

АНОТАЦІЯ

Черелюк Н. І. «Оптимізація ранньої діагностики неалкогольної жирової хвороби печінки на тлі ожиріння та надлишкової ваги з урахуванням основних філотипів кишкової мікробіоти та маркерів запалення». - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук (доктора філософії) за спеціальністю 14.01.02 - внутрішні хвороби. - Державна установа «Національний інститут терапії імені Л. Т. Малої Національної академії медичних наук України», Харків, 2021.

Захист відбудеться у спеціалізованій вченій раді Державної установи «Національний інститут терапії імені Л. Т. Малої Національної академії медичних наук України», Харків, 2022.

Дисертаційна робота присвячена вивченню діагностичних можливостей неінвазивних біомаркерів у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки (НАЖХП) на тлі ожиріння та надлишкової ваги та розробці на основі отриманих даних діагностичного алгоритму ранньої діагностики фіброзу.

У даній дисертаційній роботі вивчено можливість використання неінвазивних показників – відносного складу основних філотипів кишкової мікробіоти (КМ), сироваткової концентрації прозапальних маркерів високочутливого С-реактивного протеїну (вчСРП), фактору некрозу пухлини альфа (ФНП-альфа), рівнів мікроРНК-122 та мікроРНК-34а для діагностики раннього фіброзу у хворих на НАЖХП в залежності від індексу маси тіла (ІМТ).

На тлі стійкої тенденції до збільшення поширеності серед населення надлишкової маси тіла та вісцерального ожиріння відзначається зростання захворюваності на НАЖХП, яка стає однією з найпоширеніших причин захворювань печінки в усьому світі та в Україні зокрема (Fadiieienko G., Gridnyev O., Kushnir I., 2021). Збільшення розповсюдженості НАЖХП сприяє

значному зростанню кількості ускладнень, таких як: гепатоцелюлярна карцинома та печінкова недостатність, що призводить до збільшення показників смертності та госпіталізації пацієнтів із ускладненнями цирозу (Kumar R, Priyadarshi RN, Anand U., 2020).

Ключовим питанням у веденні хворих на НАЖХП є своєчасна діагностика фіброзу на ранній стадії, тому що саме стадія фіброзу є найважливішим фактором, який корелює з перебігом захворювання як у зворотний бік, так і в бік прогресування зі збільшенням смертності в даній групі хворих.

Невирішеним залишається питання визначення тих пацієнтів, які потребують ретельнішого спостереження, цілеспрямованих заходів щодо корекції способу життя, лікування компонентів метаболічного синдрому та у разі потреби медикаментозного лікування (Idalsoaga F, Kulkarni AV, Mousa OY, Arrese M, Arab JP, 2020).

Відповідно до сучасних уявлень про патогенетичні ланки розвитку НАЖХП, які узагальнює теорія «множинних ударів», одним із важливих механізмів, що сприяють розвитку жирової дистрофії печінки, прогресуванню прозапальних змін та фіброгенезу, є порушення КМ (Aron-Wisnewsky J, Vigliotti C, Witjes J, Le P, Holleboom AG, Verheij J., 2020). Зокрема, дослідження, проведене Raman et al., продемонструвало, що у хворих на НАЖХП та супутнє ожиріння порівняно з хворими без ожиріння спостерігається зростання бактерій філотипу *Firmicutes* (Raman M, Ahmed I, Gillevet PM, Probert CS. 2013). З іншого боку результати, отримані Jiang et al., показали відсутність статистично значущих змін складу КМ у хворих на НАЖХП порівняно з групою контролю (Jiang W, Wu N, Wang X, Chi Y, Zhang Y, Qiu X, 2015). У свою чергу у роботі Jasirwan COM. et al. було виявлено превалування бактеріального пулу *Firmicutes* порівняно із *Bacteroidetes* на рівні філотипу, проте на рівні роду кількість бактерій *Bacteroides* (14.43 %) перевищувала *Prevotella* (9.14 %), підкреслюючи, що

Bacteroides домінували над іншими родами філотипу *Firmicutes* (Jasirwan COM, Muradi A, Hasan I, Simadibrata M, Rinaldi I., 2021).

