyšetření v séru (celkový bilirubin, alaninaminotransferáza (ALT), aspartátaminotransferáza (AST), alkalická fosfatáza (ALP), celkový cholesterol, triacylglyceroly) byly stanoveny standardními analýzami při použití automatického analyzátoru (Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo).

Histologické vyšetření jater

Dva malé bločky jaterní tkáně (cca 1 cm³) byly fixovány v 4% paraformaldehydu a poté standardním způsobem zality do parafínu, nakrájeny na 5-7 µm tenké řezy a obarveny hematoxylin-eosinem. Každý preparát byl hodnocen pod světelným mikroskopem zkušeným histopatologem podle Kleiner (Kleiner et al., 2005) (As. MUDr. Jan Střítecký, CSc. – Patologicko-anatomický ústav 1. LF UK v Praze). V reprezentativním vzorku z každého tkáňového bločku byla určena jeho plocha, zhodnoceno NAS skóre (steatóza, ballooning, intralobulární zánět) a poměr mikro- a makrovesikulární steatózy. Dále byly hledány další

histopatologické známky NAFLD/NASH – rozrušení mezibuněčných adhezí (dissolving) hepatocytů, portální a periportální zánětlivý infiltrát, Mallory-Denkova tělíska a známky jaterní fibrózy.

Stanovení adipokinů

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

Real-time-PCR

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

Stanovení mastných kyselin v séru

Celkové sérové mastné kyseliny byly izolovány z 50 μ l séra podle Folcha (Folch et al., 1957) s modifikací dle Carlsona (Carlson, 1985). Jako interní standard bylo použito 10 mg methylester nonadekanové kyseliny přidané do každého vzorku. Dále následovala extrakce hexanem a vzorky byly odpařeny pod proudem dusíku. Dále rozpuštěny v 100 μ l n-heptanu a uchovány v -20 °C pod dusíkem do dalšího zpracování. Všechny reakce byly provedeny v atmosféře dusíku na plynovém chromatografu Trace-GC. Analýza methylesterů mastných kyselin byla provedena na koloně z taveného křemíku pokryté chemicky navázanou stacionární fází CP-Sil 88 CB (100 m, 0.32 mm I.D.). K získání dat a ovládání byl použit software Clarity version 2.4.1.57 (Data Apex Ltd. Prague, Czech Rep.)

Příprava vzorků k analýze vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií kombinovanou s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením

Homogenizované reprezentativní části myších jater o váze 0,4 g byly naváženy do 50 ml PTFE centrifugační zkumavky. Bylo přidáno 0,4 ml cyklohexanu. Následně byl vzorek rozrušen laboratorním homogenizérem po dobu 1 min. Poté byly přidány vodný roztok acetonitrilu (1:1, v/v), 1,6 g MgSO₄ a 0,2 g NaCl. Vzorek byl 1 min. protřepáván a 5 min. centrifugován při 10000rpm. Zřetelně se oddělily 3 vrstvy. Svrchní část (cyklohexanová) a střední část (acetonitrilová) byly zmrazeny (-18°C), spodní vodná část nebyla použita.

Složení mastných kyselin v játrech – analytická metoda

Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie spolu s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (Ultra High Performance Liquid Chromatography s High Resolution Mass Spectrometry - UHPLC-HRMS) byla použita k analýze vzorků jaterní tkáně myši. Analýzy acetonitrilových a cyklohexanových extraktů byly realizovány v systému složeném z Dionex UltiMate 3000 UHPLC system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem AB SCIEX TripleTOF[®] 5600 (AB SCIEX, Concord, ON, Canada). Zdrojem iontů pro hmotnostně spektrometrická měření byl Duo Spray[™] s oddělenými zdroji elektrosprejové ionizace (ESI) a chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI). V pozitivním ESI módu byly parametry hmotnostního spektrometru následující: napětí na kapiláře: +4500 V; tlak zamlžovacího plynu: 60 psi; tlak sušícího plynu: 50 psi; teplota: 450°C; a deklasterační potenciál: 80 V. Napětí na kapiláře v negativním ESI bylo -4000 V, ostatní nastavení byla stejná jako pro ESI+.

Složení mastných kyselin – zpracování dat

Odhad molekulárních vzorců, objasnění struktury a následná předběžná identifikace sloučenin byly provedeny na základě MS a MS/MS hmotnostních spekter použitím softwaru PeakView. PeakView software vybavený FormulaFinderem umožnil vypočítat vzorce podle MS, izotopických vzorců a MS/MS rankingu, při zohlednění rozdílů mezi teoretickými a naměřenými m/z hodnotami pro jak prekurzorové, tak dceřinné ionty, a shodě experimentálních a teoretických izotopových vzorů ve smyslu rozložení a relativních intenzit.

Statistické metody

Výsledky v experimentální části jsou uváděny jako průměr ± směrodatná odchylka. Ke zhodnocení rozdílů mezi skupinami byl použit t-test (případně Mann-Whitney rank test pro

negaussovsky rozložené proměnné). K porovnání kategoriálních dat byl použit χ^2 test. Za statisticky významnou byla považována hodnota $p \leq 0.05$. Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu STATISTICA CZ v. 8 (StatSoft, Praha, ČR).

Klinická část

Skupina diabetiků 2. typu

Pacienti

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

Ultrazvukové vyšetření jater

Obraz jater byl hodnocen jako normální, když měla játra normální homogenní echotexturu obdobné echogenity jako kůra pravé ledviny a jaterní cévy byly adekvátně vizualizované. Sonografická diagnóza steatózy byla založena na nálezu „světlých jater“, tedy abnormálně zvýšené echogenity jaterního parenchymu ve srovnání s parenchymem kůry pravé ledviny, dále setřelým neostrým okrajem jaterních cév (tzv. „vessel blurring“) a také event. dorzálním oslabením akustického signálu v játrech. Jako sonografické známky jaterní fibrózy byly považovány celkové zvýšení echogenity parenchymu bez přítomné atenuace, mírné nerovnosti a nepravidelnosti jaterních cév (nerovné kontury, rarefikace) a mírné nepravidelnosti jaterního povrchu. Jako sonografické známky jaterní fibrózy byly hodnoceny hrubá až mapovitá echostruktura jaterního parenchymu, nerovný povrch jater, hypertrofie lobus caudatus a známky přítomnosti portální hypertenze (dilatace veny portae, snížený nebo retrográdní tok ve v. portae a splenomegalie)(Mathiesen et al., 2002).

Diagnóza metabolického syndromu

Metabolický syndrom byl diagnostikován na základě diagnostických kritérií konsenzu AHA (American Heart Association) a IDF (International Diabetes Foundation) (Alberti et al., 2009). Přítomnost metabolického syndromu byla rovněž hodnocena použitím původních IDF (Alberti et al., 2006) a WHO kritérií (Alberti, Zimmet, 1998) (Tabulka 3a, b, c). Kompenzace diabetu byla hodnocena podle hodnoty glykémie na lačno a glykovaného hemoglobinu.

Tabulka 3a. Diagnostická kritéria metabolického syndromu podle konsenzu AHA/IDF z roku 2009.

Přítomnost alespoň 3 z následujících 5 kritérií:	
1. Abdominální obezita:	obvod pasu >94 cm u mužů a >80 u žen
2. Zvýšení TAG v séru:	>1,7 mmol/l nebo zavedená léčba hypertriglyceridémie
3. Snížení HDL-cholesterolu:	<1,0 mmol/l u mužů a <1,3 mmol/l u žen nebo zavedená léčba
4. Zvýšený krevní tlak:	systolický >130 mm Hg a/nebo diastolický >85 mm Hg nebo zavedená léčba hypertenze
5. Zvýšená glykémie na lačno:	> 5,6 mmol/l nebo zavedená farmakologická léčba diabetu

Tabulka 3b. Diagnostická kritéria metabolického syndromu podle konsenzu IDF z roku 2005.

Přítomnost abdominální akumulace tukové tkáně:	obvod pasu >94 cm u mužů a >80cm u žen (pro evropskou populaci)
A přítomnost alespoň 2 z následujících kritérií:	
1. Koncentrace TAG v séru:	≥ 1.7 mmol/l nebo zavedená léčba dyslipidémie
2. Snížení HDL-cholesterolu v séru:	<1.03 mmol/l u mužů a <1.29 mmol/l u žen nebo zavedená léčba dyslipidémie
3. Zvýšený krevní tlak:	systolický ≥ 130 mm Hg a/nebo diastolický ≥ 85 mm Hg nebo zavedená léčba hypertenze
4. Zvýšená glukóza na lačno:	≥ 5.6 mmol/l nebo dříve diagnostikovaný diabetes mellitus 2. typu

Tabulka 3c. Diagnostická kritéria metabolického syndromu na základě původní definice WHO z roku 1998.

Porušená glukózová tolerance nebo diabetes a/nebo inzulínová rezistence a přítomnost alespoň 2 dalších kritérií:	
1. Zvýšení krevního tlaku:	$\geq 140/90$ mm Hg
2. Zvýšení TAG v séru a/nebo snížení HDL-cholesterolu v séru:	≥ 1.7 mmol/l < 0.9 mmol/l u mužů a < 1 mmol/l u žen
3. Obezita:	poměr pas/boky > 0.9 u mužů a > 0.85 u žen a/nebo BMI > 30 kg/m ² .
4. Mikroalbuminurie:	močová exkrece albuminu ≥ 20 μ g/min a/nebo poměr albumin/kreatinin $\geq 3,5$ g/mol.

Diagnóza NAFLD

Diagnóza NAFLD byla založena na diagnostických kritériích v doporučených postupech AASLD (Chalasani et al., 2012):

- 1/ známky jaterní steatózy podle zobrazovacích metod nebo histologie
- 2/ žádná jiná příčina sekundární akumulace tuku v játrech

Vyloučení nadměrného pití alkoholu (v současnosti nebo v minulosti) je základní podmínkou diagnózy NAFLD. Všichni pacienti v našem souboru měli negativní anamnézu abúzu alkoholu (tedy pití méně než 210 g týdně u mužů a 140 g týdně u žen). Všichni pacienti byli pravidelně ambulantně sledováni, a tak by významná konzumace alkoholu byla odhalena s vysokou pravděpodobností. Vyloučení významného pití alkoholu bylo u pacientů v naší skupině založeno na vyplnění dotazníku hodnotícího užívání alkoholu při pravidelných ambulantních kontrolách a ve většině případů také na rozhovoru s příbuzným pacienta. Při nálezů makrocytózy v krevním obraze bylo indikováno vyšetření karbohydrát deficientního transferinu (CDT) nebo stanovení ethylglukuronidu v moči. Dále bylo prováděno náhodné stanovování alkoholémie.

Anamnesticky bylo hodnoceno užívání léků, které mohou významně zvyšovat jaterní testy. Jedná se zejména o aminosalicyláty, amiodaron, ampicilin, tetracyklinová antibiotika,

glukokortikoidy, metotrexát, paracetamol, valproát, tamoxifen, warfarin, verapamil). Cholestáza byla vyloučena ultrazvukovým vyšetřením a stanovením ALP, u všech pacientů bylo provedeno sérologické vyšetření panelu virových hepatitid (anti-HAV, HBsAg, anti-HBc, anti-HCV). Dále byla u všech pacientů vyšetřena elektroforéza sérových bílkovin, a když byla zjištěna přítomnost vyšší hladiny gamaglobulinů, provedli jsme základní screening autoprotilátek. Tumory a ložiskové procesy v játrech byly vyloučeny ultrazvukovým vyšetřením.

U pacientů, u kterých nebylo provedeno ultrazvukové vyšetření jater, bylo zvýšení ALT ($>0,78 \mu\text{kat/l}$), nebo GGT ($>0,84 \mu\text{kat/l}$) považováno za suspektní jaterní poškození. V případě, že pacienti byli ve sledovaném období vyšetřováni vícekrát, byly hodnoceny nejvyšší hodnoty ALT a GGT. Zvýšené hodnoty ALT nebo izolovaně zvýšené hodnoty AST nebyly považovány za důkaz přítomnosti NAFLD.

Skupina pacientů s NAFLD

Pacienti

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

Diagnóza NAFLD

Diagnóza NAFLD byla založena na klinických a laboratorních vyšetřeních, histologické vyšetření jater bylo provedeno u 56 pacientů. Klinická a laboratorní vyšetření zahrnovala zvýšené hodnoty transamináz (ALT, AST, GGT), přítomnost obrazu steatózy, fibrózy nebo cirhózy na ultrazvukovém vyšetření jater a klinické okolnosti připouštějící NAFLD (přítomnost metabolického syndromu nebo jeho komponent) a vyloučení jiné etiologie jaterního poškození.

U všech pacientů byly vyloučeny virové hepatitidy, polékové poškození, autoimunitní hepatitida, biliární choroby a dědičné metabolické choroby pomocí odpovídajících laboratorních a zobrazovacích vyšetření a anamnézy. Nadměrné užívání alkoholu (více než 210g alkoholu týdně u mužů, 140g týdně u žen a anamnéza nadměrného pití alkoholu

v minulosti) bylo vyloučeno pomocí anamnézy, krátkého dotazníku, nekolísajících hodnot GGT a stanovením karbohydrát deficientního transferinu (CDT) nebo ethylglukuronidu v moči. Přítomnost zhoubných nádorových onemocnění byla rovněž vylučujícím kritériem. Kontrolní skupinu k porovnání laboratorních parametrů, zánětlivých cytokinů a celkové antioxidační kapacity tvořilo 14 zdravých jedinců. Tuto skupinu tvořili zaměstnanci Všeobecné fakultní nemocnice v Praze bez anamnézy jaterních nebo jiných onemocnění a odpovídali věkem a pohlavím sledované skupině pacientů. Jedinci v kontrolní skupině měli normální jaterní testy a byla u nich provedena stejná laboratorní vyšetření k vyloučení jaterních chorob jako u pacientů s NAFLD. Všichni pacienti podepsali před zařazením do hodnocení informovaný souhlas.

Jaterní biopsie

Jaterní biopsie byla provedena u 56 pacientů. U 43 pacientů byla provedena perkutánní metodou Menghiniho jehlou (Rockey et al., 2009), u 13 pacientů transjugulárně. Indikací pro transjugulární biopsii byla obezita, trombocytopenie, suspekce na jaterní cirhózu a potřeba měření HVPG (hepatic venous pressure gradient) (Kalambokis et al., 2007). Vzorky jaterní tkáně byly standardně barveny a poté hodnoceny zkušeným histopatologem, který nebyl seznámen s dalšími klinickými nebo laboratorními údaji. Jaterní fibróza byla hodnocena podle Kleiner a Bruntové (Brunt et al., 1999, Kleiner et al., 2005): Stupeň 0 – žádná fibróza, stupeň 1 – perisinusoidální nebo portální fibróza, stupeň 2 – perisinusoidální a portální/peroportální fibróza, stupeň 3 – septální nebo přemostující fibróza, stupeň 4 – cirhóza. Indikace k jaterní biopsii odpovídala obvyklé klinické praxi, zejména suspekci na NASH nebo významnou jaterní fibrózu. Důvody neprovedení jaterní biopsie byly zejména nesouhlas pacienta a klinické a laboratorní známky svědčící pro prostou steatózu (normální nebo mírně zvýšené ALT, typický ultrazvukový nález).

Skórovací systémy pro neinvazivní hodnocení jaterní fibrózy

Jednotlivá skóre pro neinvazivní hodnocení jaterní fibrózy byla kalkulována na základě v literatuře publikovaných vzorců: APRI bylo počítáno jako $\text{AST (IU/L/horní limit normy AST) / počet trombocytů (x10}^9\text{/L) x 100}$; FIB-4 skóre jako: $\text{věk x AST (IU/L) / počet trombocytů (x10}^9\text{/L) x ALT (IU/l)}$; NAFLD Fibrosis Score podle vzorce: $-1,675 + 0,037 \times \text{věk (roky)} + 0,094 \times \text{BMI (kg/m}^2\text{)} + 1,13 \times \text{porušená glukózová toleraance nebo diabetes (ano = 1, ne = 0)} + 0,099 \times \text{poměr AST/ALT} - 0,013 \times \text{počet trombocytů (x10}^9\text{/L)} - 0,66 \times \text{albumin (g/dl)}$; and BARD skóre jako součet následujících 3 hodnot: $\text{BMI} > 28 = 1 \text{ bod, AST/ALT} > 0,8$

= 2 body, diabetes = 1 point. OELF skóre bylo vypočítáno podle algoritmu: $-6,38 - (\ln(\text{věk}) \times 0,14) + (\ln(\text{HA}) \times 0,616) + (\ln(\text{PIIINP}) \times 0,586) + (\ln(\text{TIMP1}) \times 0,472)$; ELF skóre bylo počítáno jako: $-7,412 + (\ln(\text{HA}) \times 0,681) + (\ln(\text{PIIINP}) \times 0,775) + (\ln(\text{TIMP1}) \times 0,494)$.

Laboratorní metody

Biochemické parametry byly měřeny rutinními laboratorními technikami. Vysoce senzitivní CRP (hs-CRP) bylo měřeno imunonefelometricky (Behring Nephelometer II), zánětlivé cytokiny (IL-2, IL-6 a TNF α) technologií Lumirex užitím kitu EMD Millipore, Darmstadt, Německo. Adiponektin, leptin a inzulin byly měřeny ELISA technikami (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Kyselina hyaluronová v séru byla měřena metodou latexové aglutinace (Hyaluronic acid LT, Latex Agglutination Method, Wako Chemicals GmbH, Německo). Hladiny fragmentů M30 a M65 cytokeratinu 18 byly měřeny komerčně dostupnými ELISA kity (PEVIVA AB, Švédsko). Krev na laboratorní vyšetření byla odebrána v den jaterní biopsie nebo v době stanovení diagnózy NAFLD.

Statistické metody

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

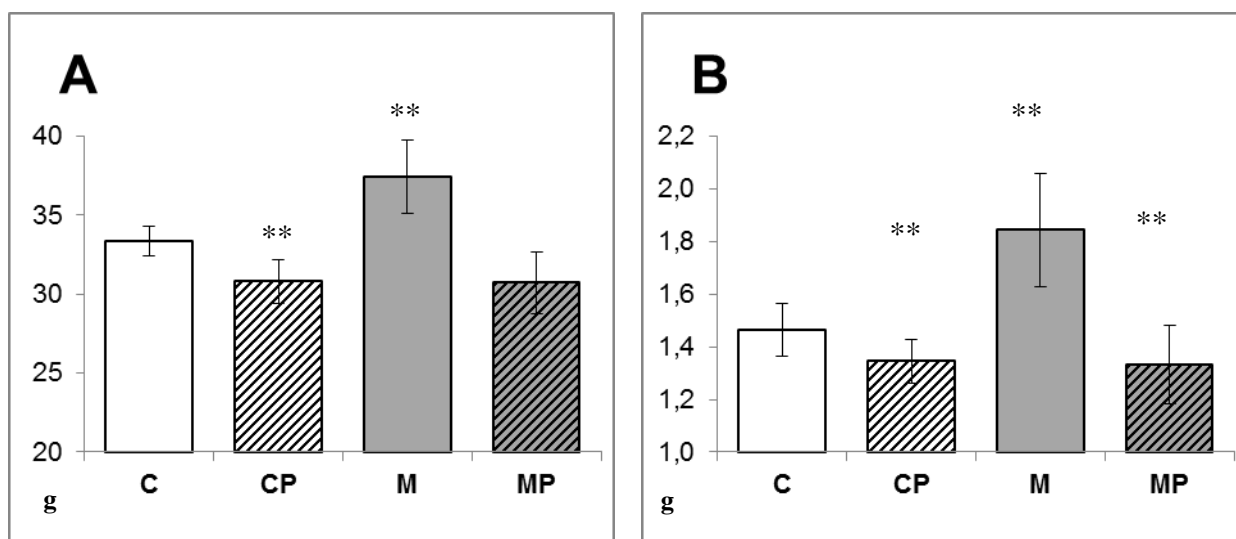
VÝSLEDKY

Experimentální část

Vliv n-3 PUFA na tělesnou hmotnost a hmotnost jater

Podávání HFMCD vedlo k vzestupu hmotnosti jater (C, 1,47 g vs. M, 1,84 g, $P < 0,01$) a celkové hmotnosti (C, 33,4 g vs. M, 37,4 g, $P < 0,01$). Obr. 2 A, B

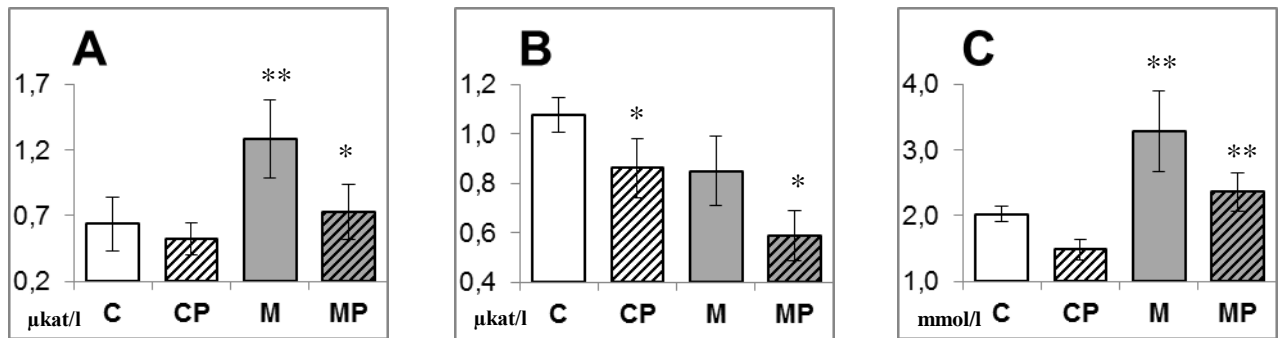
Podávání n-3 PUFA vedlo naopak k signifikantnímu poklesu celkové hmotnosti myši jak u kontrol, tak u myši krmených HFMCD (C, 33,4 g vs. CP, 28,3 g $P < 0,001$; M, 37,4 g vs. MP, 30,2 g, $P < 0,001$) a hmotnosti jater (C, 1,47 g vs. CP, 1,27 g $P < 0,01$; M, 1,84 g vs. MP, 1,33 g, $P < 0,001$). Obr. 2 A, B.



