

РЕФЕРАТ

Оптимізація ранньої діагностики неалкогольної жирової хвороби печінки з урахуванням основних філотипів кишкової мікробіоти

Автор : Черелюк Н.І.

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 скринінгу фіброзу.

У даній роботі вивчено можливість використання неінвазивних показників – відносного складу основних філотипів кишкової мікробіоти (КМ), рівнів мікроРНК-122 та мікроРНК-34а у діагностиці хворих на НАЖХП, а також визначено особливості їх вмісту 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. Збільшення розповсюдженості НАЖХП сприяє значному зростанню кількості ускладнень, таких як гепатоцелюлярна карцинома та печінкова недостатність, що призводить до збільшення показників смертності та госпіталізації пацієнтів з ускладненнями цирозу.

Ключовим питанням у веденні хворих на НАЖХП є своєчасна діагностика фіброзу на ранній стадії, тому що саме стадія фіброзу є найважливішим фактором, який корелює зі смертністю у даної групи хворих.

Невирішеним залишається питання визначення тих пацієнтів, які потребують ретельнішого спостереження, цілеспрямованих заходів щодо корекції способу життя, лікування компонентів метаболічного синдрому та при необхідності медикаментозне лікування.

Відповідно до сучасних уявлень про патогенетичні ланки розвитку НАЖХП, які узагальнює теорія «множинних ударів», одним з важливих механізмів, що сприяють розвитку жирової дистрофії печінки, прогресуванню прозапальних змін

та фіброгенезу, є порушення КМ. Зокрема, дослідження, проведене Sohail *et al.*, продемонструвало, що у хворих на НАЖХП та супутнє ожиріння у порівнянні із хворими без ожиріння спостерігається зростання бактерій філотипу Firmicutes. З іншого боку результати, отримані Jiang *et al.*, показали відсутність статистично значущих змін складу КМ у хворих на НАЖХП у порівнянні із групою контролю. А ось в роботі Jasirwan SOM *et al.* було виявлено превалювання бактеріального пулу Firmicutes у порівнянні 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.

Слід зазначити, що більшість досліджень надходили з азіатського регіону. Зокрема, Rahayu *et al.* визначав особливості мікробного профілю молодих мешканців Індонезії і показав збільшення мікробних представників родів *Clostridium*, *Prevotella*, *Atopobium*, *Bifidobacterium* та *Bacteroides*. Дані результати відповідають і іншим роботам, проведеному в даному регіоні, але суперечать вже дослідженню, проведеному в міському регіоні Джакарти, харчування в якому характеризується високим вмістом білку 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.

В свою чергу дослідження в українській популяції обмежені. Низка досліджень виявило більшу розповсюдженість синдрому надмірного бактеріального росту у хворих на НАЖХП, але обмежувались педіатричною популяцією, або не визначали основні філотипи КМ. 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 в міру збільшення ІМТ. Також при зростанні ІМТ спостерігалось збільшення співвідношення F/V (ВШ = 1.23, 95% ДІ 1,09–1,38), яке спостерігалось 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*, в 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.

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

Таким чином, метою роботи стала 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: високочутливого С-реактивного протеїну (вчСРП) та фактору некрозу пухлини альфа (ФНП-альфа).

Для досягнення запланованої мети було обстежено 140 пацієнтів, серед яких основну групу склали 120 хворих на НАЖХП (усім хворим 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%) жінок. 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 з 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 ІМТ. У I підгрупу увійшли хворі на НАЖХП із супутнім ожирінням (I-III ступенів), що за кількістю склало 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 з 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%). В свою чергу, при наявності надлишкової ваги вищезгадані прояви зустрічались з меншою частотою (23%, 34% та 23%, відповідно, $p < 0,05$).

Треба зауважити, що для досліджуваних хворих на НАЖХП не була характерна нудота. Так, в I підгрупі скарги на нудоту були виявлені лише у 11%, а в II підгрупі були відсутні зовсім та мали статистично значущий характер (КХП, $\chi^2 = 4,006359$, $df = 1$, $p < 0,45$). Періодичний біль у правому підребер'ї спостерігалися у 25% пацієнтів I підгрупи, у той час для пацієнтів 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 підгрупі, гіркота в роті спостерігалась у 18% в I підгрупі та 6% в II підгрупі.

При аналізі антропометричних показників у хворих на НАЖХП на тлі ожиріння спостерігались вірогідні ($p < 0,01$) зміни: збільшення ІМТ у 1,55 рази, ОТ – у 1,56 разів, ОС – у 1,21 разів, ОТ/ОС – у 1,28 разів; та складу тіла – зростання %ЖТ у 1,43 рази, %ВЖ – у 4,75 разів на тлі зниження %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.