Слід зазначити, що більшість досліджень надходили з азіатського регіону. Зокрема, Rahayu et al. визначав особливості мікробного профілю молодих мешканців Індонезії й показав збільшення мікробних представників родів *Clostridium*, *Prevotella*, *Atopobium*, *Bifidobacterium* та *Bacteroides* (Rahayu ES, Utami T, Mariyatun M, Hasan PN, Kamil RZ, Setyawan RH., 2019). Дані результати відповідають також іншим роботам, проведеним у даному регіоні, але суперечать дослідженню, уже проведеному в міському регіоні Джакарти, харчування в якому характеризується високим вмістом білка та жирів тваринного походження. Подібні результати підкреслюють роль географічного регіону та особливості локального харчування у формуванні профілю КМ та асоційованих захворювань, зокрема НАЖХП та ожиріння.

Зі свого боку дослідження в українській популяції обмежені. Низка досліджень виявила більшу розповсюдженість синдрому надмірного бактеріального росту у хворих на НАЖХП, але вони обмежувались педіатричною популяцією або не визначали основні філотипи КМ (Stepanov YM, Zavhorodnia NY, Yagmur VB, Lukianenko OY, Zygalo EV. 2019). У 2017 році Коляда О. у своєму дослідженні, присвяченому визначенню основних філотипів КМ у хворих на ожиріння, показав прогресивне збільшення відносного вмісту *Firmicutes* на тлі зниження кількості філотипу *Bacteroidetes* у міру збільшення ІМТ (Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L. 2017). Також при зростанні ІМТ спостерігалось збільшення співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes* (ВШ = 1.23, 95 % ДІ 1,09–1,38), яке було вірогідним навіть після поправки на вік, стать, куріння та фізичну активність (ВШ = 1.33, 95% ДІ 1,11–1,60). Відносний вміст *Actinobacteria* залишався низьким у всіх групах ІМТ.

Отже, попри наявні дослідження, присвячені визначенню ролі КМ, а саме її основних філотипів: *Firmicutes* та *Bacteroidetes*, у розвитку НАЖХП

та ожиріння, їх результати є суперечливими та потребують уточнення, особливо в українській популяції. Залишається невизначеним патофізіологічний каскад прозапальних та профібротичних змін, який поєднує зміни КМ та традиційні чинники НАЖХП і який може залучати порушення регуляторних молекул – мікроРНК-122 та -34а.

У наш час актуальною є розробка алгоритму ранньої діагностики фіброзу у хворих на НАЖХП на тлі ожиріння та надлишкової ваги, з урахуванням економічно ефективних і відтворюваних неінвазивних методів.

Таким чином, мета роботи – оптимізація ранньої діагностики фіброзу у хворих на НАЖХП на тлі ожиріння та надлишкової ваги шляхом вивчення особливостей співвідношення філотипів *Firmicutes/Bacteroidetes* КМ, молекулярно-генетичних чинників: мікроРНК-122, мікроРНК-34а, а також прозапальних маркерів: вчСРП та ФНП-альфа.

Для досягнення запланованої мети було обстежено 140 пацієнтів, серед яких основну групу склали 120 хворих на НАЖХП (в усіх хворих було виключено інші фактори розвитку вторинного стеатозу печінки) на тлі ожиріння I–III ступенів (ІМТ $\geq 30,0$ – $39,9$ кг/м²) або надлишкової ваги (ІМТ $\geq 25,0$ – $29,9$ кг/м²): 59 чоловіків (49,2 %) та 61 (50,8 %) жінку. Медіана та інтерквартильний розмах віку хворих на НАЖХП в основній групі склали 48,5 [40,00; 59,00] років. Групи мали реципрокний розподіл за віком та статтю ($p > 0,05$).

У контрольну групу увійшли 20 практично здорових добровольців із нормальною масою тіла (ІМТ 18,5–24,9 кг/м²) без клінічно значущих порушень з боку системи органів травлення та ознак стеатозу печінки: 8 чоловіків (40 %) та 12 жінок (60 %). Медіана та інтерквартильний розмах віку обстежених склали 46,30 [35,00; 56,00] років.

Пацієнти основної групи ($n = 120$) були розділені на дві підгрупи в залежності від ІМТ. У I підгрупу увійшли хворі на НАЖХП із супутнім ожирінням (I–III ступенів), що за кількістю склали 85 хворих (70,83 % від

усіх обстежених), а до II підгрупи було включено 35 хворих на НАЖХП та надлишкову вагу (29,17 % від усіх обстежених).

Відповідно до схеми дослідження проведений аналіз суб'єктивних скарг хворих на НАЖХП показав, що більш виражена клінічна симптоматика спостерігалась у хворих на НАЖХП на тлі супутнього ожиріння, ніж у хворих із надлишковою вагою. У хворих I підгрупи найбільш частими суб'єктивними скаргами були зниження толерантності до фізичних навантажень (80 %), важкість у правому підребер'ї (72 %) та астеничний синдром (64 %). У свою чергу при наявності надлишкової ваги вищезгадані прояви зустрічались із меншою частотою (23 %, 34 % та 23 %, відповідно, $p < 0,05$).

