

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2022.02.12

For correspondence: Shupyk National Healthcare University of Ukraine, 9 Dorohozhytska Street, Kyiv, Ukraine, 04112

Twitter: @CheverdaTetiana

E-mail: cheverda.doc@gmail.com

Received: 10 Oct, 2022

Accepted: 12 Dec, 2022

Published: 30 Dec, 2022

ORCID IDs

Andriy Dorofeyev:

<https://orcid.org/0000-0002-2631-8733>

Mykola Rudenko:

<https://orcid.org/0000-0003-3536-0455>

Tetiana Cheverda:

<https://orcid.org/0000-0003-2081-1874>

Disclosures: The authors declared no conflict of interest.

Author Contributions:

Conceptualization: Andriy Dorofeyev, Mykola Rudenko, Tetiana Cheverda;

Results of study: Andriy Dorofeyev, Mykola Rudenko, Tetiana Cheverda;

Writing: Andriy Dorofeyev, Mykola Rudenko, Tetiana Cheverda;

Review & editing: Andriy Dorofeyev, Mykola Rudenko, Tetiana Cheverda.

Ethical approval: The Bioethics Committee of Shupyk National Healthcare University of Ukraine, protocol No. 5, March 2, 2020. All patients signed informed consent.

Funding: The authors received no financial support for their study.



© All authors, 2022

State of the gut microbiota in patients with metabolic-associated fatty liver disease with type 2 diabetes mellitus

Andriy Dorofeyev¹, Mykola Rudenko², Tetiana Cheverda¹

¹ Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine

² Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Introduction. One of the frequent complications of the type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD). Aim. To study the composition of gut microbiota in patients with a combination of T2DM and MAFLD and to compare it with the microbiota in isolated T2DM and MAFLD.

Methods. 111 patients were studied. The main group consisted of 56 patients with a combination of MAFLD and T2DM; the 1st group included 28 patients with MAFLD and the 2nd - 27 patients with T2DM. The control group consisted of 30 practically healthy people. Diagnosis was made by steatometry, shear wave elastography, lactulose H₂ breath test, qPCR of feces using primers targeting the 16S rRNA gene, and stool culture.

Results. In the the main group SIBO was found in 48.2%, in 1st - 35.7%, in 2nd - 33.3%, compared to 10% in the control group. When compared with healthy people, the number of "other" microorganisms significantly increased in the group with isolated T2DM and *Clostridium*, *Proteus* and *Candida* were cultured; in the

case of isolated MAFLD, a decrease in *Bacteroidetes* and an increase in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, as well as an increase in *Klebsiella* and *Clostridium*. In the main group, an increase in *Actinobacteria*, "other" microorganisms, a ratio of *Firmicutes/Bacteroidetes* and a decrease in *Bacteroidetes* were found, when cultured - an increase in *Clostridium*, *Klebsiella* and *Candida*.

Conclusions. Only the group of MAFLD with T2DM was characterized by increased *Actinobacteria*; decreased absolute number of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* and increased *Escherichia*, including with altered enzymatic properties in the stool culture.

Keywords: Metabolic-associated fatty liver disease, type 2 diabetes mellitus, bacterial overgrowth syndrome, gut microbiota.

Стан кишкової мікробіоти у хворих на метаболічно асоційовану жирову хворобу печінки з цукровим діабетом 2 типу

Андрій Дорофєєв¹, Микола Руденко², Тетяна Чеверда¹

¹ Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ, Україна

² Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна

Вступ. Одним із частих ускладнень цукрового діабету 2 типу (ЦД 2 типу) є метаболічно асоційована жирова хвороба печінки (МЖХП). Мета. Вивчити склад кишкової мікробіоти у пацієнтів із поєднанням ЦД 2 та МЖХП та порівняти його з мікробіотою при ізольованих ЦД 2 та МЖХП.

Методи. Обстежено 111 пацієнтів. Основну групу склали 56 пацієнтів із поєднанням МЖХП та ЦД 2, до 1-ї групи увійшли 28 хворих на МЖХП, до 2-ї – 27 хворих на ЦД 2. Контрольну групу склали 30 практично здорових осіб. Діагностику проводили за допомогою стеатометрії, еластографії зсувної хвилі, Н-2 дихального тесту з лактулозою, qPCR калу з використанням праймерів, орієнтованих на ген 16S рРНК, і посіву калу.

Результати. В основній групі синдром надлишкового бактеріального росту (СНБР) виявлено у 48,2 %, у 1-й – 35,7 %, у 2-й – 33,3 % проти 10 % у контрольній групі. При порівнянні зі здоровими, в групі з ізольованим ЦД2 достовірно збільшена кількість «інших» мікроорганізмів, а при посіві - *Clostridium*, *Proteus* і *Candida*; при ізольованій МЖХП зниження *Bacteroidetes* та збільшення співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes*, а також збільшення *Klebsiella* та *Clostridium*. В основній групі - збільшення *Actinobacteria*, «інших» мікроорганізмів, співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes* і зниження *Bacteroidetes*, при посіві - збільшення *Clostridium*, *Klebsiella* і *Candida*.

Висновки. Тільки для групи хворих з поєднанням МЖХП та ЦД2 було характерне підвищення філи *Actinobacteria*, а при посіві – зниження абсолютної кількості *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та збільшення *Escherichia*, у т.ч із зміненими ферментативними властивостями.

Ключові слова: метаболічно асоційована жирова хвороба печінки, цукровий діабет 2 типу, синдром надлишкового бактеріального росту, кишкова мікробіота.

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2022.02.12

Адреса для листування: вул. Дорогожицька, 9, Київ, Україна 04112

Твіттер: @CheverdaTetiana

Е-пошта: cheverda.doc@gmail.com

Надійшла до редакції: 10.10.2022

Прийнята до друку: 12.12.2022

Опублікована: 30.12.2022

ORCID IDs

Андрій Дорофєєв:

<https://orcid.org/0000-0002-2631-8733>

Микола Руденко:

<https://orcid.org/0000-0003-3536-0455>

Тетяна Чеверда:

<https://orcid.org/0000-0003-2081-1874>

Конфлікт інтересів: автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Особистий внесок авторів:

Створення концепції: Андрій Дорофєєв, Микола Руденко, Тетяна Чеверда;

Результати дослідження: Андрій Дорофєєв, Микола Руденко, Тетяна Чеверда;

Написання: Андрій Дорофєєв, Микола Руденко, Тетяна Чеверда;

Редагування та затвердження остаточного варіанту:

Андрій Дорофєєв, Микола Руденко, Тетяна Чеверда.

Дозвіл комісії з питань біоетики: протокол дослідження схвалено комісією з питань етики Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, протокол № 5 від 02.03.2020 р. Усі пацієнти підписали інформовані згоди.

Фінансування: автори не отримали жодної фінансової підтримки свого дослідження.



© Всі автори, 2022

Introduction

In our country, about 2.5 million people suffer from T2DM and up to 40,000 people die from its complications every year. One of the common complications of diabetes is a non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which has recently been given a more pathogenetically sound name – MAFLD [1,2]. It was found that 70% of patients with diabetes have similar liver damage [3]. Although it is noted that MAFLD is a broader concept than NAFLD and has a more severe course, covering a wide range of patients [4]. It should be emphasized that MAFLD/NAFLD combines several variants of liver damage: simple steatosis (accumulation of more than 5% fat in hepatocytes) and steatohepatitis (development of inflammation and necrosis of hepatocytes), and MAFLD/NAFLD can lead to fibrosis, cirrhosis of the liver and hepatocellular carcinoma [5,6,7]. In addition, the accession of MAFLD leads to a deterioration in the psychological state of patients and doubles the frequency of hospitalizations compared to isolated diabetes mellitus [8].