Obrázek 2 A, B. A - hmotnost zvířat a B - hmotnost jater v jednotlivých skupinách.

Vliv HFMCD a n-3 PUFA na koncentrace sérového cholesterolu a aktivity transamináz

Podávání HFMCD po dobu 6 týdnů vedlo k jaternímu poškození s elevací ALT (M, 1,29 $\mu\text{kat/l}$ vs. C, 0,64, $P < 0,01$). Suplementace n-3 PUFA zvýšení ALT kompletně normalizovala (MP, 0,73 $\mu\text{kat/l}$ vs. M, 1,29, $P < 0,01$); Obr. 3A. Sérová hladina TAG byla suplementací n-3 PUFA signifikantně snížena (CP, 0,86 vs. C, 1,08, $P < 0,05$; MP, 0,59 vs. M, 0,86, $P < 0,05$), zatímco samotná HFMCD neměla na sérovou koncentraci triacylglycerolů vliv (M, 0,86 vs. C, 1,08, $P = 0,073$); Obr. 3B. Podávání HFMCD dále vedlo k 1,7násobnému vzestupu sérových koncentrací cholesterolu v porovnání se standardní dietou. (M, 3,28 mmol/l vs. C, 2,02; $P < 0,001$). Hladina cholesterolu se podáním n-3 PUFA prakticky normalizovala (MP, 2,36 vs. M, 3,28 mmol/l; $P < 0,001$). Podávání n-3 PUFA vedlo k poklesu sérového cholesterolu i u kontrolní skupiny (CP, 1,49 vs. C, 2,02, $P < 0,0001$). Obr. 3C



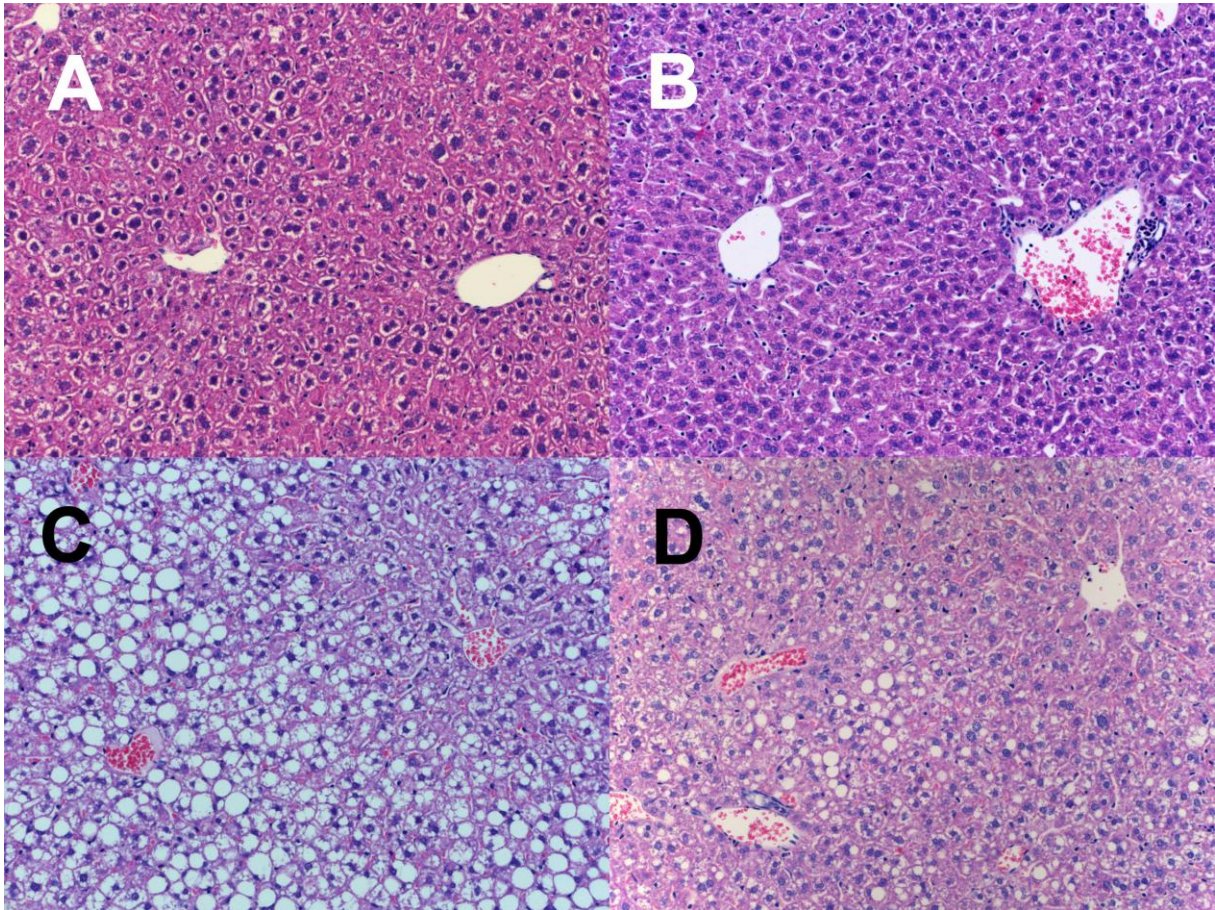
Obrázek 3 A, B, C. A - sérové hladiny ALT; B – sérové hladiny TAG; C – sérové hladiny cholesterolu

Jaterní histologie

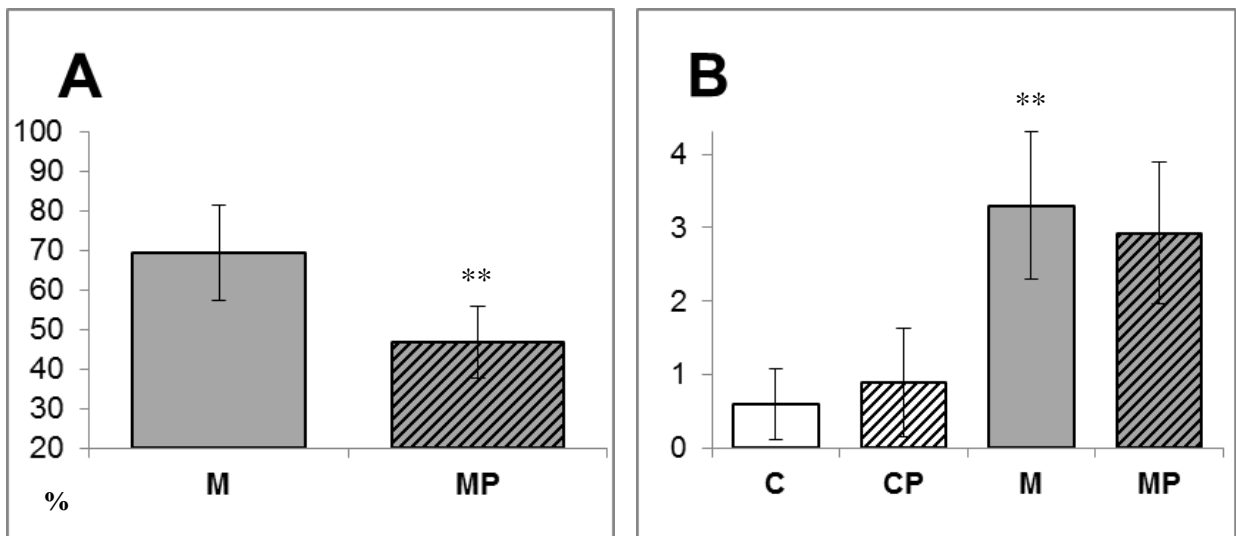
U kontrolních skupin (C, CP) nebyla pozorována steatóza a ballooning hepatocytů. V obou kontrolních skupinách byly u většiny zvířat patrné drobné fokální intralobulární zánětlivé infiltráty (C 5/6; CP 4/6) z velké většiny tvořené neutrofilními granulocyty. Žádné porto-lobulární zánětlivé infiltráty ani fibróza nebyla patrná.

V játrech zvířat s HFMCD (skupiny M a MP) je patrná jak steatóza, tak i častější intralobulární apoptóza hepatocytů (Obr. 4). Steatóza (její poměr vzhledem k ploše řezu) vykazuje výraznou fokální heterogenitu s oblastmi panlobulární steatózy, ale také oblastmi bez steatózy. Byla pozorována zejména zonální periportální makrovezikulární steatóza (M, 11 z 11 zvířat, MP 9/9). Panlobulární steatóza byla nalezena u 9/11 zvířat ve skupině M a 3/9 zvířat ve skupině MP. Ve skupině M byla u 8 zvířat nalezena mikrovezikulární steatóza. Míra steatózy byla signifikantně vyšší ve skupině M oproti MP (M, 69,4 % vs. MP. 46,8 %, $P < 0,01$), Obr. 5A. Podávání HFMCD vedlo i ke zvýšení NAS skóre. Obr. 5B

Intralobulární zánětlivé infiltráty byly pozorovány v obou skupinách krmených HFMCD, stejně tak zde byly nalezeny lipogranulomy. Apoptóza nebyla pozorována ve skupině M, ale naopak ve skupině MP (u 3 z 9 zvířat). Obr. 4.



Obrázek 4 A, B, C, D. Fotografie histopatologického nálezu, zvětšení objektivu 20x. A – skupina C; B – skupina CP, C – skupina M, D – skupina MP (laskavě poskytl as. MUDr. Jan Střítecký, CSc. Patologicko-anatomický ústav 1. LF UK a VFN).

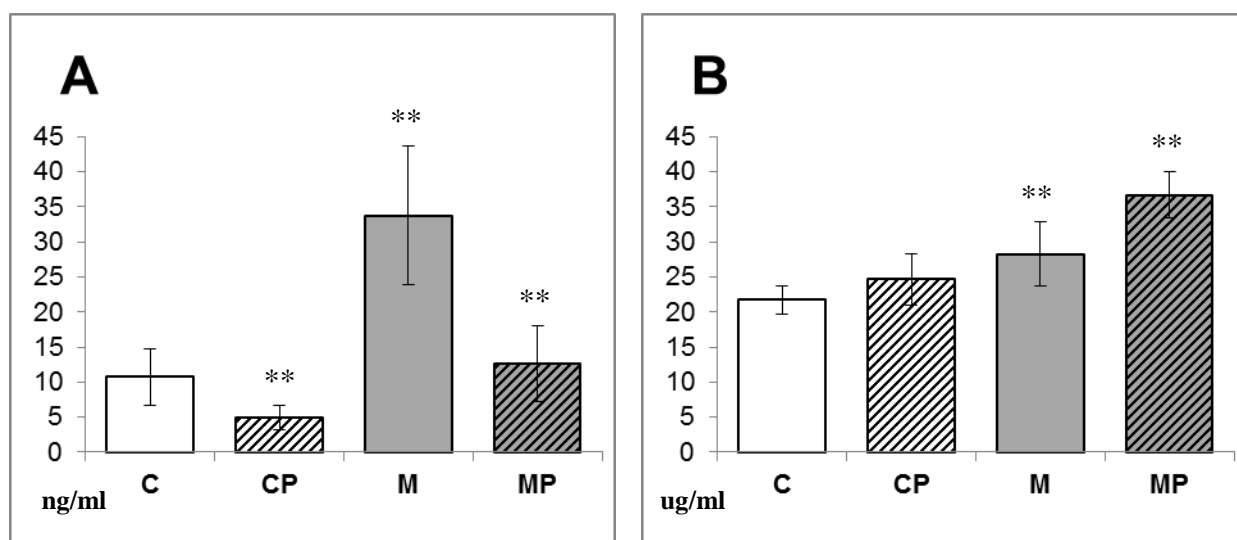


Obrázek 5 A, B. A – plocha steatózy, B – NAS skóre.

Účinek n-3 PUFA na hladinu adipokinů

Plazmatické koncentrace leptinu byly při podávání HFMCD signifikantně zvýšené (C, 10,7 ng/ml vs. M, 33,8, $P < 0,001$). Podávání n-3 PUFA hladinu leptinu normalizovalo (MP, 12,58 ng/ml vs. M, 33,8; $P < 0,001$). n-3 PUFA překvapivě snižovaly hladinu leptinu i u kontrolních skupin (CP, 4,9ng/ml vs. C 10,7, $P < 0,01$); Obr. 6A.

Hladina adiponektinu byla zvýšená u všech skupin kromě C, nejvyšší byla u M a MP (C, 21,7 $\mu\text{g/l}$ vs. M, 28,3, $P < 0,01$; M vs. MP, 34,2 $P < 0,01$); Obr. 6B.

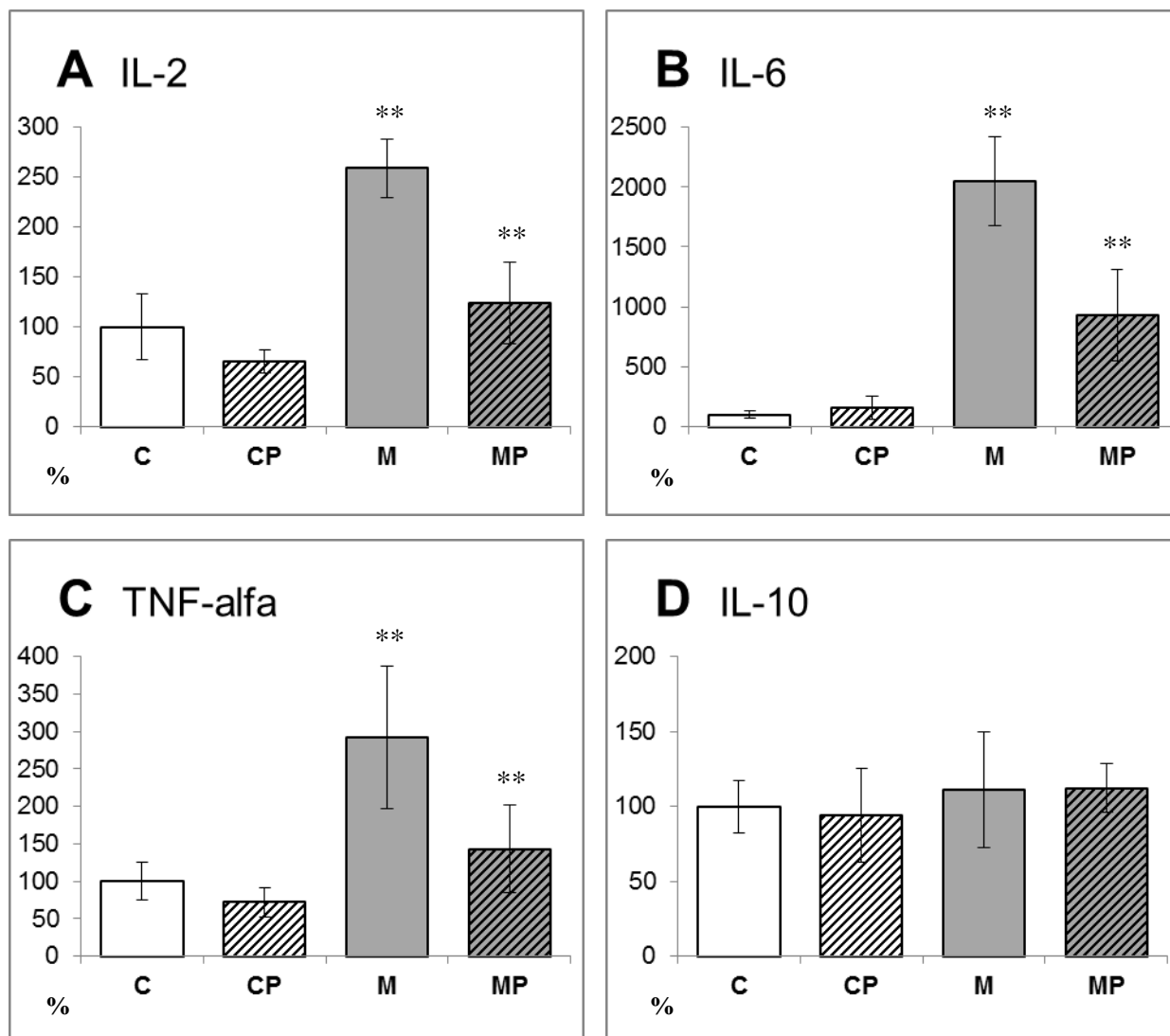


Obrázek 6 A, B. A – sérové hladiny leptinu; B – sérové hladiny adiponektinu.

Vliv n-3 PUFA na regulaci prozánětlivých cytokinů v játrech

Jaterní exprese genů kódujících klíčové prozánětlivé cytokiny je podáváním n-3 PUFA významně změněna. Expresa mRNA genů pro interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6) a $\text{TNF}\alpha$ byla minimálně 2-3násobně zvýšena při podávání HFMCD. IL-2 (M, 259% vs. C, 100%, $P < 0,001$), IL-6 (M, 2051% vs. C, $P < 0,001$), $\text{TNF}\alpha$ (M, 292% vs. C, $P < 0,001$) (Obr. 7). mRNA exprese těchto cytokinů byla výrazně redukována nebo normalizována podáváním n-3 PUFA: IL-2 (MP, 124% vs. M, 259%, $P < 0,001$), IL-6 (MP, 929% vs. M 2051%, $P < 0,001$), $\text{TNF}\alpha$ (MP, 143% vs. M, 292%), Obr. 7 A, B, C.

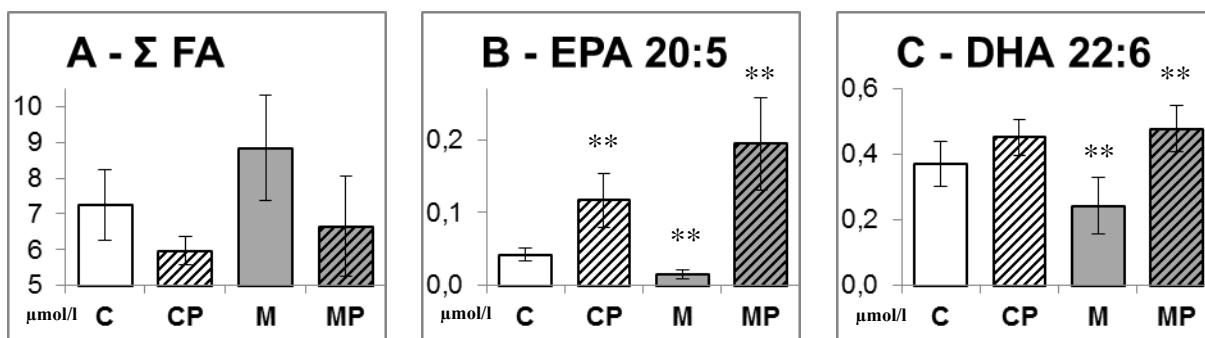
Na rozdíl od prozánětlivých cytokinů nebyla exprese mRNA pro IL-10 změněna. Obr.7 D



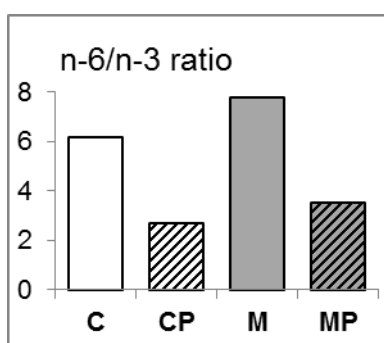
Obrázek 7 A, B, C, D. Expres mRNA cytokinů A – IL-2; B – IL-6; C – TNF α ; D – IL-10.