Потрібно зауважити, що для досліджуваних хворих на НАЖХП не була характерна нудота. Так, у I підгрупі скарги на нудоту були виявлені лише в 11 %, а в II були відсутні зовсім та мали статистично значущий характер (КХП, $\chi^2 = 4,006359$, $df = 1$, $p < 0,45$). Періодичний біль у правому підребер'ї спостерігався в 25 % хворих I підгрупи, у той час для хворих II підгрупи це було зовсім не характерно (КХП, $\chi^2 = 7,90446$, $df = 1$, $p < 0,01$). Прояви диспепсичного синдрому склали 39 % в I підгрупі та 43 % в II, гіркота в роті спостерігалась у 18 % у I підгрупі та 6 % у II підгрупі.

Під час аналізування антропометричних показників у хворих на НАЖХП на тлі ожиріння спостерігались вірогідні ($p < 0,01$) зміни: збільшення ІМТ у 1,55 рази, об'єм талії (ОТ) – у 1,56 разів, об'єм стегон (ОС) – у 1,21 разів, ОТ/ОС – у 1,28 разів та складу тіла – зростання % жирової тканини (ЖТ) у 1,43 рази, % вісцерального жиру (ВЖ) – у 4,75 разів на тлі зниження % скелетної мускулатури (СкМ) у 1,19 разів, що свідчить про переважання абдомінального типу розподілу ЖТ.

Дана тенденція спостерігалась і у хворих на НАЖХП та надлишкову вагу ($p < 0,01$): збільшення ІМТ у 1,19 рази, ОТ у 1,32 рази, ОС у 1,09 рази ($p < 0,01$) та ОТ/ОС у 1,21 рази ($p < 0,01$) та складу тіла – зростання % ЖТ у 1,04 рази, % ВЖ – у 3 разів на тлі зниження % СкМ у 1,06 разів.

Під час аналізування біохімічних показників виявлено формування резистентності до інсуліну: зростання концентрації інсуліну – у 1,83 рази у хворих на НАЖХП на тлі ожиріння та у 1,52 рази у хворих на НАЖХП та надлишкову вагу, індексу НОМА – у 2,17 рази у I підгрупі та у 1,62 рази у II підгрупі. Крім того, зміни метаболічного профілю хворих на НАЖХП супроводжувались порушеннями ліпідного обміну: збільшенням сироваткової концентрації холестерину ліпопротеїдів низької щільності (ХС ЛПНЩ) у 1,80 рази у хворих на НАЖХП на тлі ожиріння та у 1,65 рази у хворих на НАЖХП та надлишкову вагу, а також більш вираженими змінами функціонального стану печінки: у хворих на НАЖХП на тлі ожиріння концентрація аспартатамінотрансферази (АСТ) підвищувалась у 1,15 рази, аланінамінотрансферази (АЛТ) – у 1,66 рази, а гамаглутамілтранспептидази (ГГТП) – у 1,3 рази, тоді як у хворих на НАЖХП та надлишкову вагу підвищувалася лише концентрація АЛТ у 1,2 рази.

Зміни складу КМ у хворих на НАЖХП характеризувались підвищенням відносного вмісту *Firmicutes*: даний показник у хворих із супутнім ожирінням збільшувався у 1,78 рази та надлишковою вагою – у 1,72 рази. Кореляційний аналіз показав, що відносний вміст *Firmicutes* зростає відповідно до % ВЖ ($r = +0,74$, $p = 0,01$ та $r = +0,70$, $p = 0,01$, відповідно) та % СкМ (у хворих із надлишковою вагою $r = -0,47$, $p = 0,03$). Крім того, у хворих на НАЖХП було визначено зниження відносного вмісту *Bacteroidetes*: у хворих із супутнім ожирінням на 53,91 % і надлишковою вагою – на 45,66 %, що корелювало з % ВЖ ($r = -0,48$, $p = 0,01$ та $r = -0,49$, $p = 0,003$, відповідно). Розрахунковий показник співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes* також збільшувався у хворих на НАЖХП у 5,7 разів при наявності супутнього ожиріння, а у хворих із надлишковою вагою – у 4,3 рази. Найбільш значущі зміни КМ були асоційовані з особливостями клінічного перебігу НАЖХП: збільшення *Firmicutes* було виявлено при формуванні суб'єктивних скарг на порушення дефекації ($N = 6,66$, $p < 0,01$;) і диспепсичні явища ($N = 4,80$, $p = 0,028$); зменшення відносного вмісту

Bacteroidetes на тлі збільшення співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes* – при порушеннях дефекації ($N = 10,58$; $p < 0,01$ та $N = 26,91$; $p < 0,01$, відповідно).