It is known that metabolic diseases that lead to the development of fatty liver disease and diabetes mellitus, are associated with changes in the composition of intestinal microbiota [9,10]. However, all these studies did not identify separate cohorts of patients with and without diabetes mellitus, so there is still no clear idea of the gut microbiota's contribution to liver damage in diabetes mellitus [11]. It is also necessary to consider national characteristics of the gut microbiota, which depend on the nutrition and polymorphism of genes responsible for the interaction of the intestinal wall and microbiota, which differ in Ukraine and Europe, Asia and America. Therefore, the aim of our research was to study the composition of gut microbiota in patients with T2DM and MAFLD in residents of the capital region (who generally represent the Ukrainian population), as well as compare them with patients with T2DM without liver damage and patients with MAFLD without diabetes mellitus.

Materials and Methods

The work was performed at the Department of Therapy of Shupyk National University of Health of Ukraine. The study was approved by the Bioethics Committee of Shupyk National University of Health of Ukraine. Patients were

included in the study voluntarily and were required to sign an informed consent, which indicated the goals and objectives of the study, as well as the opportunity to terminate participation at any time.

We observed 111 patients (63 males and 48 females) aged 19 to 75. The main group consisted of 56 patients (31 males/25 females) with a combination of MAFLD and T2DM; the 1st comparison group included 28 patients (17 males/11 females) with MAFLD without diabetes, and the 2nd comparison group included 27 patients (15 males/12 females) with T2DM without MAFLD. The control group consisted of 30 practically healthy people (18 males/12 females) aged 19 to 59 who showed no signs of T2DM and MAFLD during the survey. Criteria for inclusion in the study were the presence of T2DM and/or MAFLD, age over 18 and consent to be included in the study. The exclusion criteria were the detection of viral, toxic, alcoholic, and drug-induced hepatitis and liver cirrhosis.

The diagnosis of T2DM was made based on generally accepted criteria of the American Diabetes Association [12]. The diagnosis of MAFLD was made in combination with T2DM, and in patients of 1st group – with obesity and/or metabolic syndrome and sonographic signs of steatosis in steatometry. Steatohepatitis was exhibited with additional detection of markers of cytolysis. All patients underwent sonographic examination on a Soneus P7 Ultrasign, which necessarily included steatometry and shear wave elastography. The severity of steatosis and liver fibrosis was assessed according to the recommendations of the World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology [13].

Clinical and laboratory parameters of the examined patients are presented in Table 2.

A lactulose hydrogen breath test using the Micro H₂ apparatus (Micro, UK) was used to detect small intestinal bacterial overgrowth (SIBO). The choice in favor of lactulose rather than glucose test was made taking into account 2 groups of patients with T2DM. The test was performed according to standard methods. The increase in hydrogen concentration (H₂) in the first 60 minutes by 20

Вступ

У нашій країні близько 2,5 мільйонів людей хворіє на ЦД2 і від його ускладнень щороку помирає до 40 тисяч хворих. Одним із частих ускладнень діабету є неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП), яка нещодавно отримала більш патогенетично обґрунтовану назву - МАЖХП [1,2]. Встановлено, що у 70% хворих на ЦД2 зустрічається подібне ураження печінки [3]. Хоча зазначається, що МАЖХП є більш широким поняттям, ніж НАЖХП і відрізняється більш тяжким перебігом, охоплюючи велике коло пацієнтів [4]. Слід підкреслити, що МАЖХП/НАЖХП поєднує кілька варіантів ураження печінки: простий стеатоз (накопичення в гепатоцитах більше 5% жиру) і стеатогепатит (розвиток запалення та некрозу гепатоцитів), а наслідками МАЖХП/НАЖХП можуть бути фіброз, цироз печінки і гепатоцелюлярна карцинома [5,6,7]. До того ж, приєднання МАЖХП призводить до погіршення психологічного стану пацієнтів і вдвічі збільшує частоту госпіталізації порівняно з ізольованим ЦД2 [8]

Відомо, що метаболічні захворювання, що призводять до розвитку жирової хвороби печінки, у т.ч. ЦД2 пов'язані зі зміною складу кишкової мікробіоти [9,10]. Однак у всіх цих дослідженнях не виділяли окремі когорти хворих з ЦД2 і без діабету, тому досі немає чіткого уявлення про внесок кишкової мікробіоти в пошкодження печінки при ЦД2 [11]. Також слід враховувати національні особливості кишкової мікробіоти, що залежать від характеру харчування та поліморфізму генів, які відповідають за взаємодію кишкової стінки з мікробіотою, що відрізняються в Україні та країнах Європи, Азії та Америки, де проводилися подібні дослідження. Тому метою нашого дослідження було вивчення у жителів столичного регіону (які загалом відображають українську популяцію) складу кишкової мікробіоти у хворих на ЦД2 та МАЖХП, а також порівняння з мікробіотою у пацієнтів на ЦД2 без ураження печінки та у хворих з МАЖХП без діабету.

Матеріали та методи

Робота виконана на кафедрі терапії Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика. Дослідження схвалено комітетом з біоетики Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика.

Пацієнти залучались у дослідження добровільно та обов'язково підписували форму інформованої згоди, у якій були вказані мета, завдання та його етапи, а також можливість у будь-який час завершити участь у дослідженні.

Під нашим спостереженням перебувало 111 пацієнтів (63 чоловіки та 48 жінок) віком від 19 до 75 років. В основній групі – 56 хворих (31 чоловік та 25 жінок) із поєднанням МАЖХП та ЦД2; у першій групі порівняння було 28 пацієнтів (17 чоловіків та 11 жінок) із МАЖХП без діабету, а у другій – 27 пацієнтів (15 чоловіків та 12 жінок) із ЦД2 без жирової хвороби печінки. В якості контрольної групи було обстежено 30 практично здорових людей (18 чоловіків та 12 жінок) у віці від 19 до 59 років, у яких під час обстеження були відсутні ознаки ЦД2 та МАЖХП. Критеріями включення у дослідження були наявність при обстеженні ЦД2 та/або МАЖХП, вік старше 18 років та згода на проведення дослідження. Критеріями виключення було виявлення вірусних, токсичних, алкогольних, медикаментозних гепатитів та цирозу печінки.

Діагноз ЦД 2 ставили на підставі загальноприйнятих критеріїв Американської Діабетологічної Асоціації [12]. Діагноз МАЖХП виставляли при поєднанні ЦД2, а у хворих 1-ї групи - ожиріння та/або метаболічного синдрому та сонографічних ознак стеатозу при стеатометрії. Стеатогепатит визначали при додатковому виявленні маркерів цитолізу. Всім хворим проводилося сонографічне дослідження на апараті Soneus P7 Ultrasign, що обов'язково включало стеатометрію і еластографію зсувної хвилі. Вираженість стеатозу та фіброзу печінки оцінювали згідно з рекомендаціями World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology [13].

Клініко-лабораторні показники обстежених хворих представлені у таблиці 2.

Для оцінки синдрому надлишкового бактеріального росту (СНБР) був використаний лактулозний H₂-дихальний тест з використанням апарату «Micro H₂» (Micro, Великобританія). Вибір на користь лактулозного, а не глюкозного тесту було зроблено з урахуванням 2-х груп хворих на ЦД2. Тест проводився за стандартною методикою. Позитивним вважалося збільшення концентрації водню (H₂) у перші

ppm compared to baseline was considered positive. The percentage of the main phylotypes of microorganisms was determined by a polymerase chain reaction of the 16S rRNA gene using universal primers and primers specific to *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*. Other microorganisms meant representatives of the gut microbiome that do not belong to *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* phylotypes. *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) ratio was also calculated. The quantity and quality of DNA were measured by NanoDrop ND-8000 (Thermo Scientific, USA). The primer structure is shown in Table 1.