Vliv n-3 PUFA na sérové koncentrace a složení volných mastných kyselin

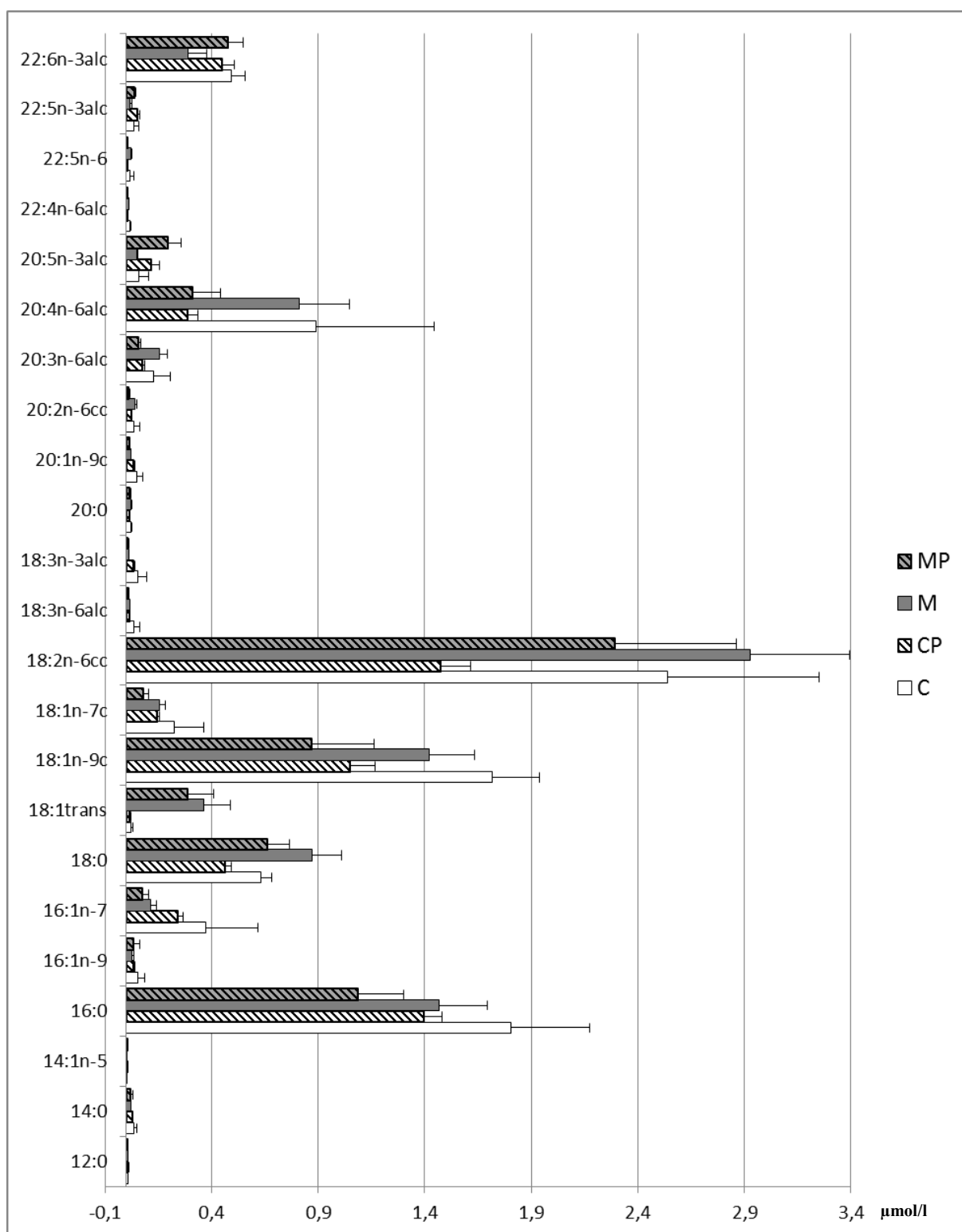
Celková koncentrace mastných kyselin byla nižší u skupin s n-3 PUFA (CP, MP) ve srovnání s kontrolami. (Obr. 8A). Koncentrace nasycených a mononenasycených mastných kyselin byla vyšší u skupin C a M ve srovnání se skupinami s n-3 PUFA (CP a MP), zatímco hladiny DHA a EPA byly suplementací n-3 PUFA zvýšeny (Obr 8B, C). Poměr n-6/n-3 polynenasycených mastných kyselin nebyl změněn u skupin C a M, zatímco suplementace n-3 PUFA měla tendenci tento poměr snižovat. Obrázek 9. Detailní složení plazmatických mastných kyselin ukazuje Obrázek 10.



Obrázek 8 A, B, C. Sérové koncentrace mastných kyselin A – celková koncentrace mastných kyselin; B – sérová hladina EPA; C – sérová hladina DHA



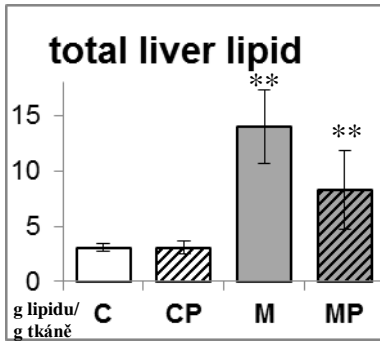
Obrázek 9. Poměr n-6/n-3 polynenasycených mastných kyselin v séru



Obrázek 10. Detailní složení mastných kyselin v séru

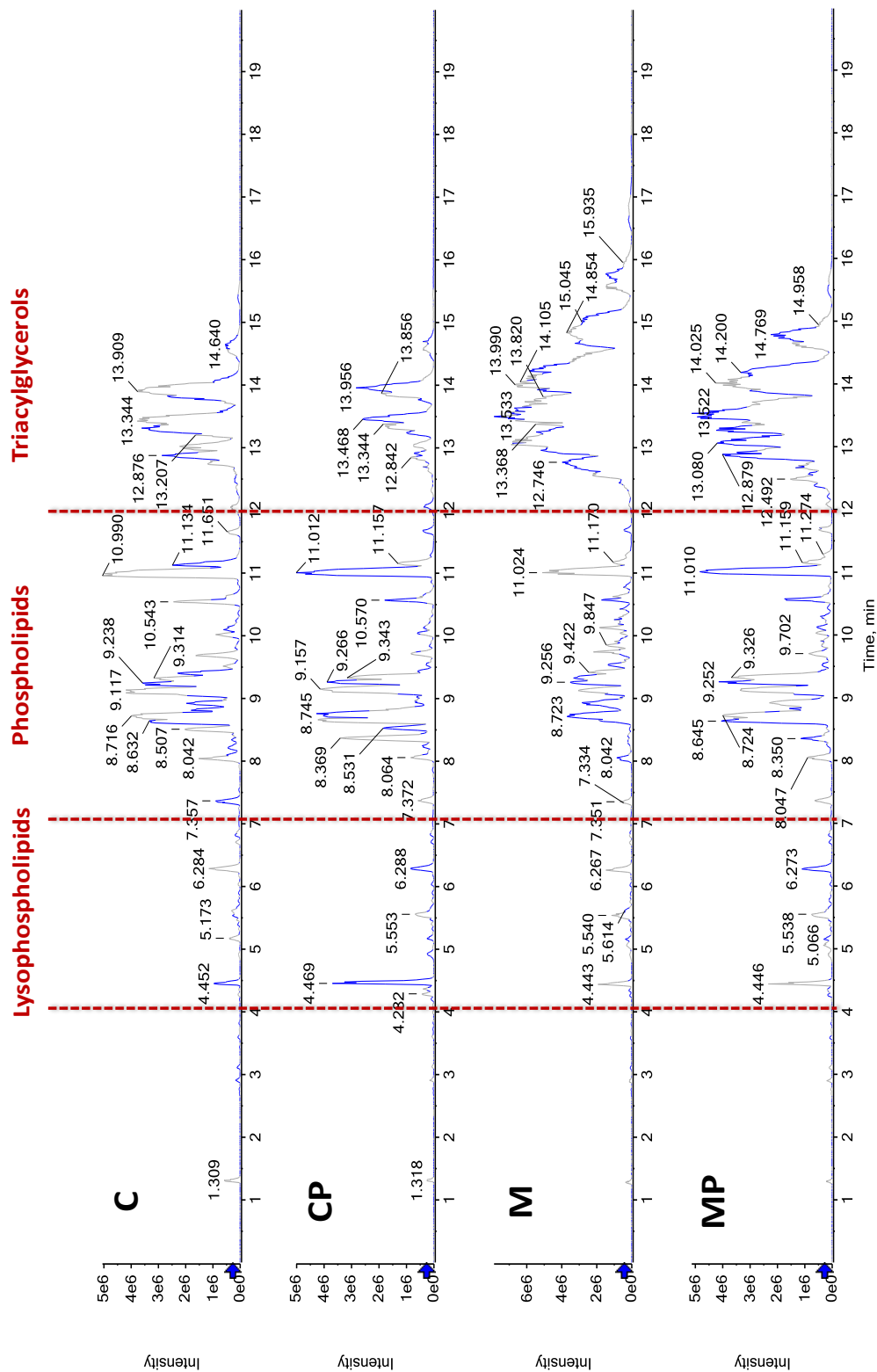
Vliv n-3 PUFA na obsah a složení jaterních triacylglycerolů

Ve skupině s HFMCDD (M, MP) došlo k signifikantnímu zvýšení obsahu lipidů v játrech (M, 13,97 g lipidů/100 g jaterní tkáň vs. C, 3,08, $P < 0,001$, MP, 8,29 vs. CP, 3,08, $P < 0,001$). Podávání n-3 PUFA vedlo ke snížení celkového obsahu lipidů v játrech ve skupině MP (MP, 8,29 vs. M, 13,97, $P < 0,01$), ale ne na úroveň kontrolních skupin (C, CP). Obr. 11.

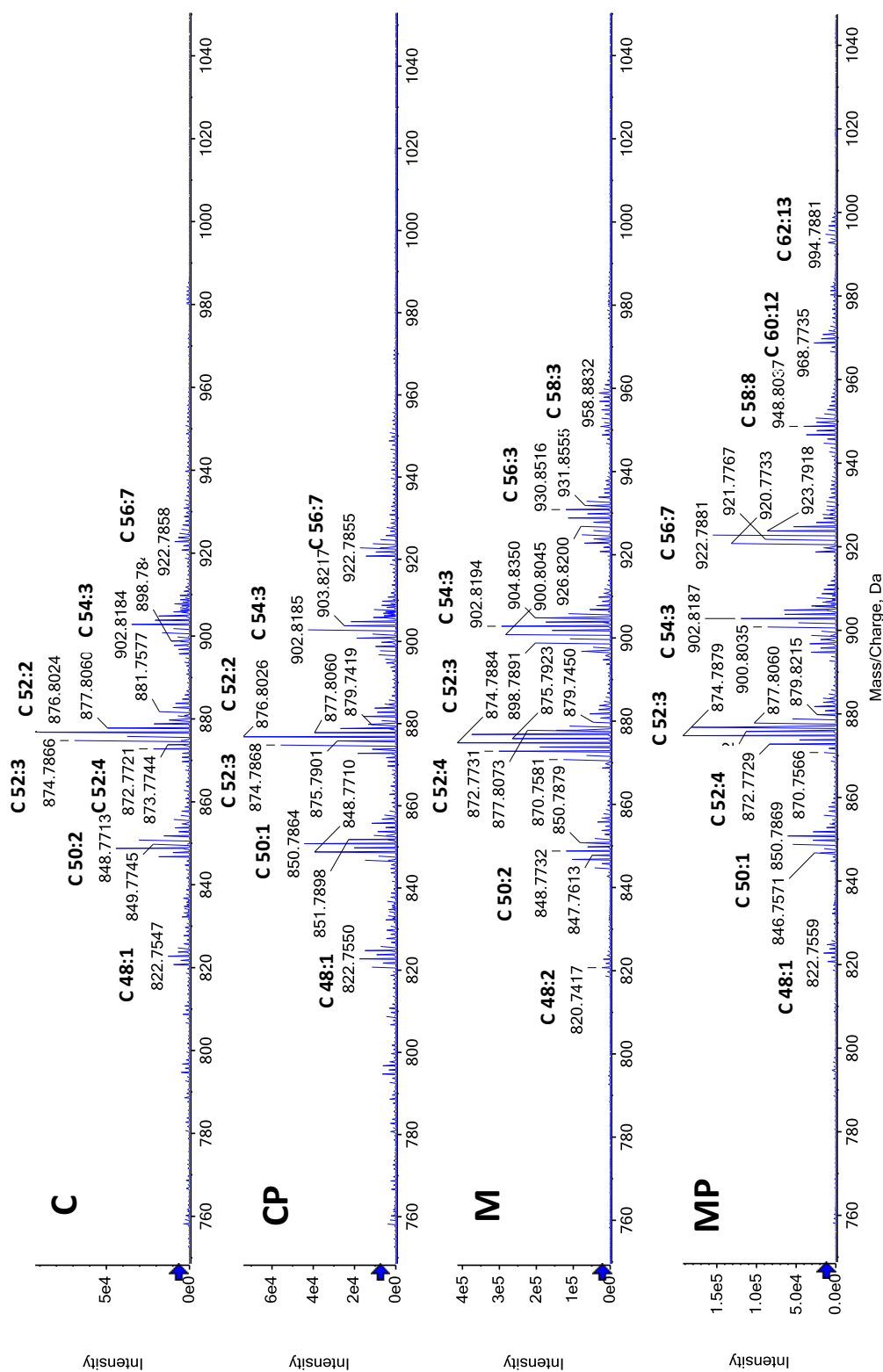


Obrázek 11 Celkový obsah lipidů v jaterní tkáni

Analyza jaterních lipidů pomocí ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením



Obrázek 12. Celkový iontový chromatogram (pozitivní MS ionization mode) cyklohexanový extrakt; typ diety: C - kontrola, CP – kontrola + n-3 PUFA, M - HFMC, MP – HFMC + n-3 PUFA

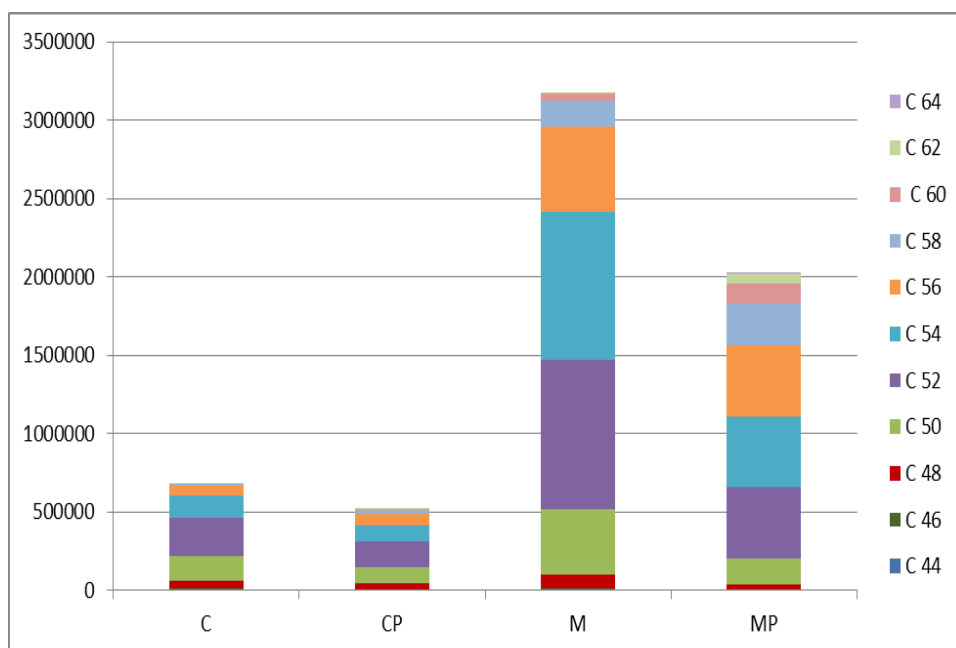


Obrázek 13. Hmotnostní spektra TAG, m/z 750 – 1050 (cyklohexan, positive ionization mode), retenční čas (RT) 12 – 17,5 min. Kódy C x:y ukazují celkový počet uhlíků (x) a počet dvojných vazeb (y) v mastných kyselinách vázaných na příslušný TAG.

Nejvýraznější rozdíly mezi jednotlivými skupinami jsou pozorovány mezi retenčními časy 12 - 17,5 minuty (Obr. 12), které odpovídají právě TAG. HFMCD výrazně zvýšila detekované TAG a jejich intenzity v játerní tkáni ve srovnání s kontrolními skupinami. Naopak, když byly do diety přidány PUFA, tak se intenzity TAG v játerní tkáni snížily (skupiny CP a MP).

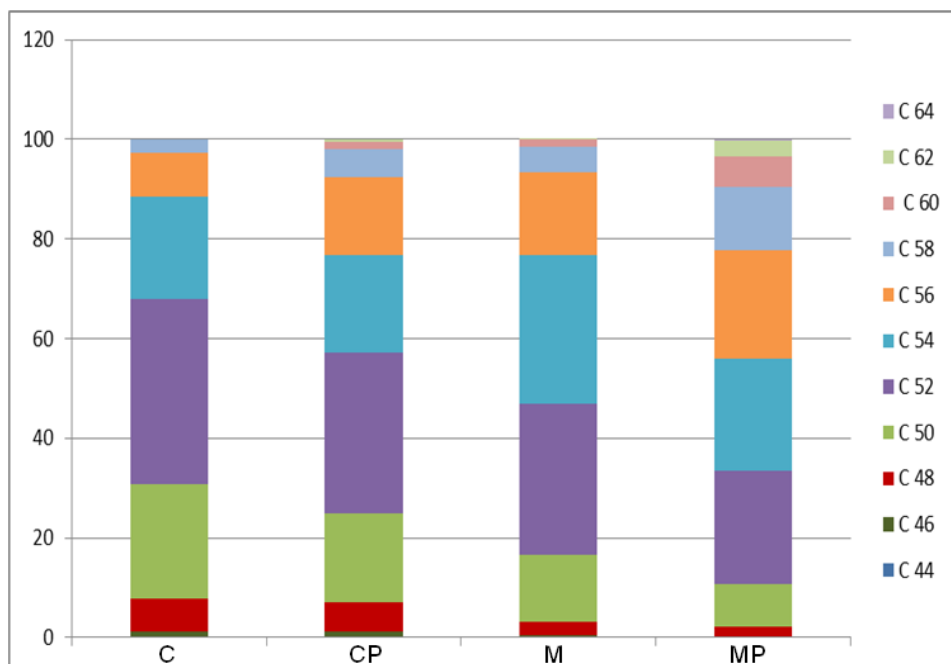
Z následného hodnocení získaných dat vyplývá, že játra myši krmených HFMCD obsahovaly TAG s vyššími m/z hodnotami (Obrázek 13), jinými slovy TAG obsahující mastné kyseliny s delším řetězcem. Navíc, když byly do diety přidány ještě n-3 PUFA, zvýšilo se ještě množství dvojných vazeb v mastných kyselinách.

K identifikaci a semikvantifikaci TAG byl použit software LipidView. Obrázek 14 ukazuje absolutní sumu intenzit TAG v játrech. Potvrzuje jak vzestup celkového množství triglyceridů v játrech u myši krmených MCD (M, MP) a také vliv n-3 PUFA na redukcii obsahu TAG v játrech (CP, MP). Průměrné relativní směrodatné odchylky RSD byly pro jednotlivé skupiny C 34,0 %, CP 60,8 %, M 36,2 %, MP 43,7 % (RSD vypočítána jako relativní směrodatná odchylka všech detekovaných TAG).



Obrázek 14. Absolutní součet TAG v játrech podle uhlíkových čísel, cyklohexanový extrakt (positive ionisation mode). Kódy C x ukazují celkový počet uhlíků (x) v mastných kyselinách vázaných na určitý TAG.

Byl nalezen vyšší obsah triacylglycerolů s delšími uhlíkatými řetězci (vyšším počtem uhlíků) C 58, C 60, C 62 a C 64 v játrech myši skupiny MP ve srovnání se skupinou M. Tento nárůst byl 155,8 % pro C 58, 288,1 % pro C 60, 2362,3 % pro C 62 a řetězce mastných kyselin s 64 uhlíky byly nalezeny pouze ve skupině MP. Na druhou stranu TAG s kratšími řetězci (C46, C 48, C 50) se vyskytují častěji u kontrolních skupin.



Obrázek 15. Distribuce TAG v cyklohexanových extraktech (positive ionisation mode). C x značí celkový počet uhlíků (x) v mastných kyselinách jednotlivých TAG. Zobrazeny relativní hodnoty po normalizaci dat.

Srovnáním záznamů vlivu n-3 PUFA na jaterní triacylglyceroly analyzované metodou UHPLC-HRMS u sledovaných skupin C (kontrola) a CP (kontrola + n-3 PUFA), M (HFMCD dieta) a MP (HFMCD + n-3 PUFA) lze uzavřít následujícím způsobem:

Při srovnání skupin molekulárních druhů TAG (dle CN:n DB) u skupin C a CP:

Skupiny C a CP (kontroly) se nelišily koncentrací TAG podle CN. Podávání n-3 PUFA snižovalo počet dvojných vazeb; ve skupině CP se ve srovnání se skupinou C objevila frakce C50:1 a vymizela frakce C50:2 a frakce C52:4. K těmto změnám došlo zřejmě na úkor frakce TAG C50:2 a C52:4.

Při srovnání skupin molekulárních druhů TAG (dle CN:n DB) u skupin M a MP:

Skupina M má ve srovnání se skupinou MP (ale i C) významně zvýšen obsah TAG. Toto zvýšení jde na vrub frakcí TAG C50, C52, C54 a C56, které přispívají z 90 % k celkovému obsahu TAG. n-3 PUFA snižovaly koncentraci frakcí C50, C52 a C54; vliv n-3 PUFA na obsah C56 není významný. Koncentrace C58 a C60 se významně zvyšují a v játrech se objevuje frakce C62, která je ve skupině M na hranici detekce. n-3 PUFA ovlivňují také počet dvojných vazeb ve frakcích TAG; při srovnání M a MP se objevují frakce C48:1 a C50:1. n-3 PUFA dále indukují přítomnost frakcí C56:7, C58:8, C60:12 a C62:13.