Дослідження прозапальних та профібротичних маркерів у хворих на НАЖХП виявило підвищення рівня мікроРНК-122 при наявності надлишкової ваги у 40 разів ($p < 0,01$), а при супутньому ожирінні – у 39,09 разів ($p < 0,01$), які залежали від стадії фіброзу ($N = 6,16$; $p = 0,46$); збільшення рівня мікроРНК-34а у 6,20 рази та у 6,40 рази, відповідно ($p < 0,01$); вчСРП – у 3,23 та 4,87 рази, відповідно ($p < 0,01$). Збільшення рівня мікроРНК-122 було асоційоване з особливостями клінічної симптоматики – суб'єктивним відчуттям зниженням толерантності до фізичних навантажень (за критерієм Манна-Уїтні; $U = 364,50$; $p < 0,01$), болем та важкістю у правому підребер'ї ($U = 355,00$; $p < 0,01$; та $U = 509,50$; $p = 0,029$, відповідно), концентрацією загального білірубину ($r = +0,27$; $p = 0,0136$) та його фракцій – прямим та непрямим білірубінном ($r = +0,23$; $p = 0,0358$ та $r = +0,24$; $p = 0,0170$, відповідно); а також із ультрасонографічними розмірами печінки, а саме товщиною лівої долі ($r = +0,27$; $p = 0,0120$). У хворих на НАЖХП на тлі ожиріння збільшення рівня мікроРНК-34а пов'язане зі зниженням толерантності до фізичних навантажень ($U = 288,00$; $p < 0,01$), болем у правому підребер'ї ($U = 416,00$; $p < 0,01$, відповідно), а також надмірним розвитком % ЖТ ($r = +0,37$; $p = 0,02$).

У хворих на НАЖХП зміни прозапальних та профібротичних маркерів були асоційовані зі змінами КМ: мікроРНК-122 зі співвідношенням *Firmicutes/Bacteroidetes* (у хворих із супутнім ожирінням $r = 0,27$; $p = 0,0117$ та надлишковою вагою $r = 0,56$; $p = 0,0003$) та *Bacteroidetes* (у хворих із надлишковою вагою $r = -0,34$; $p = 0,043$); мікроРНК-34а корелювало із *Bacteroidetes* (у хворих із надлишковою вагою $r = -0,44$; $p = 0,0086$) та співвідношенням *Firmicutes/Bacteroidetes* ($r = 0,38$; $p = 0,0231$).

Визначено додаткові діагностичні маркери – % ВЖ, сироваткові концентрації прозапальних маркерів вчСРП та ФНП-альфа, рівнів мікроРНК-

122 та -34a в плазмі крові, а також співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes*. За допомогою використання методу характеристичних кривих для кожного з діагностичних критеріїв були розраховані їхні cut-off value, які для сироваткової концентрації вчСРП склали – 4,5 мг/л (AUC = 0,99, чутливість 1,00, специфічність 0,030; $p < 0,05$); для сироваткової концентрації ФНП-альфа – 5,5 пг/мл (AUC = 0,97, чутливість 0,98, специфічність 0,025; $p < 0,05$); для рівня мікроРНК-122 – 12,50 в.о. (AUC = 0,99, чутливість 0,98, специфічність 0,048; $p < 0,05$); для рівня мікроРНК-34a – 5,50 в.о. (AUC = 0,98, чутливість 0,98, специфічність 0,106; $p < 0,05$); для % ВЖ склали 8,5 % (AUC = 0,99, чутливість 1,00, специфічність 0,175; $p < 0,05$); для співвідношення основних філотипів КМ *Firmicutes/Bacteroidetes* – 1,51 (AUC = 0,95, чутливість 0,83, специфічність 0,021; $p < 0,05$).