Table 1

The structure of primers to determine the composition of the main phylotypes of gut microbiota

Enterotypes	The structure of primers
Bacteroidetes	798ebF AAACCTCAAAGAATTGACGG (direct) cfb967R GGTAAGGTTCTCGCGTAT (reverse)
Actinobacteria	Act920F3 TACGGCCGCAAGGCTA (direct) Act1200R TCRTCCCCACCTTCCTCCG (reverse)
Firmicutes	928F-Firm TGAAACTYAAAGGAATTGACG (direct) 1040FirmR ACCATGCACCACCTGTC (reverse)
Universal	926F AAACCTCAAAGAATTGACGG (direct) 1062R CTCACRRCACGAGCTGAC (reverse)

For a more detailed study of gut microbiota, all patients underwent stool culture of feces. The percentage of patients with a positive culture result for each microorganism was calculated. Statistical analysis was performed using Office Excel 2016 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) and Statistics-12 (StatSoft). The student's t-test was used for parametric analysis and Mann-Whitney U-test for nonparametric analysis. The criterion χ^2 was used to compare qualitative indicators.

Results

As can be seen from Table 2, patients in the main group did not differ significantly from the control group in terms of age, sex, and total bilirubin ($p > 0.05$). It is natural that when compared with patients without diabetes, the main group had a significantly higher level of HbA1c, and when compared with patients with T2DM without liver damage, higher indicators of cytolysis ($p < 0.001$) and steatometry ($p < 0, 05$) and elastography ($p < 0.001$) were observed.

We found an increased number of small intestinal microflora according to the lactulose hydrogen breath test, as compared with the control group, in all three groups of patients. Thus, in patients from the main group, the frequency

Table 2

Clinical and laboratory parameters of patients

Indices	Main group (n = 56)	1st group (n = 28)	2nd group (n = 27)	Control group (n = 30)
Age, (years)	49,2±3,8	45,8±4,2	51,5±4,4	45,1±4,0
Gender, male/female(%)	55,4/44,6	60,7/39,3	55,6/44,4	60/40
BMI (kg/m ²)	31,4±1,8*	33,9±2,2	30,7±1,9	24,8±0,9
OT/OS	1,33±0,11*	1,47±0,10	1,18±0,09	0,73±0,07
AK, (dB/cm)	2,61±0,34*®	2,68±0,31	1,83±0,19	1,65±0,15
MLS (kPa)	7,35±0,67*®®	6,99±0,72	4,62±0,41	3,27±0,35
HbA1c (%)	8,36±0,38*§	4,52±0,24	8,17±0,32	4,15±0,26
AlAt, (Ed/l)	45,7±3,6*®®	48,2±3,1	36,3±2,4	34,3±2,5
AsAt, (Ed/l)	39,5±2,7*®®	41,3±2,8	27,8±2,1	29,1±2,3
Total bilirubin (mkmol/l)	15,4±1,7	14,9±1,4	13,2±1,1	12,8±0,8
Cholesterol (mmol / l)	6,23±0,51*	6,79±0,64	5,33±0,49	4,01±0,36
TG (mmol / l)	3,15±0,25*	3,2±0,30	3,11±0,22	2,43±0,19

BMI – body mass index, WC/TV – waist circumference/thigh volume, AK – attenuation coefficient, MLS – mean liver stiffness, AlAt – alanine aminotransferase, HbA1c – glycated hemoglobin, AsAt – aspartate aminotransferase, TG – triglycerides

Note: * – $p < 0,05$ – significant differences compared with the control group;
§ – $p < 0,05$ – significant differences with 1st group;
® – $p < 0,05$ – significant differences with the 2nd group;
®® – $p < 0.001$ with the 2nd group.

60 хвилин на 20 ppm порівняно з вихідним рівнем. Відсоткове співвідношення основних філотипів мікроорганізмів вивчалось за допомогою полімеразної ланцюгової реакції гена 16S рРНК з використанням універсальних праймерів та праймерів, специфічних для *Firmicutes*, *Actinobacteria* та *Bacteroidetes*. Під «іншими» мікроорганізмами малися на увазі представники кишкового мікробіому, що не відносяться до філотипів *Firmicutes*, *Actinobacteria* та *Bacteroidetes*. Також обчислювали співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B). Кількість та якість ДНК оцінювали NanoDrop ND-8000 (Thermo Scientific, США). Структура праймерів наведена у таблиці 1.

Таблиця 1

Структура праймерів для визначення складу основних філотипів кишкової мікрофлори

Ентеротипи	Структура праймерів
Bacteroidetes	798ebF AAACCTCAAAGGAATTGACGG (прямий) cfb967R GGTAAGGTTCTCTCGCGTAT (зворотній)
Actinobacteria	Act920F3 TACGGCCGCAAGGCTA (прямий) Act1200R TCRTCCCACTTCCTCCG (зворотній)
Firmicutes	928F-Firm TGAACCTYAAAGGAATTGACG (прямий) 1040FirmR ACCATGCACACCTGTG (зворотній)
Universal	926F AAACCTCAAAGGAATTGACGG (прямий) 1062R CTCACRRACACGAGCTGAC (зворотній)

Для детальнішого вивчення товстокишкової мікрофлори всім хворим проводили посів калу. Підраховували відсоток пацієнтів з позитивним результатом висівання кожного мікроорганізму. Статистичний аналіз проводився за допомогою Office Excel 2016 (Корпорація Microsoft, Редмонд, Вашингтон, США) та Статистика-12 (StatSoft). Для параметричного аналізу використовували t-критерій Стьюдента, а для непараметричного U-критерій Манна-Уїтні. Для порівняння якісних показників застосовувався критерій χ^2 .

Результати

Як видно з таблиці 2, хворі основної групи достовірно не відрізнялися від контрольної групи за віком, статтю та рівнем загального білірубину ($p > 0,05$). Цілковито закономірно, що порівняно з пацієнтами без діабету, в основній групі був достовірно більш високий рівень HbA1c, а порівняно з хворими на ЦД2 без ураження печінки виявилися більш високі показники цитолізу ($p < 0,001$), а також стеатометрії ($p < 0,05$) та еластографії ($p < 0,001$).

Збільшення кількості тонкокишкової мікрофлори за даними H2-лактолозного дихального тесту порівняно з контрольною групою було виявлено нами у всіх трьох групах хворих. У хворих основної групи частота

Таблиця 2

Клініко-лабораторні показники пацієнтів

Показники	Основна група (n = 56)	1-а група (n = 28)	2-а група (n = 27)	Контрольна група (n = 30)
Вік, (років)	49,2±3,8	45,8±4,2	51,5±4,4	45,1±4,0
Стать, чоловіки/жінки (%)	55,4/44,6	60,7/39,3	55,6/44,4	60/40
ІМТ (кг/м ²)	31,4±1,8*	33,9±2,2	30,7±1,9	24,8±0,9
ОТ/ОС	1,33±0,11*	1,47±0,10	1,18±0,09	0,73±0,07
КЗ, (dB/см)	2,61±0,34* [@]	2,68±0,31	1,83±0,19	1,65±0,15
СЖП (кПа)	7,35±0,67* ^{@@}	6,99±0,72	4,62±0,41	3,27±0,35
HbA1c (%)	8,36±0,38* [§]	4,52±0,24	8,17±0,32	4,15±0,26
АлАт, (Од/л)	45,7±3,6* ^{@@}	48,2±3,1	36,3±2,4	34,3±2,5
АсАт, (Од/л)	39,5±2,7* ^{@@}	41,3±2,8	27,8±2,1	29,1±2,3
Білірубін загальний (мкмоль/л)	15,4±1,7	14,9±1,4	13,2±1,1	12,8±0,8
Холестерин (ммоль/л)	6,23±0,51*	6,79±0,64	5,33±0,49	4,01±0,36
ТГ (ммоль/л)	3,15±0,25*	3,2±0,30	3,11±0,22	2,43±0,19

ІМТ- індекс маси тіла, ОТ/ОС- обсяг талії/обсяг стегон, КЗ- коефіцієнт загасання, СЖП- середня жорсткість печінки, АлАт- аланінамінотрансфераза, HbA1c- глікований гемоглобін, АсАт- аспаратамінотрансфераза, ТГ- тригліцериди.