Klinická část

Skupina diabetiků 2. typu

Laboratorní nálezy a klinické parametry ve studované skupině pacientů jsou v Tabulce 4. Diagnóza metabolického syndromu na základě IDF kritérií byla přítomna u 93 % pacientů s DM2, kritéria AHA/IDF splňovalo 96 % pacientů. Podle původních WHO kritérií mělo diagnózu metabolického syndromu 96 % pacientů.

Tabulka 4. Demografické a laboratorní nálezy pacientů (hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka; * statistický rozdíl mezi pacienty s NAFLD a těmi bez známek jaterní léze).

Parametr	Všichni pacienti (n=180)	Pacienti s NAFLD (n=124)	Pacienti bez NAFLD (n=17)	Pacienti bez US vyšetření (n=39)	*p
Muži/ženy (počet)	113/67	78/46	9/8	26/13	0.354
Věk (roky)	64.2±9.3	63.5±9.1	66.1±13.6	65.4±7.7	0.193
Hmotnost (kg)	94.2±18,7	97,1±19,4	80,8±14,9	90,7±14,4	0.001
BMI (kg/m ²)	31,9±5.4	32.6±5.2	28.6±5.9	30.8±5.2	0.005
Obvod pasu (cm)	110.8±12.9	113.4±12.8	105.2±10.7	105.4±11.9	0.025
Hypertenze	82%	85%	71%	87%	0.835

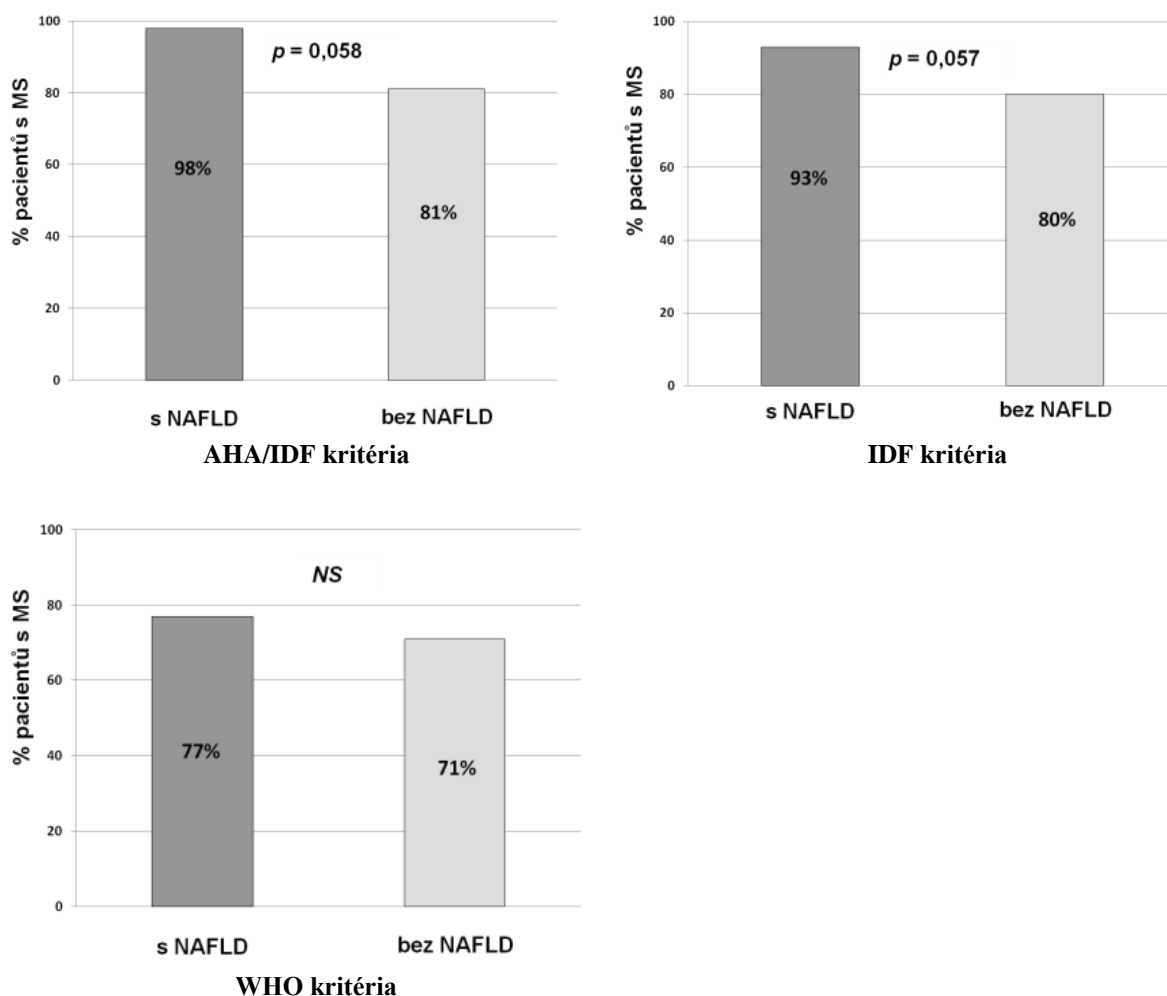
(% pacientů)					
Triglyceridy (mmol/l)	1.8±1.4	1.9±1.6	1.2±0.4	1.7±0.7	0.004
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.3±0.3	1.3±0.3	1.3±0.4	1.3±0.3	0.645
Glykémie na lačno (mmol/l)	7.6±3.5	7.9±3.9	7.6±4	6.9±1.6	0.660
Glykovaný Hb (mmol/mol)	53.4±16.4	54.7±18.5	51.6±11.4	49.8±8.3	0.897
Bilirubin (μmol/l)	10.6±10.4	11.1±11.9	10.4±3.4	9.6±6.5	0.23
ALT (μkat/l)	0.66±0.49	0.76±0.55	0.37±0.13	0.46±0.15	<0.001
AST (μkat/l)	0.54±0.3	0.5±0.34	0.4±0.09	0.42±0.09	0.003
GGT (μkat/l)	1.02±1.71	1.3±2	0.35±0.19	0.43±0.18	<0.001
Kys. močová (μmol/l)	322.9±84.8	326.3±94.4	313.4±54.9	315.9±60.6	0.743

K určení četnosti výskytu NAFLD jsme použili skupinu pacientů, u kterých bylo provedeno rovněž ultrazvukové vyšetření jater. Tato skupina čítala 122 ze 180 vyšetřených pacientů. Znamky NAFLD byly přítomny u 79 % pacientů. Ze zbylých pacientů bez dostupného ultrazvukového vyšetření mělo 10 vyšší ALT (a GGT) a dalších 8 mělo vyšší hodnoty GGT. Tito pacienti byli také považováni za pacienty se suspektním jaterním postižením.

Nejčastějším ultrazvukovým nálezem byla steatóza jater. 5 pacientů (4 %) mělo ultrazvukový nález jaterní cirhózy a 11 (9 %) jaterní fibrózy (Tabulka 5). Mezi skupinou pacientů s NAFLD a skupinou bez NAFLD nebyly nalezeny signifikantní rozdíly ve věku ani pohlaví. Stejně tak nebyly nalezeny rozdíly v parametrech kompenzace diabetu (hodnoty glykémie na lačno a glykovaného hemoglobinu). Pacienti s NAFLD však měli signifikantně vyšší tělesnou hmotnost, BMI, obvod pasu a hladinu triglyceridů v séru. Prakticky všichni pacienti s NAFLD (98 % podle AHA/IDF kritérií) měli metabolický syndrom. Počet pacientů s metabolickým syndromem byl ve skupině bez NAFLD nižší (Obr. 16).

Tabulka 5. Ultrazvukové nálezy u pacientů s DM2.

Ultrazvukový nález	Počet pacientů (%)
Jaterní cirhóza	5 (4 %)
Fibróza	11 (9 %)
Steatóza	80 (66 %)
Normální nález	26 (21 %)
Celkem vyšetřeno pacientů	122



Obrázek 16. Výskyt metabolického syndromu u pacientů s DM2 s a bez NAFLD. Metabolický syndrom diagnostikován na základě AHA/IDF, IDF nebo WHO kritérií.

V celé sledované skupině pacientů 79 % pacientů bylo léčeno statiny, 34 % dostávalo fibráty, 82 % užívalo antihypertenziva, 32 % mělo léčenou hyperurikémii. Co se týče kontroly diabetu, 4 % pacientů byla na dietě, 61 % užívalo perorální antidiabetika, 36 % perorální antidiabetika s inzulínem a 9 % pouze inzulín.

Pomocí lineární regrese jsme hodnotili korelaci přítomnosti jednotlivých rizikových faktorů s přítomností jaterní léze – NAFLD (Tabulka 6). Ze zkoumaných parametrů byla korelace nejtěsnější pro rizikové faktory související s vlastním metabolickým syndromem (tělesná hmotnost $p=0,001$, BMI $p=0,005$ a obvod pasu $p=0,025$). S ostatními parametry – např. parametry kompenzace diabetu (glykémie na lačno $p=0,813$, glykovaný hemoglobin 0,53) korelace nalezena nebyla.

Tabulka 6. Korelace mezi klinickými parametry a přítomností NAFLD ve skupině pacientů s NAFLD (lineární regrese).

Parametr	p hodnota
Tělesná hmotnost (kg)	0,001
BMI (kg/m^2)	0,005
Obvod pasu (cm)	0,025
Přítomnost hypertenze	0,108
Přítomnost hypertriglyceridémie	0,182
Glykémie na lačno (mmol/l)	0,813
Hodnota glykovaného hemoglobinu HbA1c (mmol/mol)	0,530
Bilirubin ($\mu\text{mol}/\text{l}$)	0,819
Léčba inzulínem	0,533
Léčba perorálními antidiabetiky	0,135
Léčba statiny	0,325
Léčba fibráty	0,855

Skupina pacientů s NAFLD

Charakteristika pacientů

NAFLD bylo diagnostikováno u 112 pacientů – 79 mužů a 33 žen. Mezi skupinami mužů a žen nebyly rozdíly v antropologických nebo biochemických parametrech nebo v pokročilosti jaterní fibrózy. Muži byli ve srovnání s ženami mladší ($46,1 \pm 14,5$ vs $55,6 \pm 14,3$ let, $p=0,002$). Klinické a laboratorní parametry všech pacientů s NAFLD a kontrol uvádí Tabulka 7. U zdravých kontrol byly ve srovnání se skupinou NAFLD/NASH signifikantně nižší hodnoty

glykémie, inzulínu, adiponektinu a fragmentů cytokeratinu 18 M30 i M65. Nebyly zjištěny rozdíly v sérových hodnotách zánětlivých markerů.

Tabulka 7. Porovnání klinických a laboratorních parametrů mezi skupinou pacientů s NAFLD a kontrolami (hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka).

Parametr	NAFLD (n=112)	Kontroly (n=14)	p-hodnota
Věk (roky)	48,9 ± 14,9	43,9 ± 9	ns
Glykémie na lačno (mmol/l)	5,98 ± 1,8	4,7 ± 0,4	<0,001
IL-2 (ng/l)	7,35 ± 22,7	10,33 ± 28,3	ns
IL-66 (ng/l)	18,37 ± 34,4	6,21 ± 6,7	ns
TNF α (ng/l)	11,84 ± 12	12,08 ± 8	ns
M30 (U/l)	379 ± 375	122 ± 49	<0,001
M65 (U/l)	884 ± 675	301 ± 79	<0,001
hsCRP (mg/l)	26,95 ± 27	15,5 ± 13,5	ns
TAC (%)	10,43 ± 2,4	8,23 ± 2,2	0,002
Leptin (mg/l)	10,82 ± 7,3	9,97 ± 8,7	ns
Adiponektin (mg/l)	6,72 ± 5,2	10,88 ± 5,5	0,002
Inzulín (mIU/l)	16,09 ± 11,4	7,59 ± 4,1	<0,001
HA (μ g/l)	49,5 ± 103	20,9 ± 15	ns

IL-2: interleukin 2, IL-6: interleukin 6, TNF α : tumor necrosis factor α , M30, M65: fragmenty cytokeratinu-18, hsCRP: vysoce senzitivní C-reaktivní protein, TAC: celková antioxidační kapacita, HA: hyaluronová kyselina.

Rozlišení NASH a prosté steatózy

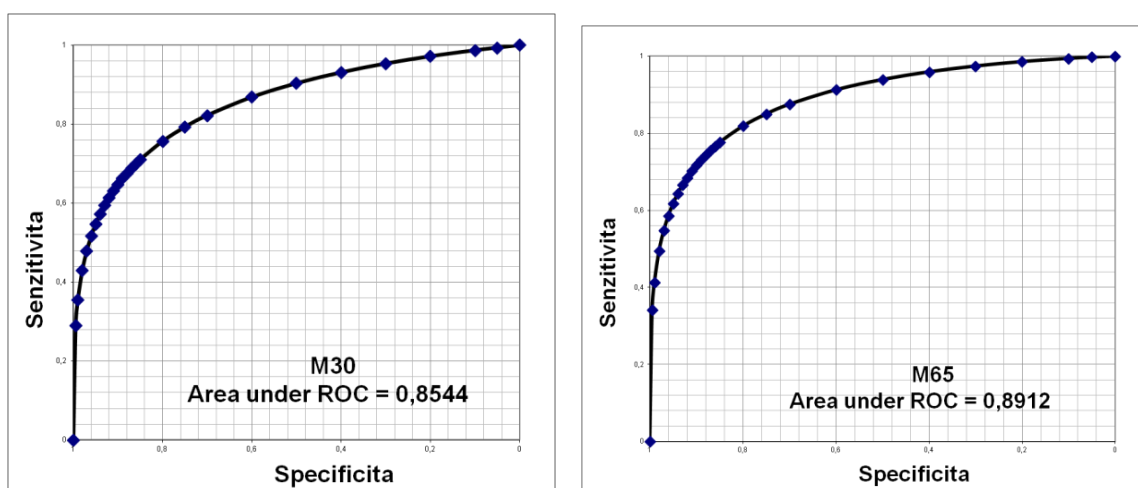
Histologické známky NASH byly přítomny u 38/56 pacientů, prostá steatóza u zbylých 18 pacientů. Klinická a laboratorní data těchto podskupin uvádí Tabulka 8. Pacienti s NASH měli signifikantně vyšší GGT, AST a triglyceridy. Pacienti s NASH měli dle očekávání také pokročilejší stupeň jaterní fibrózy (2,64±0,9 vs 1,3±1,4, p=0,002). Nicméně pacienti s pokročilou fibrózou F3 a F4 byli přítomni i ve skupině pacientů bez NASH (3 pacienti v této skupině měli cirhózu).

Sérové koncentrace fragmentů cytokeratinu 18 M30 a M65 byly signifikantně vyšší u pacientů s NASH. Senzitivita specifická fragmentů cytokeratinu 18 v rozlišení pacientů s a bez NASH byla kalkulována pomocí ROC křivek. Nejvíce signifikantním parametrem byla sérová koncentrace fragmentů M65 (senzitivita 80 %, specifická 82 %, pro cut-off hodnotu 750 U/l). AUROC pro M65 0,89, pro M30 0,85 (Tabulka 9, Obázek 17). Žádný další parametr neměl obdobnou senzitivitu a specifitu.

Tabulka 8. Klinické a laboratorní nálezy u pacientů s NAFLD a rozdělených podle přítomnosti histologických známek NASH (hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka).

Parametr	NASH+ n=38	NASH- n=18	p-hodnota
Věk (roky)	46,4 ± 15	43,6 ± 16	ns
BMI (kg/m ²)	31,2 ± 3,01	28,9 ± 4,47	ns
GGT (μkat/l)	5,34 ± 4,7	2,3 ± 2,9	0,004
ALT (μkat/l)	2,25 ± 1,6	1,54 ± 1,3	ns
AST (μkat/l)	1,28 ± 0,7	0,79 ± 0,4	0,003
Triglyceridy (mmol/l)	3,08 ± 3,4	1,46 ± 0,6	0,011
Stupeň fibrózy histologicky (Kleiner score)	2,64±0,9	1,3±1,4;	0,002
PIIINP (pg/ml)	539 ± 138	618 ± 147	ns
TIMP 1 (ng/ml)	91,6 ± 12,9	69,5 ± 17	0,004
IL-2 (ng/l)	2,42 ± 6,9	10,57 ± 34	ns
IL-6 (ng/l)	13,86 ± 24,7	18,7 ± 38,2	ns
TNFα (ng/l)	10,27 ± 7,2	10,51 ± 6,4	ns
M30 (U/l)	516 ± 394	181 ± 85	0,001
M65 (U/l)	1333 ± 804	836 ± 437	0,014
Hs CRP (mg/l)	22,48 ± 18,7	19,38 ± 22,6	ns
TAC (%)	11,5 ± 2,7	10,4 ± 2,2	ns
Leptin (mg/l)	9,8 ± 6,6	10,65 ± 6,9	ns
Adiponektin (mg/l)	7,53 ± 9,1	6,75 ± 4,4	ns
Inzulín (mIU/l)	23,99 ± 20,1	14,04 ± 8,4	ns
HA (μg/l)	69,9 ± 112	20,3 ± 14,1	0,057
AST/ALT	0,65 ± 0,2	0,72 ± 0,4	ns
APRI	0,86 ± 0,5	0,65 ± 0,5	ns

ALT-alaninaminotransferza, AST-aspartátaminotransferáza, BMI-body mass index, GGT-gamaglutamyltrasferáza, HA-hyaluronová kyselina, IL-2-interleukin-2, IL-6-interleukin-6, M30/M65-fragmenty cytokeratinu M30/M65, PIIINP-N-terminální peptid prokolagenu-3, TAC-celková antioxidační kapacita, TIMP1-tkáňový inhibitor metaloproteinázy-1, TNFα – tumor nekrotizující faktor α



Obrázek 17. Senzitivita a specifická fragmentů cytokeratinu 18 M30/M65 v rozlišení pacientů s NASH.

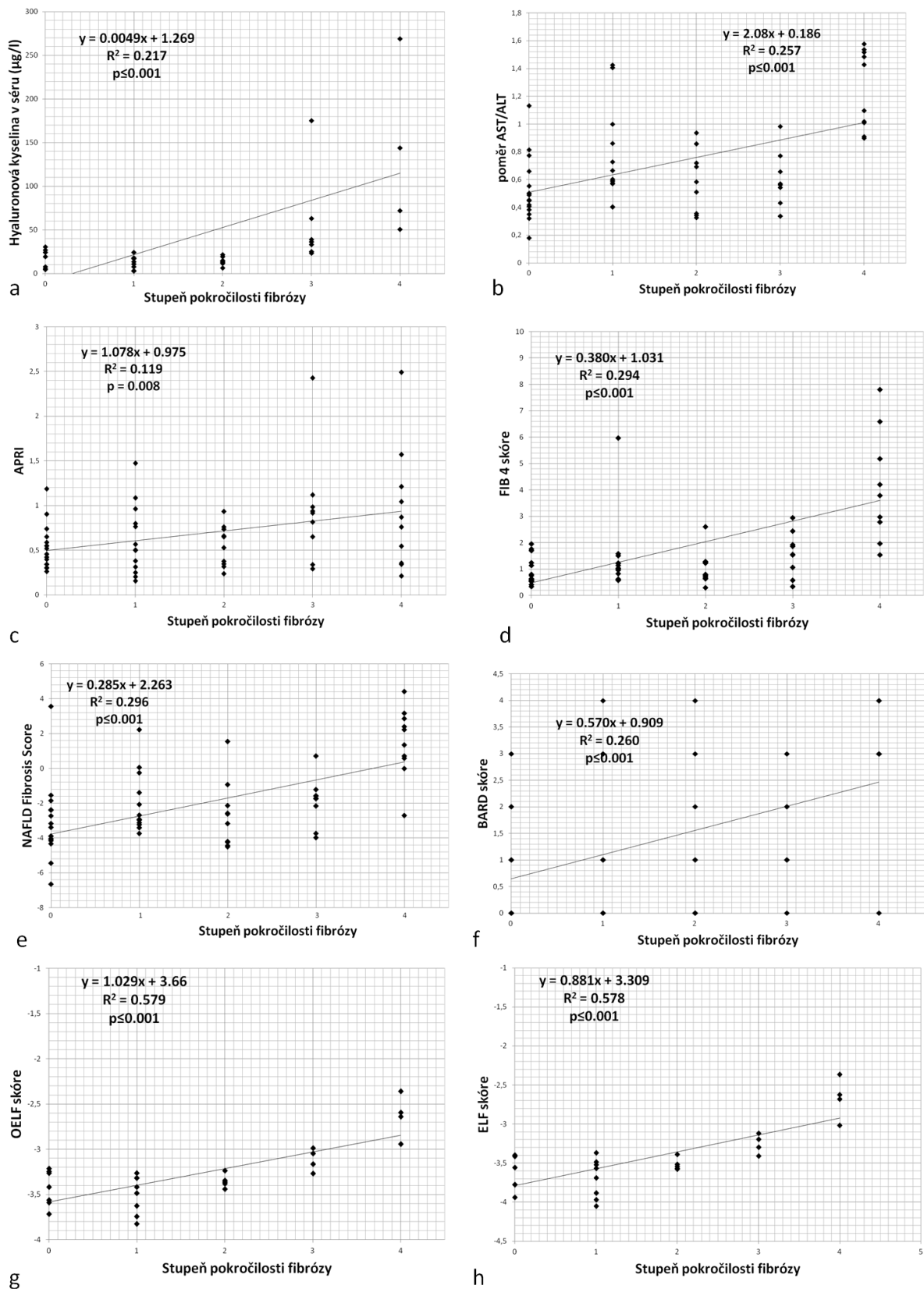
Tabulka 9. Senzitivita a specifická parametrů při rozlišení mezi pacienty s/bez histologického nálezu NASH.