На підставі визначених маркерів створений алгоритм ранньої діагностики фіброзу у хворих на НАЖХП на тлі ожиріння та надлишкової маси тіла, який складається з 4 поступових етапів. Для кожного з них виділена низка значущих діагностичних факторів та наведені значення їхніх cut-off value. Етап I включає інтерв'ювання хворого з ознаками гепатопатії за даними ультразвукової діагностики (УЗД) з метою визначення скарг та анамнестичних даних для виключення етіологічних факторів вторинної жирової дистрофії печінки та обов'язкове об'єктивне обстеження з перкусійним/пальпаторним визначенням розмірів печінки, а також антропометричних показників та складу тіла за даними біоімпедансометрії: % ВЖ. На II етапі хворому рекомендовано визначення маркерів цитолізу, а саме АЛТ та ГГТП. Етап III включає визначення метаболічних та прозапальних параметрів: індексу НОМА; загального холестерину (ЗХС) та ХС ЛПНЩ; вчСРП та ФНП-альфа. Завершальний IV етап включає оцінку генетичних та біологічних чинників: визначення основних філотипів КМ та рівня мікроРНК-122 та мікроРНК-34a.

Використання алгоритму дозволяє шляхом поетапного обстеження провести скринінг хворих на НАЖХП та тлі ожиріння і надлишкової ваги, а

також визначити хворих із фіброзом, навіть на ранніх стадіях, своєчасно призначити ефективні схеми лікування, які включають корекцію образу життя та медикаментозну інтервенцію, запобігти прогресуванню захворювання та розвитку ускладнень, що асоційовані з покращенням соціоекономічних наслідків.

Вперше в українській популяції визначені особливості складу КМ у хворих на НАЖХП на тлі ожиріння та надлишкової ваги, виявлений зв'язок між відносним вмістом КМ та іншими прозапальними й профібротичними маркерами, зокрема рівнем мікроРНК-122 та -34а в плазмі крові, доведена доцільність їх використання в діагностичних цілях, що обґрунтовує їхню практичну значущість та розроблено алгоритм ранньої діагностики фіброзу для даної групи хворих.

Ключові слова: неалкогольна жирова хвороба печінки, фіброз, кишкова мікробіота, мікроРНК-122, мікроРНК-34а.

ABSTRACT

Chereliuk N.I. "Optimization of early diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease on the background of obesity and overweight, taking into account the main phylotypes of gut microbiota and markers of inflammation".

The thesis for a scientific degree of the candidate of medical sciences (doctor of philosophy) on a specialty 14.01.02 – internal diseases. – Government Institution «L. T. Malaya Therapy National Institute of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine» 2021.

Defence of a thesis will take place in the specialized scientific council of the Government Institution «L. T. Malaya Therapy National Institute of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, 2022.

The work is devoted to the study of diagnostic possibilities of non-invasive biomarkers in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) on the background of obesity and overweight and development based on the obtained data of the diagnostic algorithm for early diagnosis of fibrosis.

In this paper, the possibility of using non-invasive indicators – the relative composition of the main phylotypes of gut microbiota (GM), serum concentrations of pro-inflammatory markers highly sensitive C-reactive protein (CRP), tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha), levels of microRNA-122 (miR-122) and microRNA-34a (miR-34a) for the diagnosis of early fibrosis in patients with NAFLD depending on body mass index (BMI).

Against the background of the steady trend of increasing prevalence of overweight and visceral obesity, there is the increase in the incidence of NAFLD, which is becoming one of the most common causes of liver disease worldwide and in Ukraine in particular (Fadieienko G., Gridnyev O., Kushnir I., 2021). The increase in the prevalence of NAFLD contributes to the significant increase in complications such as hepatocellular carcinoma and hepatic failure, leading to increased mortality and hospitalization of patients with cirrhosis complications (Kumar R, Priyadarshi RN, Anand U., 2020).

The key issue in the management of patients with NAFLD is the timely diagnosis of fibrosis at the early stage, because the stage of fibrosis is the most important factor that correlates with the course of the disease both in the reverse direction and in the direction of progression with an increase in mortality in this group of patients.

The issue of identifying those patients who require closer monitoring, targeted lifestyle adjustments, treatment of components of the metabolic syndrome and, if necessary, medical treatment remains unresolved (Idalsoaga F, Kulkarni AV, Mousa OY, Arrese M, Arab JP, 2020).