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою;
§ - $p < 0,05$ з 1-ю групою;
@ - $p < 0,05$ з 2-ю групою;
@@ - $p < 0,001$ з 2-ю групою.

of SIBO detection was 48.2% (27 patients), in the first group it was 35.7% (10 patients), and in the 2nd group – 33.3% (9 patients), while in the control group it was 10% (3 patients). The criterion χ^2 in the main group, compared with the control group, was 12.56 $g < 0.001$; as compared with patients with isolated MAFLD $\chi^2 = 1.18 p > 0.05$ and compared with patients with T2DM $\chi^2 = 1.64 p > 0.05$.

When analyzing the percentage of the main phylotypes of gut microorganisms, we obtained the following results (Table 3):

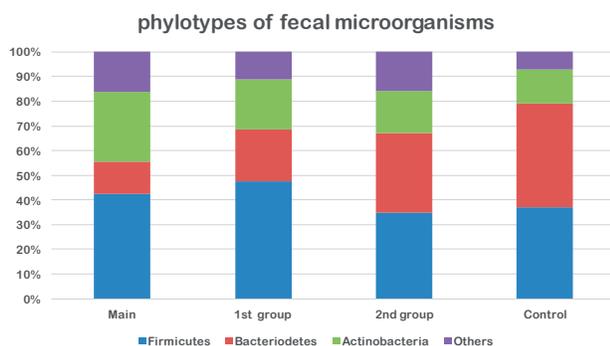


Figure 1. The main phylotypes of fecal microorganisms in the study groups (%)

As can be seen from Table 3 and Fig. 1, in the main group of patients, compared with healthy patients, a significant increase in the number of phylotypes of *Actinobacteria* and *other* microorganisms was detected, as well as a decrease in *Bacteroidetes*, and an increase in the ratio of *Firmicutes/Bacteroidetes*. When compared with the 1st group, a significant increase in the number of microorganisms of *Actinobacteria* phylotype was found, and when compared with the 2nd group, we identified increased *Actinobacteria*, decreased *Bacteroidetes* and in-

creased *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio. At the same time, in 1st group, a significant decrease in the number of *Bacteroidetes* and an increase in the ratio of *Firmicutes/Bacteroidetes* was identified compared with the group of healthy people. In the second group, we found only a significant increase in *other* microorganisms compared to the control group.

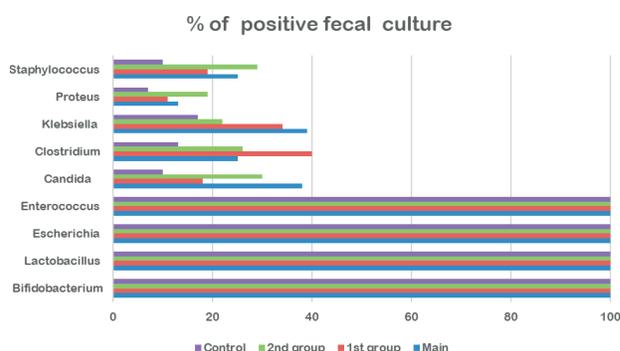


Figure 2. Frequency of positive result of seeding of feces on microorganisms in the studied groups (%)

As can be seen from the data in Table 4 and Fig. 2, *Clostridium* bacteria appeared in all three groups of patients significantly more often than in the control group. Microorganisms, such as *Klebsiella* and fungi of the genus *Candida* were also significantly more common in the main group than in healthy groups. Compared with patients with isolated MAFLD, the main group had significantly less common *Clostridium*, and compared with isolated T2DM – *Klebsiella* was significantly more. It should be noted that although microorganisms, such as *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* and *Enterococcus* were shown in all patients, in the main group, a significant decrease in the absolute number of *Bifidobacterium* ($6,87 \pm 0,55$ lg CFU/g vs $8,24 \pm 0,27$ lg CFU/g), *Lactobacillus* ($5,61 \pm 0,49$ lg CFU/g vs

Table 3

Phylotypes of fecal microorganisms (%) in the studied groups M (IQR)

Type of bacteria	Main group (n = 56)	1st group (n = 28)	2nd group (n = 27)	Control group (n = 30)
Firmicutes	42,2 (34,7-1,4)	47,8 (39,9-2,6)	34,8 (26,7-1,5)	36,4 (29,1-42,9)
<i>Bacteroidetes</i>	13,7 * [@] (7,9-20,8)	21,1* (16,7-27,0)	32,4 (24,0-39,4)	41,7 (37,2-45,7)
<i>Actinobacteria</i>	28,6* ^{§@} (21,3-38,1)	19,8 (14,1-21,5)	17,1 (11,6-22,0)	14,1 (9,2-17,8)
«Others»	15,8* (12,5-19,6)	11,2 (8,1-15,3)	15,8* (11,7-20,5)	6,9 (4,4-10,0)
F/B	3,16* ^{§@} (2,37-5,82)	2,26* (1,90-2,28)	1,06 (0,89-1,17)	0,88 (0,72-1,06)

Note: * – $p < 0,05$ -significant differences compared with the control group;
[§] – $p < 0,05$ – significant differences with 1st group;
[@] – $p < 0,05$ – significant differences with the 2nd group;
 F/B – *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio.

виявлення СНРБ склала 48,2% (27 осіб), у першій групі 35,7% (10 осіб), у 2 групі 33,3% (9 осіб), в той час як у контрольній групі - 10% (3 особи). Критерій χ^2 в основній групі у порівнянні з контрольною групою становив 12,56 $p < 0,001$; у порівнянні із хворими ізольованою МАЖХП $\chi^2 = 1,18$ $p > 0,05$, а у порівнянні з пацієнтами з ЦД2 $\chi^2 = 1,64$ $p > 0,05$.

При аналізі відсоткового вмісту основних філотипів кишкових мікроорганізмів ми отримали наступні результати (Таблиця 3)

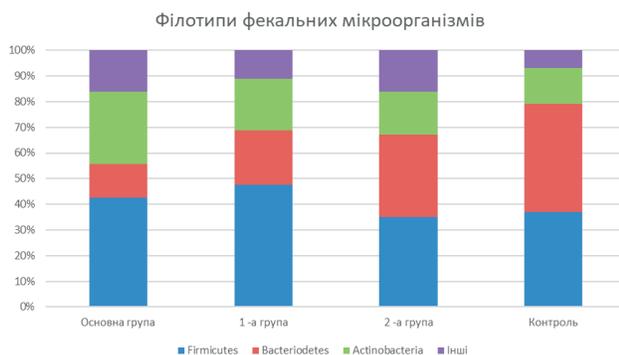


Рисунок 1. Основні філотипи фекальних мікроорганізмів в досліджуваних групах (%)

Як видно з таблиці 3 та рис. 1, в основній групі пацієнтів, порівняно зі здоровими, знаходили достовірно збільшення кількості мікроорганізмів філотипів *Actinobacteria* та «інших» мікроорганізмів, зменшення *Bacteroidetes*, а також збільшення співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes*. При зіставленні з 1-ю групою, в основній групі нами знайдено достовірно збільшення кількості мікроорганізмів філотипу *Actinobacteria*, а при зіставленні з 2-ю групою - збільшення *Actinobacteria*, зниження *Bacteroidetes* та підвищення співвідношення

Firmicutes/Bacteroidetes. У той же час у 1-й групі ми знайшли достовірно зниження кількості *Bacteroidetes* та підвищення співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes* порівняно з групою здорових людей. У другій групі нами знайдено лише достовірно підвищення «інших» мікроорганізмів порівняно з контрольною групою.