Parametr	Cut-off hodnota	Senzitivita	Specifická	95% CI
M30 (U/l)	211	0,79	0,76	0,56-0,93
	234	0,75	0,81	0,50-0,92
M65 (U/l)	789	0,78	0,85	0,48-0,93
	737	0,80	0,82	0,57-0,95
AST (μ kat/l)	0,6	0,71	0,55	0,54-0,88
ALT (μ kat/l)	1,02	0,71	0,60	0,52-0,85
GGT (μ kat/l)	1,66	0,57	0,50	0,28-0,83

ALT-alaninaminotransferza, AST-aspartátaminotransferáza, GGT-gamaglutamyltransferáza, M30/M65-fragmety cytokeratinu M30/M65

Rozlišení pokročilosti jaterní fibrózy

Celá skupina pacientů s jaterními biopsiemi byla rozdělena podle jednotlivých stupňů pokročilosti jaterní fibrózy (Tabulka 10). Pacientů s nepokročilou fibrózou (F0 – F2) bylo 39, pacientů s pokročilou fibrózou (F3 – F4) bylo 17. Pacienti s jaterní cirhózou (F4) byli ve srovnání s ostatními pacienty signifikantně starší ($p < 0,01$). Stupeň pokročilosti jaterní fibrózy jednoznačně koreloval se sérovou koncentrací hyaluronové kyseliny (HA). ($p < 0,001$, koncentrace HA $< 75 \mu\text{g/l}$ vylučovala přítomnost pokročilé fibrózy F3 – F4, Tabulka 12). Obdobně korelovaly stupně pokročilosti s různými skórovacími systémy (poměr AST/ALT, $p < 0,001$; APRI skóre, $p < 0,01$; NAFLD Fibrosis Score, $p < 0,001$; FIB 4 skóre, $p < 0,001$, BARD skóre, $p < 0,001$) Obrázky 18a-h, Tabulka 11. Stupeň pokročilosti jaterní fibrózy nekoreloval s parametry související s apoptózou a nekrotózou hepatocytů – fragmenty cytokeratinu 18 M30 a M65.



Obrázek 18 a-h. Korelace jednotlivých neinvazivních parametrů s histologickým nálezem a – hyaluronová kyselina; b – AST/ALT; c – APRI skóre; d – FIB 4 skóre; e – NAFLD Fibrosis Score; f – BARD skóre; g – OELF skóre; h – ELF skóre.

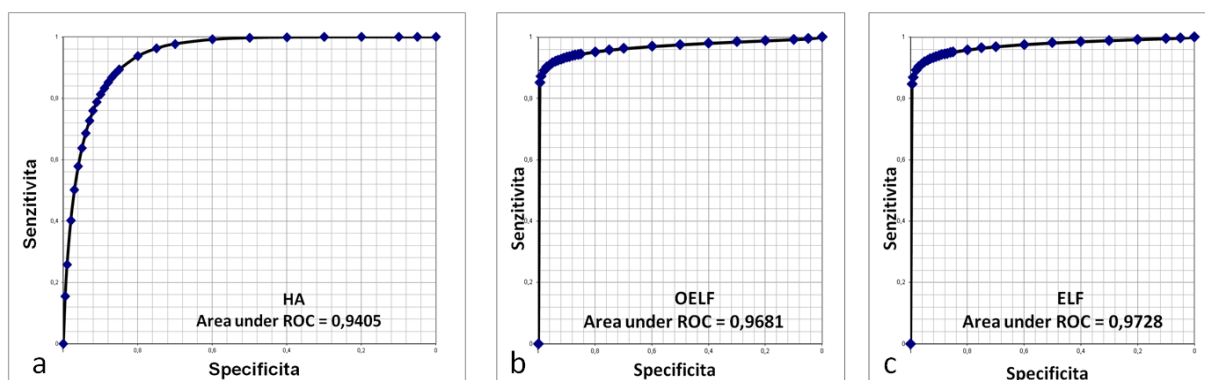
Tabulka 10. Klinické a laboratorní nálezy u pacientů s NAFLD podle jednotlivých stupňů pokročilosti jaterní fibrózy (hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka, ** p≤0,01; *p≤0,05; ns nesignifikantní).

Parametr	F0 (n=16)	F1 (n=13)	F2 (n=10)	F3 (n=9)	F4 (n=8)	p-hodnota
Věk (roky)	37,8 ± 13,8	42,1 ± 14	37,6 ± 10,6	46,2 ± 133	66,6 ± 6	F4 vs. F0-3**
BMI (kg/m ²)	27,5 ± 4	30,5 ± 3,2	28,5 ± 5,2	31,3 ± 4,9	31,3 ± 3,2	F4 vs. F0*
ALT (μkat/l)	1,8 ± 0,9	1,4 ± 1,3	1,8 ± 1,5	2,6 ± 1,9	0,5 ± 0,2	F4 vs. F0-3*
AST (μkat/l)	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,6	0,9 ± 0,5	1,3 ± 0,7	0,6 ± 0,3	ns
GGT (μkat/l)	3,6 ± 4,4	1,9 ± 2,7	2,9 ± 1,7	5,3 ± 5,1	1,8 ± 1,4	F4 vs. F3*
Triglyceridy (mmol/l)	1,58 ± 0,7	2,5 ± 3,4	1,6 ± 0,8	2 ± 0,9	1,4 ± 0,8	ns
Albumin (g/l)	46 ± 3,6	43,6 ± 5,5	44,7 ± 5	45,8 ± 4,7	35,5 ± 12,5	F4 vs. F0*
Trombocyty (*10 ⁹ /l)	210 ± 44	201 ± 54	223 ± 67	215 ± 65	119 ± 55	F4 vs. F0-3*
PIIINP (pg/ml)	602 ± 134	542 ± 174	699 ± 141	518 ± 32	994 ± 195	F4 vs. F2.3* F4 vs. F0.1**
TIMP 1 (ng/ml)	65 ± 20	78 ± 16	73 ± 17	98 ± 10	169 ± 83	F4 vs. F0.1*
IL-2 (ng/l)	0,72 ± 1	0,93 ± 0,7	17,49 ± 51	4,13 ± 9,1	16,88 ± 29	ns
IL-6 (ng/l)	5,95 ± 7	4,29 ± 2,7	23,41 ± 54	15,45 ± 32	41,9 ± 49	F4 vs. F0-3*
TNFα (ng/l)	6,44 ± 3,7	10,25 ± 4,4	10,16 ± 6,3	7,23 ± 5	15,7 ± 10,9	ns
M 30 (U/l)	339 ± 292	365 ± 202	399 v 307	643 ± 472	392 ± 548	ns
M 65 (U/l)	834 ± 533	992 ± 412	871 ± 510	1325 ± 751	1223 ± 957	ns
hs CRP (mg/l)	14,56 ± 6,5	19,82 ± 21	22,05 ± 33	26,03 ± 14	22,09 ± 11	ns
TAC (%)	10,11 ± 1,3	11,62 ± 3,1	10,67 ± 1,5	11,91 ± 2,6	9,15 ± 2,3	ns
HA (μg/l)	21,31 ± 11	13,11 ± 6,7	20,87 ± 20	92,58 ± 129	269,5 ± 315	F4 vs. F1.2*; F4 vs. F0**; F3 vs. F0-2**
AST/ALT	0,52 ± 0,2	0,76 ± 0,3	0,62 ± 0,2	0,58 ± 0,2	1,25 ± 0,3	ns
APRI	0,53 ± 0,2	0,61 ± 0,4	0,55 ± 0,2	0,94 ± 0,6	0,94 ± 0,7	ns
FIB-4	0,88 ± 0,5	1,43 ± 1,5	1,02 ± 0,6	1,58 ± 0,8	4,89 ± 3,2	ns
NAFLD Fibrosis Score	-3,72 ± 3,1	-2,05 ± 1,7	-2,73 ± 1,9	-1,9 ± 1,4	1,49 ± 2	ns
BARD	0,76 ± 0,9	1,23 ± 1,3	1,2 ± 1,4	1,33 ± 0,9	3 ± 1,1	ns
OELF		-3,44 ± 0,18		-2,88 ± 0,31		F0-2 vs. F3-4**
ELF		-3,62 ± 0,21		-2,96 ± 0,37		F0-2 vs. F3-4**

Tabulka 11. Korelace mezi stupněm pokročilosti jaterní fibrózy a klinickými a laboratorními parametry a neinvazivními skóre (lineární regrese).

Parametr	r	p
Věk (roky)	0,589	p<0,001
Trombocyty (*10 ⁹ /l)	-0,353	p<0,01
Albumin (g/l)	-0,320	p<0,05
BMI (kg/m ²)	0,293	p<0,05
TIMP 1 (ng/ml)	0,590	p<0,01
IL6 (ng/l)	0,331	p<0,05
Inzulín (mIU/l)	0,366	p<0,05
HA (µg/l)	0,486	p<0,001
poměr AST/ALT	0,501	p<0,001
APRI	0,345	p<0,01
FIB-4	0,544	p<0,001
NAFLD Fibrosis Score	0,540	p<0,001
BARD skóre	0,510	p<0,001
OELF skóre	0,761	p<0,001
ELF skóre	0,760	p<0,001

K rozlišení mezi pokročilou jaterní fibrózou (F3 – F4) a nepokročilou fibrózou (F0 – F2) jsme vypočítali senzitivitu a specifitu průzných parametrů. Nejvýznamnější parametrem se v tomto ohledu ukázala sérová koncentrace HA (senzitivita 80 %, specifita 91 % při cut-off hodnotě 30 µg/l; respektive 90 % a 84 % při cut-off hodnotě 25 µg/l; AUROC 0,94; Obrázek 19a-c, Tabulka 12). OELF skóre (senzitivita 92 %, specifita 93 % při cut-off hodnotě -3,24; AUROC 0,93) a ELF skóre (senzitivita 90 %, specifita 97 % při cut-off hodnotě -3,37; AUROC 0,97). Ostatní parametry nedosahovaly statistické významnosti. Vypočítané AUROC hodnoty pro ostatní skóre byly AST/ALT 0,73; APRI skóre 0,7; NAFLD Fibrosis Score 0,81; FIB-4 skóre 0,83; BARD skóre 0,77 (Tabulka 13).



Obrázek 19a-c. Senzitivita a specifita a- HA; b – OELF; c- ELF testu v rozlišení pokročilé a nepokročilé fibrózy.

Tabulka 12. Senzitivita a specificita různých parametrů v rozlišení mezi pacienty s pokročilou fibrózou (F3, F4) and pacienty s žádnou nebo mírnou fibrózou (F0-F2).

Parametr	Cut-off hodnota	Senzitivita	Specificita	95% CI
HA (μg/l)	25	0,90	0,84	0,59-0,99
	30	0,80	0,91	0,44-0,96
FIB-4 skóre	1,24	0,78	0,72	0,59-0,92
	1,51	0,73	0,78	0,50-0,87
NAFLD Fibrosis Score	-2,16	0,78	0,70	0,54-0,92
APRI skóre	0,65	0,64	0,66	0,40-0,79
poměr AST/ALT	0,67	0,67	0,67	0,44-0,82
OELF skóre	-3,24	0,92	0,93	0,58-0,99
ELF skóre	-3,37	0,9	0,97	0,51-0,99
	-3,39	0,93	0,93	0,51-0,99

Porování skupin pacientů s a bez jaterní biopsie

Ke zhodnocení použitelnosti zkoumaných neinvazivních markerů byly porovnány klinické a laboratorní parametry u pacientů s a bez jaterní biopsie (Tabulka 13). Na základě neinvazivního parametru M65 (cut-off hodnota 750 U/l) měli pacienti indikovaní k jaterní biopsii častěji steatohepatitidu než pacienti, kteří k jaterní biopsii indikováni nebyli (68 % vs 16 %, $p < 0,001$). Při hodnocení jaterní fibrózy (HA, cut-off hodnota 30 μg/l) by přibližně stejná část pacientů měla významnou fibrózu (35 % vs 29 % u bioptovaných, ns).

Tabulka 13. Klinické a laboratorní parametry u skupin pacientů s/bez provedené jaterní biopsie (hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka).

Parametr	biopsie +	biopsie -	p-hodnota
Věk (roky)	44,1 ± 15	52,5 ± 14	0,007
BMI	29,6 ± 4,3	30,9 ± 3,3	0,193
GGT (μkat/l)	3 ± 3,5	1,55 ± 1,4	0,012
ALT (μkat/l)	1,63 ± 13	0,99 ± 0,6	0,044
AST (μkat/l)	0,89 ± 0,5	0,65 ± 0,3	0,030
TAG (mmol/l)	1,8 ± 1,7	1,8 ± 0,9	0,774
Albumin (g/l)	46,1 ± 23,3	46,1 ± 4,9	0,99
Trombocyty (*10 ⁹ /l)	194 ± 66	242 ± 68	<0,001
IL-2 (ng/l)	10,46 ± 28,8	2,87 ± 5,6	0,445
IL-6 (ng/l)	24 ± 42,2	10,1 ± 14,5	0,310
TNFα (ng/l)	11,4 ± 8,5	12,5 ± 16	0,712
M30 (U/l)	433 ± 373	336 ± 375	0,021
M65 (U/l)	1091 ± 742	544 ± 346	<0,001
hsCRP (mg/l)	20,9 ± 20,6	32,4 ± 32,6	0,368
TAC (%)	10,4 ± 2,4	10,5 ± 2,5	0,802
Leptin (mg/l)	10,9 ± 7,3	10,8 ± 7,4	0,839
Adiponektin (mg/l)	7,1 ± 6,5	6,3 ± 3,6	0,798

Inzulín (mIU/l)	18,3 ± 14,6	14,1 ± 7,1	0,250
HA (µg/l)	57,8 ± 131	37,6 ± 36,4	0,298
poměr AST/ALT	0,72 ± 0,36	0,73 ± 0,25	0,293
APRI skóre	0,67 ± 0,47	0,43 ± 0,35	<0,001
FIB-4 skóre	1,83 ± 2,1	1,26 ± 0,85	0,575
NAFLD Fibrosis Score	-2,02 ± 2,8	-2,71 ± 2,2	0,196
BARD skóre	1,43 ± 1,3	1,5 ± 1,4	0,789

DISKUSE

Podávání HFMCD diety vedlo u myší v našem experimentu ke změnám typickým pro NAFLD. Zvířata měla významně vyšší hmotnost, vyšší aktivitu ALT a hladinu cholesterolu v séru. Játra těchto zvířat byla celkově těžší, s histologickým obrazem jaterní steatózy, která vykazovala výraznou fokální heterogenitu. Byla pozorována zejména zonální periportální makrovezikulární steatóza.

Podávání n-3 PUFA zabraňovalo nárůstu hmotnosti zvířat a mělo příznivý vliv na jaterní poškození. Vedlo k normalizaci aktivity ALT a také snižovalo celkovou hmotnost jater. Míra steatózy jater hodnocená celkovou plochou postižení hepatocytů v reprezentativní části vzorku jaterní tkáně byla u zvířat s n-3 PUFA ve srovnání s kontrolami signifikantně nižší. Tyto výsledky korespondují s literaturou, protektivní efekt n-3 PUFA na vznik jaterní steatózy byl prokázán jak v mnoha experimentech (Sekiya et al., 2003, Alwayn et al., 2005, Batetta et al., 2009, Gonzalez-Periz et al., 2009, Tandy et al., 2009, Ferramosca et al., 2012, Rossmeisl et al., 2014), tak u lidí (Spadaro et al., 2008, Tanaka et al., 2008) a tento příznivý efekt podporuje i metaanalýza RCT u lidí z roku 2012 (Parker et al., 2012).

Podávání n-3 PUFA vedlo k poklesu sérové hladiny cholesterolu u experimentální i u kontrolní skupiny myší. Obdobný efekt jsme pozorovali i u sérové hladiny TAG, která však nebyla podáváním HFMCD diety signifikantně zvýšena. Celkové množství lipidů v játrech myší bylo podáváním HFMCD ve srovnání s kontrolami zvýšeno. Podávání n-3 PUFA kontrolní skupině ke zvýšení celkového obsahu lipidů v játrech nevedlo. Vedlo ovšem k významnému snížení obsahu lipidů v játrech u skupiny s HFMCD, ne však na úroveň kontrolních skupin.

Ze záznamů UHPLC-HRMS analýzy jaterní tkáně jsou patrné rozdíly ve složení TAG mezi jednotlivými skupinami. Skupiny C a CP (kontroly) se nelišily koncentracemi frakcí TAG podle počtu uhlíků v mastných kyselinách (CN – carbon number: n – počet dvojných vazeb). Objevení se frakce C50:1 a vymizení frakcí C50:2 a C52:4 lze interpretovat indukcí peroxisomální β -oxidace a zkracováním délky řetězce mastné kyseliny (FA) a redukcí počtu dvojných vazeb a následnou reesterifikací na TAG. Ve skupině s HFMCD (M) je ve srovnání se skupinou MP, která dostávala navíc n-3 PUFA (ale i s kontrolou) významně zvýšen obsah TAG. Toto zvýšení jde na vrub frakcí C50, C52, C54 a C56, které přispívají z 90 %

k celkovému obsahu TAG. Efektu podávání n-3 PUFA se projevilo zejména snížením koncentrací frakcí C50, C52 a C54, významným zvýšením koncentrací frakcí C58 a C60 a objevením se frakce C62, která je ve skupině M na hranici detekce. n-3 PUFA dále ovlivňují počet dvojných vazeb ve frakcích TAG, při srovnání M a MP se objevují (podobně jako u skupin C a CP) frakce C48:1 a C50:1. Dále n-3 PUFA indukují přítomnost frakcí C56:7, C58:8, C60:12 a C62:13 ve skupině MP.

Hypotriglyceridemizující vliv n-3 PUFA je komplexní povahy. Souvisí s prokázanými účinky n-3 PUFA na metabolismus lipidů vedoucími zejména ke snížení lipogeneze v játrech a ke zvýšení oxidace FA (Rossmeisl et al., 2014). Patří mezi ně 1/ modulace exprese hlavních transkripčních faktorů, zejména PPAR α (Sanderson et al., 2008) a SREBP-1c (Sampath, Ntambi, 2005); 2/ tkáňová produkce eicosanoidů a dalších lipidových regulátorů (Flachs et al., 2009); 3/ indukce adiponektinu (Flachs et al., 2006) a změny endokannabinoidní signalizace (Piscitelli et al., 2011).

n-3 PUFA snižují dostupnost FA pro syntézu TAG ovlivněním enzymů lipogeneze, indukci β -oxidace v mitochondriích a indukci peroxisomální ω -oxidace se zkracováním FA a redukcí dvojných vazeb. Následně dochází k reesterifikaci TAG a objevení se frakcí C48:1 a C50:1. Přítomnost frakcí C58 a vyšších s vyšším počtem dvojných vazeb lze vysvětlit mechanisticky. Suplementace u skupiny MP přísunem DHA (C22:6 n-3) a EPA (C20:5 n-3) může vysvětlit 13 dvojných vazeb (DB): například 2x DHA a 1x kyselina olejová (18:1 n-9) a ostatní možné kombinace. Otázkou zůstává, proč u skupiny CP chybí ve srovnání s MP C58:8 až C62:13.

Celkové koncentrace mastných kyselin v séru byly zvýšeny u skupin s HFMCD a kontrolní dietou, podávání n-3 PUFA vedlo k jejich poklesu. Sérové koncentrace EPA a DHA byly ve srovnání s kontrolou podáváním HFMCD signifikantně sníženy, suplementace vedla k jejich signifikantnímu zvýšení. S tím souvisí i nález, že jak zvířata v kontrolní skupině, tak v HFMCD skupině vykazovala vysoký poměr n-6/n-3 PUFA v séru. Má se za to, že zvýšení n-6 PUFA může být jednou z přímých patogenetických příčin NAFLD a NASH (El-Badry et al., 2007). Přítomnost nadbytku n-6 PUFA vede k tvorbě eikosanoidů z arachidonové kyseliny, které mají prozánětlivé účinky (Simopoulos, 2003). Suplementace n-3 PUFA tento poměr v našem experimentu vrátila do fyziologického rozmezí (1:1 – 1:4). Změny poměru n-6/n-3 PUFA ve prospěch n-6 jsou známy i ze studií u pacientů s NAFLD (Araya et al., 2004, Elizondo et al., 2007, Pettinelli et al., 2009). To souvisí i s dietními návyky těchto pacientů.