При аналізі 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 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 АСТ підвищувалась у 1,15 рази, АЛТ – у 1,66 рази, а ГГТП – у 1,3 рази, тоді як у хворих на НАЖХП та надлишкову вагу підвищувалась 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 рази 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 сироваткової концентрації 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 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 рівнів 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 білірубіном ($r=+0,23$; $p=0,0358$ та $r=+0,24$; $p=0,0170$, відповідно); а також з ультрасонографічними розмірами печінки, а саме товщиною лівої долі ($r=+0,27$; $p=0,0120$); при цьому, у хворих на НАЖХП на тлі ожиріння – збільшення вмісту 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, мікроРНК-122 та -34а, а також співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes*. За допомогою використання методу характеристичних кривих для кожного з діагностичних критеріїв були розраховані їх cut-off value, яке для сироваткової концентрації вчСРБ складало – 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 сироваткового вмісту мікроРНК-122 – 12,50 в.о. ($AUC=0,99$, чутливість 0,98, специфічність 0,048; $p < 0,05$); для сироваткового рівня мікроРНК-34а – 5,50 в.о. ($AUC=0,98$, чутливість 0,98, специфічність 0,106; $p < 0,05$); для частки вісцерального жиру %ВЖ складало 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 раннього комплексного скринінгу фіброзу у хворих на НАЖХП на тлі ожиріння та надлишкової маси тіла, який складається з 4 поступових етапів. Для кожного з етапів виділена низка значущих діагностичних факторів та наведені значення їх cut-off value. Етап I включає інтерв'ювання хворого з ознаками гепатопатії за даними 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: частки вісцерального жиру. На етапі II хворому рекомендовано визначення маркерів цитолізу, а саме АЛТ та ГГТП. Етап III включає визначення метаболічних та прозапальних параметрів: індексу НОМА; ЗХС та ХС ЛПНЩ; вчСРП та ФНП-альфа. Заключний етап IV включає оцінку генетичних та біологічних чинників: визначення основних філотипів КМ та вимірювання сироваткової концентрації мікроРНК-122 та мікроРНК-34а.

Використання алгоритму дозволяє шляхом поетапного обстеження провести скринінг хворих на НАЖХП та тлі ожиріння та надлишкової ваги та визначити хворих з фіброзом, навіть на ранніх стадіях, своєчасно призначити ефективні схеми лікування, які включають корекцію образу життя та медикаментозну терапію, попередити прогресування захворювання та розвиток ускладнень, що асоційоване 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 і профібротичними маркерами, зокрема сироватковим вмістом мікроРНК-122 та -34а, а також доведена доцільність їх використання в діагностичних цілях, що обґрунтовує їх практичну значущість.

За матеріалами роботи опубліковано 18 наукових праць, серед яких 7 статей і 11 тез доповідей у матеріалах конгресів, з'їздів і конференцій, як всеукраїнського рівня, так і європейського. Серед публікацій 5 статей представлено у журналах, внесених до переліку фахових видань України, 2 статті

— у закордонних виданнях, в тому числі в журналі, що індексується наукометричною базою Scopus. Серед всіх публікацій, одна претенгенткою особисто в моноавторстві. Отримано 2 патенту на корисну модель.

Автор :Черелюк Н.І.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ РОБІТ ЧЕРЕЛЮК НАТАЛІЇ ІГОРІВНИ