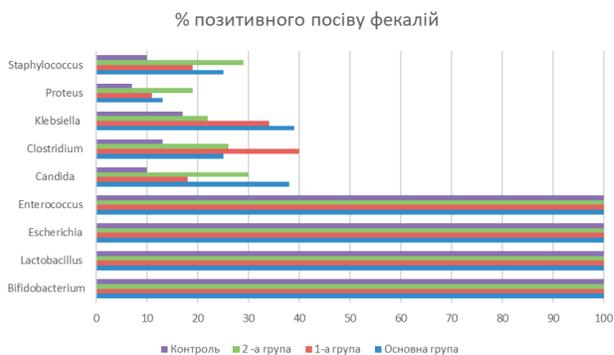


Рисунок 2. Частота позитивного результату висіву фекалій на мікроорганізми у досліджуваних групах (%)

Як видно з наведених у таблиці 4 та рис. 2 даних, у всіх трьох групах хворих достовірно частіше, ніж у контрольній, висівали мікроорганізми *Clostridium*. В основній групі також достовірно частіше, ніж у здорових, зустрічалися такі мікроорганізми як *Klebsiella* і гриби роду *Candida*. Порівняно з пацієнтами з ізольованою МАЖХП, в основній групі достовірно рідше знаходили *Clostridium*, а порівняно з ізольованим ЦД2 - достовірно частіше *Klebsiella*. Слід зазначити, що хоча такі мікроорганізми як *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* та *Enterococcus* висівали у всіх пацієнтів, в основній групі нами знайдено достовірно зменшення абсолютної кількості *Bifidobacterium* ($6,87 \pm 0,55$ lg КУО/г vs $8,24 \pm 0,27$ lg КУО/г), *Lactobacillus*

Таблиця 3

Філотипи фекальних мікроорганізмів (%) у досліджуваних групах M(IQR)

Тип бактерій	Основна група (n = 56)	1-а група (n = 28)	2-а група (n = 27)	Контроль (n = 30)
Firmicutes	42,2 (34,7-51,4)	47,8 (39,9-52,6)	34,8 (26,7-41,5)	36,4 (29,1-42,9)
Bacteroidetes	13,7 * [@] (7,9-20,8)	21,1* (16,7-27,0)	32,4 (24,0-39,4)	41,7 (37,2-45,7)
Actinobacteria	28,6* ^{§@} (21,3-38,1)	19,8 (14,1-21,5)	17,1 (11,6-22,0)	14,1 (9,2-17,8)
«Інші»	15,8* (12,5-19,6)	11,2 (8,1-15,3)	15,8* (11,7-20,5)	6,9 (4,4-10,0)
F/B	3,16* ^{§@} (2,37-5,82)	2,26* (1,90-2,28)	1,06 (0,89-1,17)	0,88 (0,72-1,06)

Примітка: * - $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою;
§ - $p < 0,05$ з 1-ю групою;
@ - $p < 0,05$ з 2-ю групою;
F/B - співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes*.

Table 4

**Frequency of positive results of cultures of feces on microorganisms (%)
in the studied groups**

Bacteria	Main group (n = 56)	1st group (n = 28)	2nd group (n = 27)	Control group (n = 30)
Bifidobacterium (%)	100	100	100	100,0
T	p>0,05 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	p>0,05	p>0,05	
Lactobacillus (%)	100	100	100	100,0
T	p>0,05 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	p>0,05	p>0,05	
Escherichia (%)	100	100	100	100,0
T	p>0,05 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	p>0,05	p>0,05	
Enterococcus (%)	100	100	100	100,0
T	p>0,05 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	p>0,05	p>0,05	
Candida (%)	37,5	17,9	29,6	10
T	p<0,001 p ₁ =0,002 p ₂ >0,05	p>0,05	p<0,001	
Clostridium (%)	25	39,3	25,9	13,3
T	p=0,031 p ₁ =0,034 p ₂ >0,05	p<0,001	p= 0,021	
Klebsiella (%)	39,3	34,4	22,2	16,7
T	p<0,001 p ₁ >0,05 p ₂ =0,01	p=0,006	p>0,05	
Proteus (%)	12,5	10,7	18,5	6,7
T	p>0,05 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	p>0,05	p=0,016	
Staphylococcus (%)	25	18,5	28,6	10
T	p=0,06 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	p>0,05	p>0,05	

6,93±0,35 lg CFU/g) and an increase in *Escherichia* (8,44±0,32 lg CFU/g vs 7,61±0,24 lg CFU/g) compared to the control group (p <0.05) were identified; also, a decrease in *Lactobacillus* (5,61±0,49 lg CFU/g vs 7,01±0,41 lg CFU/g) and *Enterococcus* (6,14±0,35 lg CFU/g vs 7,20±0,38 lg CFU/g) compared to the first group (p <0.05). In addition, patients in the main group significantly more often (p <0.05) than in the control had *Escherichia* with altered enzymatic properties – lactase-negative (19,6% vs 3,3%) and hemolyzing (10,7% vs 0%).

Discussion

According to our study, there are changes in gut microbiota in all three groups of patients, but

there are differences between groups. Thus, in comparison with healthy people, we found we found overgrowth of the small intestinal flora. At the same time, in patients with isolated T2DM and NAFLD, small intestinal bacterial overgrowth syndrome was detected twice as often as in healthy people in all groups of patients. It should be noted that while in DM2, the frequency of SIBO according to the meta-analysis occurred with almost the same frequency as in our study, in isolated NAFLD, it was almost 30% more common than in our patients [14;15]. In our study, the frequency of SIBO detection in the case of comorbidity was almost five times higher than in healthy people. This may mean the importance of changes in the composition of

Таблиця 4

Частота виявлення окремих мікроорганізмів у фекаліях (%) у досліджуваних групах

Мікроорганізм	Основна група (n = 56)	1-а група (n = 28)	2-а група (n = 27)	Контроль (n = 30)
<i>Bifidobacterium</i> (%)	100	100	100	100,0
T	p>0,05 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	p>0,05	p>0,05	
<i>Lactobacillus</i> (%)	100	100	100	100,0
T	p>0,05 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	p>0,05	p>0,05	
<i>Escherichia</i> (%)	100	100	100	100,0
T	p>0,05 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	p>0,05	p>0,05	
<i>Enterococcus</i> (%)	100	100	100	100,0
T	p>0,05 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	p>0,05	p>0,05	
<i>Candida</i> (%)	37,5	17,9	29,6	10
T	p<0,001 p ₁ =0,002 p ₂ >0,05	p>0,05	p<0,001	
<i>Clostridium</i> (%)	25	39,3	25,9	13,3
T	p=0,031 p ₁ =0,034 p ₂ >0,05	p<0,001	p= 0,021	
<i>Klebsiella</i> (%)	39,3	34,4	22,2	16,7
T	p<0,001 p ₁ >0,05 p ₂ =0,01	p=0,006	p>0,05	
<i>Proteus</i> (%)	12,5	10,7	18,5	6,7
T	p>0,05 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	p>0,05	p=0,016	
<i>Staphylococcus</i> (%)	25	18,5	28,6	10
T	p=0,06 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	p>0,05	p>0,05	

Примітка: p – порівняно з контрольною групою;
p1- порівняно з хворими 1-ї групи;
p2- порівняно з хворими 2-ї групи.