According to modern ideas about the pathogenetic links in the development of NAFLD, which are generalized by the theory of "multiple strokes", one of the important mechanisms contributing to the development of fatty liver disease, progression of pro-inflammatory changes and fibrogenesis is a disorder in GM (Aron-Wisnewsky J, Vigliotti C, Witjes J, Le P, Holleboom AG, Verheij J., 2020). In particular, the research by Raman et al., showed that in patients with NAFLD and concomitant obesity in comparison with non-obese patients there is an increase in bacteria of Firmicutes phylotype (Raman M, Ahmed I, Gillevet PM, Probert CS. 2013). On the other hand, the results obtained by Jiang et al., showed the absence of statistically significant changes in the composition of GM in patients with NAFLD compared with the control group (Jiang W, Wu N, Wang X, Chi Y, Zhang Y, Qiu X, 2015). But in the paper of Jasirwan COM et al. the prevalence of the bacterial pool of Firmicutes compared to *Bacteroidetes* was found at the phylotype level, but at the genus level the number of *Bacteroides* bacteria (14.43 %) exceeded *Prevotella* (9.14 %), emphasizing that *Bacteroides* dominated other genera of *Firmicutes* phylotype (Jasirwan COM, Muradi A, Hasan I, Simadibrata M, Rinaldi I., 2021).

It should be noted that most of the researches came from the Asian region. In particular, Rahayu *et al.* determined the features of the microbial profile of young Indonesians and showed the increase in microbial representatives of the genera *Clostridium*, *Prevotella*, *Atopobium*, *Bifidobacterium* and *Bacteroides*

(Rahayu ES, Utami T, Mariyatun M, Hasan PN, Kamil RZ, Setyawan RH., 2019). These results are consistent with other studies in the region, but are in conflict with the study conducted in Jakarta's urban region, which has the food high in protein and animal fats. Such results emphasize the role of the geographical region and the peculiarities of local nutrition in the formation of the profile of GM and associated diseases, including NAFLD and obesity.

In turn, research in Ukrainian population is limited. A number of studies have found the higher prevalence of bacterial overgrowth syndrome in patients with NAFLD, but were limited to the paediatric population, or did not determine the main phylotypes of GM (Stepanov YM, Zavorodnia NY, Yagmur VB, Lukianenko OY, Zygalo EV. 2019). In 2017, Kolyada O. in his study on the determination of the main phylotypes of GM in obese patients, showed the progressive increase in the relative content of *Firmicutes* against the background of the decrease in the number of *Bacteroidetes* phylotype with increasing BMI (Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L. 2017). Also, with increasing BMI, there was the increase in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio (OR = 1.23, 95 % CI 1.09–1.38), which was likely even after adjusting for age, sex, smoking and physical activity (OR = 1.33, 95 % CI 1.11–1.60). The relative content of *Actinobacteria* remained low in all BMI groups.

Thus, despite the available research on the role of GM, namely its main phylotypes: *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, in the development of NAFLD and obesity, their results are contradictory and need to be clarified, especially in Ukrainian population. The pathophysiological cascade of pro-inflammatory and profibrotic changes, which combines changes in GM and traditional factors of NAFLD, and which may involve violations of regulatory molecules – miR-122 and miR-34a, remains unclear.

Today it is important to develop the algorithm for early diagnosis of fibrosis in patients with NAFLD on the background of obesity and overweight, taking into account cost-effective and reproducible non-invasive methods.

Thus, the aim of the work was to optimize the early diagnosis of fibrosis in NAFLD patients with obesity and overweight by studying the ratio of *Firmicutes/Bacteroidetes* phylotypes of GM, molecular genetic factors: miR-122, miR-34a, as well as pro-inflammatory markers: CRP and TNF-alpha.

To achieve the planned goal, 140 patients were examined, among which the main group consisted of 120 patients with NAFLD (all patients were excluded from other factors of secondary hepatic steatosis) on the background of obesity of I–III degrees (BMI \geq 30.0–39.9 kg/m²) or overweight (BMI \geq 25.0–29.9 kg/m²): 59 men (49.2 %) and 61 (50.8 %) women. The median and interquartile range of age of patients with NAFLD in the main group was 48.5 [40.00; 59.00] years. The groups had the reciprocal distribution by age and sex ($p > 0.05$).

The control group included 20 healthy volunteers with normal body weight (BMI 18.5–24.9 kg/m²) without clinically significant disorders of the digestive system and signs of hepatic steatosis: 8 men (40 %) and 12 women (60 %). The median and interquartile range of the age of the subjects was 46.30 [35.00; 56.00] years.

Patients in the main group ($n = 120$) were divided into two subgroups depending on BMI. The first subgroup included patients with NAFLD with concomitant obesity (I–III degrees), which amounted to 85 patients (70.83 % of all surveyed), and the second subgroup included 35 patients with NAFLD and overweight (29.17 % of all surveyed).