Ve srovnání s kontrolami vykazují nižší konzumaci ryb (Zelber-Sagi et al., 2007), polynenasycených tuků (Musso et al., 2003) a vyšší konzumaci n-6/n-3 tuků (Cortez-Pinto et al., 2006).

Podávání n-3 PUFA příznivě ovlivňuje hladinu adipokinů, popisováno je zejména zvýšení hladiny adiponektinu (Flachs et al., 2006). Snížená hladina adiponektinu je klíčový etiologický faktor přispívající k téměř všem komplikacím obezity (Kawano, Arora, 2009). Je spojena s oxidačním stresem, endoteliální dysfunkcí a subklinickým zánětem (Balistreri et al., 2010). Ačkoli 3D-struktura adiponektinu výrazně připomíná TNF α , jejich efekty jsou zcela opačné (Shapiro, Scherer, 1998). Jak in vivo, tak in vitro experimenty prokázaly, že adiponektin a TNF α vzájemně potlačují svoji produkci a rovněž antagonizují svoje efekty v cílových tkáních (Maeda et al., 2002). Navíc jsou protizánětlivé efekty adiponektinu potencovány indukcí protizánětlivých cytokinů jako jsou IL-10 a antagonisty IL-1 receptoru (Tilg, Hotamisligil, 2006). Hladina adiponektinu se v některých studiích ukazuje jako nezávislý prediktor vzniku NASH (Handa et al., 2014). Bylo prokázáno, že obezita vede ke snížení hladiny adiponektinu (Polyzos et al., 2011), nižší expresi genu *Adipoq* v tukové tkáni (Hu et al., 1996) a ke snížené expresi adiponektinového receptoru-2 v játrech (Tomita et al., 2008). To vede k hypotéze, že deplece adiponektinu hraje významnou roli v metabolických následcích obezity (Handa et al., 2014).

Hladina adiponektinu v séru byla v našem experimentu nejvyšší ve skupinách s HFMCD dietou, což je poněkud v rozporu s výše uvedenými mechanismy. Podávání n-3 PUFA nicméně vedlo ke zvýšení jeho sérové koncentrace. Naopak podávání n-3 PUFA mělo za následek signifikantní snížení hladiny leptinu, která byla nejvyšší u myši s HFMCD. To koresponduje s literárními údaji, že obezita a inzulínová rezistence je spojena se zvýšenou hladinou leptinu (Sorensen et al., 1996), navíc u stavů spojených s excesivním kalorickým příjmem je hyperleptinémie spojena s inaktivací/downregulací leptinových receptorů v játrech a hypotalamu – takzvanou leptinovou rezistencí (Fuentes et al., 2010). Leptin také snižuje ektopické ukládání tuku v játrech a svalech (Denver et al., 2011), také je produkován stelátními buňkami v játrech, čímž může přispívat k fibrogenzi (Canbakan et al., 2008). Význam leptinu v patogenezi NAFLD je ale zatím spíše nejasný (Polyzos et al., 2015), jeho efekt může záviset i na současné hladině adiponektinu.

Produkce klasických prozánětlivých cytokinů jako IL-6 a TNF α je jedním z nejčasnějších následků mnoha typů jaterního poškození. Vede k produkci dalších cytokinů, což má za následek rektutování zánětlivých buněk a zahájení reparačního procesu, který v játrech zahrnuje i fibrogenezi. Za fyziologických podmínek jsou v játrech TNF α a další cytokiny sotva detekovatelné (Tilg, Hotamisligil, 2006). Zvýšená exprese TNF α (Crespo et al., 2001) a s tím související zvýšená míra apoptózy hepatocytů u NASH (Feldstein et al., 2003) jsou význačnými vlastnostmi typickými pro pacienty s NASH oproti pacientům s prostou steatózou. Jaterní exprese mRNA genů kódujících klíčové prozánětlivé cytokiny (TNF α , IL-2, IL-6) byla podáváním HFMCD v našem experimentu výrazně zvýšena. Podávání n-3 PUFA vedlo k její opětovné normalizaci. Exprese mRNA protizánětlivého IL-10 nebyla změněna ani podáváním HFMCD ani n-3 PUFA. Zvýšení exprese prozánětlivých cytokinů souvisí například s plazmatickou hladinou FFA, která byla nejvyšší právě u myši s HFMCD. Zvýšená hladina FFA indukuje produkci TNF v játrech (Feldstein et al., 2004) a neutralizace TNF α protilátkou na zvířecím modelu zlepšuje histologický nálezný v játrech (Li et al., 2003). Dále se uvádí, že FFA cirkulují ve vyšších koncentracích u pacientů s NAFLD, a že jejich koncentrace koreluje se závažností postižení (Nehra et al., 2001).

Určitou limitaci spatřujeme ve vlastním experimentálním modelu. Ideální experimentální model NAFLD neexistuje. Indukce NAFLD podáváním methionin-cholin deficientní diety vede obvykle k postupné kachektizaci pokusných zvířat (Kirsch et al., 2003) a z tohoto důvodu není brána jako model odpovídající klinické situaci (Larter, Yeh, 2008). V našem experimentu však zvířata na váze přibývala. Rovněž makrovezikulární periportální steatóza není pro myši krmené methionin-cholin deficientní dietou typická (Larter, Yeh, 2008). Konzultovali jsme proto firmu dodávající tuto dietu a došli jsme k závěru, že deficit cholinu a methioninu není v dietě absolutní, a že v dietě jsou obě látky v malém množství přítomny. Náš model tak vykazuje hlavně změny vyvolané vysokotukovou dietou. To ve skutečnosti lépe odpovídá reálné klinické situaci, kdy jsou pacienti s NAFLD spíše obézní. V posledních letech je také zvažována možnost endogenní deplece cholinu způsobená změnami střevního mikrobiomu (Russell et al., 2013) a její podíl na vzniku NAFLD, takže oba modely mohou mít svoje opodstatnění.

Příznivý efekt n-3 PUFA byl u lidí prokázán u kardiovaskulárních onemocnění, kde snižuje jejich incidenci a mortalitu (Kris-Etherton et al., 2002, Mozaffarian et al., 2013). Tento protektivní efekt je přičítán snížení plazmatické hladiny triglyceridů a protizánětlivému

účinku n-3 PUFA (Roche, Gibney, 2000, Itariu et al., 2012). Vezmeme-li v úvahu známé a dobře dokumentované problémy v adherenci pacientů ke změnám životního stylu, dosažení udržitelné redukce hmotnosti a nežádoucí efekty různých léčiv, je alternativa dietní suplementace n-3 PUFA jednoduchou a praktickou alternativní léčbou s minimálními nežádoucími účinky (Hatzitolios et al., 2004, Capanni et al., 2006, Tanaka et al., 2008, Zhu et al., 2008). Z dostupných údajů z randomizovaných kontrolovaných studií vyplývá, že jedinými dostupnými látkami, které prokazatelně snižují obsah tuku v játrech jsou thiazolidinediony (Musso et al., 2003, Musso et al., 2010, Sanyal et al., 2010) a n-3 PUFA (Parker et al., 2012). Jejich přínos v léčbě u pacientů s NAFLD je však potřeba zhodnotit vhodně navrženými randomizovanými studiemi.

Údaje o vysokém výskytu NAFLD u vysoce rizikových skupin pacientů (zejména u DM2) jsou známy z literatury v posledních 5 letech (Musso et al., 2010, Yilmaz, 2012, Lazo et al., 2013), obdobná data z České republiky nebyla dosud k dispozici. Naše práce potvrzuje vysoký výskyt NAFLD u pacientů s DM2 a metabolickým syndromem, který odpovídá literárním údajům. Také ukazuje, že přítomnost jaterního postižení závisí spíše na jednotlivých komponentech metabolického syndromu, než na kompenzaci diabetu. Naše pozorování ukazují, že prakticky všichni pacienti s jaterní lézí mají rovněž metabolický syndrom. To dobře koresponduje s názory z poslední doby, že NAFLD vznik metabolického syndromu a diabetu předchází (Lonardo et al., 2015).

Klinická část naší práce má některé limitace. První limitací je fakt, že jaterní léze u NAFLD je obtížné přesně hodnotit. V ideálním případě by bylo nejvhodnější hodnotit přítomnost jaterní léze pomocí biopsie a histologického vyšetření. Toto je však v běžné klinické praxi těžko proveditelné. Navíc indikovat jaterní biopsii u pacienta s normálními jaterními testy a sonografickým nálezem jaterní steatózy je i z etického hlediska zpochybnitelné. Z těchto důvodů zůstane jaterní biopsie metodou vhodnou pouze pro selektovanou skupinu pacientů. Pro většinu pacientů tak do budoucna přichází v úvahu zejména metody neinvazivní diagnostiky. V této části naší práce jsme se soustředili na hodnocení zcela běžně dostupných parametrů jaterního poškození (transaminázy, ultrazvukové vyšetření jater). ALT je enzym, jehož sérová hladina je zvýšena u jaterních lézí různé etiologie včetně NAFLD. GGT je enzym, který je typicky zvýšen u alkoholové jaterní léze, ale také právě u NAFLD. Zvýšení těchto, nebo jiných běžných laboratorních parametrů se k eventuálnímu hodnocení přítomnosti nebo pokročilosti jaterní fibrózy nehodí. Ze studií u pacientů s chronickou HCV

infekcí nebo právě u pacientů s NAFLD je známo, že pacienti s normálními jaterními testy mohou mít celé spektrum pokročilosti jaterní fibrózy (Mofrad et al., 2003).

Další limitací je fakt, že ultrazvukové vyšetření jater nebylo k dispozici u celé kohorty pacientů, což může vést ke zkreslení celkového výskytu NAFLD. Naším cílem bylo určit frekvenci výskytu jaterního postižení u skupiny pacientů s DM2. Nejedná se tedy o vzorek obecné populace, ale o vysoce selektovanou skupinu pacientů s DM2 a rovněž s metabolickým syndromem. Údaje o výskytu steatózy jater v České republice v obecné ani jiné populaci nejsou dosud k dispozici. Vzhledem k rostoucí prevalenci nadváhy a obezity je předpokládán vysoký výskyt. Dále je tu přirozený vývoj NAFLD. Většina pozorování vychází z průřezových studií, nebo studií zaujímajících krátké časové období. Jedna z mála prací týkající se výskytu a vývoje NAFLD v delším časovém období hodnotí na skupině více než 200 „zdravých jedinců“ bez předchozí anamnézy jaterního léze výskyt a vývoj NAFLD v 7letém období (Zelber-Sagi et al., 2012). Méně než třetina těchto pacientů měla na počátku studie sonografické známky NAFLD. Za dobu 7 let se u dalších 20 % steatóza vyvinula, naopak u třetiny pacientů se známkami NAFLD na počátku nastala kompletní regrese. Hlavním faktorem odpovědným za regresi byla redukce hmotnosti. Z výše uvedeného vyplývá, že každé hodnocení vývoje NAFLD musí brát v úvahu rovněž možnost spontánní regrese. Za nejvýznamnější opatření ve snaze o snížení výskytu NAFLD lze považovat prevenci nadváhy.

Identifikace rizikových faktorů NAFLD a jejich včasné řešení může snížit výskyt nejenom NAFLD ale i dalších extrahepatálních chorob s pojených s tímto stavem. Je například známo, že pacienti s NAFLD mají zvýšené riziko ischemické choroby srdeční, infarktu myokardu a vyšší mortality na ICHS obecně (Vilar et al., 2013). Původně čistě hepatologická choroba se tak stává středobodem metabolického syndromu a pacient s NAFLD by měl být dále vyšetřen a sledován s ohledem na možnou přítomnost jiných metabolických komplikací nebo aterosklerózy.

Je mnoho důvodů k užívání neinvazivních parametrů v diagnostice NASH a fibrózy u pacientů s NAFLD namísto klasické jaterní biopsie. Kromě obecného trendu k užívání neinvazivních diagnostických technik to je zejména vysoký výskyt NAFLD v populaci. Provádět jaterní biopsie u několika procent populace je jistě těžko představitelné. Dále je potřeba zmínit, že pacientovi po biopsické confirmaci NASH nedokážeme v současné době

nabídnout specifickou farmakologickou léčbu. A bude-li v budoucnosti taková léčba k dispozici, je hodnocení její účinnosti biopticky opět obtížně představitelné. Navíc bývá diagnostická hodnota biopsie často přeceňována vzhledem k subjektivitě a variabilitě hodnocení s přesností pod 90 % (Ratziu et al., 2005). Ideální diagnostické metody u NAFLD by proto měly být neinvazivní, přesné, snadno dostupné a opakovatelné a mělo by mít prognostickou hodnotu při dlouhodobém sledování.

Hlavní úkol při hledání neinvazivních metod detekce NASH a jaterní fibrózy u NAFLD představuje hodnocení jejich použitelnosti a jejich následná implementace do běžné klinické praxe. Je potřeba se vyrovnat s různými obtížemi. V některých neinvazivních skóre jsou parametry, které nejsou běžně stanovovány (jako např. TIMP a PIIINP v ELF a OELF skóre). Většina skóre byla vytvořena na základě průřezových studií a jejich hodnota při dlouhodobém sledování nebo při specifické klinické situaci (například screening jaterní fibrózy) není dosud jasná. Dále je tu možná nejasnost vzorců pro počítání jednotlivých skóre. Zatímco v původních pracích týkajících se ELF skóre (Rosenberg et al., 2004) a OELF skóre (Guha et al., 2008) vychází výsledky v negativních hodnotách nebo kolem nuly, byla v pozdějších pracích do vzorce přidána konstanta +10 (Nobili et al., 2009, Hernaez et al., 2011). Toto pak komplikuje hodnocení a interpretaci dosažených výsledků a poolování dat.

Jaterní steatóza je v běžné klinické praxi nejčastěji diagnostikována ultrazvukovým vyšetřením jater. Toto vyšetření je snadno dostupné a pacienta nijak nezatěžuje. Mezi jeho nevýhody patří nižší senzitivita při akumulaci tuku v méně než 30 % hepatocytů (Hernaez et al., 2011). To je fakt, který si možná významná část lékařů interpretujících ultrazvukový nálezn neuvědomuje. Ultrazvukové vyšetření dále neumožňuje identifikovat pacienty s NASH (Hernaez et al., 2011). Klasickou metodou diagnostiky NASH pak byla jaterní biopsie, která v tomto ohledu není z mnoha výše uvedených důvodů pro pacienty s NAFLD optimální metodou.

V současnosti dostupná data ukazují, že apoptóza hepatocytů, vysoce organizovaná a geneticky řízená forma zániku buněk, hraje v jaterním poškození a progresi NAFLD významnou roli (Schuppan, Schattenberg, 2013). S tím souvisí i fakt, že za nejslibnější neinvazivní parametr NASH je v současnosti považováno stanovení fragmentů cytokeratinu 18 v séru. Fragmenty cytokeratinu 18 představují biomarker apoptózy a nekrózy hepatocytů (Yilmaz et al., 2007). Z celé řady různých fragmentů cytokeratinu 18 byly studovány zejména

M30 (brány jako marker apoptózy) a M65 (marker nekrózy buněk) (Wieckowska et al., 2006, Feldstein et al., 2009, Joka et al., 2012).

Doporučené postupy AASLD z roku 2012 užívání stanovení cytokeratinu 18 v běžné klinické praxi nedoporučují, pozdější metaanalýza dat více než 800 pacientů z 10 studií (Chen et al., 2014) však dokládá, že stanovení jak fragmentů, tak celkového cytokeratinu 18 v séru představuje klinicky významný benefit v neinvazivní diagnostice NASH. V této metaanalýze byla zjištěna hodnota AUROC pro fragmenty cytokeratin-18 k identifikaci NASH 0,845 se 77% senzitivitou a 71% specificitou. Autoři z toho vyvozují, že je tento biomarker vhodnější ke screeningu než k vlastní diagnostice NASH. Jiná metaanalýza hodnotící použití fragmentů cytokeratinu 18 došla obdobným výsledkům (poolovaná senzitivita 66 % a specificita 82 % v diagnostice NASH) (Kwok et al., 2014). V naší práci byly výsledky při stanovení fragmentů cytokeratinu 18 ještě lepší. AUROC při rozlišení NASH a prosté steatózy 0,89 pro M65 a 0,85 pro M30. A také senzitivita a specificita byly vyšší (80 % a 82 % pro M65 a 75 % a 81 % pro M30). Podle našich výsledků je tak stanovení fragmentů M65 cytokeratinu 18 v séru (s cut-off hodnotou 750 U/l) nejlepší jednotlivý neinvazivní marker NASH. Naše výsledky rovněž podporují návrh na použití M30/M65 jako screeningový test NASH, protože jejich hodnoty byly mezi skupinou pacientů s NASH a kontrolami statisticky významně rozdílné.

Další podstatnou informací pro lékaře pečujícího o pacienta s chronickou jaterní chorobou je stupeň pokročilosti jaterní fibrózy. Běžné ultrazvukové vyšetření se pro hodnocení jaterní fibrózy nehodí a eventuelní nálezy typu „steatofibrózy“ nebo „zmnožení periportálního vaziva“ je potřeba brát s velkou rezervou. Jaterní fibróza může být sonograficky rozeznána až ve stádiu jaterní cirhózy, ale jen pokud již jsou přítomny hrubé morfologické změny jako nerovný povrch jater a hypertrofie lobus caudatus, nebo sonografické známky portální hypertenze jako zpomalení průtoku v portální žíle, její dilatace nebo splenomegalie. To jsou všechno známky pokročilé jaterní choroby. Mezi prostou steatózou a pokročilou jaterní cirhózou tak v sonografické diagnostice vzniká velké diagnostické okno. Proto byly v poslední době hledány způsoby, jak diagnostiku jaterní fibrózy zpřesnit bez nutnosti jaterní biopsie.

Důležitým nálezem naší práce hodnotícím možnosti neinvazivní diagnostiky jaterní fibrózy je, že stanovením sérové koncentrace hyaluronové kyseliny, tedy užitím jediného biochemického parametru, lze rozlišit pacienty s nebo bez signifikantní jaterní fibrózy. Užití cut-off hodnoty

HA 20 – 30 µg/l byly obdobné jako u jiných autorů (Sowa et al., 2013), avšak senzitivita a specificita byla v naší práci vyšší. Užitím tohoto parametru jsme docházeli k akceptovatelným falešně pozitivním a negativním výsledkům. Podobných výsledků bylo dosaženo při použití OELF a ELF skóre. Zůstává však otázkou, jestli může být nákladné a v rutinní praxi nedostupné vyšetření některých jejích parametrů (PIIINP a TIMP) přeneseno do rutinní klinické praxe.

Ostatní hodnocená skóre neinvazivní diagnostiky jaterní fibrózy také korelovala se stupněm pokročilosti fibrózy, ale diskriminační hodnoty nedosahovaly uspokojivé přesnosti s nízkou senzitivitou a specificitou. Kupodivu to byl i případ NAFLD Fibrosis Score, které je doporučováno současnými doporučenými postupy AASLD (Chalasani et al., 2012) jako screeningový test vylučující jedince s nízkým rizikem jaterní fibrózy. NAFLD Fibrosis Score (Angulo et al., 2007) bylo validováno na skupině histologicky ověřených pacientů s NAFLD k rozlišení mezi jednotlivými stupni fibrózy a pokročilou fibrózou. Lze tak identifikovat pacienty s nejvyšším rizikem progresu do terminální fáze jaterního onemocnění. V naší práci se hodnoty NAFLD Fibrosis Score mezi jednotlivými stupni lišili, avšak bez statistické významnosti. Spekuluje, že to je díky naší specifické populaci či jiným faktorům.

Další zajímavé pozorování představuje vysoké procento pacientů s možnou pokročilou jaterní fibrózou ve skupině nebioptovaných pacientů s NAFLD. V naší práci jaterní biopsie potvrdila NASH u 38 pacientů (68 % pacientů indikovaných k jaterní biopsii). Při použití M65 s cut-off hodnotou 750 U/l by byl NASH pravděpodobně přítomen u 65 % pacientů (u 4 případů byla diagnóza falešně pozitivní, u 2 falešně negativní). Na druhou stranu u pacientů, kteří k jaterní biopsii indikováni nebyli by byl při použití stejného postupu NASH diagnostikován pouze u 16 % pacientů. To představuje menší výskyt, než bývá uváděno v literatuře, kde bývá výskyt NASH uváděn mezi 30 - 40 % (Ekstedt et al., 2006). Na druhou stranu v naší bioptované skupině byl výskyt vyšší (NASH byl histologicky diagnostikován u 68 % pacientů). Průměrný výskyt NASH v obou skupinách se tak blíží literárním 40 %. Z toho vyvozujeme, že na základě klinické situace mají lékaři tendenci pacienty s NASH spíše bioptovat.