(5,61±0,49 lg КУО/г vs 6,93±0,35 lg КУО/г) та збільшення *Escherichia* (8,44±0,32 lg КУО/г vs 7,61±0,24 lg КУО/г), ніж у людей в контрольній групі (p<0,05); а також зменшення *Lactobacillus* (5,61±0,49 lg КУО/г vs 7,01±0,41 lg КУО/г) та *Enterococcus* (6,14±0,35 lg КУО/г vs 7,20±0,38 lg КУО/г), порівняно з першою групою (p<0,05). До того ж, у хворих в основній групі достовірно частіше (p<0,05), ніж у контрольній, зустрічалися *Escherichia* із зміненими ферментативними властивостями – лактазо-негативні (19,6% vs 3,3%) та гемолізуючі (10,7% vs 0%).

Обговорення

Як показало наше дослідження, у всіх трьох групах хворих відзначаються зміни кишкової мікробіоти, проте між групами є відмінності. Так, у порівнянні зі здоровими, у всіх групах пацієнтів ми виявили надмірне зростання тонкокишкової флори, при цьому у хворих із ізольованими ЦД2 та МАЖХП синдром надлишкового бактеріального росту зустрічався вдвічі частіше, ніж у здорових. Слід зазначити, що якщо при ЦД2 частота СНБР за даними мета-аналізу зустрічалася майже з такою самою частотою як у нашому дослідженні, то при ізольованій

the small intestinal microbiota in the development of MAFLD in T2DM. At the same time, the composition of colonic microbiota differed not only from the control group and almost healthy people but also varied between the groups.

If in comparison with healthy people in the group with isolated T2DM, we found a significant increase in the number of *other* microorganisms, and in the stool culture of *Clostridium*, *Proteus* and *Candida*. Reportedly, *Clostridium* is a representative of the *Firmicutes* phylotype and can metabolize pyruvate with the formation of short-chain fatty acids (SCFAs), primarily butyrate and ethanol. *Proteus* is a microorganism of the *Proteobacteria* phylotype, which belonged to *other* microorganisms in our study. These organisms can ferment glucose and synthesize ammonia. Fungi of the genus *Candida* belong to the class *Saccharomycetes* and, being a representative of the intestinal microbiota, it is involved in the metabolism of mono- and disaccharides with the formation of SCFAs. According to other studies, the following changes in the composition of intestinal microbiota were noted in T2DM. A large North American study showed a decrease in the number of SCFAs-producing microflora and increased endotoxin-producing Gram-negative flora. At the phylotype level, increased *Lentisphaerae* and decreased *Firmicutes*, *Actinobacteria*, and *Synergistetes* were found, and at the level of individual microorganisms, a decrease in *Clostridium* and an increase in *Escherichia-Shigella* were identified, and changes in the number of *Actinobacteria*, *Clostridium*, and *Escherichia-Shigella* were associated with metformin use. [16]. Dutch investigation, which included more than 2 thousand patients, established that *Clostridiaceae* were more common in patients with T2DM. [17]. At the same time, in the Finnish study, representatives of the *Clostridium* family were found more often in patients with T2DM. It should be noted that this study did not include patients who took metformin, which can affect the composition of gut microbiota [18]. Thus, in the native population of patients with T2DM, representatives of the *Clostridiaceae* family are more common in the colonic microbiota (which may be related to metformin use).

In isolated MAFLD, we found a decrease in *Bacteroidetes* an increased *Firmicutes/Bac-*

teroidetes ratio and increased *Klebsiella* and *Clostridium*. *Klebsiella* is distinguished by its ability to metabolize glucose and ammonium, and its cell membrane is a source of lipopolysaccharides (LPS). According to the literature, there is an increase in the phylum *Proteobacteria* and representatives of the genus *Escherichia* in patients with NAFLD (MAFLD). This pathology is characterized by an increase in the number of Gram-negative and a decrease in Gram-positive microorganisms [11]. It is noted that as the degree of liver damage (fibrosis/cirrhosis) increases in patients with NAFLD and microbiota changes grow too [19]. Also, in patients with NAFLD, changes in the gut microbiome and in the number of *Candida albicans* are found [20]. In a Ukrainian study, patients with NAFLD had a decreased number of *Lactobacillus spp.* and increased *Enterobacter spp./Citrobacter spp.*, *Bacteroides fragilis* group with an overall increase in bacterial mass [10]. The increase in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio found by us in the studied population of NAFLD patients is primarily characteristic of obesity and its corresponding metabolic disorders and also has a positive correlation with the degree of hepatic steatosis [21; 22]. Growth of *Klebsiella* and *Clostridium* can lead to liver damage by increasing their production of LPS and ethanol.

In patients of the main group with a combination of T2DM and MAFLD, we found an increase in *Actinobacteria*, *other* microorganisms, and the ratio of *Firmicutes/Bacteroidetes*, as well as a decrease in *Bacteroidetes*; in the stool culture – an increase in *Clostridium*, *Klebsiella* and *Candida*. We also found a decrease in the absolute number of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* and an increase in *Escherichia*; concerning *Escherichia coli*, microorganisms with altered enzymatic properties – lactase-negative and hemolytic were more frequent than in healthy people. According to the literature, patients with a combination of DM2 and NAFLD (MAFLD), showed a decrease in the number of *Firmicutes*, incl. *Lactobacilli* and an increase in *Escherichia* [11]. Thus, the patients with a combination of DM2 and FAFLD examined by us, in addition to changes in the gut microbiota characteristic of diabetes (increased frequency of *other* microorganisms, *Clostridium* and fungi of the genus *Candida*) and MAFLD (decreased *Bacteroidetes*, increased *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio and

НАЖХП майже на 30% частіше, ніж у наших пацієнтів [14;15]. Частота виявлення СНБР при поєднаній патології виявилася у нашому дослідженні майже вп'ятеро вищою, ніж у здорових. Це може означати важливе значення зміни складу тонкокишкової мікробіоти у розвитку МАЖХП при ЦД2.

У той же час склад товстокишкової мікробіоти відрізнявся не тільки від контрольної групи практично здорових людей, але й між групами з патологією.

Порівняно зі здоровими, в групі з ізольованим ЦД2 ми знайшли достовірне збільшення кількості «інших» мікроорганізмів, а при посіві -*Clostridium*, *Proteus* і *Candida*. Як відомо, *Clostridium* є представниками філотипу *Firmicutes* і мають здатність метаболізувати піруват як з утворенням коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК) (у першу чергу бутирату), так і етанолу. *Proteus* – мікроорганізм філотипу *Proteobacteria*, який у нашому дослідженні відносився до «інших» мікроорганізмів. Ці організми мають здатність ферментувати глюкозу і синтезувати аміак. Гриби роду *Candida* відносяться до класу *Saccharomycetes* та як представники кишкової мікрофлори беруть участь у метаболізмі моно- та дисахаридів з утворенням КЛЖК. Згідно з іншими дослідженнями, при ЦД2 відзначалися наступні зміни складу кишкової мікробіоти. У великому північноамериканському дослідженні показано зменшення кількості мікрофлори, що продукує КЛЖК та збільшення грамнегативної флори, що продукує ендотоксини. На рівні філотипів було знайдено збільшення *Lentisphaerae* та зменшення *Firmicutes*, *Actinobacteria* та *Synergistetes*, а на рівні окремих мікроорганізмів зменшення *Clostridium* та збільшення *Escherichia-Shigella*, причому зміна кількості *Actinobacteria*, *Clostridium* та *Escherichia-Shigella* асоціювалася з прийомом метформіну [16]. У нідерландському дослідженні, що включало більше 2 тис. пацієнтів, було встановлено, що у хворих на ЦД2 рідше виявляли *Clostridiaceae* [17]. У той же час, у фінському дослідженні у хворих з ЦД2 частіше знаходили представників сімейства *Clostridium*. Слід зазначити, що до цього дослідження не залучалися пацієнти, які приймали метформін, який може впливати на склад кишкової мікробіоти [18]. Таким чином, у вітчизняній

популяції хворих на ЦД2 у товстокишкової мікробіоті частіше зустрічаються представники сімейства *Clostridiaceae* (що може бути пов'язане з прийомом метформіну).

