

Х. Б. Квіт

ОСОБЛИВОСТІ МІКРОБІОМУ КИШЕЧНИКУ ПАЦІЄНТІВ ІЗ НЕАЛКОГОЛЬНОЮ ЖИРОВОЮ ХВОРОБОЮ ПЕЧІНКИ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Мета роботи – оцінити склад мікробіому кишечника пацієнтів із неалкогольною жирною хворобою печінки (НАЖХП) та визначити його роль у розвитку і прогресуванні захворювання.

Пацієнти і методи. У дослідженні взяли участь 152 пацієнти з НАЖХП (середній вік – $46,5 \pm 0,89$ років), які обстежувалися в кількох медичних центрах. Контрольну групу склали 150 пацієнтів без патології печінки (середній вік – $48,36 \pm 0,97$ років). Критерії діагностики НАЖХП включали ультразвукове дослідження печінки, оцінку гепато-ниркового індексу та виявлення кардіо-метаболічних факторів ризику. Склад кишкового мікробіому аналізували методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Особливу увагу приділяли *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroides* та *Akkermansia muciniphila*.

Результати досліджень та їх обговорення. У пацієнтів із НАЖХП спостерігали значне зростання рівня *Firmicutes* – ($50,3 \pm 2,46$) % та *Actinobacteria* – ($15,34 \pm 2,87$) % порівняно з контрольною групою – ($25,17 \pm 1,51$) та ($10,9 \pm 1,87$) % відповідно. Індекс *Firmicutes/Bacteroides* був суттєво вищим у пацієнтів із НАЖХП – ($5,02 \pm 2,61$) проти ($2,10 \pm 1,74$). Наявність *Akkermansia muciniphila* була значно нижчою у пацієнтів із НАЖХП (33,0 %) порівняно з контрольною групою (63,0 %).

Кореляційний аналіз показав позитивний зв'язок між рівнями *Actinobacteria* та індексом *Firmicutes/Bacteroides* ($r=0,75$, $p \leq 0,05$), а також між індексом *F/B* та рівнем тригліцеридів у крові ($r=0,68$, $p \leq 0,05$). Виявлено негативну кореляцію між наявністю *Akkermansia muciniphila* та діагностованою НАЖХП ($r=-0,69$, $p \leq 0,05$).

Висновки. Пацієнти з НАЖХП демонструють значні зміни у складі мікробіому кишечника. Збільшення рівня *Firmicutes* та *Actinobacteria*, підвищений індекс *Firmicutes/Bacteroides* та зменшення рівня *Akkermansia muciniphila* вказують на порушення бар'єрної функції кишечника. *Akkermansia muciniphila* має захисний ефект, що відкриває перспективи терапії із застосу-

ванням пробіотиків для відновлення здорового мікробіому та запобігання прогресуванню НАЖХП.

Ключові слова: НАЖХП; мікробіом кишечника; *Firmicutes*; *Actinobacteria*; *Akkermansia muciniphila*.

Неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) є одним із найпоширеніших хронічних захворювань печінки у світі, що значно підвищує ризик розвитку серцево-судинних захворювань, цукрового діабету 2 типу та інших метаболічних порушень [1–3]. За оцінками, поширеність НАЖХП сягає близько 25 % серед дорослого населення і продовжує зростати через високий рівень ожиріння та нездоровий спосіб життя. Хоча патогенез НАЖХП залишається недостатньо вивченим, сучасні дослідження наголошують на важливій ролі кишкового мікробіому у розвитку та прогресуванні цього захворювання [4–6].

Кишковий мікробіом – це складна екосистема, що відіграє ключову роль у регуляції енергетичного балансу, метаболізмі ліпідів і запальних процесах, які значно впливають на патогенез НАЖХП. Дослідження свідчать, що у пацієнтів із НАЖХП спостерігаються характерні зміни в складі кишкового мікробіому, зокрема зниження різноманітності мікроорганізмів і порушення співвідношення основних бактерійних таксонів [7, 8]. Ці зміни можуть впливати на бар'єрну функцію кишечника, підвищуючи його проникність та сприяючи транслокації бактерійних продуктів. Це, своєю чергою, викликає хронічне запалення, що посилює стеатоз і фіброз печінки [9, 10].

Вивчення особливостей мікробіому кишечника пацієнтів із НАЖХП є надзвичайно актуальним, адже воно відкриває нові перспективи для діагностики, прогнозування та лікування цього захворювання. Розуміння взаємозв'язку між складом мікробіому та прогресуванням НАЖХП може сприяти створенню інноваційних терапевтичних підходів, таких як мікробна терапія, пробіотики та дієтичні втручання. Це може допомогти уповільнити або навіть зупинити розвиток НАЖХП.