Signifikantní fibróza byla histologicky popsána u 17 pacientů (30 % pacientů indikovaných k jaterní biopsii). Při použití hladiny HA v séru s cut-off hodnotou 30 µg/l jako jednoduchého neinvazivního testu by byla signifikantní jaterní fibróza předpokládána u 29 % pacientů (u 3

falešně negativně, u 4 falešně pozitivně). Při použití tohoto neinvazivního markeru ve skupině pacientů neindikovaných k jaterní biopsii by 35 % pacientů splňovalo kritéria pro signifikantní fibrózu, tedy obdobné procentuální zastoupení jako ve skupině bioptovaných.

Tyto výsledky mohou ukazovat, že základní klinické a laboratorní parametry užívané v běžné klinické praxi mohou při zvažování indikace k jaterní biopsii selektovat spíše pacienty se steatohepatitidou. I přes to, že je stupeň jaterní fibrózy považován za jeden z nejzásadnějších parametrů určujících prognózu konkrétního pacienta (Machado, Cortez-Pinto, 2013), může významná část pacientů s jaterní fibrózou uniknout řádné diagnóze. Naše pozorování dokumentuje skutečnost, že diagnostika signifikantní fibrózy založená na rutinních vyšetřovacích postupech včetně ultrazvukového vyšetření není patřičná.

Jednou z limitací naší práce se zdá být fakt, že ne všichni pacienti podstoupili jaterní biopsii. Nicméně skupina nebioptovaných pacientů, která jinak podstoupila stejná klinická, biochemická a zobrazovací vyšetření, je zajímavá z mnoha důvodů. Indikace jaterní biopsie je problémem, se kterými se potýkají hepatologové na celém světě. Striktní kritéria pro indikaci jaterní biopsie neexistují a ne všichni pacienti jsou ochotni podstoupit takto invazivní vyšetření. Výběr pacientů k jaterní biopsii v našem souboru nebyl založen na randomizaci, ale na klinické situaci. Jak ukazuje následné použití neinvazivních metod diagnostiky NASH a fibrózy, je většina pacientů s NASH směřována k jaterní biopsii. Ve skupině bez jaterní biopsie bylo pouze 15 % pacientů s hodnotami M65 cytokeratinu 18 odpovídajícími NASH. V kontrastu s tím je fakt, že dokonce vyšší procento nebioptovaných pacientů (35 % vs 29 %) splňovalo neinvazivní kritéria signifikantní fibrózy. To zdůrazňuje potřebu podrobného vyšetřování a následného sledování u pacientů s diagnózou NAFLD, u kterých nebyla provedena jaterní biopsie. A tak je paradoxně fakt, že jaterní biopsie nebyla provedena u všech pacientů v našem souboru, a to díky okolnostem běžným v klinické praxi, jedním z nejzajímavějších nálezů v této části naší práce.

Naše skupina pacientů s NAFLD měla ve srovnání se zdravými kontrolami signifikantně nižší hladinu adiponektinu. To je známo i z jiných prací (Lemoine et al., 2009, Gastaldelli et al., 2010). Dále se uvádí, že hladina adiponektinu klesá o 20 – 40 % v průběhu progresu NAFLD do NASH (Dowman et al., 2011). Na rozdíl od jiných autorů (Shimada et al., 2007, Arvaniti et al., 2008) jsme signifikantní rozdíly v koncentraci adiponektinu v séru mezi pacienty s prostou steatózou a s NASH nezaznamenali. Nezaznamenali jsme ani eventuelní rozdíly

v hladinách leptinu (pacienti NAFLD vs. kontroly; NAFLD vs. NASH). Pacienti s NAFLD dále měli signifikantně vyšší glykémii na lačno a hladinu inzulínu. Což naznačuje, že inzulínová rezistence jde ruku v ruce s vývojem NAFLD.

ZÁVĚRY

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

Podávání vysokotukové methionin-cholin deficientní diety myším vedlo k jaternímu poškození s laboratorními i histologickými znaky charakteristickými pro NAFLD. V játrech těchto zvířat jsme dále prokázali zvýšený obsah triacylglycerolů a zvýšenou expresi mRNA genů prozánětlivých cytokinů. Změny byly rovněž patrné v plazmatických hladinách mastných kyselin a adipokinů.

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

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

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

LITERATURA

Adams, L. A., Sanderson, S., Lindor, K. D. and Angulo, P. "The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies." *J Hepatol* 2005; 42(1): 132-138.

Adiels, M., Taskinen, M. R. and Boren, J. "Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia." *Curr Diab Rep* 2008; 8(1): 60-64.

Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P., Loria, C. M., Smith, S. C., Jr., International Diabetes Federation Task Force on, E., Prevention, National Heart, L., Blood, I., American Heart, A., World Heart, F., International Atherosclerosis, S. and International Association for the Study of, O. "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." *Circulation* 2009; 120(16): 1640-1645.

Alberti, K. G., Zimmet, P. and Shaw, J. "Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation." *Diabet Med* 2006; 23(5): 469-480.

Alberti, K. G. and Zimmet, P. Z. "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation." *Diabet Med* 1998; 15(7): 539-553.

Alwayn, I. P., Andersson, C., Zauscher, B., Gura, K., Nose, V. and Puder, M. "Omega-3 fatty acids improve hepatic steatosis in a murine model: potential implications for the marginal steatotic liver donor." *Transplantation* 2005; 79(5): 606-608.

Alwayn, I. P., Gura, K., Nose, V., Zausche, B., Javid, P., Garza, J., Verbese, J., Voss, S., Ollero, M., Andersson, C., Bistran, B., Folkman, J. and Puder, M. "Omega-3 fatty acid supplementation prevents hepatic steatosis in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease." *Pediatr Res* 2005; 57(3): 445-452.

Angulo, P. "Nonalcoholic fatty liver disease." *N Engl J Med* 2002; 346(16): 1221-1231.

Angulo, P., Hui, J. M., Marchesini, G., Bugianesi, E., George, J., Farrell, G. C., Enders, F., Saksena, S., Burt, A. D., Bida, J. P., Lindor, K., Sanderson, S. O., Lenzi, M., Adams, L. A.,

Kench, J., Therneau, T. M. and Day, C. P. "The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD." *Hepatology* 2007; 45(4): 846-854.

Angulo, P., Keach, J. C., Batts, K. P. and Lindor, K. D. "Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* 1999; 30(6): 1356-1362.

Araya, J., Rodrigo, R., Videla, L. A., Thielemann, L., Orellana, M., Pettinelli, P. and Poniachik, J. "Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." *Clin Sci (Lond)* 2004; 106(6): 635-643.

Arvaniti, V. A., Thomopoulos, K. C., Tsamandas, A., Makri, M., Psyrogiannis, A., Vafiadis, G., Assimakopoulos, S. F. and Labropoulou-Karatza, C. "Serum adiponectin levels in different types of non alcoholic liver disease. Correlation with steatosis, necroinflammation and fibrosis." *Acta Gastroenterol Belg* 2008; 71(4): 355-360.

Assy, N., Kaita, K., Mymin, D., Levy, C., Rosser, B. and Minuk, G. "Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients." *Dig Dis Sci* 2000; 45(10): 1929-1934.

Balistreri, C. R., Caruso, C. and Candore, G. "The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases." *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 802078.

Baranova, A., Gowder, S. J., Schlauch, K., Elariny, H., Collantes, R., Afendy, A., Ong, J. P., Goodman, Z., Chandhoke, V. and Younossi, Z. M. "Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance." *Obes Surg* 2006; 16(9): 1118-1125.

Barrows, B. R. and Parks, E. J. "Contributions of different fatty acid sources to very low-density lipoprotein-triacylglycerol in the fasted and fed states." *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(4): 1446-1452.

Batetta, B., Griinari, M., Carta, G., Murru, E., Ligresti, A., Cordeddu, L., Giordano, E., Sanna, F., Bisogno, T., Uda, S., Collu, M., Bruheim, I., Di Marzo, V. and Banni, S. "Endocannabinoids may mediate the ability of (n-3) fatty acids to reduce ectopic fat and inflammatory mediators in obese Zucker rats." *J Nutr* 2009; 139(8): 1495-1501.

Bedogni, G., Miglioli, L., Masutti, F., Tiribelli, C., Marchesini, G. and Bellentani, S. "Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study." *Hepatology* 2005; 42(1): 44-52.

Belfort, R., Mandarino, L., Kashyap, S., Wirfel, K., Pratipanawatr, T., Berria, R., DeFronzo, R. A. and Cusi, K. "Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling." *Diabetes* 2005; 54(6): 1640-1648.

Boden, G., Cheung, P., Stein, T. P., Kresge, K. and Mozzoli, M. "FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283(1): E12-19.

Broughton, K. S. and Wade, J. W. "Total fat and (n-3):(n-6) fat ratios influence eicosanoid production in mice." *J Nutr* 2002; 132(1): 88-94.

Browning, J. D., Szczepaniak, L. S., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, J. D., Cohen, J. C., Grundy, S. M. and Hobbs, H. H. "Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity." *Hepatology* 2004; 40(6): 1387-1395.

Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A. and Bacon, B. R. "Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions." *Am J Gastroenterol* 1999; 94(9): 2467-2474.

Caldwell, S. H., Lee, V. D., Kleiner, D. E., Al-Osaimi, A. M., Argo, C. K., Northup, P. G. and Berg, C. L. "NASH and cryptogenic cirrhosis: a histological analysis." *Ann Hepatol* 2009; 8(4): 346-352.

Caldwell, S. H., Oelsner, D. H., Iezzoni, J. C., Hespeneide, E. E., Battle, E. H. and Driscoll, C. J. "Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease." *Hepatology* 1999; 29(3): 664-669.

Canbakan, B., Tahan, V., Balci, H., Hatemi, I., Erer, B., Ozbay, G., Sut, N., Hacibekiroglu, M., Imeryuz, N. and Senturk, H. "Leptin in nonalcoholic fatty liver disease." *Ann Hepatol* 2008; 7(3): 249-254.

Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R. G., Tuohy, K. M., Gibson, G. R. and Delzenne, N. M. "Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia." *Diabetologia* 2007; 50(11): 2374-2383.

Capanni, M., Calella, F., Biagini, M. R., Genise, S., Raimondi, L., Bedogni, G., Svegliati-Baroni, G., Sofi, F., Milani, S., Abbate, R., Surrenti, C. and Casini, A. "Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study." *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23(8): 1143-1151.

Carlson, L. A. "Extraction of lipids from human whole serum and lipoproteins and from rat liver tissue with methylene chloride-methanol: a comparison with extraction with chloroform-methanol." *Clin Chim Acta* 1985; 149(1): 89-93.

Cortez-Pinto, H., Jesus, L., Barros, H., Lopes, C., Moura, M. C. and Camilo, M. E. "How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients?" *Clin Nutr* 2006; 25(5): 816-823.

Crespo, J., Cayon, A., Fernandez-Gil, P., Hernandez-Guerra, M., Mayorga, M., Dominguez-Diez, A., Fernandez-Escalante, J. C. and Pons-Romero, F. "Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients." *Hepatology* 2001; 34(6): 1158-1163.

Cusi, K. "Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications." *Gastroenterology* 2012; 142(4): 711-725 e716.

Das, K., Das, K., Mukherjee, P. S., Ghosh, A., Ghosh, S., Mridha, A. R., Dhibar, T., Bhattacharya, B., Bhattacharya, D., Manna, B., Dhali, G. K., Santra, A. and Chowdhury, A. "Nonobese population in a developing country has a high prevalence of nonalcoholic fatty liver and significant liver disease." *Hepatology* 2010; 51(5): 1593-1602.

Das, U. N. "Biological significance of essential fatty acids." *J Assoc Physicians India* 2006; 54: 309-319.

Dassanayake, A. S., Kasturiratne, A., Rajindrajith, S., Kalubowila, U., Chakrawarthy, S., De Silva, A. P., Makaya, M., Mizoue, T., Kato, N., Wickremasinghe, A. R. and de Silva, H. J. "Prevalence and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease among adults in an urban Sri Lankan population." *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(7): 1284-1288.

Day, C. P. "Genetic and environmental susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease." *Dig Dis* 2010; 28(1): 255-260.

Day, C. P. and James, O. F. "Steatohepatitis: a tale of two "hits"?" *Gastroenterology* 1998; 114(4): 842-845.

de Marco, R., Locatelli, F., Zoppini, G., Verlato, G., Bonora, E. and Muggeo, M. "Cause-specific mortality in type 2 diabetes. The Verona Diabetes Study." *Diabetes Care* 1999; 22(5): 756-761.

Dentin, R., Benhamed, F., Pegorier, J. P., Fougelle, F., Viollet, B., Vaulont, S., Girard, J. and Postic, C. "Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the

inhibition of ChREBP nuclear protein translocation." *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2843-2854.

Denver, R. J., Bonett, R. M. and Boorse, G. C. "Evolution of leptin structure and function." *Neuroendocrinology* 2011; 94(1): 21-38.

Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D. and Parks, E. J. "Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease." *J Clin Invest* 2005; 115(5): 1343-1351.

Dowman, J. K., Tomlinson, J. W. and Newsome, P. N. "Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis." *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33(5): 525-540.

Ekstedt, M., Franzen, L. E., Mathiesen, U. L., Thorelius, L., Holmqvist, M., Bodemar, G. and Kechagias, S. "Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes." *Hepatology* 2006; 44(4): 865-873.

El-Badry, A. M., Graf, R. and Clavien, P. A. "Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver?" *J Hepatol* 2007; 47(5): 718-725.

Elizondo, A., Araya, J., Rodrigo, R., Poniachik, J., Csendes, A., Maluenda, F., Diaz, J. C., Signorini, C., Sgherri, C., Comporti, M. and Videla, L. A. "Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients." *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15(1): 24-31.

Fabbrini, E., Mohammed, B. S., Magkos, F., Korenblat, K. M., Patterson, B. W. and Klein, S. "Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease." *Gastroenterology* 2008; 134(2): 424-431.

Feldstein, A. E., Canbay, A., Angulo, P., Taniai, M., Burgart, L. J., Lindor, K. D. and Gores, G. J. "Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis." *Gastroenterology* 2003; 125(2): 437-443.

Feldstein, A. E., Werneburg, N. W., Canbay, A., Guicciardi, M. E., Bronk, S. F., Rydzewski, R., Burgart, L. J. and Gores, G. J. "Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway." *Hepatology* 2004; 40(1): 185-194.

Feldstein, A. E., Wieckowska, A., Lopez, A. R., Liu, Y. C., Zein, N. N. and McCullough, A. J. "Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study." *Hepatology* 2009; 50(4): 1072-1078.

Ferramosca, A., Conte, A., Burri, L., Berge, K., De Nuccio, F., Giudetti, A. M. and Zara, V. "A krill oil supplemented diet suppresses hepatic steatosis in high-fat fed rats." *PLoS One* 2012; 7(6): e38797.

Flachs, P., Mohamed-Ali, V., Horakova, O., Rossmeisl, M., Hosseinzadeh-Attar, M. J., Hensler, M., Ruzickova, J. and Kopecky, J. "Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet." *Diabetologia* 2006; 49(2): 394-397.

Flachs, P., Rossmeisl, M., Bryhn, M. and Kopecky, J. "Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism." *Clin Sci (Lond)* 2009; 116(1): 1-16.

Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." *J Biol Chem* 1957; 226(1): 497-509.

Fuentes, T., Ara, I., Guadalupe-Grau, A., Larsen, S., Stallknecht, B., Olmedillas, H., Santana, A., Helge, J. W., Calbet, J. A. and Guerra, B. "Leptin receptor 170 kDa (OB-R170) protein expression is reduced in obese human skeletal muscle: a potential mechanism of leptin resistance." *Exp Physiol* 2010; 95(1): 160-171.

Gastaldelli, A., Cusi, K., Pettiti, M., Hardies, J., Miyazaki, Y., Berria, R., Buzzigoli, E., Sironi, A. M., Cersosimo, E., Ferrannini, E. and Defronzo, R. A. "Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects." *Gastroenterology* 2007; 133(2): 496-506.

Gastaldelli, A., Harrison, S., Belfort-Aguiar, R., Hardies, J., Balas, B., Schenker, S. and Cusi, K. "Pioglitazone in the treatment of NASH: the role of adiponectin." *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32(6): 769-775.

Gentile, C. L. and Pagliassotti, M. J. "The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease." *J Nutr Biochem* 2008; 19(9): 567-576.

Geurts, L., Everard, A., Van Hul, M., Essaghir, A., Duparc, T., Matamoros, S., Plovier, H., Castel, J., Denis, R. G., Bergiers, M., Druart, C., Alhouayek, M., Delzenne, N. M., Muccioli, G. G., Demoulin, J. B., Luquet, S. and Cani, P. D. "Adipose tissue NAPE-PLD controls fat

mass development by altering the browning process and gut microbiota." *Nat Commun* 2015; 6: 6495.

Ghoshal, A. K. "New insight into the biochemical pathology of liver in choline deficiency." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30(4): 263-273.

Gonzalez-Periz, A., Horrillo, R., Ferre, N., Gronert, K., Dong, B., Moran-Salvador, E., Titos, E., Martinez-Clemente, M., Lopez-Parra, M., Arroyo, V. and Claria, J. "Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins." *FASEB J* 2009; 23(6): 1946-1957.

Guha, I. N., Parkes, J., Roderick, P., Chattopadhyay, D., Cross, R., Harris, S., Kaye, P., Burt, A. D., Ryder, S. D., Aithal, G. P., Day, C. P. and Rosenberg, W. M. "Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers." *Hepatology* 2008; 47(2): 455-460.

Handa, P., Maliken, B. D., Nelson, J. E., Morgan-Stevenson, V., Messner, D. J., Dhillon, B. K., Klintworth, H. M., Beauchamp, M., Yeh, M. M., Elfers, C. T., Roth, C. L. and Kowdley, K. V. "Reduced adiponectin signaling due to weight gain results in nonalcoholic steatohepatitis through impaired mitochondrial biogenesis." *Hepatology* 2014; 60(1): 133-145.

Harrison, S. A., Oliver, D., Arnold, H. L., Gogia, S. and Neuschwander-Tetri, B. A. "Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease." *Gut* 2008; 57(10): 1441-1447.

Hatzitolios, A., Savopoulos, C., Lazaraki, G., Sidiropoulos, I., Haritanti, P., Lefkopoulos, A., Karagiannopoulou, G., Tzioufa, V. and Dimitrios, K. "Efficacy of omega-3 fatty acids, atorvastatin and orlistat in non-alcoholic fatty liver disease with dyslipidemia." *Indian J Gastroenterol* 2004; 23(4): 131-134.

Hernaez, R., Lazo, M., Bonekamp, S., Kamel, I., Brancati, F. L., Guallar, E. and Clark, J. M. "Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis." *Hepatology* 2011; 54(3): 1082-1090.

Hoverstad, T. and Midtvedt, T. "Short-chain fatty acids in germfree mice and rats." *J Nutr* 1986; 116(9): 1772-1776.

Hu, E., Liang, P. and Spiegelman, B. M. "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity." *J Biol Chem* 1996; 271(18): 10697-10703.

Huang, W., Metlakunta, A., Dedousis, N., Zhang, P., Sipula, I., Dube, J. J., Scott, D. K. and O'Doherty, R. M. "Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance." *Diabetes* 2010; 59(2): 347-357.

Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Cusi, K., Charlton, M., Sanyal, A. J., American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Disease, and American College of Gastroenterology. "The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology." *Gastroenterology* 2012; 142(7): 1592-1609.

Chen, J., Zhu, Y., Zheng, Q. and Jiang, J. "Serum cytokeratin-18 in the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis: A meta-analysis." *Hepatol Res* 2014; 44(8): 854-862.

Cholongitas, E., Senzolo, M., Standish, R., Marelli, L., Quaglia, A., Patch, D., Dhillon, A. P. and Burroughs, A. K. "A systematic review of the quality of liver biopsy specimens." *Am J Clin Pathol* 2006; 125(5): 710-721.

Itariu, B. K., Zeyda, M., Hochbrugger, E. E., Neuhofer, A., Prager, G., Schindler, K., Bohdjalian, A., Mascher, D., Vangala, S., Schranz, M., Krebs, M., Bischof, M. G. and Stulnig, T. M. "Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial." *Am J Clin Nutr* 2012; 96(5): 1137-1149.

Jiang, C., Xie, C., Li, F., Zhang, L., Nichols, R. G., Krausz, K. W., Cai, J., Qi, Y., Fang, Z. Z., Takahashi, S., Tanaka, N., Desai, D., Amin, S. G., Albert, I., Patterson, A. D. and Gonzalez, F. J. "Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease." *J Clin Invest* 2015; 125(1): 386-402.

Joka, D., Wahl, K., Moeller, S., Schlue, J., Vaske, B., Bahr, M. J., Manns, M. P., Schulze-Osthoff, K. and Bantel, H. "Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* 2012; 55(2): 455-464.

Jump, D. B. "N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription." *Curr Opin Lipidol* 2008; 19(3): 242-247.

Kalambokis, G., Manousou, P., Vibhakorn, S., Marelli, L., Cholongitas, E., Senzolo, M., Patch, D. and Burroughs, A. K. "Transjugular liver biopsy--indications, adequacy, quality of specimens, and complications--a systematic review." *J Hepatol* 2007; 47(2): 284-294.

Kashyap, S., Belfort, R., Gastaldelli, A., Pratipanawatr, T., Berria, R., Pratipanawatr, W., Bajaj, M., Mandarino, L., DeFronzo, R. and Cusi, K. "A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes." *Diabetes* 2003; 52(10): 2461-2474.