При ізольованій МАЖХП нами виявлено зниження *Bacteroidetes* та збільшення співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes*, а також збільшення *Klebsiella* та *Clostridium*. *Klebsiella* відноситься до філотипу *Proteobacteria* (клас *Gamma**proteobacteria*), у нашому дослідженні віднесених до «інших» мікроорганізмів. *Klebsiella* відрізняються здатністю метаболізувати глюкозу та амоній, а їхня клітинна оболонка є джерелом ліпополісахаридів (ЛПС). За даними літератури, у хворих з НАЖХП (МАЖХП) відзначається збільшення філи *Proteobacteria* та представників родів *Escherichia*. Для цієї патології вважається характерним збільшення кількості грамнегативних і зниження грампозитивних мікроорганізмів [11]. Зазначається, що зі збільшенням ступеня пошкодження печінки (фіброз/цироз) у хворих на НАЖХП наростають зміни мікробіоти [19]. Також у хворих з НАЖХП знаходять зміни кишкової мікробіоти та насамперед кількості *Candida albicans* [20]. В українському дослідженні у хворих на НАЖХП було знайдено зниження кількості *Lactobacillus spp.* та збільшення *Enterobacter spp./Citrobacter spp.*, *Bacteroides fragilis group* при загальному збільшенні бактеріальної маси [10]. Виявлене нами у досліджуваній популяції хворих на МАЖХП збільшення співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes* характерне насамперед для ожиріння та пов'язаних з ним метаболічних порушень, а також має позитивну кореляцію зі ступенем стеатозу печінки. [21;22] Збільшення кількості *Klebsiella* та *Clostridium* може призвести до пошкодження печінки за рахунок збільшення вироблення ними ЛПС та етанолу.

У хворих основної групи з поєднанням ЦД2 та МАЖХП нами знайдено збільшення *Actinobacteria*, «інших» мікроорганізмів, співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes* і зниження *Bacteroidetes*, а при посіві - збільшення *Clostridium*, *Klebsiella* і *Candida*. Також нами знайдено зниження абсолютної кількості *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та збільшення *Escherichia*, причому серед кишкових паличок частіше, ніж у здорових, висівалися мікроорганізми зі зміненими ферментатив-

Klebsiella and *Clostridium* seeding frequency, although to a lesser extent than in isolated FA-FLD), the following features were noted: increased *Actinobacteria* phyla, and when sowing, a decrease in the absolute number of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and an increase in *Escherichia*, including those with altered enzymatic properties. The indicated changes in the colonic microflora could contribute to liver damage, both due to a decrease in the synthesis of dietary fiber and due to increased production of LPS, ammonia and ethanol.

Changes we found in the gut microbiota of residents of the capital region of Ukraine with T2DM and MAFLD may be associated with genetic characteristics, dietary habits, as well as the use of such a hypoglycemic drug as metformin.

In the population of patients with MAFLD that developed on the background of T2DM that we

studied, changes in the gut microbiota were found, which are not only similar to changes in isolated MAFLD and T2DM but also have some differences.

1. The development of SIBO and increased frequency of *Clostridium* seeding was common in all three groups of patients.
2. Patients of the main group and patients with T2DM featured an increase in *other* microorganisms and fungi of the genus *Candida*; patients with isolated MAFLD had a decrease in *Bacteroidetes* and an increase in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio and the frequency of *Klebsiella* seeding.
3. Only the group of patients with a combination of MAFLD and T2DM was characterized by increased *Actinobacteria*, and in the stool culture – a decrease in the absolute number of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and an increase in *Escherichia*, including with altered enzymatic properties.

References

1. Fouad Y, Waked I, Bollipo S, et al. What's in a name? Renaming 'NAFLD' to 'MAFLD'. *Liver Int.* 2020 Jun;40(6):1254-1261. DOI: 10.1111/liv.14478.
2. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol.* 2020 Jul;73(1):202-209. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.03.039.
3. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, et al. The Global Epidemiology of NAFLD and NASH in Patients with type 2 diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Hepatol.* 2019 Oct;71(4):793-801. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.06.021.
4. Ayada I, van Kleef LA, Alferink LJM, et al. Systematically comparing epidemiological and clinical features of MAFLD and NAFLD by meta-analysis: Focusing on the non-overlap groups. *Liver Int.* 2022 Feb;42(2):277-287. DOI: 10.1111/liv.15139.
5. Koch LK, Yeh MM. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Diagnosis, pitfalls, and staging. *Ann Diagn Pathol.* 2018 Dec;37:83-90. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2018.09.009.
6. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018 Jan;15(1):11-20. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.109.
7. Kleiner DE. Histopathology, grading and staging of nonalcoholic fatty liver disease. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2018 Mar;64(1):28-38. DOI: 10.23736/S1121-421X.17.02445-X.
8. Balp MM, Krieger N, Przybysz R, et al. The burden of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) among patients from Europe: A real-world patient-reported outcomes study. *JHEP Rep.* 2019 Jun 15;1(3):154-161. DOI: 10.1016/j.jhepr.2019.05.009.
9. Oh JH, Lee JH, Cho MS, et al. Characterization of Gut Microbiome in Korean Patients with Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Nutrients.* 2021 Mar 21;13(3):1013. DOI: 10.3390/nu13031013.
10. Fadiencko GD, Gridnyev AY, Kushnir IE, et al. Characteristics of intestinal dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. [in Ukrainian]. *Modern Gastroenterology.* 2020;6:5-13. DOI: <http://doi.org/10.30978/MG-2020-6-5>.
11. Aron-Wisnewsky J, Vigliotti C, Witjes J, et al. Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020 May;17(5):279-297. DOI: 10.1038/s41575-020-0269-9.
12. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care.* 2022 Jan 1;45(Suppl 1):S17-S38. DOI: 10.2337/dc22-S002.

ними властивостями – лактазонегативні та гемолізуючі. За даними літератури, у хворих із поєднанням ЦД2 та МАЖХП (МАЖХП) відзначається зниження кількості *Firmicutes*, у т.ч. лактобактерій та збільшення *Escherichia* [11]. Таким чином, в обстежених нами пацієнтів із поєднанням ЦД2 та МАЖХП, крім змін кишкової мікробіоти, властивих діабету (збільшення «інших» мікроорганізмів, частоти висіву *Clostridium* та грибів роду *Candida*) та МАЖХП (зниження *Bacteroidetes*, підвищення співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes* та частоти висіву *Klebsiella* та *Clostridium*, хоча і меншою мірою, ніж при ізольованій МАЖХП) відзначалися такі особливості: підвищення філи *Actinobacteria*, а при посіві - зниження абсолютної кількості *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та збільшення *Escherichia*, у т.ч. із зміненими ферментативними властивостями. Зазначені зміни товстокишкової мікрофлори могли сприяти пошкодженню печінки як за рахунок зменшення синтезу КЛЖК, так і за рахунок збільшення вироблення ЛПС, аміаку і етанолу.

Знайдені нами зміни кишкової мікробіоти у мешканців столичного регіону України хво-

рих на ЦД2 та МАЖХП можуть бути пов'язані з генетичними особливостями, характером харчування, а також з прийомом такого цукрознижувального препарату як метформін.

У вивченій нами популяції хворих з МАЖХП, що розвинулася на тлі ЦД2, знайдено зміни кишкової мікробіоти, які не тільки подібні до змін ізольованих МАЖХП та ЦД2, але й мають низку відмінностей.