Метою цього дослідження було визначити склад мікробіому кишечника пацієнтів із НАЖХП та оцінити його можливу роль у розвитку і прогресуванні хвороби.

Матеріали і методи

У дослідженні взяли участь 152 пацієнти з НАЖХП, які зверталися до амбулаторних відділень ТОВ «Агенція „Трускавецькурорт”», лікувально-консультативних відділень № 1 і № 2 ПП «Медичний центр “Інтерсоно”», а також до терапевтичного відділення Лікарні Святого Пантелеймона Першого територіального медичного об'єднання Львова.

Критерії включення:

- наявність НАЖХП, підтверджена клінічними, лабораторними дослідженнями та сімейним анамнезом;
- інформована згода пацієнта на участь у дослідженні.

Критерії діагностики НАЖХП за допомогою УЗД включали:

- дифузне підвищення ехогенності паренхіми печінки;
- співвідношення яскравості печінки та правої нирки, що визначалося для розрахунку гепато-ниркового індексу (IPC);

Стадії стеатозу печінки за допомогою УЗД визначали за наступними критеріями:

S1: підвищення ехогенності паренхіми; S2: незначна гепатомегалія, підвищення ехогенності паренхіми, фрагментація та згладженість судинного малюнка; S3: гепатомегалія, підвищення ехогенності паренхіми, втрата судинного малюнка, ослаблення ехосигналу до діафрагми.

Крім ультразвукового обстеження або стеатометрії, діагноз НАЖХП встановлювався за наявності одного з наступних факторів кардіометаболічного ризику:

- Обвід талії: >102 см у чоловіків та >88 см у жінок.
- Артеріальний тиск: >130/85 мм рт. ст. або прийом медикаментозного лікування гіпертонії.
- Рівень тригліцеридів у плазмі: >1,70 ммоль/л або специфічне медикаментозне лікування (гіполіпідемічна терапія).
- Рівень ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ): <1,0 ммоль/л у чоловіків та <1,3 ммоль/л у жінок або специфічне медикаментозне лікування.
- Рівень глюкози натще: 5,6–6,9 ммоль/л або рівень HbA1c 5,7–6,4 %.
- Індекс інсулінорезистентності (НОМА-IR): >2,5.
- Рівень високочутливого С-реактивного білка (hs-CRP): >2 мг/л [11].

Вік пацієнтів основної групи варіював від 24 до 69 років, середній вік становив $46,5 \pm 0,89$ років. Жінок було 85 (55,9 %), чоловіків – 67 (44,1 %).

Контрольну групу склали 150 пацієнтів без НАЖХП, патологічних змін у печінці та тяжких супутніх захворювань. Їх вік становив від 22 до 74 років, середній вік – $48,36 \pm 0,97$ ро-

ків. Гендерний склад контрольної групи був подібним до основної: жінок – 81 (54 %), чоловіків – 69 (46 %).

Пацієнтів виключали з дослідження за наявності таких чинників, як ознаки інфікування вірусами гепатитів В і С, вживання етанолу в гепатотоксичних дозах (30–40 г етанолу в день), автоімунний гепатит, медикаментозний гепатит, хвороба Вільсона-Коновалова, запальні захворювання кишечника, тяжкі супутні захворювання з боку серцево-судинної системи, легень, нирок, злоякісні новоутворення, які могли б супроводжуватися змінами досліджуваних параметрів і, таким чином, вплинути на результати дослідження, психічні захворювання, відмова пацієнта від участі в дослідженні або нездатність пацієнта дотримуватись порад лікаря.

Для аналізу мікробіому використовували метод полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Зразки калу зберігали при температурі $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом тижня до виділення ДНК. ДНК екстрагували з 1,5–2 г заморожених зразків калу фенол-хлороформним методом. ДНК концентрували до 200 мкл у спеціальному буферному розчині. Якість і концентрацію ДНК вимірювали за допомогою NanoDrop ND-8000 (Thermo Scientific, США). Зразки з концентрацією ДНК <20 нг або A260/280 <1,8 підлягали додатковому очищенню або осадженню етанолом.

Реакцію ПЛР здійснювали у термоциклері Rotor-Gene 6000 (QIAGEN, Німеччина) за таким протоколом: початкова денатурація – $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв; 30 циклів: денатурація – $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 с; відпалювання – 15 с; елонгація – $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 с; кінцева елонгація – $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв. Кожна реакція містила 0,05 одиниць/мкл полімерази Taq (Sigma Aldrich), 0,2 мМ dNTP, 0,4 мкМ праймерів, 1× буфер, ~10 нг ДНК і воду до 25 мкл. Зразки ампліфікували в трьох примірниках для кожної пари праймерів.