Kawano, J. and Arora, R. "The role of adiponectin in obesity, diabetes, and cardiovascular disease." *J Cardiometab Syndr* 2009; 4(1): 44-49.

Kirpich, I. A., Marsano, L. S. and McClain, C. J. "Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease." *Clin Biochem* 2015.

Kirsch, R., Clarkson, V., Shephard, E. G., Marais, D. A., Jaffer, M. A., Woodburne, V. E., Kirsch, R. E. and Hall Pde, L. "Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies." *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18(11): 1272-1282.

Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Ferrell, L. D., Liu, Y. C., Torbenson, M. S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A. J., Sanyal, A. J. and Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research, N. "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* 2005; 41(6): 1313-1321.

Kotronen, A., Vehkavaara, S., Seppala-Lindroos, A., Bergholm, R. and Yki-Jarvinen, H. "Effect of liver fat on insulin clearance." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293(6): E1709-1715.

Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., Appel, L. J. and American Heart Association. Nutrition, C. "Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease." *Circulation* 2002; 106(21): 2747-2757.

Kucera, O. and Cervinkova, Z. "Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats." *World J Gastroenterol* 2014; 20(26): 8364-8376.

Kunesova, M. M., D.; Hainer, V. (2011). Epidemiologie a zdravotní rizika obezity. Základy klinické obezitologie. V. Hainer. Praha Grada Publishing, a.s.: 15 - 34.

Kwok, R., Tse, Y. K., Wong, G. L., Ha, Y., Lee, A. U., Ngu, M. C., Chan, H. L. and Wong, V. W. "Systematic review with meta-analysis: non-invasive assessment of non-alcoholic fatty

liver disease--the role of transient elastography and plasma cytokeratin-18 fragments." *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39(3): 254-269.

Larter, C. Z. "Not all models of fatty liver are created equal: understanding mechanisms of steatosis development is important." *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(9): 1353-1354.

Larter, C. Z. and Yeh, M. M. "Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right." *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23(11): 1635-1648.

Lazo, M., Hernaez, R., Eberhardt, M. S., Bonekamp, S., Kamel, I., Guallar, E., Koteish, A., Brancati, F. L. and Clark, J. M. "Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994." *Am J Epidemiol* 2013; 178(1): 38-45.

Lee, S., Gura, K. M. and Puder, M. "Omega-3 fatty acids and liver disease." *Hepatology* 2007; 45(4): 841-845.

Lefterova, M. I. and Lazar, M. A. "New developments in adipogenesis." *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20(3): 107-114.

Leite, N. C., Salles, G. F., Araujo, A. L., Villela-Nogueira, C. A. and Cardoso, C. R. "Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus." *Liver Int* 2009; 29(1): 113-119.

Lemoine, M., Ratziu, V., Kim, M., Maachi, M., Wendum, D., Paye, F., Bastard, J. P., Poupon, R., Housset, C., Capeau, J. and Serfaty, L. "Serum adipokine levels predictive of liver injury in non-alcoholic fatty liver disease." *Liver Int* 2009; 29(9): 1431-1438.

Levy, J. R., Clore, J. N. and Stevens, W. "Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fischer 344 rats." *Hepatology* 2004; 39(3): 608-616.

Li, Z., Yang, S., Lin, H., Huang, J., Watkins, P. A., Moser, A. B., Desimone, C., Song, X. Y. and Diehl, A. M. "Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* 2003; 37(2): 343-350.

Lombardi, B., Pani, P. and Schlunk, F. F. "Choline-deficiency fatty liver: impaired release of hepatic triglycerides." *J Lipid Res* 1968; 9(4): 437-446.

Lonardo, A., Ballestri, S., Marchesini, G., Angulo, P. and Loria, P. "Nonalcoholic fatty liver disease: A precursor of the metabolic syndrome." *Dig Liver Dis* 2015; 47(3): 181-190.

Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B. and Oh, B. J. "Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease." *Mayo Clin Proc* 1980; 55(7): 434-438.

Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K., Horie, M., Takeda, S., Aoyama, T., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. "Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30." *Nat Med* 2002; 8(7): 731-737.

Machado, M., Marques-Vidal, P. and Cortez-Pinto, H. "Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery." *J Hepatol* 2006; 45(4): 600-606.

Machado, M. V. and Cortez-Pinto, H. "Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal." *J Hepatol* 2013; 58(5): 1007-1019.

Marx, N., Duez, H., Fruchart, J. C. and Staels, B. "Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells." *Circ Res* 2004; 94(9): 1168-1178.

Mathiesen, U. L., Franzen, L. E., Aselius, H., Resjo, M., Jacobsson, L., Foberg, U., Fryden, A. and Bodemar, G. "Increased liver echogenicity at ultrasound examination reflects degree of steatosis but not of fibrosis in asymptomatic patients with mild/moderate abnormalities of liver transaminases." *Dig Liver Dis* 2002; 34(7): 516-522.

McPherson, S., Stewart, S. F., Henderson, E., Burt, A. D. and Day, C. P. "Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." *Gut* 2010; 59(9): 1265-1269.

Merriman, R. B., Ferrell, L. D., Patti, M. G., Weston, S. R., Pabst, M. S., Aouizerat, B. E. and Bass, N. M. "Correlation of paired liver biopsies in morbidly obese patients with suspected nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* 2006; 44(4): 874-880.

Minervini, M. I., Ruppert, K., Fontes, P., Volpes, R., Vizzini, G., de Vera, M. E., Gruttadauria, S., Miraglia, R., Pipitone, L., Marsh, J. W., Marcos, A., Gridelli, B. and Demetris, A. J. "Liver biopsy findings from healthy potential living liver donors: reasons for disqualification, silent diseases and correlation with liver injury tests." *J Hepatol* 2009; 50(3): 501-510.

Miura, K., Kodama, Y., Inokuchi, S., Schnabl, B., Aoyama, T., Ohnishi, H., Olefsky, J. M., Brenner, D. A. and Seki, E. "Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice." *Gastroenterology* 2010; 139(1): 323-334 e327.

Mofrad, P., Contos, M. J., Haque, M., Sargeant, C., Fisher, R. A., Luketic, V. A., Sterling, R. K., Shiffman, M. L., Stravitz, R. T. and Sanyal, A. J. "Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values." *Hepatology* 2003; 37(6): 1286-1292.

Mozaffarian, D., Lemaitre, R. N., King, I. B., Song, X., Huang, H., Sacks, F. M., Rimm, E. B., Wang, M. and Siscovick, D. S. "Plasma phospholipid long-chain omega-3 fatty acids and total and cause-specific mortality in older adults: a cohort study." *Ann Intern Med* 2013; 158(7): 515-525.

Muccioli, G. G., Naslain, D., Backhed, F., Reigstad, C. S., Lambert, D. M., Delzenne, N. M. and Cani, P. D. "The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis." *Mol Syst Biol* 2010; 6: 392.

Musso, G., Gambino, R. and Cassader, M. "Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update." *Obes Rev* 2010; 11(6): 430-445.

Musso, G., Gambino, R., Cassader, M. and Pagano, G. "A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* 2010; 52(1): 79-104.

Musso, G., Gambino, R., Cassader, M. and Pagano, G. "Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity." *Ann Med* 2011; 43(8): 617-649.

Musso, G., Gambino, R., De Michieli, F., Cassader, M., Rizzetto, M., Durazzo, M., Faga, E., Silli, B. and Pagano, G. "Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* 2003; 37(4): 909-916.

Nehra, V., Angulo, P., Buchman, A. L. and Lindor, K. D. "Nutritional and metabolic considerations in the etiology of nonalcoholic steatohepatitis." *Dig Dis Sci* 2001; 46(11): 2347-2352.

Nobili, V., Parkes, J., Bottazzo, G., Marcellini, M., Cross, R., Newman, D., Vizzutti, F., Pinzani, M. and Rosenberg, W. M. "Performance of ELF serum markers in predicting fibrosis stage in pediatric non-alcoholic fatty liver disease." *Gastroenterology* 2009; 136(1): 160-167.

Okanoue, T., Umemura, A., Yasui, K. and Itoh, Y. "Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in Japan." *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 1: 153-162.

Oliveira, C. P., Coelho, A. M., Barbeiro, H. V., Lima, V. M., Soriano, F., Ribeiro, C., Molan, N. A., Alves, V. A., Souza, H. P., Machado, M. C. and Carrilho, F. J. "Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease." *Braz J Med Biol Res* 2006; 39(2): 189-194.

Pachikian, B. D., Essaghir, A., Demoulin, J. B., Neyrinck, A. M., Catry, E., De Backer, F. C., Dejeans, N., Dewulf, E. M., Sohet, F. M., Portois, L., Deldicque, L., Molendi-Coste, O., Leclercq, I. A., Francaux, M., Carpentier, Y. A., Fougelle, F., Muccioli, G. G., Cani, P. D. and Delzenne, N. M. "Hepatic n-3 polyunsaturated fatty acid depletion promotes steatosis and insulin resistance in mice: genomic analysis of cellular targets." *PLoS One* 2011; 6(8): e23365.

Parker, H. M., Johnson, N. A., Burdon, C. A., Cohn, J. S., O'Connor, H. T. and George, J. "Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis." *J Hepatol* 2012; 56(4): 944-951.

Pawar, A. and Jump, D. B. "Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes." *J Biol Chem* 2003; 278(38): 35931-35939.

Pettinelli, P., Del Pozo, T., Araya, J., Rodrigo, R., Araya, A. V., Smok, G., Csendes, A., Gutierrez, L., Rojas, J., Korn, O., Maluenda, F., Diaz, J. C., Rencoret, G., Braghetto, I., Castillo, J., Poniachik, J. and Videla, L. A. "Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR-alpha ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion." *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(11): 1080-1086.

Pinidiyapathirage, M. J., Dassanayake, A. S., Rajindrajith, S., Kalubowila, U., Kato, N., Wickremasinghe, A. R. and de Silva, H. J. "Non-alcoholic fatty liver disease in a rural, physically active, low income population in Sri Lanka." *BMC Res Notes* 2011; 4: 513.

Piscitelli, F., Carta, G., Bisogno, T., Murru, E., Cordeddu, L., Berge, K., Tandy, S., Cohn, J. S., Griinari, M., Banni, S. and Di Marzo, V. "Effect of dietary krill oil supplementation on the endocannabinoidome of metabolically relevant tissues from high-fat-fed mice." *Nutr Metab (Lond)* 2011; 8(1): 51.

- Polyzos, S. A., Kountouras, J. and Mantzoros, C. S. "Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review." *Metabolism* 2015; 64(1): 60-78.
- Polyzos, S. A., Kountouras, J., Zavos, C. and Tsiaousi, E. "The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease." *Diabetes Obes Metab* 2010; 12(5): 365-383.
- Polyzos, S. A., Toulis, K. A., Goulis, D. G., Zavos, C. and Kountouras, J. "Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis." *Metabolism* 2011; 60(3): 313-326.
- Ratziu, V., Charlotte, F., Heurtier, A., Gombert, S., Giral, P., Bruckert, E., Grimaldi, A., Capron, F., Poynard, T. and Group, L. S. "Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease." *Gastroenterology* 2005; 128(7): 1898-1906.
- Rockey, D. C., Caldwell, S. H., Goodman, Z. D., Nelson, R. C., Smith, A. D. and American Association for the Study of Liver, D. "Liver biopsy." *Hepatology* 2009; 49(3): 1017-1044.
- Roden, M., Stingl, H., Chandramouli, V., Schumann, W. C., Hofer, A., Landau, B. R., Nowotny, P., Waldhausl, W. and Shulman, G. I. "Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans." *Diabetes* 2000; 49(5): 701-707.
- Roche, H. M. and Gibney, M. J. "Effect of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on fasting and postprandial triacylglycerol metabolism." *Am J Clin Nutr* 2000; 71(1 Suppl): 232S-237S.
- Rosenberg, W. M., Voelker, M., Thiel, R., Becka, M., Burt, A., Schuppan, D., Hubscher, S., Roskams, T., Pinzani, M., Arthur, M. J. and European Liver Fibrosis, G. "Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study." *Gastroenterology* 2004; 127(6): 1704-1713.
- Rossmeisl, M., Medrikova, D., van Schothorst, E. M., Pavlisova, J., Kuda, O., Hensler, M., Bardova, K., Flachs, P., Stankova, B., Vecka, M., Tvrzicka, E., Zak, A., Keijer, J. and Kopecky, J. "Omega-3 phospholipids from fish suppress hepatic steatosis by integrated inhibition of biosynthetic pathways in dietary obese mice." *Biochim Biophys Acta* 2014; 1841(2): 267-278.
- Russell, W. R., Hoyles, L., Flint, H. J. and Dumas, M. E. "Colonic bacterial metabolites and human health." *Curr Opin Microbiol* 2013; 16(3): 246-254.

Sampath, H. and Ntambi, J. M. "Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism." *Annu Rev Nutr* 2005; 25: 317-340.

Sanderson, L. M., de Groot, P. J., Hooiveld, G. J., Koppen, A., Kalkhoven, E., Muller, M. and Kersten, S. "Effect of synthetic dietary triglycerides: a novel research paradigm for nutrigenomics." *PLoS One* 2008; 3(2): e1681.

Santomauro, A. T., Boden, G., Silva, M. E., Rocha, D. M., Santos, R. F., Ursich, M. J., Strassmann, P. G. and Wajchenberg, B. L. "Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects." *Diabetes* 1999; 48(9): 1836-1841.

Sanyal, A. J., Chalasani, N., Kowdley, K. V., McCullough, A., Diehl, A. M., Bass, N. M., Neuschwander-Tetri, B. A., Lavine, J. E., Tonascia, J., Unalp, A., Van Natta, M., Clark, J., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Hoofnagle, J. H., Robuck, P. R. and Nash, C. R. N. "Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis." *N Engl J Med* 2010; 362(18): 1675-1685.

Sekiya, M., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Najima, Y., Nakakuki, M., Nagai, R., Ishibashi, S., Osuga, J., Yamada, N. and Shimano, H. "Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression." *Hepatology* 2003; 38(6): 1529-1539.

Serhan, C. N. and Chiang, N. "Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution." *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13(4): 632-640.

Shapiro, L. and Scherer, P. E. "The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor." *Curr Biol* 1998; 8(6): 335-338.

Shimada, M., Kawahara, H., Ozaki, K., Fukura, M., Yano, H., Tsuchishima, M., Tsutsumi, M. and Takase, S. "Usefulness of a combined evaluation of the serum adiponectin level, HOMA-IR, and serum type IV collagen 7S level to predict the early stage of nonalcoholic steatohepatitis." *Am J Gastroenterol* 2007; 102(9): 1931-1938.

Schattenberg, J. M. and Galle, P. R. "Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man." *Dig Dis* 2010; 28(1): 247-254.

Schuppan, D. and Schattenberg, J. M. "Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches." *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28 Suppl 1: 68-76.

Simopoulos, A. P. "Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects." *World Rev Nutr Diet* 2003; 92: 1-22.

Sorensen, T. I., Echwald, S. and Holm, J. C. "Leptin in obesity." *BMJ* 1996; 313(7063): 953-954.

Sowa, J. P., Heider, D., Bechmann, L. P., Gerken, G., Hoffmann, D. and Canbay, A. "Novel algorithm for non-invasive assessment of fibrosis in NAFLD." *PLoS One* 2013; 8(4): e62439.

Spadaro, L., Magliocco, O., Spampinato, D., Piro, S., Oliveri, C., Alagona, C., Papa, G., Rabuazzo, A. M. and Purrello, F. "Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease." *Dig Liver Dis* 2008; 40(3): 194-199.

Starley, B. Q., Calcagno, C. J. and Harrison, S. A. "Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection." *Hepatology* 2010; 51(5): 1820-1832.

Stienstra, R., Mandard, S., Patsouris, D., Maass, C., Kersten, S. and Muller, M. "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against obesity-induced hepatic inflammation." *Endocrinology* 2007; 148(6): 2753-2763.

Sung, K. C., Wild, S. H. and Byrne, C. D. "Resolution of fatty liver and risk of incident diabetes." *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(9): 3637-3643.

Suzuki, A., Angulo, P., Lymp, J., Li, D., Satomura, S. and Lindor, K. "Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." *Liver Int* 2005; 25(4): 779-786.

Szczepaniak, L. S., Nurenberg, P., Leonard, D., Browning, J. D., Reingold, J. S., Grundy, S., Hobbs, H. H. and Dobbins, R. L. "Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288(2): E462-468.

Taira, R., Yamaguchi, S., Shimizu, K., Nakamura, K., Ayabe, T. and Taira, T. "Bacterial cell wall components regulate adipokine secretion from visceral adipocytes." *J Clin Biochem Nutr* 2015; 56(2): 149-154.

Tanaka, N., Sano, K., Horiuchi, A., Tanaka, E., Kiyosawa, K. and Aoyama, T. "Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis." *J Clin Gastroenterol* 2008; 42(4): 413-418.

Tandy, S., Chung, R. W., Wat, E., Kamili, A., Berge, K., Griinari, M. and Cohn, J. S. "Dietary krill oil supplementation reduces hepatic steatosis, glycemia, and hypercholesterolemia in high-fat-fed mice." *J Agric Food Chem* 2009; 57(19): 9339-9345.

Tilg, H. and Hotamisligil, G. S. "Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance." *Gastroenterology* 2006; 131(3): 934-945.

Tilg, H. and Moschen, A. R. "Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis." *Hepatology* 2010; 52(5): 1836-1846.

Tomita, K., Oike, Y., Teratani, T., Taguchi, T., Noguchi, M., Suzuki, T., Mizutani, A., Yokoyama, H., Irie, R., Sumimoto, H., Takayanagi, A., Miyashita, K., Akao, M., Tabata, M., Tamiya, G., Ohkura, T. and Hibi, T. "Hepatic AdipoR2 signaling plays a protective role against progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice." *Hepatology* 2008; 48(2): 458-473.

Tschop, M. and Heiman, M. L. "Rodent obesity models: an overview." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; 109(6): 307-319.

Tvrzicka, E., Kremmyda, L. S., Stankova, B. and Zak, A. "Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011; 155(2): 117-130.

Vernon, G., Baranova, A. and Younossi, Z. M. "Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults." *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34(3): 274-285.

Vilar, C. P., Cotrim, H. P., Florentino, G. S., Barreto, C. P., Florentino, A. V., Bragagnoli, G. and Schwingel, P. A. "Association between nonalcoholic fatty liver disease and coronary artery disease." *Rev Assoc Med Bras* 2013; 59(3): 290-297.

Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., Dugar, B., Feldstein, A. E., Britt, E. B., Fu, X., Chung, Y. M., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J. D., Allayee, H., Tang, W. H., DiDonato, J. A., Lusis, A. J. and Hazen, S. L. "Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease." *Nature* 2011; 472(7341): 57-63.

Wanless, I. R. and Lentz, J. S. "Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors." *Hepatology* 1990; 12(5): 1106-1110.

Wieckowska, A., Zein, N. N., Yerian, L. M., Lopez, A. R., McCullough, A. J. and Feldstein, A. E. "In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* 2006; 44(1): 27-33.

Xu, A., Wang, Y., Keshaw, H., Xu, L. Y., Lam, K. S. and Cooper, G. J. "The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice." *J Clin Invest* 2003; 112(1): 91-100.

Xu, J., Nakamura, M. T., Cho, H. P. and Clarke, S. D. "Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats." *J Biol Chem* 1999; 274(33): 23577-23583.

Yilmaz, Y. "Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions?" *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36(9): 815-823.

Yilmaz, Y., Dolar, E., Ulukaya, E., Akgoz, S., Keskin, M., Kiyici, M., Aker, S., Yilmaztepe, A., Gurel, S., Gulden, M. and Nak, S. G. "Soluble forms of extracellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis." *World J Gastroenterol* 2007; 13(6): 837-844.

Zelber-Sagi, S., Lotan, R., Shlomai, A., Webb, M., Harrari, G., Buch, A., Nitzan Kaluski, D., Halpern, Z. and Oren, R. "Predictors for incidence and remission of NAFLD in the general population during a seven-year prospective follow-up." *J Hepatol* 2012; 56(5): 1145-1151.

Zelber-Sagi, S., Nitzan-Kaluski, D., Goldsmith, R., Webb, M., Blendis, L., Halpern, Z. and Oren, R. "Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study." *J Hepatol* 2007; 47(5): 711-717.

Zelber-Sagi, S., Nitzan-Kaluski, D., Halpern, Z. and Oren, R. "Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures." *Liver Int* 2006; 26(7): 856-863.

Zhu, F. S., Liu, S., Chen, X. M., Huang, Z. G. and Zhang, D. W. "Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids from seal oils on nonalcoholic fatty liver disease associated with hyperlipidemia." *World J Gastroenterol* 2008; 14(41): 6395-6400.

Zhu, L., Baker, S. S., Gill, C., Liu, W., Alkhouri, R., Baker, R. D. and Gill, S. R. "Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH." *Hepatology* 2013; 57(2): 601-609.

Zoppini, G., Fedeli, U., Gennaro, N., Saugo, M., Targher, G. and Bonora, E. "Mortality from chronic liver diseases in diabetes." *Am J Gastroenterol* 2014; 109(7): 1020-1025.