1. Спільним для всіх трьох груп пацієнтів був розвиток СНБР та збільшення частоти висіву *Clostridium*.
2. Загальним між хворими основної групи та пацієнтами з ЦД2 було збільшення «інших» мікроорганізмів та грибів роду *Candida*, а з пацієнтами ізольованої МАЖХП - зниження *Bacteroidetes*, підвищення співвідношення *Firmicutes/Bacteroidetes* та частоти висіву *Klebsiella*.
3. Тільки для групи хворих з поєднанням МАЖХП та ЦД2 було характерне підвищення філи *Actinobacteria*, а при посіві - зниження абсолютної кількості *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та збільшення *Escherichia*, у т.ч. із зміненими ферментативними властивостями.

Список літератури

1. Fouad Y, Waked I, Bollipo S, et al. What's in a name? Renaming 'NAFLD' to 'MAFLD'. *Liver Int.* 2020 Jun;40(6):1254-1261. DOI: 10.1111/liv.14478.
2. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol.* 2020 Jul;73(1):202-209. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.03.039.
3. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, et al. The Global Epidemiology of NAFLD and NASH in Patients with type 2 diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Hepatol.* 2019 Oct;71(4):793-801. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.06.021.
4. Ayada I, van Kleef LA, Alferink LJM, et al. Systematically comparing epidemiological and clinical features of MAFLD and NAFLD by meta-analysis: Focusing on the non-overlap groups. *Liver Int.* 2022 Feb;42(2):277-287. DOI: 10.1111/liv.15139.
5. Koch LK, Yeh MM. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Diagnosis, pitfalls, and staging. *Ann Diagn Pathol.* 2018 Dec;37:83-90. DOI: 10.1016/j.anndiagnpath.2018.09.009.
6. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018 Jan;15(1):11-20. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.109.
7. Kleiner DE. Histopathology, grading and staging of nonalcoholic fatty liver disease. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2018 Mar;64(1):28-38. DOI: 10.23736/S1121-421X.17.02445-X.
8. Balp MM, Krieger N, Przybysz R, et al. The burden of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) among patients from Europe: A real-world patient-reported outcomes study. *JHEP Rep.* 2019 Jun 15;1(3):154-161. DOI: 10.1016/j.jhepr.2019.05.009.
9. Oh JH, Lee JH, Cho MS, et al. Characterization of Gut Microbiome in Korean Patients with Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Nutrients.* 2021 Mar 21;13(3):1013. DOI: 10.3390/nu13031013.
10. Fadiencko GD, Gridnyev AY, Kushnir IE, et al. Characteristics of intestinal dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. [in Ukrainian]. *Modern Gastroenterology.* 2020;6:5-13. DOI:http://doi.org/10.30978/MG-2020-6-5.

13. Ferraioli G, Wong VW, Castera L, et al. Liver Ultrasound Elastography: An Update to the World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology Guidelines and Recommendations. *Ultrasound Med Biol*. 2018 Dec;44(12):2419-2440. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.07.008.
14. Feng X, Li XQ. The prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Aging (Albany NY)*. 2022 Jan 27;14(2):975-988. DOI:https://doi.org/10.18632/aging.203854.
15. Wijarnpreecha K, Lou S, Watthanasuntorn K, et al. Small intestinal bacterial overgrowth and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2020 May;32(5):601-608.
16. Maskarinec G, Raquinio P, Kristal BS, et al. The gut microbiome and type 2 diabetes status in the Multiethnic Cohort. *PLoS One*. 2021 Jun 23;16(6):e0250855. DOI: 10.1371/journal.pone.0250855.
17. Chen Z, Radjabzadeh D, Chen L, et al. Association of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes With Gut Microbial Diversity: A Microbiome-Wide Analysis From Population Studies. *JAMA Netw Open*.2021Jul1;4(7):e2118811. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.18811.
18. Ruuskanen MO, Erawijantari PP, Havulinna AS, et al. Gut Microbiome Composition Is Predictive of Incident Type 2 Diabetes in a Population Cohort of 5,572 Finnish Adults. *Diabetes Care*. 2022 Jan 31:dc212358. DOI: 10.2337/dc21-2358. Epub ahead of print. PMID: 35100347. DOI: 10.2337/dc21-2358.
19. Sharma SP, Suk KT, Kim DJ. Significance of gut microbiota in alcoholic and non-alcoholic fatty liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2021 Oct 7;27(37):6161-6179. DOI: 10.3748/wjg.v27.i37.6161.
20. Fotis D, Liu J, Dalamaga M. Could gut mycobiome play a role in NAFLD pathogenesis? Insights and therapeutic perspectives. *Metabol Open*. 2022 Mar 14;14:100178. DOI: 10.1016/j.metop.2022.100178.
21. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*. 2020 May 19;12(5):1474. DOI: https://doi.org/10.1016/j.metop.2022.100178.
22. Jasirwan COM, Muradi A, Hasan I, et al. Correlation of gut Firmicutes/Bacteroidetes ratio with fibrosis and steatosis stratified by body mass index in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Biosci Microbiota Food Health*. 2021;40(1):50-58. DOI: https://doi.org/10.12938/bmfh.2020-046.

11. Aron-Wisniewsky J, Vigliotti C, Witjes J, et al. Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020 May;17(5):279-297. DOI: 10.1038/s41575-020-0269-9.
12. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*. 2022 Jan 1;45(Suppl 1):S17-S38. DOI: 10.2337/dc22-S002.
13. Ferraioli G, Wong VW, Castera L, et al. Liver Ultrasound Elastography: An Update to the World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology Guidelines and Recommendations. *Ultrasound Med Biol*. 2018 Dec;44(12):2419-2440. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.07.008.
14. Feng X, Li XQ. The prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Aging (Albany NY)*. 2022 Jan 27;14(2):975-988. DOI:https://doi.org/10.18632/aging.203854.
15. Wijarnpreecha K, Lou S, Watthanasuntorn K, et al. Small intestinal bacterial overgrowth and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2020 May;32(5):601-608.
16. Maskarinec G, Raquinio P, Kristal BS, et al. The gut microbiome and type 2 diabetes status in the Multiethnic Cohort. *PLoS One*. 2021 Jun 23;16(6):e0250855. DOI: 10.1371/journal.pone.0250855.
17. Chen Z, Radjabzadeh D, Chen L, et al. Association of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes With Gut Microbial Diversity: A Microbiome-Wide Analysis From Population Studies. *JAMA Netw Open*. 2021 Jul 1;4(7):e2118811. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.18811.
18. Ruuskanen MO, Erawijantari PP, Havulinna AS, et al. Gut Microbiome Composition Is Predictive of Incident Type 2 Diabetes in a Population Cohort of 5,572 Finnish Adults. *Diabetes Care*. 2022 Jan 31;dc212358. doi: 10.2337/dc21-2358. Epub ahead of print. PMID: 35100347. DOI: 10.2337/dc21-2358.
19. Sharma SP, Suk KT, Kim DJ. Significance of gut microbiota in alcoholic and non-alcoholic fatty liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2021 Oct 7;27(37):6161-6179. DOI: 10.3748/wjg.v27.i37.6161.
20. Fotis D, Liu J, Dalamaga M. Could gut mycobiome play a role in NAFLD pathogenesis? Insights and therapeutic perspectives. *Metabol Open*. 2022 Mar 14;14:100178. DOI: 10.1016/j.metop.2022.100178.
21. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*. 2020 May 19;12(5):1474. DOI: https://doi.org/10.1016/j.metop.2022.100178.
22. Jasirwan COM, Muradi A, Hasan I, et al. Correlation of gut Firmicutes/Bacteroidetes ratio with fibrosis and steatosis stratified by body mass index in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Biosci Microbiota Food Health*. 2021;40(1):50-58. DOI: https://doi.org/10.12938/bmfh.2020-046.