According to the study scheme, the analysis of subjective complaints of patients with NAFLD showed that more pronounced clinical symptoms were observed in patients with NAFLD against the background of concomitant obesity than in overweight patients. In patients of the first subgroup, the most frequent subjective complaints were decreased tolerance to physical activity (80 %), heaviness in the right hypochondrium (72 %) and asthenic syndrome (64 %). In turn, in the presence of excess weight, the above manifestations were less common (23 %, 34 % and 23 %, respectively, $p < 0.05$).

It should be noted that the studied patients with NAFLD were not have nausea. Thus, in the first subgroup complaints of nausea were found in only 11 %, and in the second subgroup were completely absent and were statistically significant (chi-square, $\chi^2 = 4.006359$, $df = 1$, $p < 0.45$). Periodic pain in the right hypochondrium was observed in 25 % of patients of the first subgroup, while for patients of the second subgroup it was not typical (chi-square, $\chi^2 = 7.90446$, $df = 1$, $p < 0.01$). Manifestations of dyspeptic syndrome were 39 % in the first subgroup and 43 % in the second subgroup, bitterness in the mouth was observed in 18 % in the first subgroup and 6 % in the second subgroup.

During analysis of anthropometric indicators in patients with NAFLD on the background of obesity, probable ($p < 0.01$) changes were observed: the increase in BMI of 1.55 times, waist circumference (WC) – 1.56 times, hip circumference (HC) – 1.21 times, waist-to-hip ratio (WHR) – 1.28 times; and body composition – an increase of % adipose tissue (AT) in 1.43 times, % visceral fat (VF) – 4.75 times against the background of a decrease in % of skeletal muscle (SkM) in 1.19 times, which indicates the predominance of the abdominal type of distribution of AT.

This trend was also observed in patients with NAFLD and overweight ($p < 0.01$): increased BMI in 1.19 times, WC in 1.32 times, HC in 1.09 times ($p < 0.01$) and WHR in 1.21 times ($p < 0.01$); and body composition - increase in % AT in 1.04 times, % VF – in 3 times against decrease in % of SkM in 1.06 times.

During analysis of biochemical parameters revealed the formation of insulin resistance: the increase in insulin concentration – 1.83 times in patients with NAFLD on the background of obesity and 1.52 times in patients with NAFLD and overweight, HOMA index – 2.17 times in the first subgroup and 1.62 times in the second subgroup. In addition, changes in the metabolic profile of patients with NAFLD were accompanied by disorders of lipid metabolism: increased serum concentration of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in 1.80 times in patients with NAFLD on the background of obesity and in 1.65 times in patients

with NAFLD and overweight, as well as more pronounced changes in liver function: in patients with NAFLD on the background of obesity, the concentration of aspartate aminotransferase (AST) increased 1.15 times, alanine aminotransferase (ALT) – 1.66 times, and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) – 1.3 times, while in patients with NAFLD and overweight increased only the concentration of ALT 1.2 times.

Changes in the composition of GM in patients with NAFLD were characterized by the increase in the relative content of *Firmicutes*: this figure in patients with concomitant obesity increased by 1.78 times and overweight – by 1.72 times. Correlation analysis showed that the relative content of *Firmicutes* increases according to % VF ($r = +0.74$, $p = 0.01$ and $r = +0.70$, $p = 0.01$, respectively) and % of SkM (in patients with excess weight $r = -0.47$, $p = 0.03$). In addition, the decrease in the relative content of *Bacteroidetes* was found in patients with NAFLD: in patients with concomitant obesity by 53.91 % and overweight – by 45.66 %, which correlated with the % VF ($r = -0.48$, $p = 0.01$ and $r = -0.49$, $p = 0.003$, respectively). The estimated *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio also increased by 5.7 times in patients with NAFLD with concomitant obesity, and by 4.3 times in overweight patients. The most significant changes in GM were associated with features of the clinical course of NAFLD: the increase in *Firmicutes* was found in the formation of subjective complaints of defecation disorders ($H = 6.66$, $p < 0.01$;) and dyspepsia ($H = 4.80$, $p = 0.028$); decrease in the relative content of *Bacteroidetes* against the background of the increase in the ratio of *Firmicutes/Bacteroidetes* – in disorders of defecation ($H = 10.58$; $p < 0.01$ and $H = 26.91$; $p < 0.01$, respectively).