Мікробний склад аналізували за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі (qRT-PCR), визначаючи загальне ДНК бактерій, а також ДНК *Bacteroidetes*, *Firmicutes* та *Actinobacteria* з використанням таргетних праймерів.

Отримані медико-біологічні дані обробляли за допомогою пакета для статистичного аналізу Statistica 11.0 for Windows. Відповідно до поставлених завдань використовували факторний і кореляційний аналізи. Результати подано у вигляді $M \pm m$, де M – середнє значення параметра, m – стандартна похибка середнього. Для оцінки достовірності різниці між середніми значеннями незалежних змінних застосовували t-критерій Стьюдента. Значення вважали статистично достовірними при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз складу мікробіому показав значні відмінності між групами обстежених пацієнтів.

Дані, наведені в таблиці 1, демонструють достовірне переважання частки *Firmicutes* серед пацієнтів із

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

НАЖХП – (50,30±2,46) %, порівняно з контрольною групою – (25,17±1,51) %. Також виявлено статистично значущу різницю у відсотковому співвідношенні *Actinobacteria* – (15,34±2,87) % у пацієнтів із НАЖХП проти (10,90±1,87) % у контрольній групі. Індекс *Firmicutes/Bacteroides* також суттєво відрізнявся між групами. У пацієнтів із НАЖХП цей показник становив (5,02±2,61), тоді як у контрольній групі – (2,10±1,74).

На основі отриманих даних було детально проаналізовано склад мікробіому кишечника пацієнтів із НАЖХП залежно від типу захворювання (стеатоз чи стеатогепатит), а також порівняно з контрольною групою.

Спостерігається достовірна різниця у рівні *Bacteroides* між групою пацієнтів зі стеатогепатитом (32,37±0,70 %) та групою без НАЖХП. Найвищий рівень *Firmicutes* зафіксовано у групі зі стеатогепатитом, порівняно з пацієнтами зі стеатозом і з контрольною групою. Крім того, рівень *Actinobacteria* був вищим серед осіб зі стеатогепатитом (16,98±4,12 %). Індекс *Firmicutes/Bacteroides* (F/B) достовірно відрізнявся у групі пацієнтів без стеатотичних змін у печінці (5,68±0,25), порівняно з групами зі стеатозом і стеатогепатитом (табл. 2).

Досліджені показники мікробіому можуть використовуватися для оцінки біотичних порушень у кишечнику.

Є певні типи бактерій, які, за даними сучасних досліджень, сприяють поліпшенню бар'єрної функції мікрофлори кишечника. Це дозволяє запобігти порушенням ліпідного обміну, що залежить від міцності кишко-

вої стінки та ефективності кишково-печінкової циркуляції.

Зокрема, бактерія *Akkermansia muciniphila* відіграє ключову роль у підтриманні здорового муцинового шару, захищаючи клітини, що вистилають кишкову стінку. Недостатня кількість *Akkermansia muciniphila* може призводити до порушення кишкового бар'єру, що сприяє поглинанню кишкових токсинів. Це, у свою чергу, надмірно стимулює імунну систему, викликаючи системне запалення, яке може спричинити зміни у ліпідному профілі крові та розвиток НАЖХП.

Цей показник було включено до дизайну дослідження та визначено як у пацієнтів із НАЖХП, так і в контрольній групі. Через малу відносну кількість бактерії *Akkermansia muciniphila* у мікробіомі кишечника її наявність фіксувалася в бінарному форматі:

1 – бактерія присутня у мікробіомі;

0 – бактерії немає у мікробіомі.

Серед групи з НАЖХП наявність *Akkermansia muciniphila* була визначена у мікробіомі лише 33 % пацієнтів, тоді як у контрольній групі – у 63 %. Це може свідчити про властивості *Akkermansia muciniphila* як маркера захисту муцинового шару кишечника, що забезпечує збереження міцності стінки, зменшення рівня ліпополісахаридів та, відповідно, запобігає розвитку порушень ліпідного обміну й прогресуванню НАЖХП.