№ з/п	Повна назва наукової роботи	Вихідні дані (назва видання, номер, рік, сторінки)	Співавтори (П.І.Б., науковий ступінь)
1.	Вплив немедикаментозного лікування на показники вуглеводного обміну у пацієнтів з неалкогольною жировою хворобою печінки та ожирінням	Сучасна Гастроентерологія 2018 р.№3 (101), ст.42-47	Курінна О.Г. к.м.н. Кушнір І.Е. к.м.н. Чернова В.М. к.м.н.
2.	Співвідношення основних філотипів кишкової мікробіоти у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки та ожиріння	Сучасна Гастроентерологія 2019 р.№5 (119), ст.26-33	
3.	Effect of lifestyle modification on proinflammation markers in non-alcoholic fatty liver disease	WGO -World Congress of Gastroenterology, 2019, ст. 258	Fadieienko G.D. DMedSc, Prof. Kurinna O. H Ph.D.
4.	Роль кишечной микробиоты в развитии неалкогольной жировой болезни печени	Современная Гастроэнтерология 2019 р.№4 (108), ст.92-99	Фадєєнко Г.Д. д.м.н., проф. Гриднев А.Е. д.м.н. Куриная Е.Г. к.м.н.
5.	Relationship between the main phylotypes of intestinal microbiota and comorbid states in patients with nonalcoholic fatty liver disease and obesity.	Paris NASH Meeting. 2019p., Abstract 16	Fadieienko G.D. DMedSc, Prof. Kurinna O. H Ph.D. Radzishavska Ye. B. Ph.D.
6.	Зв'язок між ступенем стеатозу та фіброзу, а також показниками складу тіла у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки із супутнім ожирінням	«Досягнення профілактичної медицини як основа збереження здоров'я і благополуччя», 2019р, ст. 60	Фадєєнко Г.Д. д.м.н., проф. Курінна О.Г. к.м.н. Олійник О.В., Радзишевська Є.Б. к.м.н.
5.	Співвідношення основних філотипів кишкової мікробіоти у хворих на НАЖХП та супутнє ожиріння"	«Ювілейні терапевтичні читання. Клінічна та профілактична медицина: досвід та нові напрямки розвитку»	Фадєєнко Г.Д. д.м.н., проф. Курінна О.Г. к.м.н.
6.	Зв'язок неалкогольної жирової хвороби печінки з порушеннями мікробного складу кишечника"	Медицина сьогодні і завтра, 2019р. №1 (82), ст.16-22.	Фадєєнко Г.Д. д.м.н., проф. Курінна О.Г. к.м.н.
7.	Нова технологія лікування хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки	«Неінфекційні захворювання: ключові чинники, що впливають на якість та тривалість життя» , 2020р, ст.157	Фадєєнко Г.Д. д.м.н., проф. Кушнір І. Е. к.м.н. Гриднев О. Є. д.м.н. Чернова В. М. к.м.н. Соломенцева Т. А. к.м.н. Нікіфорова Я. В. к.м.н. Курінна О.Г. к.м.н.
8.	Стан кишкової мікробіоти у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки в залежності від коморбідного перебігу на тлі асоційованих з метаболічним синдромом захворювань	«Неінфекційні захворювання: ключові чинники, що впливають на якість та тривалість життя» , 2020р., ст.161	Фадєєнко Г.Д. д.м.н., проф. Гальчинська В.Ю. к.м.н.

9.	Метаболічні захворювання та неалкогольна жирова хвороба печінки- особливості стану кишкової мікробіоти"	Проблеми ендокринної патології, 2020р. №4 ст.99-105	Фадєєнко Г.Д. д.м.н., проф. Гальчинська В.Ю. к.м.н.
10.	Effect of body mass index on the ratio of the main microbiota phylotypes in patients with non-alcoholic fatty liver disease	EG Week 2020. Met. Exchange. Evolve, 2020р., Abstract 16 PO839	Fadieienko G.D. DMedSc, Prof. Gridnyev O.E. DMedSc
11.	Співвідношення основних філотипів кишкової мікробіоти у пацієнтів на неалкогольну жирову хворобу печінки в залежності від стадії фіброзу	«Сучасна медицина очима молоді: проблеми і перспективи вирішення», 2020р. ст 164	Фадєєнко Г.Д. д.м.н., проф. Курінна О.Г. к.м.н.
12.	Вплив медикаментозного лікування на клініко-антропометричні показники, біохімічні параметри та маркери системного запалення у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки	34-а річна наукова сесія присвячена підсумкам заключних та перехідних етапів науково-дослідних робіт в ДУ "Національний інститут терапії ім. Л.Т. Малої НАМН України"2020р., ст. 2	Степанова О.В.
13.	Визначення рівнів експресії miR-34a та miR-122 у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки із супутнім ожирінням"	Вітчизняна та світова медицина в умовах сучасності, 2020р. ст. 91-96	Фадєєнко Г.Д. д.м.н., проф.
14.	Співвідношення основних філотипів кишкової мікробіоти у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки на тлі ожиріння та його зв'язок зі стадією стеатозу печінки	Сучасна Гастроентерологія 2020 р.№6 (116), ст.14-20	Фадєєнко Г.Д. д.м.н., проф.
15.	Ratio of main phylotypes of gut microbiota in patients with non-alcoholic fatty liver disease depending on the body mass index	Wiadomosci Lekarskie 2021р. VOLUME LXXIV, ISSUE 3 PART 1, ст.523-529	Fadieienko G.D. DMedSc, Prof. Galchinskaya V. Y. Ph.D.