The study of pro-inflammatory and profibrotic markers in patients with NAFLD revealed the increase in serum level of miR-122 in the presence of excess weight by 40 times ($p < 0.01$), and in concomitant obesity – by 39.09 times ($p < 0.01$), which depended on the stage of fibrosis ($H = 6.16$; $p = 0.46$); increase level miR-34a by 6.20 times and 6.40 times, respectively ($p < 0.01$); CRP - 3.23 and 4.87 times, respectively ($p < 0.01$). The increase level miR-122 levels was

associated with the features of clinical symptoms – the subjective feeling of the decrease in exercise tolerance (according to the Mann-Whitney test; $U = 364.50$; $p < 0.01$), pain and heaviness in the right hypochondrium ($U = 355, 00$, $p < 0.01$, and $U = 509.50$; $p = 0.029$, respectively), the concentration of total bilirubin ($r = +0.27$; $p = 0.0136$) and its fractions – direct and indirect bilirubin ($r = +0.23$, $p = 0.0358$ and $r = +0.24$, $p = 0.0170$, respectively); as well as with ultrasonographic dimensions of the liver, namely the thickness of the left lobe ($r = +0.27$; $p = 0.0120$); at the same time, in patients with NAFLD against the background of obesity, the increase level of miR-34a is associated with the decrease in exercise tolerance ($U = 288.00$; $p < 0.01$), pain in the right hypochondrium ($U = 416.00$; $p < 0.01$, respectively), as well as excessive development of % AT ($r = +0.37$; $p = 0.02$).

In patients with NAFLD, changes in pro-inflammatory and profibrotic markers were associated with changes in GM: miR-122 with *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio (in patients with concomitant obesity $r = 0.27$; $p = 0.0117$ and overweight $r = 0.56$; $p = 0.0003$) and *Bacteroidetes* (in overweight patients $r = -0.34$; $p = 0.043$); miR-34a correlated with *Bacteroidetes* (in overweight patients $r = -0.44$; $p = 0.0086$) and the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio ($r = 0.38$; $p = 0.0231$).

Additional diagnostic markers – % VF, serum concentrations of pro-inflammatory markers CRP and TNF-alpha, levels of miR-122 and -34a in blood plasma, as well as the ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* were determined. Using the method of characteristic curves for each of the diagnostic criteria, their cut-off value was calculated, which for the serum concentration of CRP was – 4.5 mg/l (AUC = 0.99, sensitivity 1.00, specificity 0.030; $p < 0,05$); for serum TNF-alpha concentration – 5.5 pg/ml (AUC = 0.97, sensitivity 0.98, specificity 0.025; $p < 0.05$); for level miR-122 content – 12.50 AU (AUC = 0.99, sensitivity 0.98, specificity 0.048; $p < 0.05$); for level of miR-34a – 5.50 AU (AUC = 0.98, sensitivity 0.98, specificity 0.106; $p < 0.05$); for the proportion of visceral fat % VF was 8.5 % (AUC = 0.99, sensitivity 1.00, specificity 0.175; $p < 0.05$); for the

ratio of the main phylotypes of GM *Firmicutes/Bacteroidetes* – 1.51 (AUC = 0.95, sensitivity 0.83, specificity 0.021; $p < 0.05$).

Based on the identified markers, the algorithm for early diagnosis of fibrosis in patients with NAFLD on the background of obesity and overweight, which consists of 4 gradual stages. For each of the stages, a number of significant diagnostic factors are identified and their cut-off values are given. Stage I includes interviewing the patient with signs of hepatopathy on ultrasound to determine complaints and anamnestic data to exclude etiological factors of secondary fatty liver disease and mandatory objective examination with percussion/palpation to determine the size of the liver, as well as anthropometric indicators and composition of body according to bioimpedancemetry: the proportion of visceral fat. At stage II, the patient was recommended to determine markers of cytolysis, namely ALT and GGT. Stage III includes determination of metabolic and pro-inflammatory parameters: HOMA index; general cholesterol and LDL cholesterol; CRP and TNF-alpha. The final stage IV includes the assessment of genetic and biological factors: determination of the main phylotypes of GM and level of miR-122 and miR-34a.

The use of the algorithm allows step-by-step screening of patients with NAFLD and obesity and overweight and identify patients with fibrosis, even in the early stages, timely prescribe effective treatment regimens that include lifestyle adjustments and drug therapy, prevent disease progression and development associated with improving socio-economic consequences.

For the first time in Ukrainian population the features of GM in patients with NAFLD on the background of obesity and overweight were identified, the relationship between the relative content of GM and other pro-inflammatory and profibrotic markers, including serum miR-122 and -34a, for diagnostic purposes, which justifies their practical significance.

Key words: non-alcoholic fatty liver disease, fibrosis, gut microbiota, miR-122, miR-34a.