На основі отриманих даних про взаємозв'язок між порушеннями ліпідного обміну, наявністю НАЖХП і змі-

Таблиця 1

Мікробіом кишечника пацієнтів із НАЖХП порівняно з групою контролю

Показник	НАЖХП (n=152)	Контрольна група (n=150)	p
Частка <i>Bacteroides</i> , %	31,29±1,11	25,65±1,48	≥0,05
Частка <i>Firmicutes</i> , %	50,30±2,46	25,17±1,51	≤0,05
Частка <i>Actinobacteria</i> , %	15,34±2,87	10,90±1,87	≤0,05
Частка інших мікроорганізмів, %	12,88±0,84	9,68±0,25	≥0,05
Індекс <i>Firmicutes/Bacteroides</i>	5,02±2,61	2,10±1,74	≤0,05

Таблиця 2

Мікробіом кишечника пацієнтів із різними типами НАЖХП

Показник	Стеатоз (n=65)	Стеатогепатит (n=46)	Без НАЖХП (n=47)
Частка <i>Bacteroides</i> , %	28,61±0,73	32,37±0,7***	25,65±1,48
Частка <i>Firmicutes</i> , %	47,6±0,28	51,9±0,10***	25,17±1,51
Частка <i>Actinobacteria</i> , %	12,99±5,62*	16,98±4,12***	10,9±1,87
Частка інших мікроорганізмів, %	1,84±1,61**	2,12±0,83***	5,68±0,25

Примітки:

* – різниця достовірна між групами «Стеатоз» та «Стеатогепатит», p<0,05;

** – різниця достовірна між групами «Стеатоз» та «Без НАЖХП», p<0,05;

*** – різниця достовірна між групами «Стеатогепатит» та «Без НАЖХП», p<0,05.

нами складу мікробіому кишечника було здійснено кореляційний аналіз. Він дозволив визначити предиктори та можливі маркери розвитку НАЖХП.

Так, виявлено сильну позитивну кореляцію між рівнем *Actinobacteria* та індексом F/B ($r=0,75$, $p\leq 0,05$) у пацієнтів із НАЖХП. Крім того, спостерігалася позитивна кореляція між індексом F/B та рівнем тригліцеридів у крові ($r=0,68$, $p\leq 0,05$).

Ці результати свідчать про високу ймовірність впливу зростання рівня *Actinobacteria* та індексу F/B на розвиток або прогресування НАЖХП. Оскільки тригліцериди є одним із ключових кардіометаболічних факторів ризику, зростання зазначених бактерійних філотипів може бути пов'язане з метаболічними порушеннями, що сприяють розвитку НАЖХП. Також було проаналізовано вплив наявності *Akkermansia muciniphila* на прогресування та розвиток НАЖХП. Для цього розраховано кореляцію між наявністю цієї бактерії та діагнозом НАЖХП.

Аналіз даних дозволив встановити негативну кореляцію між наявністю бактерії *Akkermansia muciniphila* та діагностованою НАЖХП ($r=-0,69$, $p\leq 0,05$). Це свідчить про те, що присутність *Akkermansia muciniphila* у мікробіомі пацієнтів може мати захисний ефект, знижуючи ризик розвитку та прогресування захворювання.

Наявність цієї бактерії сприяє збереженню бар'єрної функції кишечника, зменшуючи транслокацію ліпополі-

сахаридів і знижуючи рівень системного запалення. Таким чином, дефіцит *Akkermansia muciniphila* може бути пов'язаний із підвищеною проникністю кишечника, що посилює метаболічні порушення та сприяє прогресуванню НАЖХП.

Висновки

1. У пацієнтів із НАЖХП спостерігаються значні зміни у складі мікробіому кишечника, зокрема зростає частка бактерій типу *Firmicutes* та *Actinobacteria* і зменшується кількість *Akkermansia muciniphila*.

2. Підвищений індекс F/B у пацієнтів із НАЖХП може бути додатковим маркером дисбіозу кишечника, сприяючи оцінці ступеня тяжкості та прогресування захворювання.

3. Зростання частки *Actinobacteria* може призводити до підвищення індексу F/B, що впливає на рівень тригліцеридів у хворих із НАЖХП. Це може бути одним із факторів ризику розвитку та прогресування захворювання.

4. Виявлена негативна кореляція між наявністю *Akkermansia muciniphila* та НАЖХП підтверджує важливу роль цієї бактерії у підтримці бар'єрної функції кишечника. Це відкриває перспективи для терапевтичного застосування пробіотиків, до складу яких входить *Akkermansia muciniphila*, з метою корекції мікробіому кишечника та відновлення його бар'єрної функції.

Література

- Guo, X., Yin, X., Liu, Z., & Wang, J. (2022). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathogenesis and natural products for prevention and treatment. *International journal of molecular sciences*, 23(24), 15489.
- Younossi, Z., Anstee, Q. M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., ... & Bugianesi, E. (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature reviews gastroenterology & hepatology*, 15(1), 11-20.
- Raza, S., Rajak, S., Upadhyay, A., Tewari, A., & Sinha, R. A. (2021). Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 26, 206.
- Wei, S., Wang, L., Evans, P. C., & Xu, S. (2024). NAFLD and NASH: etiology, targets and emerging therapies. *Drug Discovery Today*, 103910.
- Papatheodoridi, M., & Cholongitas, E. (2018). Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): current concepts. *Current pharmaceutical design*, 24(38), 4574-4586.
- De, A., Bhagat, N., Mehta, M., Taneja, S., & Duseja, A. (2024). Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) definition is better than MAFLD criteria for lean patients with NAFLD. *Journal of hepatology*, 80(2), e61-e62.
- Aron-Wisniewsky, J., Vigliotti, C., Witjes, J., Le, P., Holleboom, A.G., Verheij, J., ... & Clément, K. (2020). Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(5), 279-297.
- Zhai, Q., Wu, H., Zheng, S., Zhong, T., Du, C., Yuan, J., ... & Li, J. (2023). Association between gut microbiota and NAFLD/NASH: a bidirectional two-sample Mendelian randomization study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1294826.
- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E.A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, 65(8), 1038-1048.
- Wu, L., Li, J., Feng, J., Ji, J., Yu, Q., Li, Y., ... & Guo, C. (2021). Crosstalk between PPARs and gut microbiota in NAFLD. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 136, 111255.
- Solomentseva, T. A. (2023). New criteria for metabolic fatty liver disease: advantage or doubt? *Suchasna gastroenterolohiya – Modern gastroenterology*, 4, 84-90 [In Ukrainian].

FEATURES OF THE GUT MICROBIOME IN PATIENTS WITH NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

Kh. B. Kvit

Danylo Halytsky Lviv National Medical University

SUMMARY. The aim – to assess the composition of the gut microbiome in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and determine its role in the development and progression of the disease.

Patients and Methods. The study involved 152 patients with NAFLD (mean age 46.5±0.89 years) who were examined at several medical centers. The control group consisted of 150 patients without liver pathology (mean age 48.36±0.97 years). NAFLD was diagnosed using liver ultrasound, evaluation of the hepatorenal index, and identification of cardiometabolic risk factors. The composition of the gut microbiome was analyzed using real-time polymerase chain reaction (PCR), focusing on Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroides, and Akkermansia muciniphila.

Results. Patients with NAFLD exhibited significantly increased levels of Firmicutes (50.30±2.46 %) and Actinobacteria (15.34±2.87 %) compared to the control group (25.17±1.51 % and 10.90±1.87 %, respectively). The Firmicutes/Bacteroides index was substantially higher in NAFLD patients (5.02±2.61 vs. 2.10±1.74). The presence of Akkermansia muciniphila was notably lower in NAFLD patients (33 %) compared to the control group (63 %).

Correlation analysis revealed a positive relationship between Actinobacteria levels and the Firmicutes/Bacteroides index ($r=0.75$, $p\leq 0.05$), as well as between the F/B index and blood triglyceride levels ($r=0.68$,

$p\leq 0.05$). A negative correlation was found between the presence of Akkermansia muciniphila and diagnosed NAFLD ($r=-0.69$, $p\leq 0.05$).

Conclusions. Patients with NAFLD exhibit significant alterations in the composition of the gut microbiome. Increased levels of Firmicutes and Actinobacteria, a higher Firmicutes/Bacteroides index, and decreased levels of Akkermansia muciniphila indicate impaired gut barrier function. Akkermansia muciniphila exerts a protective effect, suggesting potential for probiotic therapy to restore a healthy microbiome and prevent NAFLD progression.

Key words: NAFLD; gut microbiome; Firmicutes; Actinobacteria; Akkermansia muciniphila.

Відомості про автора:

Квіт Христина Богданівна – канд. мед. наук, доцентка кафедри терапії № 1, медичної діагностики, гематології та трансфузіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; e-mail: akskris88@gmail.com

ORCID ID 0000-0003-1394-9429

Information about the author:

Kvit Kh. B. – PhD, Associate Professor of the Department of Therapy № 1, Medical Diagnostics, Hematology and Transfusiology, Faculty Postgraduate Teaching, Danylo Halytsky Lviv National Medical University; e-mail: akskris88@gmail.com

ORCID ID 0000-0003-1394-9429

Конфлікт інтересів: немає.

Author has no conflict of interest to declare.

Отримано 20.10.2024 р.